

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

BAZI TRİAZOL TÜREVLERİNİN KLİNİK ÖNEME SAHİP ALFA AMİLAZ VE TİROSİNAZ
İNİBİSYON POTANSİYELLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO* OLARAK İNCELENMESİ

Elif AYAZOĞLU DEMİR

DOKTORA TEZİ

ARALIK 2019
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI TRİAZOL TÜREVLERİNİN KLİNİK ÖNEME SAHİP ALFA AMİLAZ VE
TİROSİNAZ İNHİBİSYON POTANSİYELLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO* OLARAK
İNCELENMESİ**

Elif AYAZOĞLU DEMİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"DOKTOR (KİMYA)"

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 19 / 11 / 2019

Tezin Savunma Tarihi : 09 / 12 / 2019

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Trabzon 2019

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Kimya Anabilim Dalında

"Elif AYAZOĞLU DEMİR tarafından hazırlanan"

**BAZI TRİAZOL TÜREVLERİNİN KLİNİK ÖNEME SAHİP ALFA AMİLAZ VE
TİROSİNAZ İNHİBİSYON POTANSİYELLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO*
OLARAK İNCELENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 19 /11 /2019 gün ve 1828 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

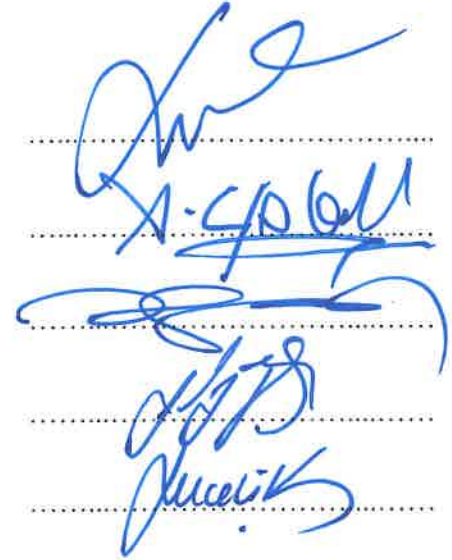
Başkan : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Prof. Dr. Tefik ÖZEN

Üye : Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selcen ÇELİK UZUNER


The image shows four handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal dotted line. The signatures are: 1. A cursive signature for Prof. Dr. Sevgi Kolaylı. 2. A signature for Prof. Dr. Ahmet Çolak. 3. A signature for Prof. Dr. Tefik Özen. 4. A signature for Doç. Dr. Fatih Şaban Beriş. The signature for Dr. Öğr. Üyesi Selcen Çelik Uzuner is not visible in the image.

**Prof. Dr. Asim KADIOĞLU
Enstitü Müdürü**

İthaf

*Kız çocuklarının eğitimine önem veren sevgili rahmetli Babam Hüseyin Avni Demir'e
ve yaşam kaynağımız olan oğlum Süleyman Yiğit'e ithaf ediyorum.*



ÖNSÖZ

Akademik hayatım boyunca bilgisini, desteğini ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, bu çalışma için desteklenen projelerin planlanıp hayata geçirilmesinde çok büyük katkıları olan, değerli eleştiri ve önerileri ile tez çalışmamı yönlendiren danışman hocam, sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK'a minnet ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmalarım için gerekli olan bileşikleri temin ettiği bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştığı için sayın Prof. Dr. Olcay BEKİRCAN'a ve tez çalışmamda Moleküler Modelleme çalışmalarını yapan sayın hocam Prof. Dr. Ahmet YAŞAR hocama teşekkürlerimi sunarım. Önerilerini aldığım tez izleme komitesi üyeleri hocalarımdan, her isteğimi asla geri çevirmeyen desteğini her daim hissettiren sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya, ufkumu genişlettiği yeniliklere sınır koymadığı bilimsel bakış açısı, akademik duruşu ve karakteri yönünden daima örnek olarak aldığım benimle laboratuvarını paylaşan sevgili sayın Dr. Öğr. Üyesi Selcen ÇELİK UZUNER'e teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında her soruma çözüm bulmak için vakit yaratan, her zaman hoşgörülü olan sayın Prof. Dr. Melike YILDIRIM AKATIN'a çok teşekkür ederim. Çalışmanın çeşitli kademelerinde bilgi ve deneyimlerini özveriyle benimle paylaşan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki değerli hocalarım Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE ve Dr. Serap ÖZER YAMAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Doktora süresince Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarlarında üzerimde emekleri olan sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK, Prof. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA ve Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU'na teşekkür ederim. Kısıtlı zamanlarda pek çok anı biriktirdiğimiz, değerli bilgilerini paylaşan sayın Doç. Dr. Zehra CAN'a, her zaman enerji dolu Dr. Öğr. Derya Cansız'a birlikte geçirdiğimiz zamanlarda mütamadiyen mutlu olup güldüğümüz Arş. Gör. İkbâl SARIKAYA'ya ve KTÜ Moleküler Biyoloji Memeli Hücre Kültürü Laboratuvarı ekip arkadaşlarıma hayatımın hem en güzel hem de en zor dönemini benimle birlikte geçirdikleri için çok teşekkür ederim. Bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, yaptığım tüm tercihlerde yanımda duran sonsuz özveri ve emekleri için sevgili Aileme, desteği, sabrı ve sıkıntılı zamanlarımda her daim yanımda olan sevgili eşim Doç. Dr. Selim DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif AYAZOĞLU DEMİR

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun TÜBİTAK-114Z771 nolu ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin FDK-2017-5520 ve FDK-2017-5948 nolu projeleri tarafından desteklenmiştir.

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Bazı Triazol Türevlerinin Klinik Öneme Sahip Alfa Amilaz Ve Tirosinaz İnhibisyon Potansiyalleirnin *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. 09/12/2019

Elif AYAZOĞLU DEMİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	IV
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÖZET	X
SUMMARY	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
TABLolar DİZİNİ.....	XV
KISALTMALAR, FORMÜLLER ve SEMBOLLER DİZİNİ.....	XVI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Enzim İnhibisyonu.....	3
1.3. İnhibitör Olarak Kullanılan Moleküller ve Hedef Enzimleri	4
1.3.1. Enzim İnhibitörü Olarak Kullanılan Triazollerin Yapısı ve Biyolojik Aktiviteleri.....	5
1.4. İlaç Keşfinde Yeni Yaklaşımlar ve Stratejiler	7
1.4.1. Eftör Yapısına Dayalı Yöntemler	7
1.4.1.1. QSAR.....	7
1.4.2. Hedef Yapısına Dayalı Yöntemler.....	8
1.4.2.1. Moleküler Modelleme	8
1.5. α -Amilaz.....	8
1.5.1. α -Amilaz Yapısı, Fonksiyonu ve Kataliz Mekanizması.....	9
1.5.2. Klinik Açıdan α -Amilaz Enzim İnhibisyonunun Önemi	11
1.5.3. Amilaz Aktivitesi Tayin Yöntemleri	13
1.5.3.1. DNSA Metodu	13
1.5.3.2. Nişasta-İyodin Metodu	14
1.6. Tirozinaz	15
1.6.1. Tirozinazın Yapısı, Fonksiyonu ve Kataliz Mekanizması.....	15
1.6.2. Klinik Açıdan Tirozinaz Enzim İnhibisyonunun Önemi	18
1.6.2.1. Melanoma	21
1.6.3. Tirozinaz Aktivitesi Tayin Yöntemleri.....	22

1.7.	Hücre Ölümü	23
1.7.1.	Apoptoz.....	23
1.7.2.	Kanser ve Apoptoz	24
1.7.3.	Apoptoz Tayin Metotları	24
1.8.	Hücre Döngüsü	25
1.9.	Çalışmanın Pratik Amacı ve Önemi	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	27
2.1.	Gereç.....	27
2.1.1.	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Malzemeler.....	27
2.1.2.	Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler.....	28
2.1.2.1	Enzim Aktivite Çalışmaları için Kullanılan Çözeltiler.....	28
2.1.2.1.1.	Tampon Çözeltiler	28
2.1.2.1.2.	Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler	29
2.1.2.2.	Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Kullanılan Çözeltiler.....	30
2.1.3.	Çalışmada Kullanılan İnhibitör Bileşikleri.....	31
2.2.	Yöntem	35
2.2.1.	Enzim Aktivite Tayinleri	35
2.2.1.1.	α -Amilaz Aktivitesi Optimizasyonu	35
2.2.1.1.1.	Optimum Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi	36
2.2.1.1.2.	Optimum Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi	36
2.2.1.1.3.	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	36
2.2.1.1.4.	Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	37
2.2.1.2.	Tirosinaz Aktivitesi Optimizasyonu	37
2.2.1.2.1.	Optimum Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi	38
2.2.1.2.2.	Optimum Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi	38
2.2.1.2.3.	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	38
2.2.1.2.4.	Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	38
2.2.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Çalışmaları	39
2.2.2.1.	α -Amilazın İnhibisyonu	40
2.2.2.2.	Tirosinazın İnhibisyonu	40
2.2.3.	Moleküler Modelleme Çalışmaları	41
2.2.4.	Hücre Kültürü Çalışmaları.....	42
2.2.4.1.	Hücre Kültürü Çalışmaları ile α -Amilaz Aktivite Tayini	42
2.2.4.1.1.	AR42J Hücre Serisi Çoğaltma ve Saklama	42

2.2.4.1.2.	AR42J ve MEF Hücreleri Üzerinde Hücre Canlılığı Tayini	43
2.2.4.1.3.	α -Amilaz İnhibisyon Çalışması İçin Hücre Sayısı Belirleme Çalışmaları	45
2.2.4.1.4.	AR42J Hücre Serisi Üzerinde A16, Akarboz Molekülünün α -Amilaz İnhibisyon Çalışmaları	45
2.2.4.2.	Hücre Kültürü Çalışmaları ile Tirosinaz Aktivite Tayini	46
2.2.4.2.1.	VMM917 Hücre Serisi ile Yapılan Çalışmalar	46
2.2.4.2.2.	VMM917 ve BJ Hücreleri Üzerinde Sitotoksosite Deneyleri	46
2.2.4.2.3.	VMM917 Hücre Serisindeki Melanin Miktarının Optimizasyonu	48
2.2.4.2.4.	VMM917 Hücresinde B9 ve Kojik Asit Moleküllerinin Tirosinaz İnhibisyon Etkisi	49
2.2.4.2.5.	B9 Molekülünün Hücre Döngüsü ve Apoptoz Üzerine Etkisinin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi	49
2.2.4.2.6.	Hücre Döngüsü Analizi	50
2.2.4.2.7.	Anneksin V-PI Analizi ile Apoptotik/Nekrotik Hücrelerin Ayrımı	51
2.2.5.	İstatistiksel Yöntemler	52
3.	BULGULAR	53
3.1.	Enzim Aktivitelerinin Optimizasyonu Çalışmaları	53
3.1.1.	Amilaz Aktivitesinin Tayini ve Optimizasyonu	53
3.1.1.1.	Optimum Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi	53
3.1.1.2.	Optimum Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi	54
3.1.1.3.	Optimum pH'nın Belirlenmesi	55
3.1.1.4.	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	56
3.1.2.	Tirosinaz Aktivitesinin Tayini ve Optimizasyonu	56
3.1.2.1.	Optimum Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi	56
3.1.2.2.	Optimum Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi	57
3.1.2.3.	Optimum pH'nın Belirlenmesi	58
3.1.2.4.	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	58
3.2.	Enzim İnhibisyon Çalışmaları	59
3.2.1.	α -Amilaz İnhibisyonu Çalışmaları	59
3.2.2.	Tirosinaz İnhibisyonu Çalışmaları	63
3.3.	Moleküler Modelleme Çalışmaları	69
3.4.	Hücre Kültürü Çalışmaları	72
3.4.1.	α -Amilaz İnhibisyon Çalışması	72
3.4.1.1.	AR42J ve MEF Hücrelerinin Kültür Edilmesi, Çoğaltılması ve Stoklanması	72

3.4.1.2.	AR42J ve MEF Hücreleri Üzerinde Çözücülerin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	72
3.4.1.3.	α -Amilaz İnhibisyon Çalışması İçin Hücre Sayısının Tespiti	76
3.4.1.4.	AR42J Hücre Serisi Üzerinde A16 Molekülünün α -Amilaz İnhibisyon Çalışmaları.....	77
3.4.1.5.	MEF Hücre Serisi Üzerinde A16 Molekülünün α -Amilaz İnhibisyon Çalışmalar	80
3.4.2.	VMM917 Hücreleri Üzerinde Tirosinaz İnhibisyon Çalışmaları.....	82
3.4.2.1.	VMM917 Hücre Serisi Optimizasyonu	82
3.4.2.2.	VMM917 ve BJ Hücreleri Üzerinde Sitotoksosite Çalışmaları	82
3.4.2.2.1.	VMM917 ve BJ Hücreleri Üzerinde Çözücünün Sitotoksik Etkisi.....	82
3.4.2.2.2.	VMM917 ve BJ Hücre Serileri Üzerinde B9, Sisplatin ve Kojik Asit Moleküllerinin Sitotoksosite Çalışmaları	83
3.4.2.2.3.	Sitotoksosite Sonuçlarına Göre IC ₅₀ Değerleri ve Seçicilik İndeksleri.....	85
3.4.2.2.4.	VMM917 Hücre Serisinde Melanin Miktarı Optimizasyonu	85
3.4.2.2.5.	VMM917 Hücrelerinde B9, Kojik Asit, A8 Moleküllerinin Tirosinaz İnhibisyon Etkisi.....	86
3.4.2.2.6.	VMM917 Hücre Serisinde B9 Bileşiğinin Hücre Döngüsüne Etkisi	88
3.4.2.2.7.	VMM917 Hücre Serisi Üzerinde B9 Bileşiğinin Apoptotik Etkisi	90
4.	TARTIŞMA.....	92
5.	SONUÇLAR.....	104
6.	ÖNERİLER.....	106
7.	KAYNAKLAR	107
	ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

BAZI TRIAZOL TÜREVLERİNİN KLİNİK ÖNEME SAHİP ALFA AMİLAZ VE
TİROSİNAZ İNHİBİSYON POTANSİYELLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO*
OLARAK İNCELENMESİ

Elif AYAZOĞLU DEMİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK
2019, 133 Sayfa

Bu çalışmada bazı triazol bileşiklerin klinik öneme sahip α -amilaz ve tirozinaz enzimleri üzerindeki inhibisyon potansiyelleri, IC_{50} değerleri, inhibisyon türü ve K_i değerleri açısından değerlendirildi. Teorik çalışmalarda bu bileşiklerin enzimlerle etkileşimlerini hesaplamak için moleküler modelleme programları kullanıldı. Ayrıca bileşiklerin inhibitör ve sitotoksik etkileri *in vitro* çalışmalar ile incelendi. Sitotoksikite ve amilaz etkinliği deneyleri AR42J hücre serileri üzerinde sırasıyla tripan mavisi metodu ve nişasta-iyot metodu ile değerlendirildi. Tirozinaz inhibisyon deneyleri VMM917 hücre serileri üzerinde gerçekleştirildi. Sitotoksikite analizlerinde MTT metodu, hücre döngüsü ve apoptoz analizlerinde ise akım sitometrik ölçümler kullanıldı. Son olarak bileşiklerin VMM917 hücrelerindeki tirozinaz inhibitör etkileri sentetik melanine karşı değerlendirildi. Ticari enzimler üzerinde yapılan deneysel çalışmalara göre IC_{50} değeri en düşük olan bileşikler α -amilaz için A16, tirozinaz için B9 ve C3 molekülleri olarak belirlendi. İnhibisyon mekanizmasının her bileşik için yarışmasız inhibisyon olduğu bulundu. Moleküler modelleme sonuçlarına göre, bağlanma enerjisi düşük olan moleküller α -amilaz için A16, tirozinaz içinse B9 ve C3 olarak belirlendi. B9 bileşiğinin seçici sitotoksik etkisi belirlendi. Bileşiğin sitotoksik etkisinin hücre döngüsünü S fazında durdurmasından ve apoptozu indüklemesinden kaynaklandığı ortaya konuldu. Yapılan çalışmalar sonucunda α -amilaz ve tirozinaz için sırasıyla A16 ve B9 bileşiklerinin potansiyel inhibitör olabilecekleri öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Enzim inhibisyonu, Hücre kültürü, Moleküler modelleme, Sitotoksikite, Triazol bileşikleri

PhD. Thesis

SUMMARY

IN VITRO AND *IN SILICO* INVESTIGATION OF CLINICALLY IMPORTANT ALPHA
AMYLASE AND THYROSINASE INHIBITION POTENTIALS OF SOME TRIAZOL
DERIVATIVES

Elif AYAZOĞLU DEMİR

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Advisor: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK
2019, 133 Pages

In this study, the inhibition potential of some triazole compounds on the clinically important α -amylase and tyrosinase enzymes, IC_{50} values, inhibition type and K_i values were evaluated. Molecular modeling programs were used to theoretically calculate the interactions of these compounds with enzymes. In addition, the inhibitory and cytotoxic effects of the compounds were examined by *in vitro* studies. Cytotoxicity potential and amylase activity were evaluated in AR42J cell line using the trypan blue method and starch-iodine method, respectively. VMM917 cell line was screened for tyrosinase inhibition. MTT assay was used for cytotoxicity analysis and flow cytometric measurements were used for cell cycle and apoptosis analysis. Finally, the tyrosinase inhibitory effects of the compounds on synthetic melanin in VMM917 cells were evaluated. According to experimental studies with commercial enzymes, the compounds with the lowest IC_{50} values were determined as A16 for α -amylase, B9 and C3 for tyrosinase. The inhibition mechanism was found to be uncompetitive inhibition for each compound. According to the results of molecular modeling, the molecules with low binding energy were determined as A16 for α -amylase and B9 and C3 for tyrosinase. B9 compound was also determined as to have a cytotoxic effect on the cells through the cell cycle arrest in S phase and induction of apoptosis. As a result of the studies, it is predicted that A16 and B9 compounds may be the potential inhibitors for α -amylase and tyrosinase, respectively.

Key Words: Cell culture, Cytotoxicity, Enzyme inhibition, Molecular modeling, Triazole compounds

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	A. Enzim katalizli bir reaksiyon için enerji seviyesi diyagramı B. Konformasyonun değişikliklerinin gösterimi	4
Şekil 2.	Triazol halkasının izomerik yapısı.....	6
Şekil 3.	Triazol halkası içeren ticari ilaçlar	6
Şekil 4.	Glikozil hidrolazların katalitik mekanizması.....	10
Şekil 5.	<i>Bacillus subtilis</i> α -amilazı için önerilen yapısal bir model.....	11
Şekil 6.	<i>Bacillus subtilis</i> α -amilazı için, PDB: 1BAG	11
Şekil 7.	DNSA yönteminin prensibi	13
Şekil 8.	Glukozun enol anyonuna dönüşüm reaksiyonu	14
Şekil 9.	Nişasta-iyot etkileşimi	15
Şekil 10.	a) Tirosinazın aktif bölgesi ve kristal yapısı b) Temsili olarak aktif bölgenin gösterimi c) <i>Agaricus bisporus</i> tirosinazının kristal yapısı	16
Şekil 11.	Monofenolaz aktivitesi	17
Şekil 12.	Difenolaz aktivitesi.....	17
Şekil 13.	Melanin oluşumu için tirosinaz katalizli metabolik süreç	18
Şekil 14.	Melaninin hücrede oluşumu	19
Şekil 15.	Hücre döngüsü evreleri.....	26
Şekil 16.	Anneksin V analizinde hücrelerin yaptığı floresans ışımalarına göre PI-Anneksin plot'ında farklı bölgelerde bulunma profilleri.....	51
Şekil 17.	Amilaz konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi	54
Şekil 18.	Amilaz enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	55
Şekil 19.	pH'nın amilaz aktivitesi üzerine etkisi	55
Şekil 20.	Sıcaklığın amilaz aktivitesi üzerine etkisi	56
Şekil 21.	Tirosinaz konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi.....	57
Şekil 22.	Tirosinaz enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	57
Şekil 23.	pH'nın tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	58
Şekil 24.	Sıcaklığın tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	59
Şekil 25.	A1 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi	60
Şekil 26.	A2 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi	60
Şekil 27.	A3 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi	60
Şekil 28.	A4 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi	61
Şekil 29.	A14 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi	61

Şekil 30.	A15 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi	61
Şekil 31.	A16 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi	62
Şekil 32.	A17 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi	62
Şekil 33.	A16 bileşiği varlığında α -amilaz inhibisyon türünün belirlenmesi	63
Şekil 34.	Tirosinaz aktivitesi üzerine A6 molekülünün etkisi	64
Şekil 35.	Tirosinaz aktivitesi üzerine A8 molekülünün etkisi	64
Şekil 36.	Tirosinaz aktivitesi üzerine A15 molekülünün etkisi	64
Şekil 37.	Tirosinaz aktivitesi üzerine B5 molekülünün etkisi	65
Şekil 38.	Tirosinaz aktivitesi üzerine B9 molekülünün etkisi	65
Şekil 39.	Tirosinaz aktivitesi üzerine B13 molekülünün etkisi	65
Şekil 40.	Tirosinaz aktivitesi üzerine C1 molekülünün etkisi	66
Şekil 41.	Tirosinaz aktivitesi üzerine C2 molekülünün etkisi	66
Şekil 42.	Tirosinaz aktivitesi üzerine C3 molekülünün etkisi	66
Şekil 43.	Tirosinaz aktivitesi üzerine C4 molekülünün etkisi	67
Şekil 44.	B9 bileşiği varlığında tirosinaz inhibisyon türünün belirlenmesi.....	68
Şekil 45.	C3 bileşiği varlığında tirosinaz inhibisyon türünün belirlenmesi.....	68
Şekil 46.	α -Amilaz enzimi ile A17 (A) ve A16 (B) bileşiklerinin <i>in siliko</i> olarak etkileşimi.....	70
Şekil 47.	Tirosinaz enzimi ile B13 (A), B9 (B), C1 (C) ve C3 (D) bileşiklerinin <i>in siliko</i> olarak etkileşimi.....	71
Şekil 48.	Tirosinaz enzimi ile aktif bölgedeki C3 molekülünün tahmin edilen konformasyonu (A), (B).....	71
Şekil 49.	AR42J (A) ve MEF (B) hücre serileri	72
Şekil 50.	Photoshop programı ile sayılan canlı ve ölü hücreler.....	73
Şekil 51.	Çözücülerin AR42J hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi.....	74
Şekil 52.	Çözücülerin MEF hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi	75
Şekil 53.	İyot ve nişasta çözeltisi optimizasyonu	76
Şekil 54.	α -Amilaz inhibisyon çalışması için optimum hücre sayısı AR42J'de belirleme çalışmaları.....	77
Şekil 55.	AR42J hücresi üzerinde farklı konsantrasyonlarda [10-1000 μ M] A16 bileşiği.....	78
Şekil 56.	AR42J hücre canlılığı üzerinde A16 bileşiğinin etkisi.....	79
Şekil 57.	AR42J üzerinde farklı konsantrasyonlarda 48 saat sonunda A16 bileşiğinin α -amilaz inhibisyonu üzerine etkisi.....	79

Şekil 58.	AR42J hücre serisi üzerinde A16 molekülünün farklı inkübasyon sürelerinde (24 ve 48 saat) α -amilaz inhibisyonu üzerine etkisi	80
Şekil 59.	AR42J hücre serisi üzerinde akarboz molekülünün α -amilaz inhibisyon çalışmaları	80
Şekil 60.	A16 molekülünün MEF hücrelerinin canlılık üzerine etkisi	81
Şekil 61.	A16 molekülünün MEF hücreleri üzerinde α -amilaz inhibisyon etkisi	81
Şekil 62.	VMM917 hücre serisinin çoğaltılma aşamaları A) yeni kültür edilmiş B) konflüent hücreler	82
Şekil 63.	DMSO ve etanolün VMM917 hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi	83
Şekil 64.	DMSO ve etanolün BJ hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi	83
Şekil 65.	B9 bileşiğinin VMM917 ve BJ hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite çalışması	84
Şekil 66.	Sisplatinin VMM917 ve BJ hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite çalışması	84
Şekil 67.	Kojik asitin VMM917 ve BJ hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite çalışması	85
Şekil 68.	Melanin miktarı optimizasyonu	86
Şekil 69.	VMM917 hücresi üzerinde B9 bileşiği ile inhibisyon çalışması.....	87
Şekil 70.	VMM917 hücrenin kojik asit ile melanin miktarı değişimi.....	87
Şekil 71.	VMM917 hücrenin A8 ile melanin miktarı değişimi.....	88
Şekil 72.	Farklı konsantrasyonlarda B9 bileşiği ile 24 saat muamele edilen hücrelere ait hücre döngüsü analiz sonuçları.....	89
Şekil 73.	B9 varlığında annexin-V analiz sonuçları	90

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Klinik olarak kullanılan enzim inhibitörleri	5
Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan gereçler ve sarf malzemeler	27
Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan enzim ve kimyasallar	28
Tablo 4. Tampon çözeltiler	29
Tablo 5. Çalışmada kullanılan inhibitör molekülleri	31
Tablo 6. α -Amilaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı	36
Tablo 7. Tirosinaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı	37
Tablo 8. α -Amilaz inhibisyon çalışması için kullanılan reaksiyon çözeltisi	40
Tablo 9. Tirosinaz inhibisyon çalışması için kullanılan reaksiyon çözeltisi.....	41
Tablo 10. α -Amilaz ve tirosinaz için belirlenen enzim aktivitesi optimizasyonu bulguları.....	59
Tablo 11. İnhibitör moleküllerinin α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi.....	62
Tablo 12. A16 bileşiği varlığında α -amilaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değeri	63
Tablo 13. Tirosinaz aktivitesi üzerine inhibitör moleküllerinin etkisi.....	67
Tablo 14. B9 ve C3 bileşikleri varlığında tirosinaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değeri.....	69
Tablo 15. α -Amilaz varlığında çalışılan inhibitör moleküllerinin bağlanma enerjileri	70
Tablo 16. Tirosinaz varlığında çalışılan inhibitör moleküllerinin bağlanma enerjileri ...	70
Tablo 17. Hücre kültürü çalışmalarına ait IC_{50} değerleri ve seçicilik indeksleri.....	85
Tablo 18. VMM917 hücresinde B9 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda hücre döngüsü analizi sonuçlarının karşılaştırılması.....	89
Tablo 19. B9 varlığında apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarının karşılaştırılması.....	91

KISALTMALAR, FORMÜLLER VE SEMBOLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AR42J	Fare pankreas kanser hücre serisi
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATCC	American Type Culture Collection
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer protein
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bid	BH3 interacting-domain death agonist protein
°C	Celcius (sıcaklık birimi)
Dk.	Dakika
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
E.C.	Enzim kod numarası
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
ECACC	European Collection of Cell Culture
FADD	Fas-associated protein with death domain
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Floroskein izotiyosiyanat
FTIR	Fouirer Transform Infrared Spectrometry
FT-NIR	Fouirer Transform Near Infrared Spektrofotometre
g	Gram
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü)
LDH	Laktat dehidrogenaz
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kcal	Kilokalori
kDa	Kilodalton
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Michaelis Menten sabiti
M	Molar

mg	Miligram
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
μ mol	Mikromol
MTT	3-(4,5- dimetil hidrazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
nm	Nanometre
PBS	Phosphate buffered saline
rpm	Dakikadaki devir sayısı
S	Substrat
U	Ünite
V	Enzimatik reaksiyon hızı
V _{max}	Maksimum hız
VMM917	İnsan melanoma hücre serisi
Δ G	Gibbs serbest enerjisi
PI	Propidyum iyodür
PS	Fosfotidilserin
p53	Tumor protein 53
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

Semboller

α	Alfa
β	Beta
μ	Mikro

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İlaç olma potansiyeline sahip farmasötik maddeler geçmişten günümüze giderek karmaşık bir hale gelmektedir. Bu durum yeşil teknoloji arayışlarını arttırmaktadır. Bu nedenle, ilaç endüstrisi geleneksel kimyasal katalizin alternatifi olarak düşük maliyetli, daha güvenli ve daha yeşil biyokatalitik süreçler aramaktadır [1, 2]. İlaç geliştirme çalışmaları enzimler, hücre yüzey reseptörleri, çekirdek hormon reseptörleri, iyon kanalları, transportlar ve DNA'nın yapısı olarak altı önemli faktör altında toplanmaktadır. Bunların çoğu dünyada pek çok hastalığın tedavisi için anahtar olarak görülmektedir. Ayrıca ilaç hedef sınıfları arasında en yüksek bütçeli çalışmaların enzimler üzerinde yapılan çalışmalara yoğunlaştırıldığı görülmektedir. Enzimler daha fazla afinite, özgüllük, yüksek katalitik verimlilik ve çoklu hedefi dönüştürme kabiliyeti istenilen ürünlere yönelik moleküller olmaları onları diğer tüm ilaç türlerinden ayıran önemli özelliklerdir. Enzim inhibisyonları hastalık tedavisinde daha yaygın hale gelmektedir [3]. Enzimler üzerinde ilaç şirketleri tarafından yapılan yıllık yatırımların 200.000 dolardan 50 milyon dolara kadar çıktığı görülmektedir [4, 5]. Proteinlerin en büyük ve en önemli gruplarından biri olan enzimler, hücrelerin metabolik durumlarının korunmasına ve düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır [6].

Enzimler, vücudumuzda gerçekleşen metabolik süreçlerdeki kimyasal reaksiyonların hızını arttıran çoğu protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Canlı bir organizma tarafından üretilen biyolojik madde veya biyolojik makro moleküller olarak da adlandırılmaktadırlar. Hayat, biyokimyasal tepkimelerin enzimler tarafından güçlü ve özgün katalizlenmelerine bağlıdır [7, 8]. Enzimler diyet yoluyla alınan besin moleküllerini parçalayıp enerjiye dönüştürerek canlılığın hayati fonksiyonlarını gerçekleştirmesine olanak sağlamaktadırlar. Aynı zamanda canlılığın temel taşlarından biri olarak işaret edilmektedirler. Enzimler gıda, tarım, kozmetik ve deterjan gibi farklı ticari kullanım alanlarına sahiptirler. Ayrıca klinik olarak da sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bir veya birden fazla enzimin yokluğunun kalıtsal olarak aktarılan genetik veya bulaşıcı olmayan metabolik hastalıklara sebep olduğu bildirilmektedir. Bu yüzden enzimlerin biyokimyasal tepkimelerdeki varlıklarının miktarı ve hızları klinik kullanımları için oldukça önem taşımaktadır [9-12]. Enzimin yokluğu kadar

enzimi kodlayan genin fazla seviyede ifade edilmesi de canlılık için hayati hasara yol açabilmektedir. Bazı genetik bozukluklar ya da çevresel şartların etkisiyle oluşan mutasyonlar sonucu gen yapısı bozulabilir. Bu da enzim miktarının hücre içindeki artışına ve böylece etkinliğinin artması sonucu metabolik süreçte fazla ürün oluşumuna sebep olabilmektedir. Metabolik yollarda gerekenden az ya da fazla enzim sentezlenmesi istenmeyen reaksiyon ürün ve/veya ürünlerinin oluşumuna katkı sağlamaktadır. Enzimin katalitik etkinliğinin artması ya da azalması bazı özgün hastalıklara öncülük etmektedir. Bu hastalıklar kişilerin hayat kalitelerini olumsuz yönde etkileyen dünya çapında hızla yayılmakta olduğu bildirilen hastalıklardır. Bu nedenle enzimlerin hayati süreçlerdeki spesifik etkinlikleri pek çok açıdan onları tedavi süreçlerinde odak noktası haline getirmektedir [13, 14]. Tüm ilaç keşif çabalarının amacı, insan hastalıklarını etkili şekilde tedavi etmek ve güvenli terapötikler geliştirmektir [15]. Fakat klinik araştırmalar bireye özgü tahmin edilmesi güç olan ilaç konsantrasyon aralığı, ilacın direnç göstermesi ve kişiler üzerinde yapılan çalışmalar için etik sorunlara dayalı ek güvenlik önlemleri gibi oldukça zor süreçlerden geçmektedir [16]. Potansiyel hedefe dayalı ilaç keşfi popüler hale gelmeden önce büyük bütçeli fenotipik bazlı tarama stratejileri farmasötik ilaç keşfinin temeli olarak verilmektedir [15]. Özellikle kanser, kemoterapik ilaçlar üzerine yapılan araştırmalarda çalışma koşullarının kolaylığından ötürü enzim inhibisyon çalışmalarının en iyi örneklerinden biri olarak gösterilmektedir [17]. Geçmişten günümüze enzim inhibisyonuna dayalı tedavi amaçlı pek çok ilaç kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları ekzemestan (meme kanseri), akarboz (tip II diyabet), miltefosin (anti- mikrobiyal), orlistat (obezite), kafein (sinir sistemi), karbidopa (Alzheimer), irinotekan (kolon kanseri), sülfonamidler (anti-mikrobiyal), pilokarpin (göz tansiyonu ve ağız içi kuruluğu) gibi farklı enzim sınıflarına ait ilaç molekülleridir [18-28].

Dünya genelinde ırklara bağlı gen bankalarının kurulması ve genler üzerinde yapılan çalışmaların ilerlemesiyle ihtiyaç duyulan akıllı ilaç sistemine geçilmesi eğilimi artmaktadır. Kişiye özel ilaç belirleme çabalarında genomik sonrası araştırma stratejilerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. İlaç pazarındaki firmalar farmasötik endüstrisi adına terapötik müdahalede fırsat olabilecek moleküler hedeflerin sayısı ve yeterliliğini sürekli olarak denemektedir. Böylece bilinen insan genomu üzerinde uygun olabilecek en etkili ilaç moleküllerini denemek, kişi için uygun dozunu ayarlamak ve en hızlı şekilde piyasaya sürebilmek için çalışmalar devam etmektedir [13, 29]. Moleküler enzimoloji alanı kuruluşundan bu yana yaklaşık bir yüzyıldır çok ciddi bir yol kat etmiştir [13, 30].

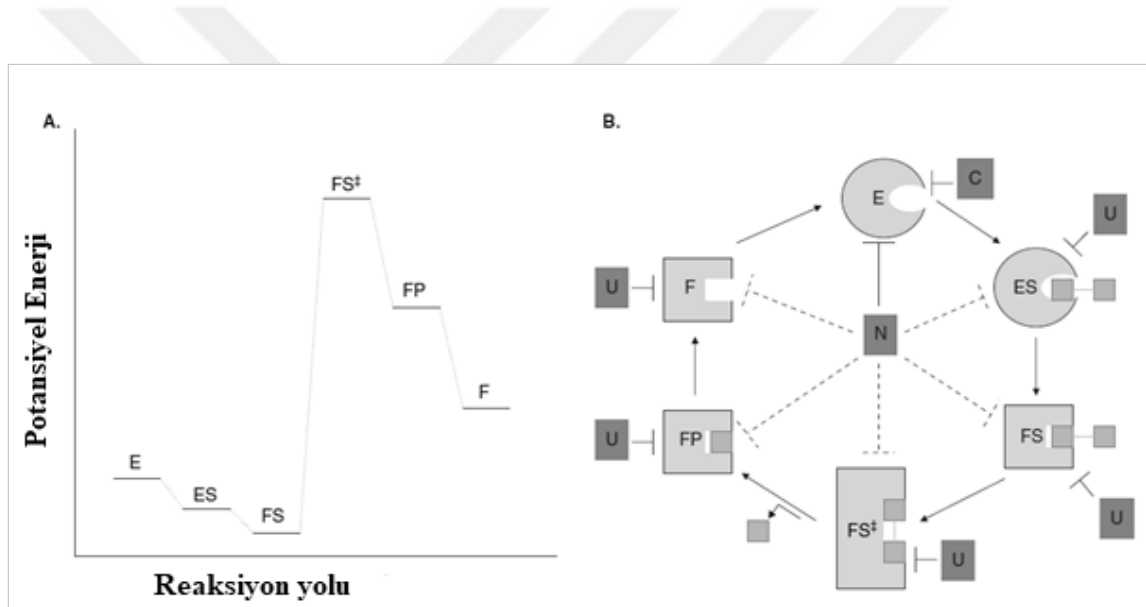
Günümüzde kullanılan ilaç hedeflerinin çoğu enzimleri hedef olarak kullanmakta ve yeni inhibitörlerin tasarlanması için gerekli olan sistematik bir yaklaşıma sahip olduğu bildirilmektedir [13]. Akıllı ilaç tasarımı ile ilgili veriler uzun yıllar sadece ara metabolitlere odaklanıldığını göstermektedir. 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. Bu yüzden araştırmaların sadece enzim inhibisyonu açısından değil aynı zamanda inhibisyon türünün belirlenebildiği kinetik çalışmalarla desteklenmesi gereklidir. Böylece *in vivo* çalışmalarla daha umut verici sonuçlar alınabilecek çalışmalar yapılması beklenmektedir [31].

1.2. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin katalitik güçleri sadece substratları ile ilgili değildir. Çoğu zaman, bir enzimin aktivitesi, inhibitörler olarak adlandırılan moleküller ile spesifik etkileşimlerle azalmaktadır. Enzim inhibisyonu, biyokimyanın en önemli konularından biridir. Örneğin, birçok ilaç, antibiyotik ve toksin, bir enzimi inhibe etme kabiliyeti ile etkilerini sergilemektedir. Enzim inhibitörleri dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Pek çok madde, enzim katalizli bir reaksiyonun hızının azalmasına sebep olabilir. Bunlardan bazıları spesifik olmayan protein denatörleriyken, diğerleri genel olarak oldukça spesifik bir şekilde hareket eden inhibitörler olarak bilinmektedirler. Aktivite kaybı, aktivite inhibitörün çıkarılması ile geri kazanılabildiği durumlarda geri dönüşümlü olabildiği gibi, aktivite kaybının zamana bağlı olduğu ve ilgilenilen zaman dilimi içerisinde geri kazanılamadığı durumlarda ise geri dönüşümsüz olabilmektedir. Eğer inhibe edilmiş enzim tamamen inaktif ise, geri dönüşümsüz inhibisyon, zaman bağımlı bir enzim konsantrasyon kaybı (düşük V_{max}) gibi davranır, diğer durumlarda ise, eksik inaktivasyon içeren zamana bağımlı değişiklikler olabilmektedir. Ağır metal iyonlarının (örneğin civa ve kurşun) genellikle, amino asit omurgasına kuvvetlice bağlanarak geri dönüşü olmayan bir inhibisyona neden oldukları bilinmektedir [32].

Metabolik yollarda gerçekleşen enzim katalizli reaksiyonların çoğu için dönüşümlü inhibitörler oldukça önemli bir yer tutmaktadır [33]. Dönüşümlü inhibisyon kendi içerisinde yarışmalı, yarışmasız ve karışık inhibisyon olarak üçe ayrılmaktadır (Şekil 1). Şekil 1'deki semboller enzimin ligand ile bağlı olduğu farklı konformasyonel durumları basit bir

gösterimle ifade etmektedir. Şekil 1A, sırasıyla E: Spesifik bir konformasyondaki serbest enzimi, ES: İlk enzim substrat kompleksini, FS: Protein değişmiş konformasyonunda enzim-substrat kompleksini, FS[‡]: Enzim-geçiş durum kompleksini, FP: bir ürün bağlı enzimi, F: Proteinin değişmiş konformasyonunda serbest enzimi temsil etmektedirler. Şekil 1B içinse A'dan farklı olarak C: yarışmalı, N: karışık, U: yarışmasız olarak belirtilmektedir. Gösterildiği gibi, yarışmalı bir inhibitör, substratı da bağlayan serbest enzim formuna bağlanabilmektedir (E). Karışık bir inhibitör, ilk substrat bağlanmasını takiben herhangi bir durumda bağlanabilmektedir (ES, FS, FS[‡], FP ve/veya F) ve yarışmasız bir inhibitör, hem substratı bağlayan serbest enzim formuna (E) hem de başlangıç substrat bağlanmasından sonra enzim formlarının istediği birine bağlanabilmektedir (ES, FS, FS[‡], FP ve/veya F) [34].



Şekil 1. A. Enzim katalizli bir reaksiyon için enerji seviyesi diyagramı B. Konformasyonun değişikliklerinin gösterimi [34].

1.3. İnhibitör Olarak Kullanılan Moleküller ve Hedef Enzimleri

Enzimlerin hastalık süreçlerinde kilit noktalarda düzenleyici olarak görev yapmaları son yirmi yıldır yapılan araştırmaların yönünü daha önceden taranmış ve yüksek etki gösterebileceğine inanılan hedefe dönük seçimli enzim inhibisyon çalışmalarına çevirmektedir. Enzim kullanımı medikal uygulamalar da geniş kapsamlı yer bulmakta ve hızla büyümektedir [35]. Küresel ilaç geliştirme şirketleri bu konu hakkında kendilerini devamlı olarak geliştirmekte ve yenilemektedirler [13]. Enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre sınıflandırılmaktadırlar. Bu yüzden enzim inhibisyonunda seçilen enzimlerin

sınıflarının öneminin yanında kimyasal yapısı, enzimin metabolik süreçteki mekanizması, geçiş durumunun yapısal karakterizasyonu ve etkileşimleri ile ayrıca kataliz sonrası açığa çıkan kimyasal türlere de odaklanılmaktadır [36-41].

Enzim substratlarının biyokimyasal doğası ve kimliği bir başka önemli husus olarak görülmektedir. Makromoleküler substratlar ve enzimler arasındaki etkileşimleri aktif bölgeye uzak bölgelerde meydana geldiği ve ilk enzim-substrat (ES) karşılaşma kompleksinin oluşumu için genel bağlanma enerjisine katkıda bulunabileceğini gösteren sayısız örnekler vardır [36-42]. Katalitik mekanizmanın detaylı bir şekilde anlaşılması ve çeşitli enzim-substrat etkileşimlerinin tam olarak ele alınması, hücresel bağlamda inhibe edilecek olan spesifik akış yolları üzerinde kontrol sağlayabilir. Örneğin substrat seçiciliği, kolay kontrol ve potansiyel olarak daha az yan etki sunan, küçük moleküllerden etkilenen belirli yolları tanımlayabilmektedir [43, 44]. Onkolojideki küçük molekül enzim inhibitörlerinin terapötik ve ticari başarısı göz önüne alındığında, mevcut ilaç keşfi ve geliştirme çabalarının ana odak noktası enzimler olarak gösterilmektedir [13]. Tablo 1’de klinik olarak kullanılan her bir enzim sınıfı için ayrı ayrı bazı enzim inhibitör molekülleri ve ilişkilendirildikleri hastalıklar verilmektedir [18, 27, 45-50].

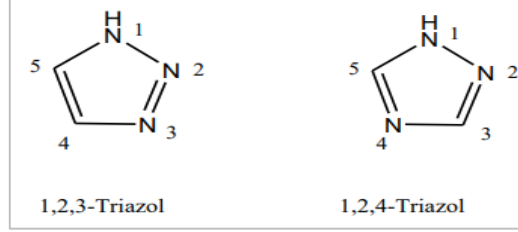
Tablo 1. Klinik olarak kullanılan enzim inhibitörleri

Enzim Sınıfı	Hedef Enzim	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

1.3.1. Enzim İnhibitörü Olarak Kullanılan Triazollerin Yapısı ve Biyolojik Aktiviteleri

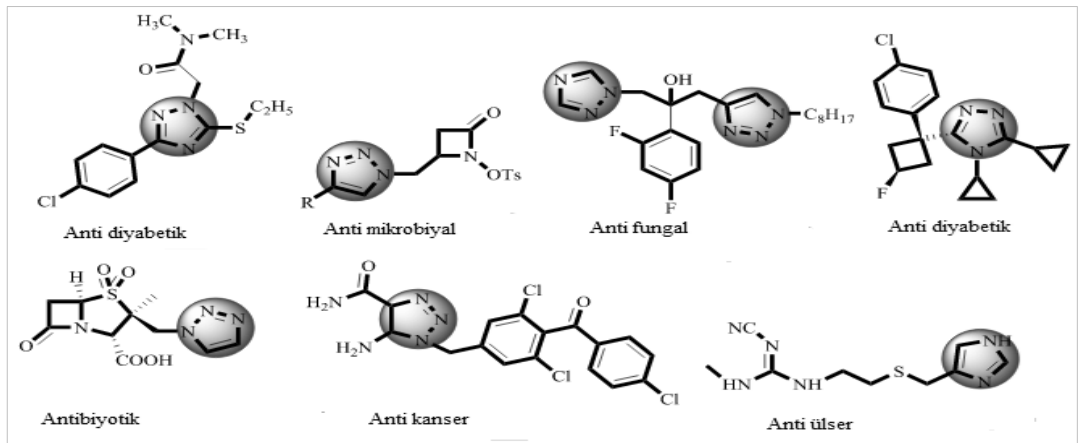
Pirodiazol olarak adlandırılan triazol halkası beş üyeli, doymamış halka yapısına sahip organik sentezli heterosiklik bileşiklerdir. Halka yapılarında arka arkaya ya da peş peşe olmayan pozisyonlarda üç azot atomu ve iki karbon atomundan oluşur. Triazol ailesinin en basit yapısı triazolün kendisidir. Triazol beyaz ila soluk sarı renkte, zayıf bazik bileşik olan kristalimsi bir katıdır. 69,06 g moleküler ağırlığı ve moleküler formülü $C_2H_3N_3$ olan

kimyasal olarak izomerik bileşikler 1, 2, 3-triazol ve 1, 2, 4-triazol çifti olarak Şekil 2’de verilmektedir [51-54].



Şekil 2. Triazol halkasının izomerik yapısı

Klinik olarak sıklıkla triazol bileşikleri çeşitli ilaçlarda kullanılmaktadır. Literatürde triazol türevlerinin anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar, analjezik, anti-viral, anti-proliferatif ve anti-kanser gibi geniş spektrumlu farmakolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmektedir [55-60]. Günümüzde klinik araştırmalar yeni ve güvenli terapötik ajanların kullanılmasına yönelik olarak yoğunlaştırılmaktadır. Triazol bileşiklerinin imidazol kısmı, çeşitli tıbbi ajanların temel maddesi olarak başarılı bir şekilde kullanılmasına rehberlik etmektedir. Triazol bileşiklerinin, imidazolün karbon atomunun nitrojen atomu ile izo-sterik olarak ikame edildiği imidazol bileşiklerinin izomerleri olduğu bildirilmektedir [53]. İlaç etken maddesi olarak 1,2,4-triazol halkası içeren bazı bileşikler Şekil 3’de verilmektedir.



Şekil 3. Triazol halkası içeren ticari ilaçlar [61].

İlaç geliştirme araştırmaları, bu yapıların klinik açıdan değerlendirilmeden önce en temel haliyle biyokimyasal deneylerle desteklenmesini öngörmektedir. Kanser tedavisinde

kemoterapötik ajanlara göre enzim inhibisyonu kullanımını toksisite açısından bakıldığında çok daha avantajlı görülmektedir [62].

1.4. İlaç Keşfinde Yeni Yaklaşımlar ve Stratejiler

Son on yıldır, yeni ilaçlar geliştirilmenin zaman alıcı ve maliyetli bir süreç olduğu görülmektedir. İlaç geliştirme üç aşamaya ayrılmaktadır: keşif evresi, klinik evre ve klinik gelişim evresi. İlaç keşif aşamasında ilk adım, potansiyel ilaç-enzim birlikteliklerini tanımlamaktır. İlaç enzim ilişkisini öngörmede hesaplamalı yaklaşımlar son yıllarda giderek daha çok ilgi görmektedir. Yönlendirilen bazı ilaçlar rasyonel gözlemlerle başarılı bir şekilde tanımlanmaktadır. Bu avantajlar ışığında sistematik olarak yeniden konumlandırma yöntemleri için daha etkin bir yaklaşım kullanmak acil bir ihtiyaç olarak belirtilmektedir [63]. Bu yaklaşımlar efektör ve hedefe dayalı yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır.

1.4.1. Efektör Yapısına Dayalı Yöntemler

Efektör (ligand) yapısına dayalı yöntemlerde amaç, etkileşimi gözlenen bileşiğin yapısal özellikleri kullanılarak ilgili reseptör yapısı aydınlatılmaktadır.

1.4.1.1. QSAR

Hesaplamalı yaklaşımlar, ilaç tasarımı ve keşfinin kolaylaştırılmasında etkinliği ile bilinmektedirler [64]. QSAR, bileşiklerin yapılarını biyolojik aktiviteleri ile ilişkilendirmek için kullanılan, kantitatif yapı-aktivite ilişkilerini ortaya koyan *in siliko* bir metottur [65]. QSAR yöntemi rasyonel ilaç tasarımı için, kritik faaliyetler veya farmakokinetik bilgiler için gerekli olan önemli özellikler ve bilgiler sağladığı için ilaç keşfi için gereken ürün maliyeti ve oluşum süresini önemli ölçüde azaltabilmektedir [66, 67]. QSAR modellerinin, çok çeşitli biyoaktif bileşiklerin ve çeşitli biyolojik aktivitelerin yapı-aktivite ilişkilerini (SAR) anlamak için başarılı bir şekilde oluşturduğu bildirilmektedir [68-73].

Yapısal modifikasyon, azaltılmış toksisitelerin yanı sıra, geliştirilmiş potansiyel ve farmakokinetik özelliklere sahip potansiyel bileşikleri elde etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [68, 74, 75]. Yapısal çeşitliliğin olmaması, ilaç keşfi alanındaki kimyasal alanların genişlemesi konusunda artan farkındalığa yol açan mevcut sorunlardan biri olarak

görülmektedir [76, 77]. Bileşiklerin yapılarında gerçekleştirilen istemli değişiklikler, yapısal çeşitliliği artırma ve dolayısıyla mevcut konuyu potansiyel olarak ele alma konusunda etkili stratejilerden biri olarak görülmektedir. Ek olarak, triazol farmakoforundaki yapısal modifikasyonun, yeni triazol ilaçlarının aranmasında etkili bir kavram olduğu belirtilmektedir [78-80].

1.4.2. Hedef Yapısına Dayalı Yöntemler

Bu yöntemin esası, seçilen reseptörün yapı-analiz hesaplamaları teorik olarak hesaplanarak etkileşime girebileceği ve güçlü bağlanma göstermesi beklenen bileşiklerin tasarlanmasına katkı sağlamaktır.

1.4.2.1. Moleküler Modelleme

Hesaplamalı yazılımlar, reseptörler ve ilaç molekülleri arasındaki potansiyel etkileşimleri önermektedir. Bu yöntemi tanımlamak için bağlanma enerjisi ve bağlanma gücü yüksek bileşikler grubu kullanılmaktadır. Bu yöntem ilaç tasarımı çalışmaları için tartışmasız çok etkili sonuçlar vermektedir [81-83]. Moleküler modelleme çalışmaları için özellikle reseptör olarak protein yapılı enzimlerle çalışılmaktadır. İlaç adayları ile enzim arasındaki ilişki uzaysal düzlemde ortaya konmaktadır. Burada genellikle enzimin üç boyutlu yapısının belli olduğu X ışınları kristallografisi kullanılarak farklı çözücü ortamlarında ligand-reseptör etkileşimi bağlanma enerjileri ve bölgeleri hesaplanmaktadır [61, 84-86]. En güçlü etkileşimi yapabilecek aday ilaç molekülünün en hızlı ve güvenli şekilde tahmin edilebileceği öngörülmektedir [87].

1.5. α -Amilaz

Amilazlar ilk kez Anselme Payen tarafından 1833 yılında keşfedilen hidrolaz sınıfı enzimler olup doğada bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda yaygın şekilde bulunmaktadır. Bu enzimler bitki tohum, yaprak ve yumrularının depo polisakkariti ve önemli bir enerji kaynağı olan nişastadaki o-glikozidik bağlarını hidroliz ederler. [88, 89]. Amilazlar, karbohidrat polimerinde parçaladıkları bölgeye göre α - β - γ -amilaz olmak üzere üç farklı gruba ayrılırlar. Her bir gruptaki amilaz enzimi farklı bir bağlanma bölgesine afinite gösterir.

Hidroliz edilen bağlanma bölgelerindeki farklılık oluşan oligosakkarit uzunluğunu belirlenmektedir [8, 90].

1.5.1. α -Amilaz Yapısı, Fonksiyonu ve Kataliz Mekanizması

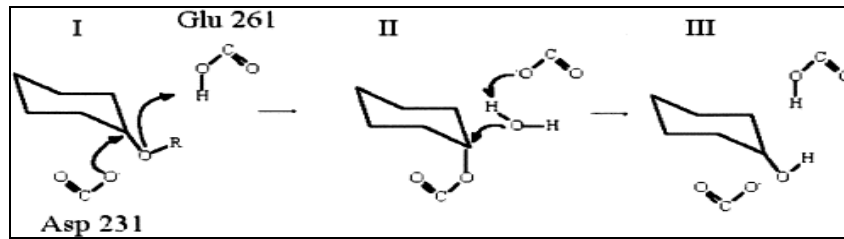
α -Amilaz enzimi (EC: 3.2.1.1; 1,4- α -D-glukanohidrolaz) karbohidrat polimerinin glukoz alt birimlerini birbirine bağlayan α -1,4 glikozidik bağlarını rastgele parçalamasından sorumlu olan maltoz, maltotrioz, amiloz, amilopektin ve dekstrin ürünlerini oluşturan bir endoglikosidazdır [91]. α -Amilaz bir metaloenzim olup kalsiyum varlığında görevini etkin bir şekilde yerine getirmektedir [92].

Bu enzimler yapı-işlev açısından, ilaç ve endüstri gibi çeşitli uygulama alanlarında kapsamlı olarak incelenmektedir. α -Amilazlar, glikozil hidrolaz aile 13' ün üyesidir. Bu ailenin başlıca özellikleri, α -glikozidik bağlara etki ederek α -anomerik mono-oligosakkarit oluşturma ya da transglikolizasyon veya bu iki aktiviteyi birlikte taşımaktır. Farklı bakterilerden (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Bacillus licheniformis*) elde edilen α -amilazların amino asit sekanslarındaki farklılıklara rağmen, üç alanlı benzer üç boyutlu yapıya sahip oldukları görülmektedir. Bunlardan alan A, aktif bölgeyi çevreleyen bir merkezi “(β/α)₈-barrel” (TIM barrel), alan B'yi aktif alanın bir tarafından ve alan C'den kaplayan α/β -yapısından oluşmaktadır. Aile üyeleri genellikle çok az dizi benzerliği göstermekle birlikte (bütün dizide sadece ~%10 benzerlik), katalizde ve aktif bölgede yer aldıkları yönlendirilmiş mutagenез, X-ışını kristalografisi ya da teorik çalışmalarla kanıtlanmış olan üç amino asitin (Asp206, Glu230 ve Asp297, numaralandırma *Bacillus licheniformis* α -amilazına göre yapılmaktadır) oldukça iyi korunduğu görülmektedir.

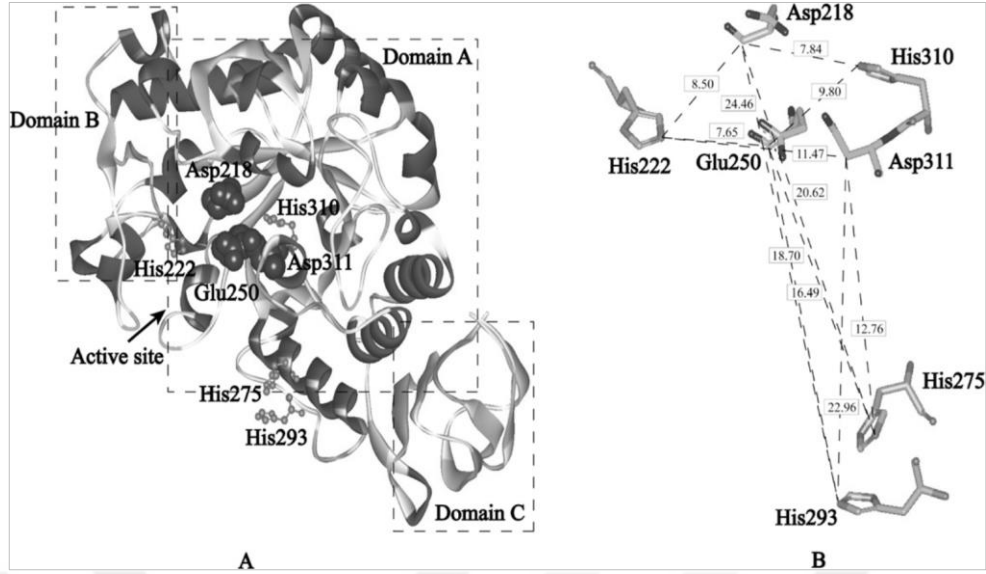
α -Amilaz ailesi enzimleri arasındaki çok düşük dizi benzerliği, değişmez rezidülerin sayısının sadece 10 amino asit ile sınırlı olmasından anlaşılmaktadır. Bu rezidülerden yedisi aktif bölge ile ilgili iken, diğer üçünün yapısal olarak önemli olduğu ileri sürülmektedir. Aile üyeleri için tanımlanan domainler; A, B, C, D ve E'dir. En iyi korunmuş domain TIM barrel'i içeren A domainidir. Domain B'nin işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte kalsiyum bağlanmasında rol alan bir korunmuş bölgesi bulunmaktadır. İşlevi bilinen bir diğer domain olan E, nişastanın bağlanmasında görev alır. D domainin tam olarak tanımlanmayan ancak olası işlevi, domain E'ye substrat bağlanmasında eşlik etmektir. C domaini üzerinde yapılan mutasyonlar sonucu bu bölümün aktivite üzerinde etkili olduğu kanıtlanmaktadır [88, 93, 94].

α -Glikozidik bağ, oda sıcaklığında yaklaşık $2 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ kendiliğinden hidroliz oranına sahip olan çok kararlı bir bağıdır [95]. α -Amilaz ailesinin üyeleri bu oranı güçlü bir şekilde arttırdığı için ailenin en verimli enzimleri olarak görülmektedirler. α -Amilaz enzimleri her zaman korunmakta olan üç esansiyel katalitik alan taşımaktadır [96]. Bu üç alandan, Glu230 ve Asp206'nın rolleri, genellikle asit (proton donörü) ve baz (nükleofil) katalizörü için çalışma olarak kabul edilmektedir [88, 97]. Katalitik mekanizma, çoğunlukla bu iki durum temelinde tartışılmaktadır. Bununla birlikte, üçüncü alanın Asp297'nin kritik rolü, substratın bozulmasında önemli bir rol oynadığı gerçeği dışında, hala tanımsız ve tartışmalı görünmektedir [98].

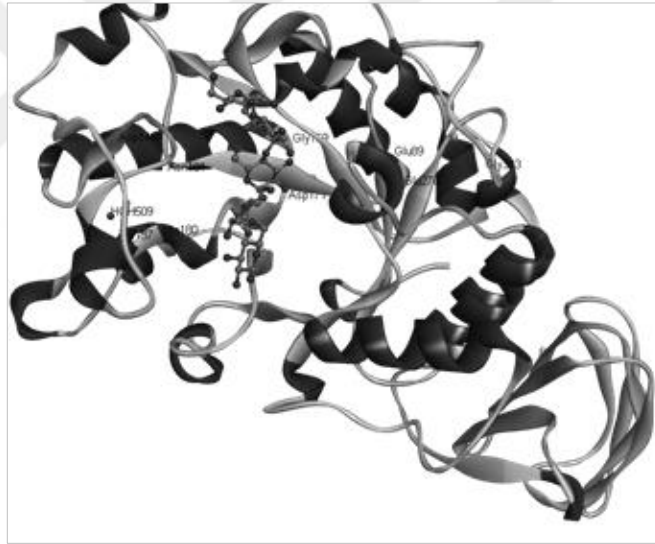
Glikozil hidrolazların diğer üyelerine benzer şekilde α -amilazlar, üç basamaklı bir katalitik mekanizma kullanmaktadır. Birinci basamak, glikozidik oksijenin bir proton verici (Glu261) tarafından protonlanmasını ve bunu -1 alt bölgesindeki şeker rezidüsünün C1 karbonuna katalitik bir nükleofilin (Asp231) nükleofilik atak yapmasını içermektedir. Substratın "aglikon" parçasının ayrılmasından sonra bir su molekülü protonunu vermiş olan Glu261 tarafından aktif hale getirilmektedir. Bu su molekülü, nükleofilin oksijeni ile şeker rezidüsünün C1 karbonu arasındaki kovalent bağı hidroliz eder ve böylelikle katalitik döngü tamamlanır (Şekil 4) [98]. Aktif bölgedeki üçüncü korunmuş amino asit olan Asp328 katalitik mekanizmada doğrudan rol almamaktadır. Bu amino asidin substratın bağlanma ve geçiş durumu kararlılığında rol oynadığı düşünülmektedir (Şekil 5) [91, 99]. *Bacillus subtilis*'dan elde edilen α -amilazın maltopentoz ile aktif bölgedeki etkileşimi Şekil 6'da verilmektedir [100].



Şekil 4. Glikozil hidrolazların katalitik mekanizması. I. Glikozidik oksijenin protonlanması, II. Bir su molekülünün aktivasyonu ve C1-D231 kovalent bağının kırılması, III. Başlangıç durumuna geri dönüş [98].



Şekil 5. *Bacillus subtilis* α -amilazı için önerilen yapısal bir model [91, 99].



Şekil 6. *Bacillus subtilis* α -amilazı için, PDB: 1BAG [100].

1.5.2. Klinik Açından α -Amilaz Enzim İnhibisyonunun Önemi

Kanser tedavisinde enzimlerin kullanımı kemoterapötik ajanlara göre toksisite açısından çok daha avantajlı görülmektedir [62]. İnsan diyetinde, sindirilebilir nişastanın ana kaynağı, buğday, pirinç ve mısır gibi tahıl mahsülleri, patates gibi kök mahsüllerden ve ayrıca baklagillerden elde edilen gıdalardır [101]. Dünya nüfusunun tükettiği yiyeceklerin büyük bir kısmı ucuz ve kolay bulunabilir olduğu için bunlardan oluşmaktadır [89, 102, 103].

Çağımızın hızlı yaşam şartları, çevre koşullarının giderek kötüleşmesi ve insanların çalışma şartları ile iş ortamlarının hareket etmelerini engelleyici yönde olması kişilerin düzensiz beslenmelerine, bu durum da kilo almalarına neden olmaktadır. Amerikan Diyabet Derneği ve Avrupa Diyabet Araştırmaları Birliği potansiyel bir birinci basamak ajan olarak veya diğer anti-hiperglisemik ilaçlarla kombine şekilde α -amilaz ve α -glukosidaz inhibitörlerinin kullanılmasını tavsiye etmektedir [104].

Diyabet, artan kan glukoz konsantrasyonu ile karakterize edilen bir metabolik bozukluk olarak tanımlanmakta olup bugünün ve yarının önemli bir sağlık sorunudur. Bu hastalığa sahip kişiler hastalığa sahip olmayanlara göre daha fazla hastalık ve ölüm riski taşırlar. Yetişkinlerde diyabetin küresel ortalaması son on yılda giderek artmaktadır. 1964 yılında 30 milyon insanın diyabetli olduğu bildirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 40 yıldan kısa bir süre içinde, bu sayının 171 milyon olacağını tahmin etmektedir. Ancak bu hastalığın günümüzde sadece yetişkin hastalığı olmaktan çıktığı görülmektedir. Günümüzde 14 yaş ve üzerinde bu hastalıkla yaşayan yarım milyondan fazla çocuğun olduğu tahmin edilmektedir. Diyabet ile ilgili global sağlık harcamalarının 673 milyar-1.197 trilyon ABD doları arasında olduğu bildirilmektedir. Bu yükseliş trendinin devam etmesi durumunda 2040 yılında hastalıkla yaşayan 642 milyon insan olacağı tahmin edilmektedir [105]. Yüksek karbohidratlı diyetler diyabete önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır [106]. İnsan popülasyonunda yaşlanma ve aşırı kilolu olmaya artan meyilden dolayı Tip-II diyabet insidansı önemli ölçüde artmaktadır. Bu nedenle, karbohidrat metabolizmasını yavaşlatabilen veya durdurabilen yeni α -glikosidaz inhibitörlerinin araştırılması, Tip-II diyabetin farmakoterapötik kontrolünde önemli bir amaçtır. Nişasta parçalanmasının α -amilaz inhibitörleri ile engellenmesi, karbohidrat asimilasyonu için gerekli bir işlem olan polisakkaritlerin enzimatik bozunmasını kontrol etmeye yönelik ilk adımdır.

İmidazol, 1,2,3-triazol ve tetrazol türevleri gibi beş üyeli azoheterosiklikler, α -glikosidaz için güçlü bir inhibitör özellik sergilerler ve bunu şeker kısımlarını taklit ederek başardıkları düşünülmektedir. Triazoller, güçlü dipol momentleri nedeniyle hidrojen bağlanması ile dipol-dipol etkileşimlerine aktif olarak katılabildiği ve ayrıca hidroliz ve oksidatif/indirgeyici koşullara karşı mükemmel bir stabilite gösterdiği için sıklıkla farmasötik alanda kullanılmaktadır. Triazol halkası, amid grubunun bir biyo-çökticisi olarak kabul edilebilir, çünkü bu kısımlar benzer bir H-bağ alıcı kapasitesine, ikame ediciler arasında benzer bir mesafeye ve benzer bir dipolar karaktere sahiptir. Triazoller, tıbbi

kimyada önemli bir yere sahip bileşiklerdir. Diyabet dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar için umut verici terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır [10].

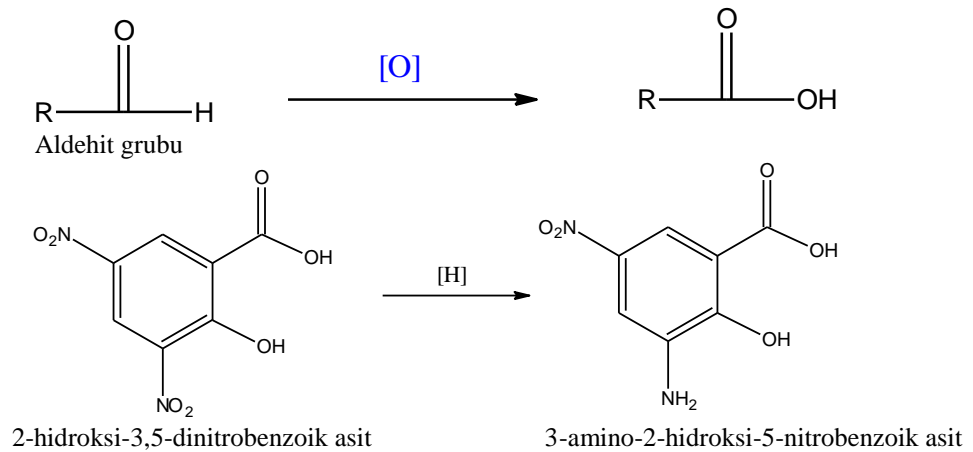
α -Amilazlar diyabet tedavisinde temel hedefdir, çünkü bu enzimlerin inhibisyonu, glukoz emilimini geciktirmektedir. Bağırsakta sindirim enzimlerinin inhibitörleri tarafından karbohidrat sindirimini geciktirilmesi, hiperglisemiye azaltmanın bir yolunu sağladığı için diyabet tedavisine yeni bir yaklaşım olarak görülmektedir. Literatürdeki ön klinik çalışmalarda akarboz bir α -amilaz inhibitörü olarak sunulmaktadır [107, 108].

1.5.3. Amilaz Aktivitesi Tayin Yöntemleri

α -Amilaz etkinliğini belirlemek için dinitrosalisilik asit (DNSA) ve nişasta-iyodin gibi dolaylı ölçüme dayalı çeşitli metotlar mevcuttur.

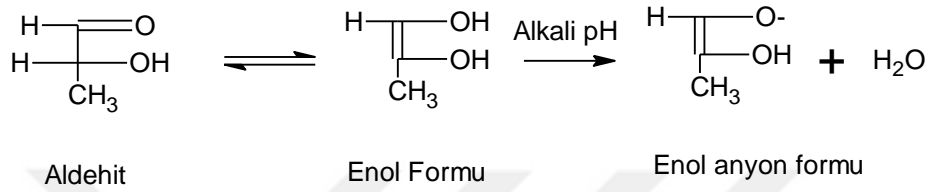
1.5.3.1. DNSA Metodu

3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) metodu ile α -amilaz varlığında farklı bölgelerden kesilen nişasta polimerinin oluşturduğu indirgen şekerlerdeki serbest karbonil gruplarının miktarındaki artışın ölçümü ile dolaylı olarak sağlanmaktadır. 3,5-dinitrosalisilik asit, 3-amino-5-nitrosalisilik asite indirgenirken, aynı anda alkali ortamda nişastadan ayrılan glukoz birimleri üzerindeki aldehit grupları oksidasyona uğramaktadır (Şekil 7). Boyar madde olarak oluşan nitroaminosalisilik asidin konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 540 nm’de ölçülebilmektedir [109].



Şekil 7. DNSA yönteminin prensibi [109].

Anomerik karbonu yapısında açıkta olan şeker grupları indirgen şeker olarak adlandırılmaktadır. Aldehit ve keton gibi düz zincirli ya da enol formu olan halka yapısında birbirleriyle denge halinde olabilmektedirler. Alkali koşullar altında indirgen şekerler ortamda bulunan Cu^{+2} gibi oksitleyici ajanlar karşısında indirgeyici olarak davranmaktadır. Hemi-asetal ve/veya hemi-ketal grupları boşta olan indirgen şekerlerin karbonil grubundaki oksijen molekülü ile Cu^{+2} arasında redoks tepkimesi oluşmaktadır (Şekil 8).

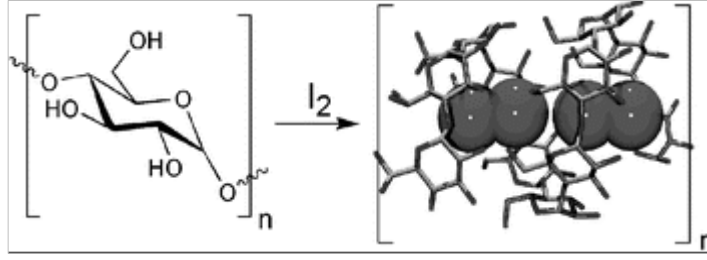


Şekil 8. Glukozun enol anyonuna dönüşüm reaksiyonu

1.5.3.2. Nişasta-İyodün Metodu

İyot değerinin belirlenmesi için bilinen yöntemler, örneğin halojenleyici reaktifin, Hanus veya Wijs çözeltilisi ile reaksiyona sokulmasından ve ardından reaksiyona girmemiş reaktifin iyodometrik olarak belirlenmesini içermektedir. Fakat bu prosedürler zaman alıcı ve çok miktarda reaktif kullanımını gerektirmektedir. Bu yüzden iyot değerinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir [110]. Yağların iyot ile hızlı ve sorunsuz analizi için FTIR (Fourier transform mid-infrared) ve FT-NIR (Fourier transform near-infrared) gibi spektroskopik yöntemler önerilmektedir. Bu yöntemler çok fazla matematiksel hesaplama içermektedir. Ayrıca genel laboratuvarlarda normalde bulunmayan karmaşık bir proses ile ölçüm yapılmaktadır. Nişasta-iyot metodu bu yöntemlere kıyasla daha kolay bir yöntem olarak görülmektedir [111].

Nişasta ile iyot etkileşimi sonucu oluşan nişasta-iyodün kompleksindeki renk yoğunluğundaki artışa göre ölçüm yapılmaktadır (Şekil 9). Bu metot polisakkaritlere özgü, sıklıkla kullanılan bir metottur. Nişasta içerisindeki amiloz ve amilopektin miktarına göre; amiloz için mavi, amilopektin için ise kırmızı/mor/menekşe tonunda renk oluşumu gözlenmektedir. Burada iyot çözeltilisinin konsantrasyonu ve amiloz zincirinin uzunluğu renk şiddetini etkileyen faktörler olarak gösterilmektedir [62, 112, 113].



Şekil 9. Nişasta-iyot etkileşimi

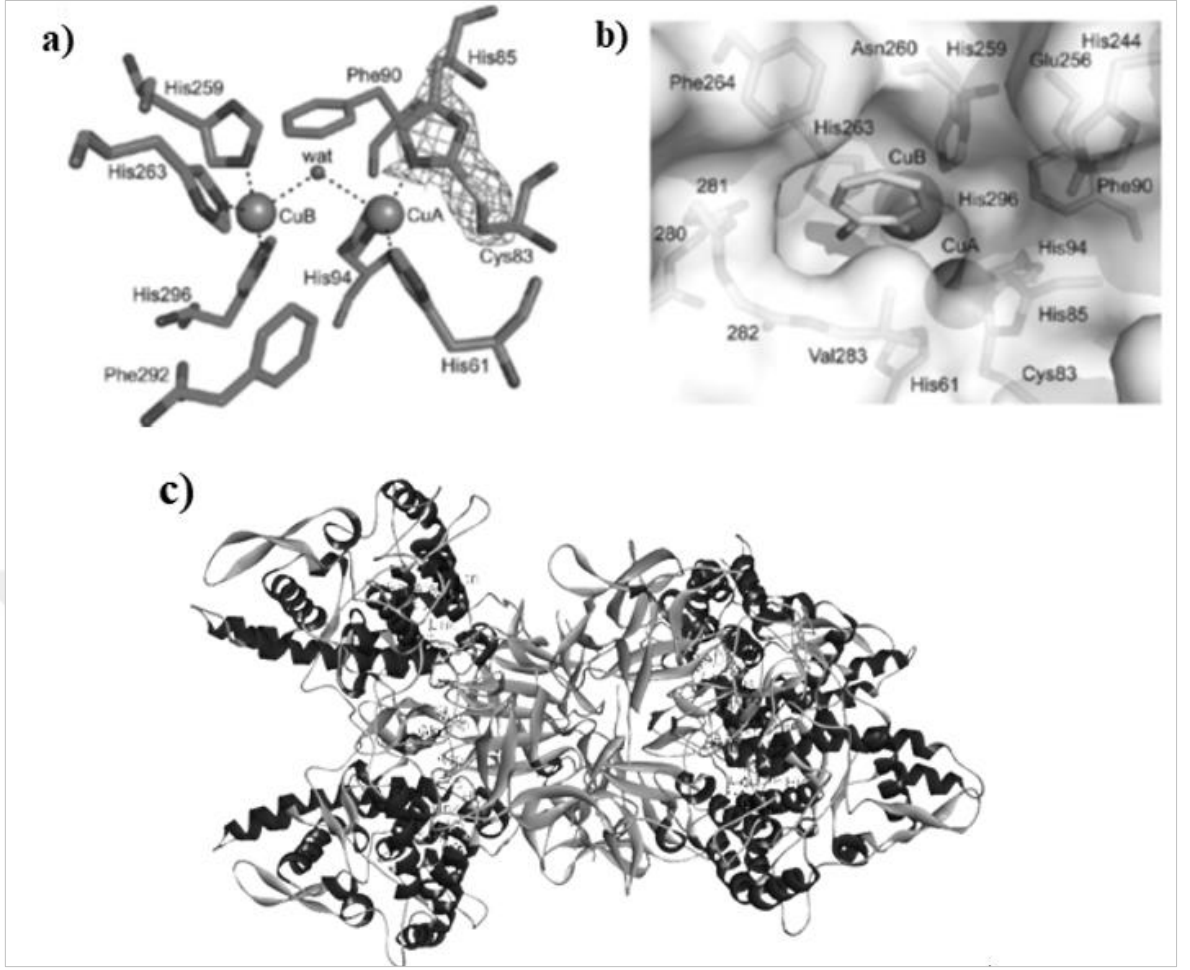
1.6. Tirosinaz

Tirosinaz memelilerde, bitkilerde, böceklerde, mantarlarda ve bakterilerde yaygın şekilde bulunan bir enzimdir [114, 115]. İlk olarak 1856 yılında Schobenbein tarafından mantardan saflaştırılarak elde edildiği bildirilmektedir [116, 117]. Tirosinazın mikroorganizma ve böcek saldırılarına karşı bitkileri koruduğu ve bitkilerde bir hasar meydana geldiğinde daha ileri bir deformasyon olmasını önlemek amacıyla melanin tabakası oluşturduğu, aynı melanin tabakasının böcek iskeletinde sertleşmeye sebep olduğu bildirilmektedir. Böylece böcekleri, mikroorganizmalara karşı koruduğu ileri sürülmektedir [118, 119].

Tirosinaz (EC 1.14.18.1; oksidoredüktaz, monofenol, o-difenol:) cilt, saç, diş eti ve gözlerdeki melanin pigmentinin biyosentezinden sorumlu olan bakır içeren bir enzimdir. Tirosinazın farklı isimlendirmeleri mevcuttur. Bunlardan bazıları polifenol oksidaz, katekol oksidaz, fenolaz, katekolaz, monofenol oksidaz ve kresolaz şeklindedir [120-123]. Elde edildikleri kaynaklara göre fenol oksidazların molekül ağırlıkları değişmektedir [124].

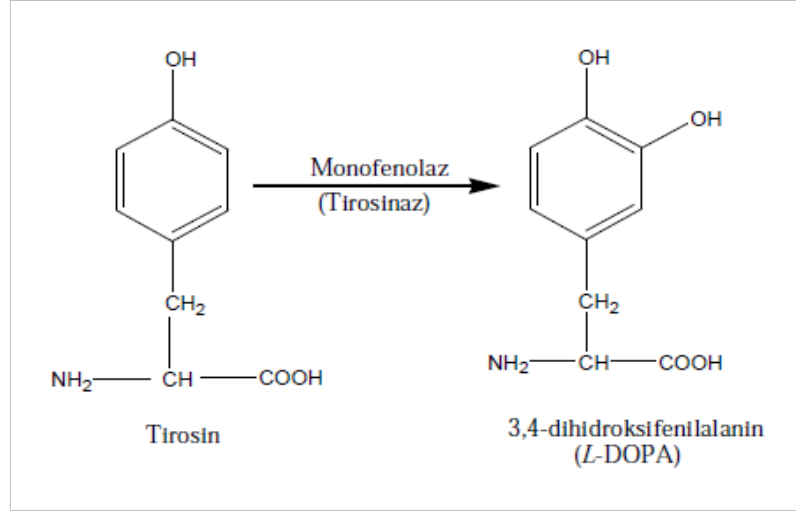
1.6.1. Tirosinazın Yapısı, Fonksiyonu ve Kataliz Mekanizması

Tirosinaz, melanin biyosentezi yolunda iki reaksiyonu katalize etmektedir. Bu yol Raper-Mason yolu olarak adlandırılmaktadır. Tirosinazın aktif merkezinde iki bakır atomu bulunmaktadır. Bu atomlar enzimin üç histidin kalıntısına bağlı bulunmaktadır. Aynı zamanda iki tane oksijen atomuyla da etkileşim halinde olduğu Şekil 10'da gösterilmektedir [100, 125, 126].

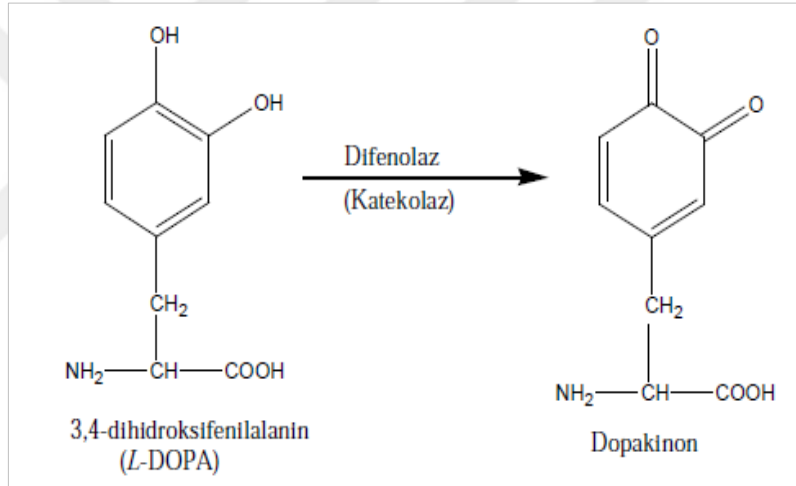


Şekil 10. a) Tirosinazın aktif bölgesi ve kristal yapısı b) Temsili olarak aktif bölgenin gösterimi c) *Agaricus bisporus* tirosinazının kristal yapısı (PDB: 2Y9X) [100].

Tirosinaz enzimi monofenollerin *o*-kinonlara hidroksilasyonu ile oksidasyonu (monofenolaz aktivitesi, Şekil 11) ve *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (*o*-difenolaz aktivitesi) aktivitelerini içermektedir (Şekil 12) [127, 128].



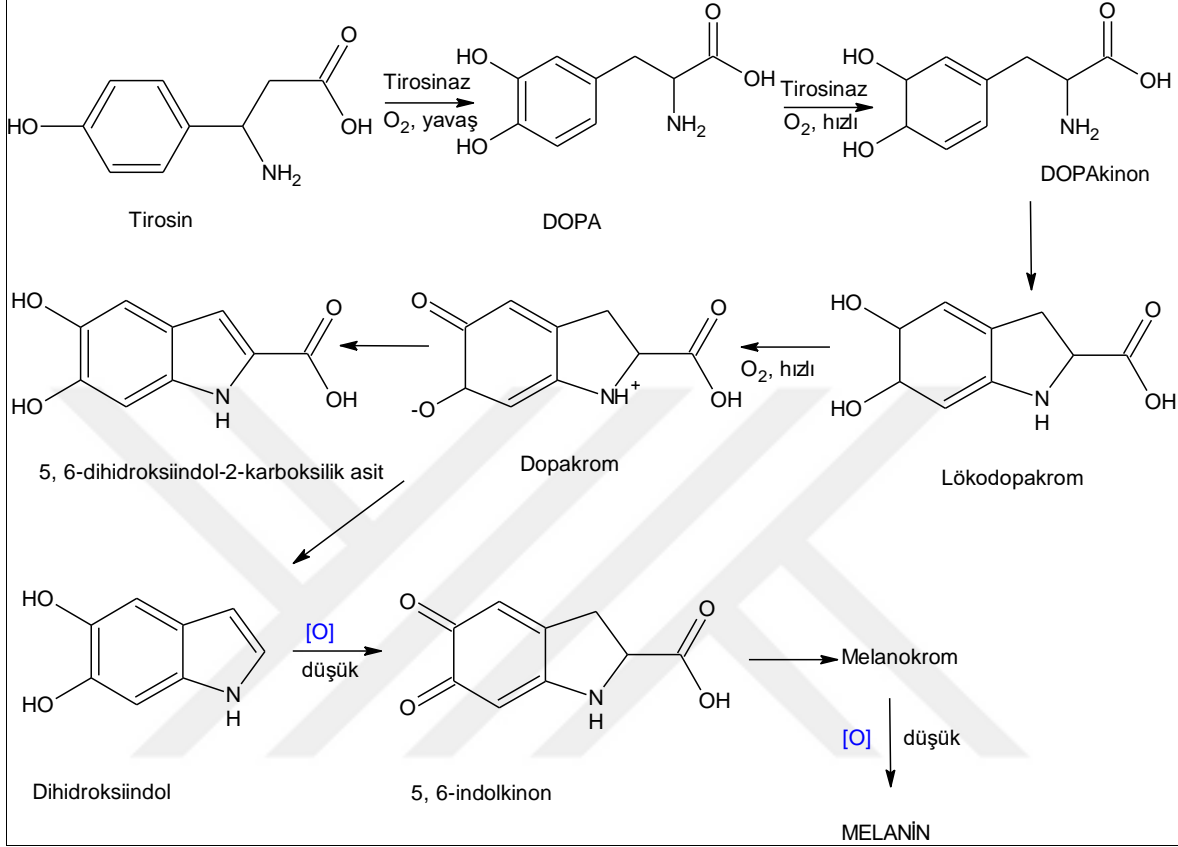
Şekil 11. Monofenolaz aktivitesi [127].



Şekil 12. Difenolaz aktivitesi [128].

o-Kınonların oluşumu enzimatik kararmanın ilk aşamasıdır. *o*-Kınonlar, *o*-dihidroksifenol formu içeren her türlü fenolik bileşenlerden oluşmaktadır. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının substratı esas olarak *o*-dihidroksifenol grubu içeren bileşiklerdir. Ancak bu her zaman zorunlu değildir. Nitekim bazı fenolik maddeler (tirozin gibi), iki aşamada *o*-kınona okside olabilmektedirler. Birinci aşamada, monohidroksi fenollere hidroksil grupları bağlanarak *o*-dihidroksifenoller oluşmakta, ikinci aşamada ise bu moleküler *o*-kınonlara dönüşmektedirler. *o*-Kınonlar, renksiz bileşikler olup enzimatik kararma reaksiyonlarında oluşan ilk maddelerdir. Daha sonra oluşan *o*-kınon ve türevleri bir araya gelerek dimerik yapılar oluştururlar. Bu yapılar polimerleşerek melanini

oluşturmaktadırlar. Bu polimer bileşikler esmer renkli olup, renk bozulmalarının esas nedeni olarak görülmektedirler (Şekil 13) [129-131].



Şekil 13. Melanin oluşumu için tirosinaz katalizli metabolik süreç [129].

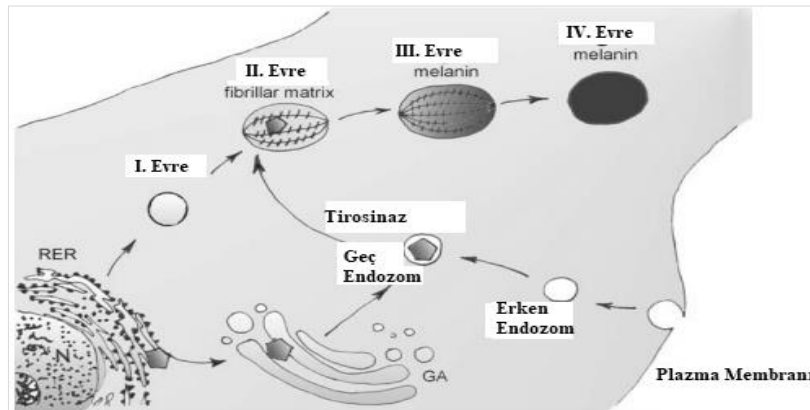
Cilt, vücudun en önemli dokularından birisidir ve vücudu dış ortamla doğrudan temastan kaynaklanan zararlardan korumaktadır. Ultraviyole (UV) ışınlar cildi zedeleyen çevresel faktörler arasında en yaygın ve en zararlı olanı olarak görülmektedir. Ayrıca UV ışınlarına maruz kalmak, melanositlerin içinde melanositlerden keratinositlere kadar melanin oluşumu ve iletimi için entegre bir mekanizmayı harekete geçirmektedir [132].

1.6.2. Klinik Açısından Tirosinaz Enzim İnhibisyonunun Önemi

Tirosinaz veya polifenol oksidaz (PFO) katalizli esmerleşme, sadece enzimin inaktive edilmesiyle değil, aynı zamanda enzimatik reaksiyon için gerekli olan O₂ veya fenolik substratın ikisinin ya da birinin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla da önlenir. Tirosinaz enziminin en yüksek katalitik etkisinin oda sıcaklığı ve pH=7,0'da olduğu bildirilmektedir.

Buna karşılık yüksek sıcaklık, $pH > 8,0$ veya $pH < 5,0$ 'da kararlılıktan sapmalar gözlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda araştırmacıların fenolik bileşenleri gidermek için tirozinaz enzimini $pH = 7,0$ ortamında kullandıkları görülmektedir [133]. Ayrıca enzimatik esmerleşme, enzimatik olarak oluşturulan kinonik ürünlerin bloke edilmesiyle ve enzimatik olmayan reaksiyonların sebep olduğu renkli bileşiklerin oluşumunun engellenmesiyle de önlenmektedir. Bununla birlikte polifenol oksidazın birçok inhibitörü bilinmektedir ve günümüzde esmerleşmeyi önlemek için bu inhibitörlerden bazıları kullanılmaktadır [134]. Tirozinaz, melanin oluşumunda etkin bir şekilde görev almaktadır. Bu durum tirozinaz enziminin tıbbi alanda ilgi çekici hale getirmektedir. Melanin heteropolimer yapıda ve suda çözünmeyen bir yapı olup 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit ve 5,6-dihidroksiindol birimlerinden oluşmaktadır. Melanin biyosentezini nasıl olduğu ilk olarak 1928 yılında Raper tarafından bitkiler ve böcekler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarla ortaya konulmuştur [135]. Melaninin hücrede oluşumu Şekil 14'de gösterilmektedir.

Spesifik inhibitörlerin insan derisi yüzeyine topikal uygulanmasının UV tarafından tahriş olmuş ve kuru cilt üzerinde faydalı etkilere sahip olabileceği öngörülmektedir, ancak henüz yeterli klinik çalışmalar yapılarak tam olarak kanıtlar ortaya konulmamıştır. Bir monooksijenaz olan tirozinaz, melanositlerde melanin sentezini katalize eden önemli bir enzimdir. Aşırı epidermal pigmentasyonun birikmesi, yaş, çillenme, yaşlılık lekeleri ve aktinik hasar bölgeleri ile ilişkili melasma gibi çeşitli dermatolojik hastalıklara yol açtığı için tirozinaz inhibitörleri, ilaçlarda ve kozmetiklerde enzimatik inhibisyon yoluyla hiperpigmentasyonun önlenmesi için giderek daha önemli hale gelmektedir [132].



Şekil 14. Melaninin hücrede oluşumu [136].

Bir PFO inhibitörü olarak üzerinde en çok çalışılan madde askorbik asittir [138, 139]. PFO'nun bir diğer etkili inhibitörü sisteindir. Sistein tarafından PFO'nun inhibisyonunun, enzimin difenolaz aktivitesiyle oluşan *o*-kinonlarla sisteinin tiyol konjugatlarını oluşturmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Ayrıca sistein, oluşan *o*-kinonları ilgili fenollerine indirgeyerek de inhibisyon sağlamış olur. PFO, prostetik grup olarak bakır içeren bir metaloenzim olduğu için siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil ditiyokarbamat, merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilmektedir [140]. 2-hidroksi-4-metoksi benzaldehid, sinnemaldehid, aris aldehid, 3,4-dihidroksi sinnamik asit ve kumik asit gibi çok sayıda aldehid türevinin PFO için potansiyel inhibitörlar olabileceği belirlenmiştir [141]. Bunlara ilave olarak, çeşitli sentetik orjinli PFO inhibitörleri de rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları anti-depresan bir ilaç olan kaptoril [(2S)-1-(3-merkapt-2-metilpropionil)-L-prolin] ve anti-troid bir ilaç olan methimazol (1-metil-2-merkaptimidazol)'dür. Hidrojen peroksit, hidroksilamin, tiyoller ve aromatik karboksilik asitler gibi birçok kimyasalın da inhibitör olarak PFO aktivitesini inhibe edici özelliğe sahip olduğu bilinmektedir [141]. Literatürde bu moleküller dışında tirozinaz inhibitörü olabilecek birçok organik molekül sentez edilmiş veya doğal ürünlerden izole edilmiştir. Örneğin, Miyazawa vd. siyah pirinç kepeğinden tirozinaz inhibitörü olabilecek bazı fenolik maddeleri çeşitli çözücüler kullanarak izole etmişlerdir [142]. Hamidian (2013) bazı azo bileşiklerini, Shu-Bai vd. (2010) bazı 1,2,3-triazol türevi bileşiklerini ve Ghani ile Ullah (2010)'da bazı 1,3,4-tiyodiazol, 1,3,4-okzadiazol, 1,2,4-triazol ve substitue hidrazid bileşiklerini alternatif tirozinaz inhibitörü olarak sentez etmiş ve bu moleküllerin inhibitör potansiyellerini incelemişlerdir [143-145]. Ayrıca gıdalardaki esmerleşme reaksiyonları açısından önemli bir örnek olması nedeniyle Ismaya vd. (2011) mantar (*Agaricus bisporus*) tirozinazının substrat bağlama bölgesi ile tropolon'un etkileşimini moleküler modelleme çalışmalarıyla üç boyutlu olarak ortaya koymaya çalışmışlardır [126]. Morrison (1982) yaptığı çalışmalarda genellikle tirozinaz inhibitörlerinin yarışmalı inhibisyon mekanizması gösterdiğini belirtmiştir. Örnek olarak L-mimosin [146] tropolon [147] ve kojik asit yarışmalı inhibitör sınıfında yer almışlardır [148]. Bunların yanında literatürde tirozinaz inhibisyonuyla ilgili (2E)-alkenal grubundan 7, 8 ve 9 karbonlu bileşikler, sitral, benzaldehid, anisaldehyd, kuminaldehyd, sinnemaldehid ve *p*-hidroksibenzaldehid'in yarışmasız, 2-hidroksi-4-metoksibenzaldehid'in ise yarışmalı inhibisyon mekanizması gösterdiği bilgileri mevcuttur [149].

Melanin, esas olarak cilt, saç folikülleri ve gözlerde bulunan melanositler olarak adlandırılan spesifik hücreler tarafından üretilen heterojen bir biyopolimerdir [150]. Koruyucu renklenmeyi sağlamanın yanı sıra melaninler, sitoplazma içinde üretilen serbest radikallerin bertaraf edilmesinde ve UV ışığını da içeren çeşitli iyonize edici radyasyon türlerinden korumada önemli bir rol oynamaktadır [151, 152]. Bununla birlikte, aşırı melanin birikimi melasma, iltihap sonrası melanoderma ve solar lentigo gibi hiperpigmentasyona neden olabilmektedir [153-155]. Melanin, tirosinin amino asidinin bir dizi oksidatif reaksiyonu yoluyla tirosinaz enzimi varlığında oluşmaktadır [156, 157]. Bu nedenle, birçok tirosinaz inhibitörünün tirosinaz aktivitesini ve dolayısıyla melanini inhibe ettiği bilindiği için cilt beyazlatıcı ajanlar olarak kozmetikte pigmentasyon bozukluğunu düzeltmek için kullanılmaktadır. [127, 158-160]. Tirosinaz enzim aktivitesinin bazı kanser türlerinde de arttığı gözlenmiştir. Bunun sonucu olarak tirosinaz enziminin inhibisyonu ile bu kanser türlerinin tedavi edilme sürecine dayalı çalışmalar yapılmıştır [161]. Tirosinaz, memelilerde melanozomlarda bulunmaktadır. Melanozomlar melanosit hücrelerindeki özelleşmiş sitoplazmik granüller olarak adlandırılmaktadır. Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de tirosinaz inhibitörlerine başvurulmaktadır [162-164]. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda tirosinaz inhibitörü olarak kozmetikte kullanılan bazı molkeüllerin sitotoksikite, cilt kanseri ve dermatit gibi ciddi yan etkileri olduğu ve kullanım için uygun olmadığı bildirilmektedir. Bu toksik etkiler göz önüne alındığında cilt beyazlatma ajanı olarak potansiyel tirosinaz inhibitörü etkisi bulunan yeni moleküllerin geliştirilme çalışmalarının oldukça popüler olduğu görülmektedir [165]. Aşırı melanin üretimi ya da anormal dağılımı albinizm, melisma ve yaşlanmayla ilgili noktalar gibi derideki düzensiz hiperpigmentasyona ve cilt kanserine neden olabilmektedir [145].

Melanin pigmentinin azaltılması sadece cilt kanserini engellemek amacıyla kullanılmamaktadır. Aynı zamanda dünya nüfusunun yaklaşık %15'i tarafından özellikle Asya bölgesinde estetik kaygılar için cilt beyazlatıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Global endüstri analistleri (GIA), cilt beyazlatıcılar için evrensel pazarın 2020 yılında özellikle Hindistan, Japonya ve Çin pazarlarında 23 milyar dolara ulaşmasını öngörmektedirler [12].

1.6.2.1. Melanoma

Dünya Sağlık Örgütüne göre günümüzde kanser tipleri sürekli olarak değişmektedir [166]. Uluslararası Kanser Araştırma Derneği'nin 2018 yılı verilerine göre bu kanser

vakasının sayısının 18 milyon olduğu ve bunun yaklaşık 10 milyon kadarının hayatını kaybettiği bilinmektedir. Bu verilere göre dünyada her 5 erkek ve 6 kadından birinin hayatları boyunca en az bir kez kanser hastalığı ile yaşamını sürdürmek zorunda olduğu, her 8 erkek ve 11 kadından birinin kanser nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmektedir. Dünya çapında yapılan araştırmalarda beş yıllık ortalama kanser teşhisi sayısının 43,8 milyon olduğu görölmektedir. Bu durum artan kanser hasta sayısı, nüfus artışı ve yaşlanmanın yanı sıra sosyal ve ekonomik gelişme düzeyi gibi pek çok faktörden kaynaklanmaktadır. Özellikle hızlı büyüyen ekonomilerde ve sanayileşmiş ölkelerde daha tipik olan yaşam tarzları ile ilişkili kanser hastalıkları, yoksulluğa bağlı kanserlerden kayma gözlenmektedir [167].

Amerika Birleşik Devletleri ile Avrupa'da her yıl 11.000-15.000 arasında kişinin ölümine sebep olarak gösterilen melanoma, kanser tipleri arasında en ölümcül deri kanseri olarak sınıflandırılmaktadır [168]. Melanomanın, Ukrayna'daki kadın hastalarda ilk beşte olduğu görölmektedir. İngiltere'de ise erkeklerde tüm kanser ölümlerinin %2'sinin melanomaya bağlı olduğu tahmin edilmektedir [169]. Son zamanlarda tedavi amaçlı yeni ilaçlar sentezlenmekte, fakat bu ilaçlardan tedavi sürecinde etkili ve yeterli olmadığı görölmektedir. Bu nedenle melanoma tedavisi için uygun ilaç ve spesifik yöntemler araştırma çalışmaları devam etmektedir [170].

1.6.3. Tirosinaz Aktivitesi Tayin Yöntemleri

PFO'ların monofenolaz ve difenolaz aktivitelerinin belirlenmesi için sıklıkla aynı spektrofotometrik yöntem kullanılmaktadır. Yöntem, 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) ile polifenol oksidaz varlığında *p*-hidroksifenil propiyonik asit ve 3,4-dihidroksifenil propiyonik asit oksidasyonunun kinon ürünü arasındaki birleştirme reaksiyonuna dayanmaktadır. MBTH-kinon eklentisi için lamda (maks) ve molar emilim (epsilon) katsayısı hesaplanmaktadır. Reaksiyon ortamında MBTH'nin varlığı, monofenol aktivitesinin ekspresyonu sırasındaki gecikme süresini azaltmaktadır. Yüksek Vmax değeri, yüksek bir katalitik sabitinin varlığını gösterir. Bu durum MBTH-kinon için epsilon değeri ile birlikte, bu metodu diğer ölçüm metotlarından daha hassas kılmaktadır [171].

1.7. Hücre Ölümü

Normal fizyoloji ve doku fonksiyonunu korumak için hasar görmüş, işlevsiz ve yaşlı hücreler düzenli hücre ölümü yoluyla parçalanarak ortadan kaldırılır. Sağlıklı olan hücreler ise belli şartlar korunarak proliferasyonla çoğalır. Hücre proliferasyonu/ve hücre ölümü arasındaki hassas dengenin bozulması kanser, nörodejeneratif, kardiyovasküler, otoimmün ve bulaşıcı hastalıklar da dahil olmak üzere, dünya genelinde önde gelen ölüm ve sakatlık nedenlerini oluşturan hastalıkların oluşmasına neden olur [172].

1.7.1. Apoptoz

“Apoptoz” terimi, “bırakma” anlamına gelen Yunanca kelimedenden türetilmiş olup “sonbaharda yaprakların ağaçlardan düşmesi” anlamına gelmektedir. Kerr ve arkadaşları tarafından 1970’lerde apoptoz tanımlandığından beri, biyolojik araştırmalar arasında sıklıkla çalışılan konulardan birisi olduğu bildirilmektedir [173]. Apoptoz, programlanmış hücre ölümü için doğal bir mekanizma olup gereksiz veya istenmeyen hücrelerin yok edilmesine hizmet eden oldukça etkin bir işlemdir. DNA hasarı veya kontrolsüz hücre çoğalması da dâhil olmak üzere apoptotik yolun aktive olmasına neden olacak pek çok hücrel koşul bulunmaktadır [174]. Apoptoz omurgalılarda doku homeostazının sağlanması ve kontrolsüz hücre çoğalmasının engellenmesinde son derece önemlidir. Genellikle akut hücre travmasından kaynaklanan düzensiz hücre ölümü biçimi olan nekrozun aksine, apoptoz enerji girişi gerektirir ve bu nedenle aktif bir süreçtir [172].

Apoptotik yol, hücre içi (intrinsik) ve hücre dışı (ekstrinsik) sinyallerle aktive edilebilen temelde iki farklı yolak üzerinden işlemektedir. Bu yollarla sırasıyla mitokondri ve ölüm reseptörlerine bağlı sinyalizasyonun aktivasyonu ile çalışmaktadır. Apoptoz sinyali olduğu anda, hücre içinde değişiklikler meydana gelmeye başlamaktadır. Bu değişiklikler, hücre iskelet ve nükleer proteinler gibi normal hücrel fonksiyon için gerekli hücrel bileşenleri parçalayan kaspaz enzimlerinin aktivasyonunu içermektedir. Kaspaz aktivitesinin bir sonucu olarak apoptotik hücreler büzölmeye başlar ve makrofajlar tarafından fagosite edilmeye işaret edecek olan plazma membranı değişikliklerine uğrar [174].

1.7.2. Kanser ve Apoptoz

Apoptozdan kaçabilme yetenekleri kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden birisidir. Kanser hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu pro-apoptotik yollar aktiflenirken, apoptotik yollar ise inhibe durumda bulunur [175, 176]. Kanserde hücre bölünmesi ile hücre ölümü arasındaki denge bozulmuştur ve hücreler hücre ölümünü indükleyecek olan sinyalleri algılamamaktadır. Buradaki sorun apoptoz yollarındaki herhangi bir bileşenin eksikliğinden kaynaklanabilmektedir. Örneğin kanser hücrelerinin %50'sinden fazlasında en önemli pro-apoptotik proteinlerden olan Bcl-2 ekspresyonu artmıştır. Yine pek çok kanser hücre tipinde “genomun gardıyanı” olarak da bilinen ve en önemli tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilen *p53* geninin azalmış ifadesi söz konusudur [173, 174]. Genel olarak kanser hücrelerinin apoptozdan kaçışları şu alt mekanizmalar üzerinden ilerlemektedir:

- a) Pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesinin bozulması
- b) Azalmış kaspaz aktivitesi
- c) Bozulmuş ölüm reseptörü sinyalizasyonu.

Bu sebeplerden dolayı apoptoz indüksiyonu kanser terapisinde potansiyel hedef mekanizmalardan birisidir. Pek çok sentetik veya doğal ürün kaynaklı bileşiğin anti-kanser etkileri apoptotik özellikleri araştırılarak ortaya konulmaktadır [173].

1.7.3. Apoptoz Tayin Metotları

Apoptoz, hücre morfolojideki değişiklikler (büzülme, plazma membranının şişmesi, apoptotik cisimciklerin oluşumu), nükleer bozulmalar (kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması) ve bazı sitoplazmik değişiklikler ile karakterize edilir. Yapısal ve fonksiyonel özelliklere dayanarak, apoptozun belirlenmesinde kullanılan bazı yöntemler aşağıda verilmiştir.

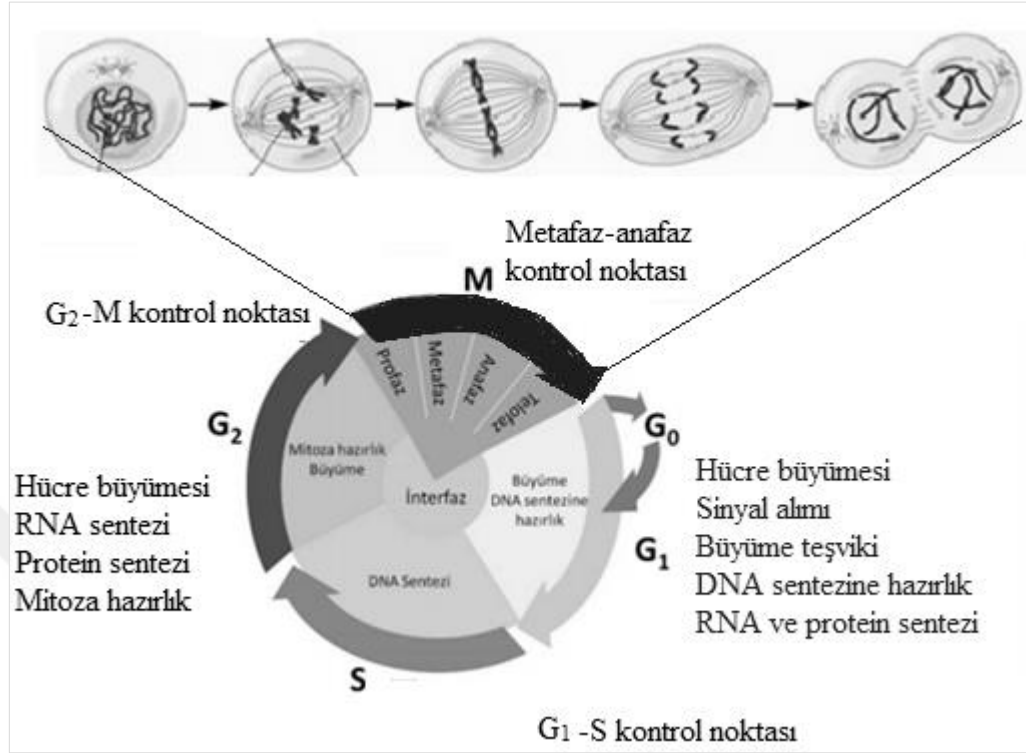
- a) Mitokondriyal hasarı belirleyen yöntemler (MTT assay, XTT assay, sitokrom c salınımının belirlenmesi, mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi),
- b) Akım ve lazer tarama sitometrisine dayalı yöntemler (Floresans aktive edici hücre sıralama (FACS), anneksin-V boyama).

Anneksin-V, fosfatidil serin (PS)'e yüksek afinitesi olan kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayıcı proteinlerin bir üyesidir. Sağlıklı hücrelerde PS çoğunlukla hücre membranının iç

yaprağında bulunmaktadır. Apoptozun aktifleşmesi ile birlikte membranın iç yaprağında bulunan PS, flippaz enzim aktivitesi sonucu dış yaprağa çıkartılmaya başlanır. Erken dönemden başlamak üzere apoptoz varlığı hücre membranının dış yaprağında bulunan PS'ye yüksek afinite ile bağlanan floresan etiketli anneksin-V ile tespit edilebilmektedir. Yöntem floresans bazlı olduğu için akım sitometrisi, floresan mikroskop veya flourometre gibi ekipmanlarla uygulanabilmektedir. Metotta nekrotik hücreleri apoptotik hücrelerden ayırmak için 7-amino-aktinomisin (7-AAD) veya propidyum iyodür (PI) gibi membranı geçemeyen boyalardan bir tanesi anneksin-V ile kombine şekilde uygulanmaktadır [177].

1.8. Hücre Döngüsü

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesinin hücre ölüm hızını aştığı zaman ortaya çıkan kontrol edilemeyen hücre çoğalması ile karakterize patolojik bir durumdur. Bu önlenemeyen hücre çoğalmasının hücre döngüsünün kontrolünün ortadan kalkmasıyla oluştuğu bildirilmektedir [178]. Hücre döngüsü, hücrenin kaderini yöneten ve döngünün devam edip etmemesine karar veren, alınan büyüme düzenleyici sinyalleri yorumlayan hücresel bir mekanizmadır [179]. Döngü birbirini takip eden dört aşamadan oluşmaktadır: G₁ (gap=boşluk), S (sentez), G₂ ve M (mitoz). Dinlenme halinde G₀ evresinde bulunan hücreler ilgili çoğalma sinyalini alınca G₁ fazına, oradan da yoğun DNA sentezinin gerçekleşeceği S fazına geçerler. S fazını, hücrelerin M fazında bölünme için hazırlandığı G₂ fazı izler. Bölünmeye hazır hücre M fazına geçerek sırasıyla profaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamaları ile mitozu sonlandırır. Hücre döngüsünde bir fazdan diğer faza geçiş siklin ve siklin bağımlı kinazlar tarafından yönlendirilir. Her bir fazdan diğerine geçişte ayrıca hücre döngüsü kontrol noktaları (cell cycle check points) bulunmaktadır (Şekil 15) [180, 181]. Normal koşullarda kontrol noktaları bir önceki fazı eksiksiz bir şekilde tamamlayan hücrenin bir sonraki faza geçişe izin verirler. Eğer faz geçişine engel bir durum (DNA hasarı gibi) tespit edilirse hücre döngüsü durdurulur (cell cycle arrest) ve hücreye ilgili hasarı tamir etmesi için zaman kazandırılır. Hasar ortadan kaldırılırsa döngü kaldığı yerden işlemeye devam eder. Eğer hasar tamir edilemezse organizmayı koruma altına almak adına hasarlı hücre için apoptoz yolağı aktifleştirilir. Kanser hücrelerinin pek çok tipinde hücre döngüsü kontrol noktaları işlevini kaybetmiş olduğundan döngü sürekli olarak aktiftir ve bu nedenle hücreler sürekli olarak mitozu uğramaktadır. Bu nedenle hücre döngüsü kontrol noktalarının aktivasyonu kanser terapisinde stratejik bir hedeftir [178, 182, 183].



Şekil 15. Hücre döngüsü evreleri [180, 181].

1.9. Çalışmanın Pratik Amacı ve Önemi

Bu çalışmada amaç, bazı triazol bileşiklerinin, klinik öneme sahip α -amilaz ve tirozinazın aktiviteleri üzerine inhibitör etkinliklerinin deneysel, teorik ve *in vitro* hücre kültürü çalışmalarıyla değerlendirmektir. Ayrıca biyokimyasal ve kinetik açıdan etkili bulunan bileşiklerin *in vitro* hücre kültürü şartlarında sitotoksik etkileri incelenmektedir. Burada temel amaç etken madde için faz çalışmalarına geçmeden önce enzim inhibitörleri ve anti-kanser özelliğe sahip potansiyel yeni bileşikler önermektir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Malzemeler

Çalışmalarda kullanılan cihazlar, sarf malzemeler ve kimyasallar sırasıyla Tablo 2 ve 3'te sunulmaktadır.

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan gereçler ve sarf malzemeler

Cihaz	Marka/Model
Hava banyolu çalkalayıcı	IKA, KS 4000 i Shaker
pH metre	InoLab, WTW pH 720
Buz makinesi	Hoshizaki, FM-80EE
Vorteks	Thermolyne, Type 37600 Mixer
Saf su cihazı	Sartorius, Arium 611UV
Isıtıcı	HS31, Chiltren
Spektrofotometre	Perkin Elmer, Lambda 25
Buzdolabı	Profilo, BD4303ANFE
Terazi	Ohaus, Pioneer
Derin dondurucu (-30°C)	Regal, RDD-1280
Manyetik karıştırıcı	HS31, Chiltren
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Acura 825, Socorex
Su banyosu	Memmert
Vorteks (karıştırıcı)	IKA, Genus 3
Mikrosantrifüj	Sigma, 1-14
Çeşitli cam malzemeler	Isolab
Mikrotüpler için termal çalkalayıcı	Boeco, TS-100 Thermo Shaker
Hava banyolu çalkalayıcı	Barnstead/Lab-Line, MaxQ Mini 4450 Shaker
Güç kaynağı	Thermo, EC 1000XL
Hücre kültürü kabini	Class II, ESCO
Karbondioksit destekli inkübatör	Hepa Class 100, Nüve
Soğutmalı santrifüj	Thermo
İnverted mikroskop	Carl Zeiss
Otoklav	Tomy SS-325
Mikropleyt okuyucu spektrofotometre	Molecular Devices Versamax
Akim sitometri	BD Accuri C6
Azot tankı	Thermo Fisher
Membran filtreleri (0,2 µm)	Sartorius Stedim Minisart
T-25 hücre kültür flaskları	Corning ve Greiner
T-75 hücre kültür flaskları	Sarsted
Steril 15 mL hacimli falkon tüpler	CAPP, Corning
Steril 50 mL hacimli falkon tüpler	CAPP, Corning
Steril 96 kuyucuklu pleytler	Corning
Steril 5 mL hacimli serolojik pipetler	LP, CAPP
Steril 10 mL hacimli serolojik pipetler	LP, CAPP
Steril 0.1-1000 µL hacimli pipet uçları	Axygen ve Grenier

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan enzim ve kimyasallar

Enzimler/Kimyasallar	Satın alındığı firma/Kodu
α -Amilaz (<i>Bacillus subtilis</i>)	Sigma, A6380
Akarboz	Sigma, J61737
Çözünür nişasta	Merck, 1012520250
Dinitrosalisilat	Sigma, D0550
di-Potasyum hidrojen fosfat	Merck, 1.05101.1000
N,N-dimetil formamid	Sigma, 227056
Steril dimetil sülfoksit	Sigma, S0481
Dimetil sülfoksit	Sigma 276855
Etanol	Sigma, 32221
İyot	Merck, 1047610100
Sodyum hidroksit	Sigma, 06203
Potasyum iyodür	Merck, 1050430250
Kojik asit	Sigma, K3125
L-Tirosin	Sigma, T3754
Mantar tirozinazı	Sigma, T3824
3-Metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorid hidrat	Sigma, 129739
Potasyum di-hidrojen fosfat	Merck, 1.04873.1000
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Sigma, D6429
Rosewell Park Memorial Institute-1640 Medium	ATCC, Sigma
Föetal bovin serumu	Thermo, 10270106
Non-essential amino asit solüsyonu	Biotech, p08-41100
Streptomisin–Penisilin solüsyonu	Wisent, 450101100
Dulbecco's phosphate-buffered saline	Pan Biotech
Tripsin-EDTA (%0,25)	Wisent, 325542100
Anneksin-V apoptoz kiti	BD, 556547
DNA içerik (hücre döngüsü) analiz kiti	BD, 340242

2.1.2. Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

2.1.2.1. Enzim Aktivite Çalışmaları İçin Kullanılan Çözeltiler

2.1.2.1.1. Tampon çözeltiler

Çalışmalarda kullanılan tampon çözeltiler Tablo 4'te verilmektedir.

Tablo 4. Tampon çözeltiler (50 mM, 50 mL)

Tampon Çözelti	pH	Ayarlayıcı (1N)	Miktar
Tris-HCl	8,0	HCl	0,3028 g tris
Tris-HCl	9,0	HCl	0,3028 g tris
Asetat	5,0	CH ₃ COOH	0,34 g NaCH ₃ COO
Fosfat	6,0	NaOH	0,05 g K ₂ HPO ₄ + 0,64 g KH ₂ PO ₄
Fosfat	6,5	NaOH	0,14 g K ₂ HPO ₄ + 0,57 g KH ₂ PO ₄
Fosfat	7,0	NaOH	0,33 g K ₂ HPO ₄ + 0,42 g KH ₂ PO ₄
Glisin-NaOH	8,0	NaOH	0,187 g C ₂ H ₅ NO ₂
Glisin-NaOH	9,0	NaOH	0,3799 g C ₂ H ₅ NO ₂
Mcilvaine	4,0	NaOH	62 mL A* + 38 mL B** karışımından 18,1 mL
Mcilvaine	5,0	NaOH	49 mL A* + 51 mL B** karışımından 16,6 mL
Mcilvaine	6,0	NaOH	37,4 mL A* + 62,6 mL B** karışımından 15,3 mL
Mcilvaine	7,0	NaOH	19 mL A* + 81 mL B** karışımından 13,8 mL

A*: 0,1 M, 5,253 g C₆H₈O₇.H₂O saf su ile çözülüp hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

B**: 0,2 M, 8,90 g Na₂HPO₄.2H₂O'nun saf su ile çözülüp hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

2.1.2.1.2. Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler

- *L-Tirosin Çözeltisi (10 mM, stok)*: 23 mg *L*-tirosin tartılıp saf su ile biraz ısıtılarak çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Gerektiğinde taze olarak hazırlandı.

- *Tirosinaz Çözeltisi (8 mg/mL, stok)*: 8 mg mantar tirosinazı tartılıp 1 mL Mcilvaine tamponunda (50 mM, pH 5,0) çözüldü. Gerektiğinde taze olarak hazırlandı.

- *α-Amilaz Çözeltisi (3,4 mg/mL, stok)*: 3,4 mg α-amilaz tartılıp, 1 mL 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) çözüldü. Gerektiğinde taze olarak hazırlandı.

- *Nişasta Çözeltisi (10 mg/mL)*: 0,1 g nişasta tartılıp bir miktar su ile bulamaç haline getirildi ve bir miktar kaynayan su içerisine ilave edildi. Ardından karışıma son hacim 10 mL olacak şekilde saf su ilave edildi.

- *MBTH çözeltisi (10 mM)*: 0,022 g MBTH tartılıp saf su ile 10 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.

- *Akarboz Çözeltisi (0,6 M, stok)*: 0,38 g akarboz tartılıp fosfat tamponunda (50 mM, pH 7,0) çözüldü ve son hacim tampon ile 10 mL'ye tamamlandı.

- *Dinitrosalisilik asit (DNSA) çözeltisinin hazırlanması*:

Çözelti A: 22 mL %1'lük NaOH çözeltisi üzerine az miktar suda çözünmüş 10 g fenol ilave edilip 100 mL'ye tamamlandı.

Çözelti B: 6,9 g sodyum bisülfid 69 mL *Çözelti A*'da çözüldü.

Çözelti C: 300 mL %4,5 NaOH, 225 g Na-K tartarat ve 880 mL % 5'lik 3,5 Dinitro salisilik asit karıştırıldı. Son olarak Çözelti B ve Çözelti C karıştırılarak DNSA çözeltisi hazırlandı.

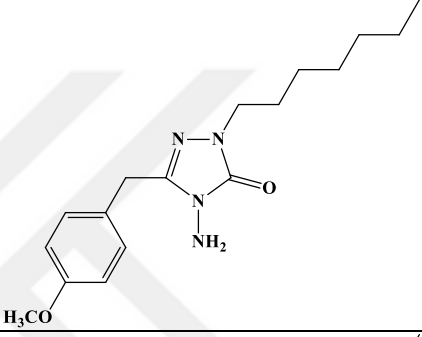
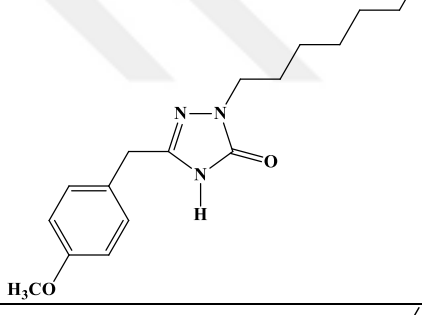
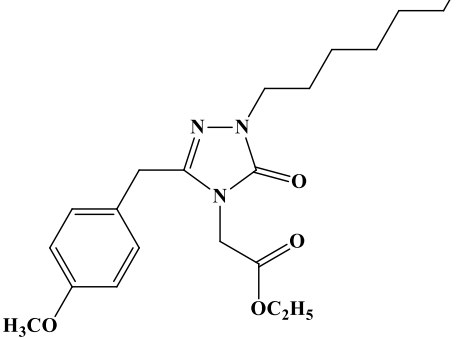
2.1.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Kullanılan Çözeltiler

- *İyot Çözeltisi*: 0,25 g I₂ ve 2,5 g KI 50 mL saf su içerisinde 37°C sıcaklıkta 150 rpm de karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler 4°C'de buzdolabında karanlıkta saklandı. Deney öncesi 1:100 oranında saf su ile seyreltilerek karanlıkta 37°C kadar getirilip kullanıldı.
- *Nişasta Çözeltisi*: 0,25 g nişasta yaklaşık 2 mL su ile bulamaç haline getirilip kaynamış saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. Sıcaklığı hücre kültürü ortamında kullanıma uygun olan 37°C'ye gelene kadar beklendi ve deneyler öncesi taze bir şekilde hazırlanıp kullanıldı.
- *MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) Çözeltisi (5 mg/mL)*: 1250 mg MTT boyası 7,5 mL steril DMSO ile çözüldü. Ardından balon jofede 250 mL'ye steril PBS ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti 0.2 µm'lik filtreden geçirildi ve 1'er mL (5 mg/mL) alikotlanarak deneylerde kullanılmak üzere -20°C'de stoklandı.
- *Sisplatin Çözeltisi (5 mM)*: 1,5 mg sisplatin 1 mL DMSO ile çözümlenerek deney günü taze olarak hazırlandı.
- *Kojik Asit Çözeltisi (10 mM)*: 1,5 mg kojik asit 1 mL DMSO ile çözümlenerek deney günü taze olarak hazırlandı.
- *Akarboz Çözeltisi (10 mM, stok)*: 0,0065 g akarboz tartılarak 1 mL saf suda çözümlenerek taze hazırlandı.
- *Sentetik Melanin Çözeltisi (1 mg/mL)*: 10 mg melanin üzerine ayarlanan %1'lik H₂O₂ (pH 10)'den 10 mL ilave edildi, vorteks ile 2 dakika çalkalanarak çözüldü. Siyah berrak bir çözelti oluştu. Bu çözelti her ölçümde yeniden kullanılmak üzere 300 µL lik alikotlar halinde -20°C'de saklandı.

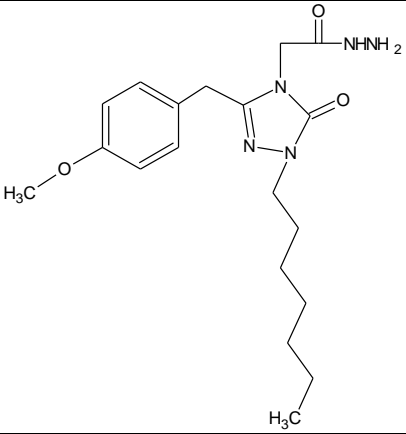
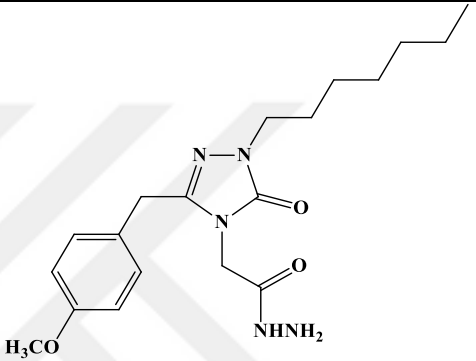
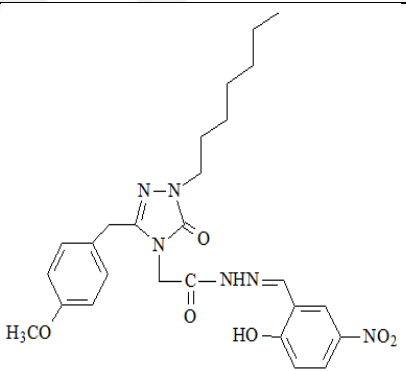
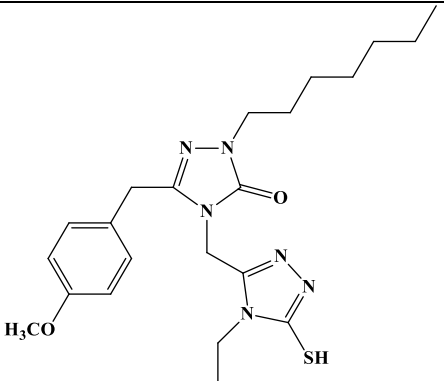
2.1.3. Çalışmada Kullanılan İnhibitör Bileşikleri

Çalışmalarda kullanılan organik bileşiklerin sentezi, KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Olcay BEKİRCAN'ın araştırma grubu tarafından gerçekleştirildi. Bu bileşikler Tablo 5'te sunulmaktadır [184-186].

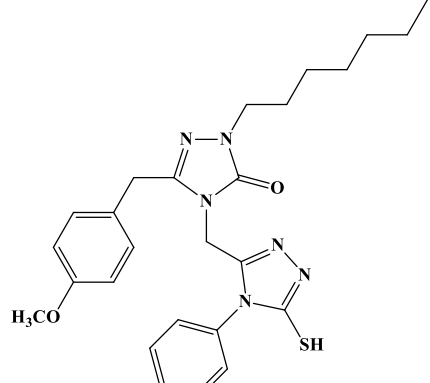
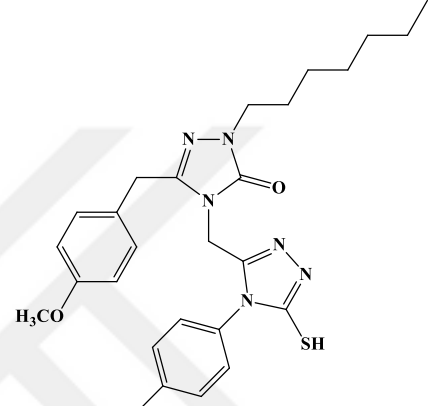
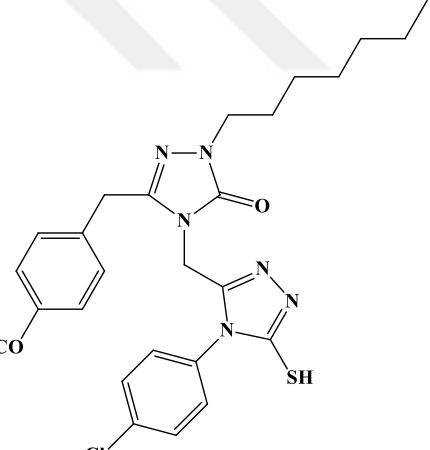
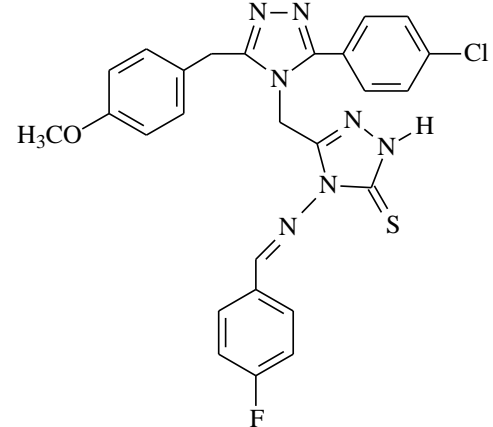
Tablo 5. Çalışmada kullanılan inhibitör molekülleri

Kodu	Adlandırması	Formülü
A1	4-Amino-2-heptil-5-(4-metoksibenzil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	
A2	2-heptil-5-(4-metoksibenzil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	
A3	Etil 2-[1-heptil-3-(4-metoksibenzil)-5-okso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]asetat	

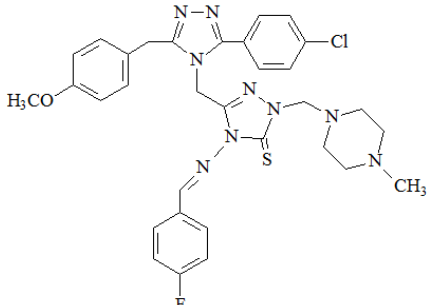
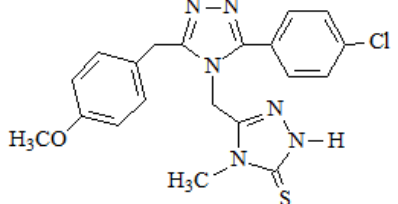
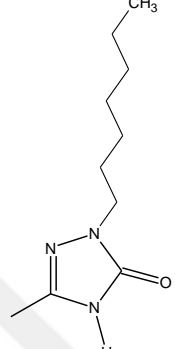
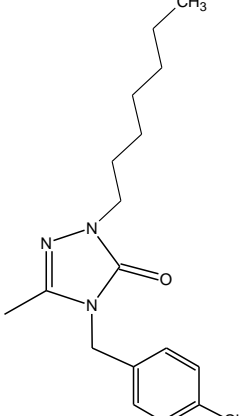
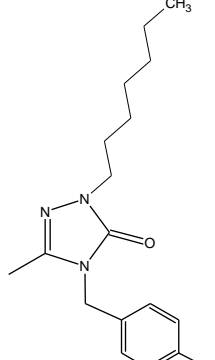
Tablo 5'in devamı

<p>A4</p> <p>2-[1-heptil-3-(4-metoksibenzil)-5-okso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il] asetohidrazid</p>	
<p>A6</p> <p>2-[3-(4-Metoksibenzil)-1-heptil-5-okso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-N-[(5-kloro-2-hidroksifenil)-etiliden]asetohidrazid</p>	
<p>A8</p> <p>2-[3-(4-Metoksibenzil)-1-heptil-5-okso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-N-[(2-hidroksi-5-nitrofenil)-metiliden]asetohidrazid</p>	
<p>A14</p> <p>2-Heptil-4-[(4-etil-4,5-dihidro-5-tion-1H-1,2,4-triazol-3-yl)metil]-5-(4-metoksibenzil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on</p>	

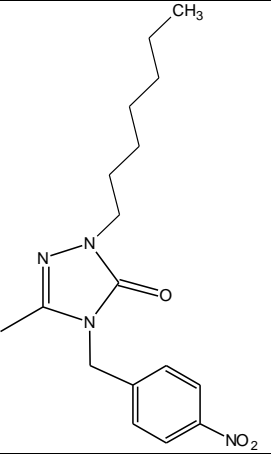
Tablo 5'in devamı

A15	2-Heptil-4-[(4-fenil-4,5-dihidro-5-tion-1H-1,2,4-triazol-3-il)metil]-5-(4-metoksibenzil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	
A16	2-Heptil-4-{[4-(4-florofenil)-4,5-dihidro-5-tion-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}c-5-(4-metoksibenzil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	
A17	2-Heptil-4-{[4-(4-klorofenil)-4,5-dihidro-5-tion-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-5-(4-metoksibenzil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	
B5	4-{[4-(Florofenil)metiliden]amino}-5-{[3-(4-klorofenil)-5-(4-metoksibenzil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]-metil}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion	

Tablo 5'in devamı

B9	4-{{[4-(Florofenil)metiliden]amino}-2-(4-metilpiperazin-1-il)-5-{{[3-(4-klorofenil)-5-(4-metoksibenzil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]metil}}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion	
B13	5-{{[3-(4-klorofenil)-5-(4-metoksibenzil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]metil}}-4-metil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion	
C1	2-heptil-5-(metil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	
C2	2-heptil-4-(4-klorobenzil)-5-(metil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	
C3	2-heptil-4-(4-bromobenzil)-5-(metil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	

Tablo 5'in devamı

C4	2-heptil-4-(4-nitrobenzil)-5-(metil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	
-----------	--	---

2.2. Yöntem

2.2.1. Enzim Aktivite Tayinleri

2.2.1.1. α -Amilaz Aktivitesi Optimizasyonu

α -Amilaz aktivitesi, nişastayla amilaz enziminin etkileşimi sonucu açığa çıkan indirgen şekerin miktarının hesaplanması esasına dayanan DNSA (3,5-dinitrosalisilik asit) metodu ile belirlendi. Bu metodun prensibi aldehit (glukoz) veya keton (fruktoz) gruplarının oksidasyonuna dayanır. Serbest aldehit veya keton grubuna sahip şekerler, alkali koşullar altında DNSA'yı, 3-amino-5-nitro salisilik aside indirgeyerek kırmızı-kahverengi renk oluşumuna neden olurlar. Renk şiddetindeki artış indirgen şeker miktarıyla orantılıdır [187].

α -Amilaz aktivitesini belirlemek için sırasıyla tampon, substrat ve enzim çözeltisi karıştırılarak 15 dakika boyunca 40°C'de su banyosunda bekletildi (Tablo 6). Bu süre sonunda su banyosundan alınan örneklere eşit hacimde DNSA eklendi ve reaksiyon karışımı tekrar 10 dakika boyunca 100°C'deki su banyosu içinde inkübe edildi [188]. İşlem tamamlandıktan sonra oda sıcaklığıyla ısıl dengenin sağlanması nedeniyle 15 dakika bekletildi ve daha sonra reaksiyon karışımının 540 nm'de kontrole karşı absorbansı okundu. Bir ünite enzim aktivitesi, reaksiyon şartlarında 1 dakikada açığa çıkan 1 μ mol maltoz miktarı olarak hesaplandı [189-191].

Tablo 6. α -Amilaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kontrol (μ L)	Numune (μ L)
Fosfat tamponu	650	630
Nişasta çözeltisi	50	50
α -Amilaz çözeltisi	--	20
DNSA	700	700

2.2.1.1.1. Optimum Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi

α -Amilaz enzimi için aktivitenin optimizasyonu ve inhibisyon çalışmalarındaki reaksiyon karışımına ilave edilmesi gereken enzim konsantrasyonunu belirlemek için 0,35 mg/mL nişasta substratı varlığında, oda sıcaklığında ve 50 mM fosfat tamponu pH 7,0'de enzim konsantrasyonu 0,09-250 ng/mL arasında değişen bir seri aktivite ölçümü Bölüm 2.2.1.1.'de anlatıldığı gibi yapıldı. Reaksiyon bileşenleri Tablo 6'daki sırayla ilave edilerek reaksiyon karışımı oluşturuldu. Ölçümlerden sonra hesaplanan enzim aktiviteleri enzim konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi. Bu grafikten belirlenen ve ilk hız ölçümlerinin doğru bir şekilde yapılabileceği uygun bir enzim konsantrasyonu belirlendi. Çalışmaların devamı belirlenen bu konsantrasyonda sürdürüldü.

2.2.1.1.2. Optimum Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

α -Amilaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için, 25 ng/mL enzim konsantrasyonunda, oda sıcaklığında ve 50 mM fosfat tamponu pH 7,0 varlığında 0,2-1,05 mg/mL nişastanın değişen substrat konsantrasyonları için reaksiyon çözeltileri Tablo 6' daki sırayla hazırlandı ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri hesaplandı. Çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

2.2.1.1.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Optimum sıcaklık ($^{\circ}$ C) belirleme çalışmaları için tespit edilen enzim, substrat ve sabit pH değerlerinde ve 10-90 $^{\circ}$ C aralığında değişen sıcaklıklarda reaksiyon çözeltileri hazırlandı. Tablo 6'daki sırayla çözeltiler reaksiyon karışımını oluşturmak üzere ilave edildi ve

ölçümler Bölüm 2.2.1.1'deki gibi yapıldı. Sıcaklık-%Bağlı Aktivite grafiği çizildi. En yüksek aktivite görülen değer optimum sıcaklık değeri olarak belirlendi [192].

2.2.1.1.4. Optimum pH'nın Belirlenmesi

Optimum pH belirleme çalışmaları için tespit edilen enzim, substrat ve sıcaklık değerinde Tablo 4'de verilen tampon çözeltilerden asetat, fosfat ve glisin-NaOH tamponları kullanılarak pH 5,0-9,0 arası için Tablo 6'daki sırayla çözeltiler reaksiyon karışımına ilave edildi. Her bir reaksiyon karışımı için ölçümler Bölüm 2.2.1.1'deki anlatıldığı gibi yapılarak pH-% Bağlı Aktivite grafiği şeklinde çizildi. En yüksek aktivite görülen değer optimum pH değeri olarak belirlendi [193].

2.2.1.2. Tirosinaz Aktivitesi Optimizasyonu

Tirosinaz aktivitesi ölçümü için Tablo 7'de verilen reaksiyon bileşenleri, oda sıcaklığında ve belirtilen sırayla mikrohacimli kapaklı tüpe ilave edilerek vortekslendi. Homojen karışım spektrofotometre küvetine alındı ve son olarak enzim çözeltisi otomatik pipet yardımı ile ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı ile spektrofotometrede kontrole karşı 500 nm'de 1 dakika boyunca kinetik ölçüm alındı. Tirosinaz aktivitesi absorbandsdaki artışın ölçülmesiyle belirlendi. Belirlenen bu değerler ünite cinsinden hesaplanarak grafiğe geçirildi. Molar absorpsiyon katsayısı $3700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ olarak kullanıldı [194]. Oluşturulan reaksiyon şartlarında, 1 dakikada açığa çıkan 1 μmol ürün miktarı bir ünite enzim aktivitesi olarak değerlendirildi [171, 195-197].

Tablo 7. Tirosinaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kontrol (μL)	Numune (μL)
Mcilvaine tamponu	936	876
MBTH	120	120
DMF	24	24
L-tirosin çözeltisi	120	120
Tirosinaz çözeltisi	--	60

2.2.1.2.1. Optimum Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Tirosinaz enzimi için aktivitenin optimizasyonu ve inhibisyon çalışmalarındaki reaksiyon karışımına ilave edilmesi gereken enzim konsantrasyonunu belirlemek için 1 mM *L*-tirosin substratı varlığında oda sıcaklığında ve 50 mM fosfat tamponu pH 6,5’da enzim konsantrasyonu 4,35-435 µg/mL arasında değişen bir seri aktivite ölçümü Bölüm 2.2.1.2.’de anlatıldığı gibi Tablo 7’deki sırayla hazırlandı ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Ölçümlerden sonra hesaplanan enzim aktiviteleri enzim konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi. Bu grafikten belirlenen ve ilk hız ölçümlerinin doğru bir şekilde yapılabileceği uygun bir enzim konsantrasyonu belirlendi. Çalışmaların devamı belirlenen bu konsantrasyonda sürdürüldü.

2.2.1.2.2. Optimum Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Tirosinaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için, 43,5 µg/mL enzim konsantrasyonunda, oda sıcaklığında ve 50 mM fosfat tamponu pH 6,5 varlığında 0,1-5 mM *L*-tirosinin değişen substrat konsantrasyonları için reaksiyon çözeltileri Tablo 7’deki sırayla hazırlandı ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri hesaplandı. Çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

2.2.1.2.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Optimum sıcaklık (°C) belirleme çalışmaları için tespit edilen enzim, substrat ve sabit pH değerlerinde ve 10-50°C aralığında değişen sıcaklıklarda reaksiyon çözeltileri hazırlandı. Tablo 7’deki sırayla çözeltiler ilave edildi ve ölçümler Bölüm 2.2.1.2’deki gibi yapıldı. Sıcaklık-% Bağlı Aktivite grafiği çizildi. En yüksek aktivite görülen değer optimum sıcaklık değeri olarak belirlendi [195].

2.2.1.2.4. Optimum pH’nın Belirlenmesi

Optimum pH belirleme çalışmaları için tespit edilen enzim, substrat ve sıcaklık değerinde Tablo 4’de verilen tampon çözeltilerden Mcilvaine ve Tris-HCl tamponları ile pH

4,0-9,0 arası için Tablo 7'deki sırayla çözeltiler ilave edildi. Ölçümler Bölüm 2.2.1.2'deki anlatıldığı gibi yapılarak pH-% Bağıl Aktivite grafiği şeklinde çizildi. En yüksek aktivite görülen değer optimum pH değeri olarak belirlendi.

2.2.2. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Çalışmaları

İnhibisyon çalışmaları için α -amilaz ve tirozinaz enzimlerinin Bölüm 2.2.1.'de belirtildiği şekilde aktivitelerinin optimizasyonu sağlandıktan sonra öncelikli olarak Tablo 5'de verilen moleküllerin her bir enzim üzerinde inhibisyon potansiyellerini görmek için uygun olan molekül grupları belirlendi. Burada seçim yapılırken enzim-substrat ilişkisinin gözleneceği aktif bölgenin kimyasal yapısı, literatürde belirtilen standart inhibitör moleküllerinin ve substratlarının yapısı göz önüne alınarak benzer yapılı olan moleküller seçilmeye çalışıldı. Tablo 5'deki moleküller katı formda olup bunların çözücü vasıtasıyla çözüldükten sonra reaksiyon ortamına katılması gerekmektedir. Tez çalışmaları sırasında kullanılacak olan her iki enziminde aktivitelerinin çözücülerden etkilenmemesi çözücü seçiminde önemli bir faktör oldu. Tüm deneyler sırasında inhibitör moleküllerini çözmek için kullanılan çözücüler kontrol karışımına ilave edildi ve inhibisyon değerleri buna göre hesaplandı. İnhibisyon çalışmaları sırasında kullanılan moleküller, uygun çözücülerde (DMSO, etanol) farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. Daha sonra tirozinaz inhibisyonunu gözlemek için doğrudan reaksiyon karışımına katılırken [198], α -amilaz içinse inhibitör molekülünün enzimle ön inkübasyonu sağlandı [199].

Belirlenen gruplardaki potansiyel inhibitör moleküllerinin enzim aktiviteleri üzerine etkilerini gözlemek için inhibitör varlığında tirozinaz için K_m (0,14 mM) değerindeki substrat konsantrasyonunda amilaz için K_m değerinin (1,02 mg/mL) altındaki bir substrat konsantrasyonunda (0,35 mg/mL) yapılan çalışmalar sonucunda $\log[I]$ -% Bağıl Aktivite grafikleri çizildi. Çalışılan tüm moleküller için enzim aktivitesini %50 azaltan $[I]$ olan IC_{50} değeri belirlenmeye çalışıldı. Daha sonra IC_{50} değeri bulunabilen moleküller ile inhibisyonun türü ve K_i değerleri grafikler çizilerek tespit edilmeye çalışıldı. Grafikler çizilirken yapılan çalışmalarda enzim konsantrasyonu, sıcaklık ve pH'nın belirlenen optimum değerleri kullanılırken substrat ve inhibitör konsantrasyonları sırasıyla $0,2K_m$ - $5K_m$ ve % 10-%75 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu aralığında tutuldu [31, 200].

2.2.2.1. α -Amilaz İnhibisyonu

α -Amilaz inhibisyonu çalışmaları için Tablo 5'te verilen organik bileşiklerden A1-A4 ve A14-A17 bileşikleri kullanıldı. α -Amilaz çözeltisi, değişen konsantrasyon aralığındaki inhibitör çözeltileri (A1: 0-540 μ M, A2: 0-9626 μ M, A3:0-1300 μ M, A4: 0-417 μ M, A14: 0-1 mM, A15:0-0,7 mM, A16: 0-0,67 mM, ve A17: 0-0,65 mM nihai konsantrasyon aralığında) ve 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) içeren reaksiyon karışımları deney tüpleri içerisinde 40°C'de su banyosunda 20 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Bu işlemi takiben reaksiyonun gerçekleşmesi için her bir karışıma (Tablo 8) 10 mg/mL'lik nişasta çözeltisinden eklenerek 15 dakika boyunca 40°C'de su banyosunda inkübasyona devam edildi. Bundan sonraki işlemler Bölüm 2.2.1.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlarla her bir organik molekül için log[I]-% Bağlı Aktivite grafiği çizildi. Enzim aktivitesinin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu IC₅₀ değeri olarak belirlendi. İlaveten α -amilaz için çalışılan Tablo 5'deki bileşikler içindeki IC₅₀ değeri belirlenebilenlerden en küçük konsantrasyona sahip A16 bileşiği için inhibisyon türü incelendi. Bu çalışma için A16 inhibitörünün olmadığı ve bileşiğin iki farklı konsantrasyonunda (50 μ M ve 150 μ M) yukarıda belirtildiği gibi aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar göre Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibitör varlığında ve yokluğunda K_m ve V_{max} değerleri ve matematiksel hesaplamalarla K_i değeri belirlendi [13, 201].

Tablo 8. α -Amilaz inhibisyon çalışması için kullanılan reaksiyon çözeltisi

Reaktifler	Kontrol (μ L)	Numune (μ L)
Fosfat tamponu	640	620
Nişasta çözeltisi	50	50
α -Amilaz çözeltisi	---	20
İnhibitör çözeltisi	---	10
İnhibitör çözücüsü	10	--
DNSA	700	700

2.2.2.2. Tirosinazın İnhibisyonu

Tirosinaz inhibisyonu çalışmaları için Tablo 5'te verilen organik moleküllerden A6, A8, A15, B5, B9, B13 ve C1-C4 molekülleri kullanıldı. Bu çalışma için her bir organik molekülün değişen konsantrasyonlardaki çözeltilerinden (A6: 0-0,8 mM, A8: 0-0,72 mM,

A15: 0-0,48 mM, B5: 0-0,1 mM, B9: 0-0,45 mM, B13:0-0,58 mM, C1: 0-100 mM, C2: 0-30 mM, C3: 0-6 mM, C4: 0-7 mM nihai konsantrasyon aralığında) 10'ar μL ilave edilerek Tablo 9'da belirtildiği gibi bir seri reaksiyon karışımı hazırlandı. Enzim çözeltisi reaksiyon karışımına en son ilave edilip ön inkübasyon yapılmaksızın Bölüm 2.2.1.2'de anlatıldığı şekilde aktivite tayini gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlarla her bir organik molekül için $\log[I]$ -% Bağıl Aktivite grafiği çizildi. Enzim aktivitesinin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlendi. İlaveten tirosinaz için çalışılan Tablo 5'deki bileşikler içindeki IC_{50} değeri belirlenebilenlerden en küçük konsantrasyona sahip B9 ve C3 bileşikleri için inhibisyon türü incelendi. Bu çalışma için B9 ve C3 inhibitörlerinin olmadığı ve bileşiklerin farklı konsantrasyonlarında (B9 için 0,2 mM ve 0,4 mM, C3 için 1,5 mM, 3 mM ve 4,5 mM) Bölüm 2.2.1.2'de belirtildiği gibi aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibitör varlığında ve yokluğunda K_m ve V_{max} değerleri ve matematiksel hesaplamalarla K_i değeri belirlendi [201].

Tablo 9. Tirosinaz inhibisyon çalışması için kullanılan reaksiyon çözeltisi

Reaktifler	Kontrol (μL)	Numune (μL)
Mcilvaine tamponu	924	864
MBTH	120	120
DMF	24	24
Tirosinaz çözeltisi	---	60
İnhibitör çözeltisi	---	12
İnhibitör çözücüsü	12	---
L-tirosin	120	120

2.2.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Tirosinaz ve α -amilaz inhibisyonu açısından potansiyel olarak etkili olabileceği düşünülen ve gruplara ayrılan inhibitör bileşikleri için teorik olarak modelleme hesaplamaları gerçekleştirildi. Modelleme çalışmaları her iki enzim içinde gruplara ayrılan bileşiklerin tamamı ile yapıldı. Öncelikle Gaussian 03 programı, DFT 6-31(gd)++ optimizasyon metodu ile bileşikler modelleme çalışmaları için optimize edildi [202-204]. Modelleme için kullanılacak olan enzimlerin kristal yapılarına literatür yardımıyla Protein Veri Bankasından (PDB) erişim sağlandı, pdb formatında α -amilaz için 1BAG, tirosinaz için 2Y9X kullanıldı [205, 206]. Optimize edilen her bir bileşik konformasyonu ve enzimlerin *in*

siliko kristal formu aktif bölgede etkileştirilerek bağlanma enerjileri program vasıtasıyla teorik olarak hesaplandı. Modelleme çalışmaları yapılacak olan enzimler öncelikle Discovery Stüdyo programı 4.1 Client versiyonu ile saflaştırıldı. Aktif bölgede organik bileşiklerle enzimi etkileştirmek ve ligand-protein etkileşimlerini görüntüleyebilmek için sırasıyla AutoDock Vina 1.1.2 [207] ve Pymol [84, 208] programları kullanıldı [209].

2.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları KTÜ Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik Anabilim Dalı ve KTÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Tüm çalışmalar öncesi ve sonrası hücre kültürü kabini 5 dakika UV ışık altında steril edildi. Ayrıca hücre kültürü kabini ve tek kullanımlık olmayan malzemeler (otomatik pipet, pipetör, kültür flaskları gibi) %70'lik etanolle silinerek kabin içine alındı. Çalışmalar süresince kullanılan tüm malzemeler steril ortamda ve steril olarak kullanıldı.

2.2.4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları ile α -Amilaz Aktivite Tayini

2.2.4.1.1. AR42J Hücre Serisi Çoğaltma ve Saklama

Amilaz etkinliğinin azalmasını hücre kültürü ortamında gözlemlemek için AR42J (ECACC, #93100618) rat pankreas kanser hücre serisi kullanıldı. Yüksek oranda α -amilaz üreten olması bu hücre serisinin tercih sebebi olmuştur [210]. Hücreler temin edildiği firmanın kullanım prosedürüne uygun olarak 2 mM glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren RPMI-1640 kültür medyasında, 37°C ve %5 CO₂ olan kültür ortamında kültüre edildi. Fare embriyonik fibroblast (MEF) hücre serisi ise spesifik olarak α -amilaz enzimi üretmiyor olması sebebiyle negatif kontrol hücreleri olarak kullanıldı. MEF hücreleri %10 FBS, %1 MEM-NEAA ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM medyasında 37°C ve %5 CO₂ olan kültür ortamında kültür edildi. Çoğaltılan tüm hücreler tez çalışmaları boyunca kullanmak için prosedürüne uygun olarak DMSO ile birlikte dondurularak sıvı azot tankında stoklandı.

2.2.4.1.2. AR42J ve MEF Hücreleri Üzerinde Hücre Canlılığı Tayini

α -Amilaz aktivitesi için ölçümü tez çalışmaları sırasında yapılan enzim inhibisyon ve moleküler modelleme çalışmalarıyla etkili bulunan inhibitör molekülü olan A16'nın AR42J ve MEF hücreleri üzerinde denenmeden önce molekülü çözmek için kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO), etanol, standart inhibitör olan akarboz ve A16 molekülünün hücre canlılığını etkilemeyen hangi konsantrasyonda kullanılması gerektiğine karar vermek için tripan mavisi metodu kullanıldı.

Tripan mavisi boyası canlı hücrelerin membranından içeri giremediği için onları boyayamazken, membran yapıları bozulmuş ölü hücrelere nüfuz ederek onların aydınlık alan mikroskopunda mavi renkte görünmesine sebep olur. Böylece ölü ve canlı hücreler photoshop programında sayılarak yüzdeler belirlenebilir. Kontrol amacıyla bazı hücreler çözücü ile muamele edilmedi ve tüm hücrelerin canlılık oranları yine tripan mavisi boyama metodu ile tespit edildi. Çok sayıda molekül konsantrasyonunun bir arada ölçümü alınacağı için bir hücre grubunda canlılık oranı belirlenirken, sıradaki diğer hücre grupları daha uzun süre beklemesi ve canlılık oranının beklenmeyen şekilde daha düşük olacağı ve bu da deneyin kendi sonucunu yanıtacağı kanaatine varıldı. Bu yüzden hücrelerin kültür edildikleri kaplardan (96 kuyucuklu pleytlerden) kaldırılması gerekmeden, buldukları yerde boyama yapılabilmesi için geliştirilmiş bir protokol olan fiksatif ile desteklenmiş tripan mavisi boyası metodu kullanıldı [211, 212]. AR42J ile MEF hücreleri üzerinde DMSO, etanol, A16 molekülü ve akarbozun fiksatif ile desteklenmiş tripan mavisi boyaması prosedürü aşağıda belirtildiği şekilde uygulandı.

➤ Fiksatif ile Desteklenmiş Tripan Mavisini Boyama Metodu

- *Hücre Kültürü:* AR42J ve MEF hücreleri yukarıda anlatıldığı gibi ilgili medyalarla 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ varlığında ayrı ayrı 96 kuyucuklu pleytlerde 24 saat kültür edildi. Ardından kendi içlerinde de gruplara ayrılan kuyucuklara AR42J hücreleri için son konsantrasyonları etanol ve DMSO için %0,1, %0,3, %0,6, %0,9, %1,2, %1,6, %1,9, %2,3, %2,6, akarboz için, 0,05, 0,5, 5, 25, 50, 250, 500 μ M, A16 molekülü için 0,001, 0,002, 0,005, 0,01, 0,05, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 5, 50, 100, 250, 500, 1000 μ M olacak şekilde ilave edilip 48 saat kültür edildi. MEF hücreleri için son konsantrasyonları etanol ve DMSO için %0,1, %0,25, %0,5, %1, %1,5, %2

olacak şekilde ilave edilip 48 saat kültür edildi. (Akarboz ve A16 molekülleri için AR42J hücreleri üzerinde IC₅₀ değeri belirlendikten sonra sadece o konsantrasyon için MEF hücresinde hücrede canlılık kontrolü yapıldı).

- *Yıkama Aşaması:* Hücreler boyanmadan önce steril PBS ile bir kere, sonrasında ise steril hücre medyası ile üç kere yıkandı. Her kuyucuk için yıkama hacmi 100 µL olarak kullanıldı.
- *Boyama Aşaması:* Yıkanan kuyucuklara %0,4'lük tripan mavisi boyası 100 µL hacminde uygulandı. Hücreler boya ile 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda hücreler yine steril hücre medyası ile üç kere yıkandı.
- *Fiksasyon Aşaması:* Boyanan ve yıkanan hücreler paraformaldehit (%4'lük) ile oda sıcaklığında yarım saat inkübe edildi. Kontrol amacı ile bazı kuyucuklar fiksatifle muamele edilmedi.
- *Mikroskop gözleminin yapılması:* Fiksasyondan sonra hücreler bir kez PBS tamponu ile yıkandıktan sonra ışık mikroskopunda incelendi.
- *Mikroskopta çekilen fotoğraflardan canlı hücre oranının belirlenmesi:* Çekilen fotoğraflardan ölü ve canlı hücre sayma photoshop programının sayma özelliği kullanılarak yapıldı.

➤ *α-Amilaz İnhibisyon Çalışması İçin Nişasta ve İyot Çözeltisi Konsantrasyonunun Optimize Edilmesi*

Hücre dışına salgılanan α-amilazın inhibisyonunu spektrofotometrik olarak ölçebilmek için nişasta ve iyot çözeltileri kullanıldı. Nişasta içeriğinin fazla olduğu örneklerin koyu mavi, az olduğu örneklerin ise daha açık mavi renk olması beklenmektedir. Nişasta içermeyen örneklerde ise sarı renk olması beklenmektedir. Böylece ekstraselüler ortama hücreler tarafından salınan α-amilaz aktivitesi ya da organik moleküller varlığında inhibisyonu kalitatif olarak belirlenebilecektir. Bu çözeltilerin optimizasyonları için her iki çözelti içinde bir seri dilüsyon ile farklı konsantrasyonlarda nişasta ve iyot çözeltileri hazırlandı ve 96 kuyucuklu pleyt ile mikroplyet okuyucuda 540 nm'de ölçüm alabilecek uygun konsantrasyonlar tespit edildi [111, 213].

2.2.4.1.3. α -Amilaz İnhibisyon Çalışması İçin Hücre Sayısı Belirleme Çalışmaları

Spektrofotometrik yöntemle hücre dışına salgılanan α -amilaz miktarının ölçülebileceği uygun hücre sayısını belirlemek için bu optimizasyon yapıldı. Burada amaç hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artan α -amilazın inhibisyonunu gözlemlemek adına sabit bir hücre sayısı ile çalışmaya devam etmeyi sağlamaktır. Bunun için AR42J hücreleri T-25 flasklara farklı sayılarda (50.000, 100.000, 250.000 ve 500.000 hücre/flask) sayılarda çoğaltıldı. 24 ve 48 saat inkübe edilmek üzere iki deney seti kuruldu. Ardından T-25 flasklar içerisindeki hücrelere medya ile birebir oranda %0,5'lik nişasta çözeltisi ilave edildi. 1 saat sonra örneklerden 100'er μ L alınıp üzerine 100'er μ L iyot çözeltisi ilave edilip mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 540 nm'de ölçüm alındı. Kontrol amacı ile sadece medya bulunan kuyucuklara nişasta çözeltisi ilave edildi.

2.2.4.1.4. AR42J Hücre Serisi Üzerinde A16, Akarboz Moleküllerinin α -Amilaz İnhibisyon Çalışmaları

A16 molekülü için 0,001-1000 μ M, pozitif kontrol molekülü olan akarboz için 0,05-500 μ M konsantrasyon aralığında hücre ortamına ilave edilerek 48 saat boyunca 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ varlığında kültür edildi. Hücrede canlılık oranlarını belirlemek için hem ışık mikroskobu altında hem de tripan mavisi boyama yöntemi ile sonuçlar değerlendirildi. Hücre canlılığını etkilemeyen A16 molekülünün uygun konsantrasyonları ile hücrede salgılanan α -amilaz etkinliği değerlendirildi. Bunun için 50.000 AR42J hücresi 4 mL hazırlanan kültür medyası ile T-25 flaskta 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ varlığında kültür edildi. 24 saat sonra taze medya ile değiştirildi ve gruplar halinde ayrılan flasklar üzerine 20 μ L farklı konsantrasyonlarda hazırlanan A16 ve akarboz çözeltileri ilave edilerek 48 saat boyunca 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ varlığında kültüre edildi. Ardından üzerine bire bir oranda nişasta çözeltisi ilave edildi. 1 saat sonra örneklerden 100 μ L alınıp üzerine 100 μ L iyot çözeltisi ilave edilip mikropleyt okuyucuda 540 nm'de ölçüm alındı. Kontrol amacı ile sadece medya bulunan kuyucuklara nişasta çözeltisi ilave edildi.

➤ MEF Hücre Serisi Üzerinde A16 ve Akarboz Moleküllerinin α -Amilaz İnhibisyon Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarıyla AR42J hücreleri üzerinde α -amilaz aktivitesini %50 oranında düşüren fakat hücre canlılığını etkilemeyen A16 ve akarboz inhibitör konsantrasyonları paralel olarak MEF hücrelerinde de denendi. Bunun için 50.000 MEF hücresi 4 mL hazırlanan MEF kültür medyası ile T-25 flaskta 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ varlığında kültüre edildi. 24 saat sonra taze medya ile değiştirildi ve üzerine 20 μ L A16 ilave edilerek 48 saat boyunca 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ varlığında kültür edildi. Ardından üzerine bire bir oranda nişasta çözeltisi ilave edildi. 1 saat sonra örneklerden 100 μ L alınıp üzerine 100 μ L iyot çözeltisi ilave edilip mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 540 nm'de ölçüm alındı. Kontrol amacı ile sadece medya bulunan kuyucuklara nişasta çözeltisi ilave edildi.

2.2.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları ile Tirosinaz Aktivite Tayini

2.2.4.2.1. VMM917 Hücre Serisi ile Yapılan Çalışmalar

Melanin sentezinde kilit noktada yer alan tirosinaz enziminin inhibisyonunu gözlemlemek için melanin açısından zengin olan melanoma, VMM917 hücre serisi (ATCC, CRL-3232) kullanıldı. Hücreler temin edilen firmanın kullanım prosedürüne uygun olarak 2 mM glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren ATCC RPMI-1640 kültür medyasında, 37°C ve %5 CO₂ olan kültür ortamında kültür edildi. Çoğaltılan hücreler tez çalışmaları boyunca kullanmak için dondurularak sıvı azot tankında stoklandı. Negatif kontrol hücresi olarak insan sünnet derisi kökenli BJ fibroblast hücre serisi (ATCC, CRL-2522) kullanıldı. Hücreler %10 FBS, %1 MEM-NEAA ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM medyasında 37°C ve %5 CO₂ olan kültür ortamında kültür edildi. Çoğaltılan hücreler tez çalışmaları boyunca kullanmak için dondurularak sıvı azot tankında stoklandı.

2.2.4.2.2. VMM917 ve BJ Hücreleri Üzerinde Sitotoksite Deneyleri

Tirosinaz inhibisyon etkinliğinin yüksek olduğu enzim inhibisyon ve moleküler modelleme çalışmalarıyla belirlenen B9 molekülünün bu potansiyelinin *in vitro* hücre kültürü denemeleriyle desteklenmesi için melanin sentezleme kabiliyetine sahip VMM917

hücrelerinde B9 molekülü, literatürde standart tirozinaz inhibitörü olan kojik asit [214] ve anti-kanser ilacı olan sisplatin [215] ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmada paralel olarak negatif kontrol BJ hücre hattı kullanıldı. Tirozinaz inhibisyonu deneylerinden önce B9'un sitotoksik etkisi MTT metoduyla [216-218] belirlendi. Buradaki amaç çalışmalarda kullanılacak olan bu moleküllerin kanserli hücrelerde gösterdiği sitotoksik etkiyi sağlıklı hücrelerde göstermediği şartları belirlemektir [219, 220]. Aynı zamanda bu hücreler üzerinde çözücü olarak DMSO'nun sitotoksikite deneyleri de yapıldı.

MTT metodu, tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının canlı hücreler tarafından indirgenmesi özelliğinden faydalanılarak kullanılır. Sarı renkli MTT boyasının tetrazolyum halkası canlı hücrelerdeki mitokondriyal enzimler tarafından parçalanır ve bu parçalanma sonucu mor renkli formazan oluşur. DMSO ile hücre içerisinde tutulan formazan kristalleri çözündürülür ve 570 nm'de spektrofotometrik olarak oluşan renk yoğunluğu ölçülür. Canlı hücre sayısı ile renk şiddeti orantılı olarak değiştiği belirtilmektedir [221, 222].

DMSO, etanol, kojik asit ve sisplatinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek için kullanılan MTT metodu aşağıdaki gibi uygulandı [223].

- T-75 flasklarda çoğaltılan VMM917 ve BJ hücreleri tripsin ile kaldırıldı. 200 µL besiyeri içinde 96 kuyucuklu steril hücre kültür pleytinin her bir kuyucuğuna 5000 hücre ekildi ve inkübatöre kaldırıldı.
- 24 saat sonra pleytlerdeki medyalar tazeleri ile değiştirildi. Eklenen besiyeri üzerine son konsantrasyonları B9 molekülü için 1,95; 3,9; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µM, kojik asit için 0,5; 1,125; 2,25; 4,5; 9; 18; 36; 72 µM ve sisplatin için 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 µM olacak şekilde ilave edildi. Sonrasında pleytler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Örnek sayısı her bir konsantrasyon için her iki hücre tipinde de 4 olacak şekilde planlandı.
- Süre sonunda pleytler içerisindeki tüm medya uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 190 µL taze besiyeri eklendi ve üzerine son konsantrasyonu 0,25 mg/mL olacak şekilde MTT boyası ilave edildi. Pleytler 2 saat 37°C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüm medyalar tekrar uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 200'er µL DMSO ilave edilip 90 dakika boyunca çalkalayıcıda 120xg' de formazan kristallerinin çözünmesi için beklendi.
- Kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği invert mikroskop altında kontrol edildi. Oluşan mor rengin absorbansı 570 nm dalga boyunda mikropleyt okuyucu spektrofotometrede okundu. Her bir örnek için elde edilen absorbans değerinin

kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak %bağılı hücre canlılığı hesaplandı.

- Her bir hücre serisinde, B9 molekülü, kojik asit ve sisplatinin yukarıda verilen değerlerdeki konsantrasyonlarıyla yapılan çalışmalarına göre %Hücre canlılığı “%Hücre Canlılığı = $[100 - OD_{\text{örnek}}/OD_{\text{kontrol}}] \times 100$ ” formülü kullanılarak hesaplandı [224].
- Elde edilen verilerden $\log[I]$ -%hücre canlılığı grafiği çizilerek VMM917 hücre serisinde kullanılan DMSO, etanol, B9, kojik asit ve sisplatin için yarı inhibitör konsantrasyonu olan IC_{50} değerleri hesaplandı.
- Hücre kültürü çalışmaları için IC_{50} değeri, potansiyel olarak ilaç olabilecek organik moleküllerin kanser hücresi üzerindeki etkileri negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında absorbans değerinde %50 düşüşe sebep olan molekül konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır [225].
- B9 molekülünün VMM917 ve BJ hücre serilerindeki IC_{50} değeri hesaplandı. Hesaplanan IC_{50} değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla molekülün kanser hücresini normal hücreden ne kadar ayırt edebildiğini gösteren seçicilik indeksi (selectivity index, SI) değeri hesaplandı [226].

$$\text{Seçicilik İndeksi} = \text{Sağlıklı Hücre } IC_{50}(BJ) / \text{Kanser Hücresi } IC_{50}(VMM917)$$

2.2.4.2.3. VMM917 Hücre Serisindeki Melanin Miktarının Optimizasyonu

VMM917 hücre serisinde sentezlenen melanin miktarını spektrofotometrik olarak ölçebilmek için öncelikle hücre sayısı optimize edildi. Teorik olarak hücre sayısı arttıkça ortamda ölçülebilir melanin miktarında artma olması beklenmektedir. Böylece melanin miktarındaki değişim ile dolaylı olarak tirozinaz miktarındaki değişim gözlemlenebildi. Bunun için VMM917 hücreleri T-25 flasklara farklı sayılarda (10.000, 25.000, 50.000, 100.000, 250.000, 500.000, 1.000.000) ekildi. Literatürde farklı günlerde bekletilerek melanin miktarındaki artış gözlemlenmeye çalışılmaktadır [227-229]. Bu örneklerden yola çıkarak T-25 flasklar içerisindeki hücreler 1-3 gün arasında kültüre edildi. Ardından hücreler üzerindeki medyalar atıldı ve 1x PBS ile 3 kez yıkandı. Literatürdeki metod üzerinde küçük modifikasyonlar yapılarak hücreler önce 2 M NaOH muamele edilerek 100°C’de bir saat bekletilip oda sıcaklığına geldikten sonra spektrofotometrede 400 nm’de ölçüm alındı [230].

2.2.4.2.4. VMM917 Hücresinde B9 ve Kojik Asit Moleküllerinin Tirosinaz İnhibisyon Etkisi

B9 ve kojik asit moleküllerinin sitotoksositeye sebep olmayan uygun konsantrasyon aralığı belirlendikten sonra her iki molekül içinde VMM917 hücresinde tirosinaz inhibisyon çalışması melanin miktarındaki azalmayı ölçerek gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle 25.000 VMM917 hücresi T-25 flaskta 24 saat kültür edildi. Ardından kültür ortamına B9 molekülü için son konsantrasyon 4, 8, 16 ve 512 μM olan çözeltiler ilave edildi. Melanin sentezinin ölçülebilecek yoğunlukta olması için 6 gün beklendi. Ardından flasktaki medyalar atıldı. 2 kez 1xPBS ile yıkandı ve tripsin ilave edilip hücreler kaldırılıp 15 mL'lik falkona alındı. Ardından 900 \times g'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve tekrar 1xPBS ile iki kez yıkandıktan sonra yeniden santrifüj edildi. Pellet kısma 2 M NaOH ilave edildi ve hücreler cam bir tüpe alınıp ağzı kapatılıp 100°C'de 1 saat bekletildi. Oda sıcaklığına gelince 400nm'de ölçüm alındı. Aynı anda melanin kalibrasyon grafiği de sentetik melaninin bir seri dilüsyonu ile hazırlanan 0,0078, 0,0156, 0,03125, 0,0625, 0,125 ve 0,25 mg/mL konsantrasyonundaki çözeltileri ile çizildi.

2.2.4.2.5. B9 Molekülünün Hücre Döngüsü ve Apoptoz Üzerine Etkisinin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

Akım (flow) sitometrisi analizi, akışkan bir sıvı içerisinde geçen küçük partikül boyutuna sahip parçacıkların (örneğin süspanse edilmiş hücrelerin), partikül boyutlarının ve/veya floresanla işaretlenmiş hücre içi markırların ölçümüne dayalı kantitatif ve hızlı cevap veren bir analiz sistemidir. Akım sitometrisi hücre döngüsü analizinde yüzey proteinlerinin değişen miktarlarının gözlenebildiği ve apoptozun belirlenmesinde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [231, 232]. VMM917 hücre serisinde B9 molekülünün sitotoksik etkisinin mekanizmasını aydınlatmak adına apoptoz ve hücre döngüsü analizleri ticari kitler kullanılarak üretici firmalarının tavsiyeleri doğrultusunda KTÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan akım sitometre cihazı (BD Biosciences, Accuri C6) kullanılarak belirlendi.

2.2.4.2.6. Hücre Döngüsü Analizi

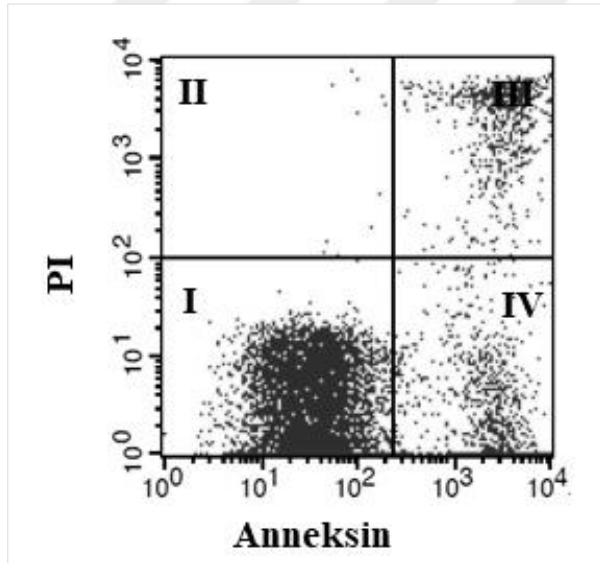
Hücre döngüsü analizinde kullanılan temel boya propidyum iyodür (PI)'dür. PI, DNA bazları arasına girebilen floresan karakterde bir boyadır. Hücreler hücre döngüsünün G₁ fazında bir kopya, G₂/M fazında ise iki kopya DNA içerirler. Dolayısıyla PI ile boyanan hücrelerden G₁ fazında olanlar bir birim ışığa verirlerken, G₂/M fazında olanlar iki birim ışığa vermektedirler. S fazında ise DNA sentezi devam ettiği için bu fazdaki hücrelerin PI ile boyama sonrası verecekleri ışığa miktarı G₁ ve G₂/M fazında verdikleri ışıkların arasında bir değerde olacaktır [233].

Hücre döngüsü analizi için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı:

- 25x10³ VMM917 hücresi T-25 flasklara ekilerek 24 saat 37°C ve %5 CO₂ olan kültür ortamında bekletildi.
- Süre sonunda medyalar tazeleni ve ilgili flasklara B9 molekülünden son konsantrasyonu 8, 16 ve 32 µM olacak şekilde pipetlemeler yapıldı ve flasklar 24 saat 37°C ve %5 CO₂ olan kültür ortamında kültür edildi.
- 24 saat sonra flask içerikleri boşaltıldı ve flasklar 4'er mL PBS ile yıkandı. Tüm flasklara hücreleri kaldırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı. 4 dakika sonra flask içerisindeki hücreler medya ile kaldırılıp 15 mL'lik steril tüplere aktarılarak 300xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Ardından yıkama tamponu ile pelletler üç kere yıkandı ve her seferinde 300xg'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Son yıkamanın ardından süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelletleri üzerine 250'şer µL A reaktifinden (deterjan tamponu) ilave edildi. Tüpler hafif hızda vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Ardından tüplere 200'şer µL B solüsyonundan (spermin tamponu) ilave edildi, hafif pipetaj yapıldı ve tüpler 10 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda tüplerin her birine buz üzerinde 200'er µL C solüsyonundan (PI boyası) ilave edildi ve tüpler 10 dakika daha karanlıkta inkübe edildi.
- Süre sonunda tüm tüpler hücre döngüsü analizi yapılmak üzere akım sitometre cihazına verildi. Her okumada 10 000 hücre saydırıldı ve her grup için bağımsız 4 okuma yapıldı (n=4).
- Her bir evredeki hücrelerin yüzdesi, cihaz üzerinde kurulu olan MODFIT 3.0 Verity yazılımı kullanılarak grafiksel olarak belirlendi ve ilgili yüzdeler hesaplandı.

2.2.4.2.7. Anneksin V-PI Analizi ile Apoptotik/Nekrotik Hücrelerin Ayrımı

Apoptoz sürecinde hücrelerde çeşitli değişiklikler olmaktadır. Bunlar membran değişiklikleri, nukleus kondenzasyonu ve DNA'nın kaspazlar tarafından kesilmesi ile oluşan klasik merdiven görüntüsü gibi karakteristik şekilde değişmesine kadar farklı hücresel kompartımanlarda meydana gelmektedir. Normalde hücre membranının iç yaprağında bulunan fosfolipidlerin (PS) apoptoz sürecinde flippaz enzimi ile dış yaprağa çıkarılmakta ve apoptoza uğrayan hücrenin makrofajlar tarafından tanınıp ortadan kaldırılmasına dair bir sinyal oluşturulmaktadır. Anneksin-V, fosfolipid bağlayabilen bir protein olup özellikle PS'ye karşı yüksek afinitelidir. Apoptoz seviyesini belirlemek üzere floreskein izotiyosiyanat (FITC) gibi floresan özellikteki boyalar ile konjuge anneksin-V boyaması apoptotik hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır. Burada nekrotik hücreleri apoptotik hücrelerden ayırmak için ikinci boya olarak PI kullanılmaktadır. Boyama sonrası akım sitometre cihazında yapılan analizde Şekil 16'da verildiği üzere dört ayrı bölgeye yayılmış popülasyon görüntüsü elde edilmektedir [234]:



- I. Bölge PI(-), Anneksin(-):**
Canlı hücreler
- II. Bölge PI(+), Anneksin(-):**
Membran bütünlüğü kontrolsüz şekilde ortadan kalkmış nekrotik hücreler
- III. Bölge PI(+), Anneksin(+):**
Geç apoptoz evresindeki ya da henüz ölmüş hücreler
- IV. Bölge PI(-), Anneksin(+):**
Erken apoptoz evresindeki hücreleri

Şekil 16. Anneksin-V analizinde hücrelerin yaptığı floresans ışımalarına göre PI-Anneksin plot'ında farklı bölgelerde bulunma profilleri

Anneksin-V analizi için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı:

- 25×10^3 VMM917 hücresi T-25 flasklara ekilerek 24 saat 37°C ve %5 CO_2 olan kültür ortamında bekletildi.
- Süre sonunda medyalar tazeleni ve ilgili flasklara B9 molekülünden son konsantrasyonu 8, 16 ve 32 μM olacak şekilde pipetlemeler yapıldı ve flasklar 24 saat 37°C ve %5 CO_2 olan kültür ortamında kültür edildi.
- 24 saat sonra flask içerikleri boşaltıldı ve flasklar 4'er mL 1xPBS ile yıkandı. Tüm flasklara hücreleri kaldırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı. 4 dakika sonra flask içerisindeki hücreler medya ile kaldırılıp 15 mL'lik steril tüplere aktarılarak $300 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant kısımlar dikkatlice uzaklaştırıldı. Ardından soğuk 1xPBS ile pelletler iki kere yıkandı ve her seferinde $300 \times g$ 'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Son yıkamanın ardından süpernatant kısımlar uzaklaştırıldı ve hücre pelletleri 100'er μL çalışma tamponu ile süspanse edildi. Süspanسیون üzerine 5 μL FITC-anneksin V çözeltisi ve 5 μL PI boyası ilave edilerek hafif pipetajlama yapıldı ve karışım 15 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi.
- Süre sonunda tüm örneklerin üzerine kit içerisinde bulunan ve seyreltilerek kullanılan 1x anneksin bağlama tamponu eklendi. Tüpler apoptoz analizi yapılmak üzere akım sitometre cihazına verildi. Her okumada 10.000 hücre saydırıldı ve her grup için bağımsız 4 okuma yapıldı ($n=4$).

2.2.5. İstatistiksel Yöntemler

Bu tez kapsamında tüm deneyler en az üç bağımsız tekrarlı olacak şekilde yapıldı ve sonuçlar aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak verildi. İstatistiksel analizler SPSS (Statistics Program for Social and Science) 13.0.1 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyan veriler için One-Way ANOVA testi ve ardından gruplar arası çoklu karşılaştırmalar için Post-Hoc Tukey testi kullanıldı. p (probability) değeri 0,5'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak yorumlandı.

3. BULGULAR

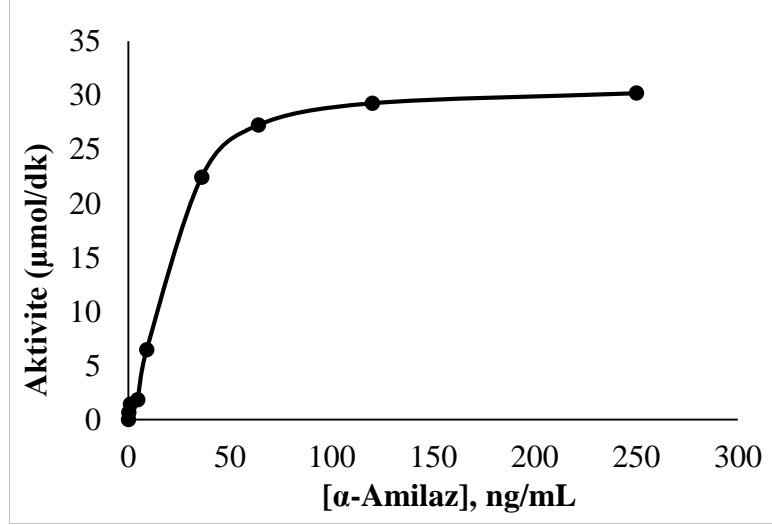
3.1. Enzim Aktivitelerinin Optimizasyonu Çalışmaları

Çalışmada kullanılan organik moleküllerin ticari olarak satın alınan α -amilaz ve tirozinaz aktivitesi üzerine inhibisyon potansiyellerini ortaya koymak amacıyla yapılan inhibisyon çalışmalarına başlamadan önce her bir enzimin aktivitesi literatüre uygun olarak belirlendi. Daha sonra inhibisyon çalışmalarının gerçekleştirileceği pH ve sıcaklık değerinin belirlenmesi yanında çalışmalardaki reaksiyon karışımlarında kullanılacak olan enzim ve substrat konsantrasyonunun tespit edilmesi için α -amilaz ve tirozinaz enzim aktivitesinin optimizasyonu sağlandı.

3.1.1. Amilaz Aktivitesinin Tayini ve Optimizasyonu

3.1.1.1. Optimum Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi

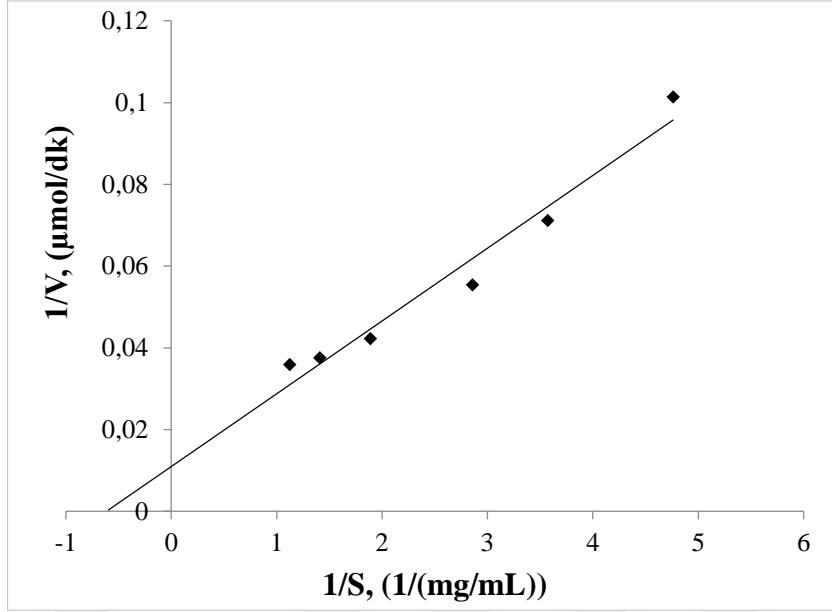
Çalışmalarda kullanılacak olan uygun enzim konsantrasyonunu belirlemek amacıyla sabit substrat konsantrasyonu kullanılarak, 0,09-250 ng/mL arasında değişen enzim konsantrasyonlarıyla reaksiyon çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerde oluşan ürün miktarını belirlemek amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Oda sıcaklığında 540 nm'de köre karşı absorbans okuması yapıldı. Absorbansa karşılık gelen protein konsantrasyonları ünite cinsinden hesaplanarak grafiğe geçirildi (Şekil 17). Şekil 17'deki hiperbolik eğriden ilk hız ölçümleri için uygun olan enzim konsantrasyonu 25 ng/mL olarak belirlendi.



Şekil 17. Amilaz konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi

3.1.1.2. Optimum Substrat Konsantrasyonun Belirlenmesi

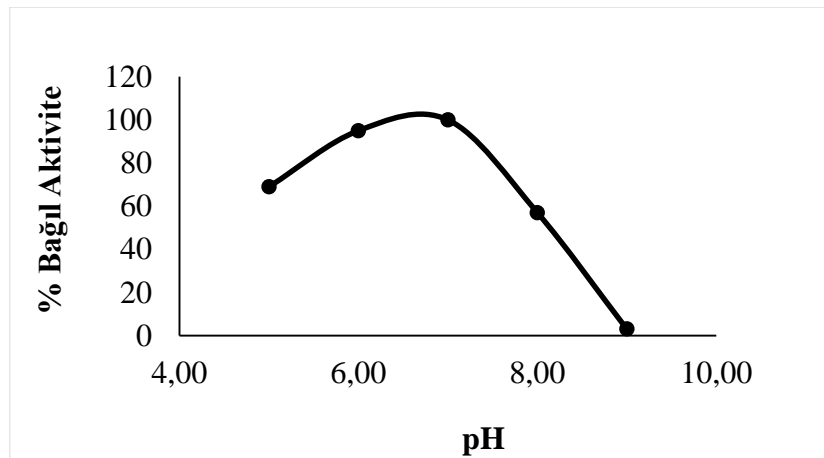
Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla sabit enzim konsantrasyonunda, 0,2-1,05 mg/mL aralığında değişen nişasta konsantrasyonlarında farklı reaksiyon karışımları hazırlandı. Oluşan ürün miktarını belirlemek amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Oda sıcaklığında 540 nm'de köre karşı absorbans okuması yapıldı. Absorbansa karşılık gelen enzim aktivitesi ünite cinsinden hesaplanarak substrat doygunluk eğrisi çizildi. İlk hız ölçümleri için uygun olan ünite miktarına karşılık gelen nişasta konsantrasyonu 0,35 mg/mL olarak belirlendi. Ayrıca Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 18). K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla, 1,02 mg/mL ve 153,8 µmol/dk olarak hesaplandı.



Şekil 18. Amilaz enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

3.1.1.3. Optimum pH'nın Belirlenmesi

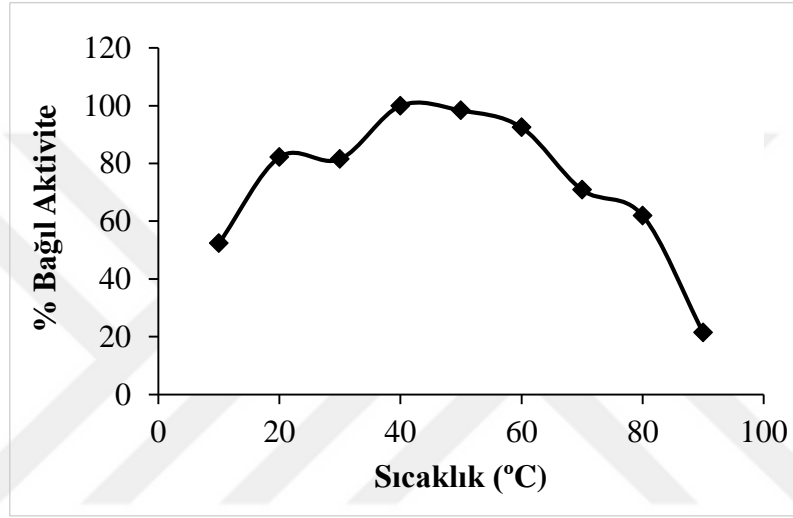
Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu pH bölgesinde çalışmak için sabit enzim ve substrat (nişasta) konsantrasyonunda farklı pH'lardaki (50 mM asetat tamponu pH 5,0; 50 mM fosfat tamponu pH 6,0-7,0 ve 50 mM glisin tamponu pH 8,0-9,0) tampon çözeltileri kullanılarak spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Absorbansa karşılık gelen ürün miktarları aktiviteye dönüştürülerek pH-%Bağlı Aktivite şeklinde grafiğe geçirildi (Şekil 19). Amilaz aktivitesinin 50 mM fosfat tamponu pH 7,0'de en yüksek aktivite gösterdiği bulundu.



Şekil 19. pH'nın α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi

3.1.1.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Sıcaklığın amilaz aktivitesi üzerine etkisini gözlemlemek için substrat ve enzim konsantrasyonu, pH sabit tutulurken sıcaklık değeri 10-90°C aralığında değiştirilerek spektrofotometrik ölçümler alındı. Absorbansa karşılık gelen ürün miktarları ünite cinsinden aktivite olarak hesaplanarak Sıcaklık-%Bağlı Aktivite grafiği çizildi (Şekil 20). Amilaz aktivitesinin 40°C’de en yüksek aktivite gösterdiği bulundu.

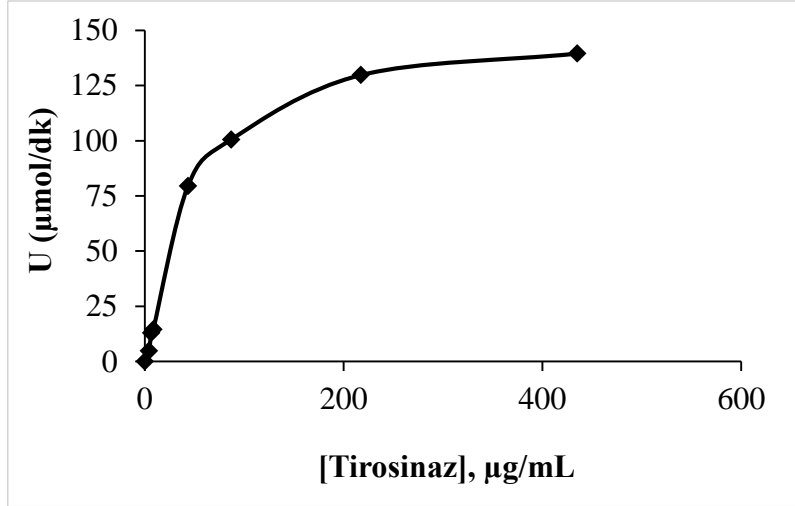


Şekil 20. Sıcaklığın amilaz aktivitesi üzerine etkisi

3.1.2. Tirosinaz Aktivitesinin Tayini ve Optimizasyonu

3.1.2.1. Optimum Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi

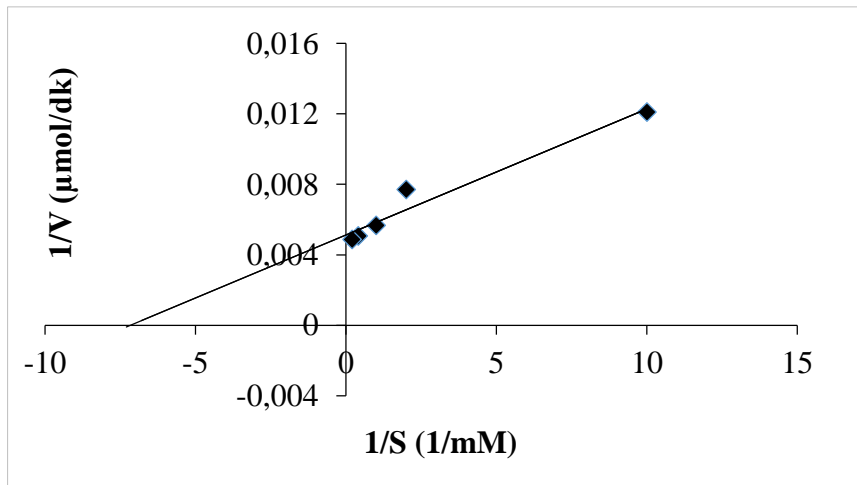
Çalışmalarda kullanılacak olan uygun enzim konsantrasyonunu belirlemek amacıyla sabit substrat konsantrasyonu kullanılarak, 4,35-435 µg/mL arasında değişen enzim konsantrasyonlarıyla reaksiyon çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerde oluşan ürün miktarını belirlemek amacıyla oda sıcaklığında spektrofotometre de 500 nm’de 1 dakika boyunca kinetik ölçüm ile absorbans okuması yapıldı. Absorbansa karşılık gelen ürün konsantrasyonları ünite cinsinden aktiviteye dönüştürülerek grafiğe geçirildi (Şekil 21). Şekil 21’deki hiperbolik eğriden ilk hız ölçümleri için uygun olan enzim konsantrasyonu 43,5 µg/mL olarak belirlendi.



Şekil 21. Tirosinaz konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi

3.1.2.2. Optimum Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

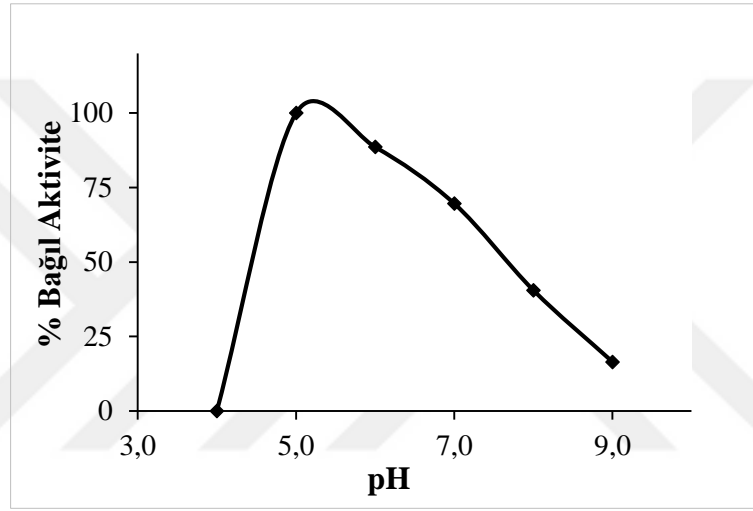
Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla sabit enzim konsantrasyonunda, 0,1-5 mM aralığında değişen *L*-tirosin konsantrasyonlarında farklı çözeltiler hazırlandı. Oluşan ürün miktarını belirlemek amacıyla oda sıcaklığında spektrofotometrede 500 nm’de 1 dakika boyunca kinetik ölçüm ile absorbans okuması yapıldı. Absorbansa karşılık gelen ürün miktarları ünite cinsinden hesaplanarak substrat doygunluk eğrisi çizildi. İlk hız ölçümleri için uygun olan ünite miktarına karşılık gelen *L*-tirosin konsantrasyonu 0,14 mM olarak belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 22). K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla, 0,14 mM ve 166,6 µmol/dk olarak hesaplandı.



Şekil 22. Tirosinaz enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

3.1.2.3. Optimum pH'nın Belirlenmesi

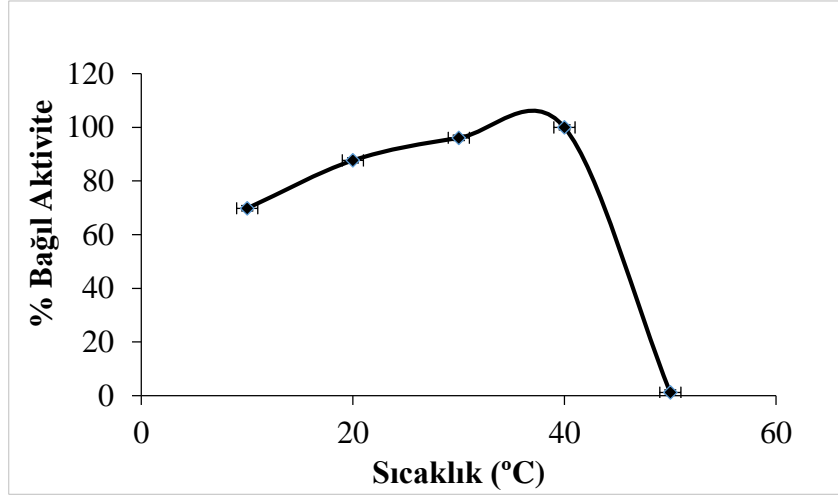
Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu pH değerinde çalışmak için sabit substrat konsantrasyonu (*L*-tirosin) varlığında farklı pH (50 mM mcilvaine tamponu pH 4,0-7,0 ve 50 mM tris-HCl tamponu pH 8,0-9,0) tampon çözeltileri kullanılarak spektrofotmetrik ölçümler yapıldı. Absorbansa karşılık gelen ürün miktarları pH-%Bağıl Aktivite şeklinde grafiğe geçirildi (Şekil 23). Tirozinaz aktivitesinin 50 mM mcilvaine tamponu pH 5,0'de en yüksek aktivite gösterdiği bulundu.



Şekil 23. pH'nın tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi

3.1.2.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Sıcaklığın tirozinaz aktivitesi üzerine etkisini gözlemlemek için substrat ve enzim konsantrasyonu, pH sabit tutulurken sıcaklık değeri 10-50°C aralığında değiştirilerek spektrofotmetrik ölçümler yapıldı. Absorbansa karşılık gelen ürün miktarları ünite cinsinden aktivite olarak hesaplandıktan sonra Sıcaklık-%Bağıl Aktivite grafiği çizildi (Şekil 24). Tirozinaz aktivitesinin 40°C'de en yüksek aktivite gösterdiği bulundu.



Şekil 24. Sıcaklığın tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi

Bu çalışmalardan elde edilen bulguların ortak tablosu Tablo 10'da sunulmaktadır.

Tablo 10. α -Amilaz ve tirozinaz için belirlenen enzim aktivitesi optimizasyonu bulguları

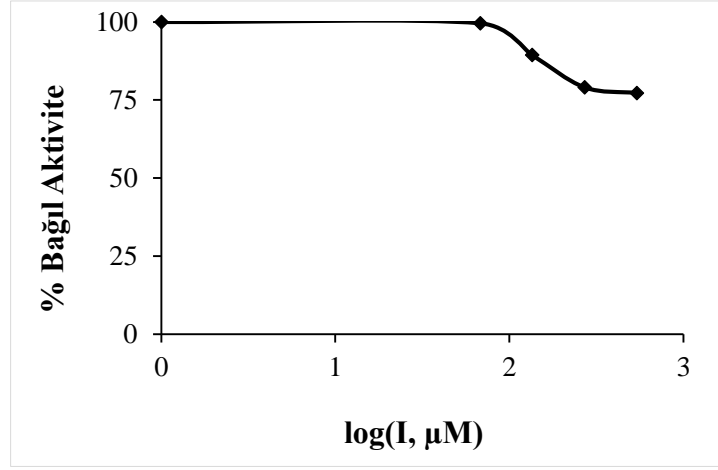
	Opt. pH	Opt. sıcaklık	Enzim konsantrasyonu	* K_m
α-Amilaz	7,0	40 °C	25 ng/mL	1,02 (0,35) mg/mL
Tirozinaz	5,0	40 °C	43,5 μ g/mL	0,14 mM

* K_m değerleri her bir enzim için 2.2.1'de bahsi geçen substratları durumunda belirlenmiş olup, α -amilaz hariç (substratın çözünürlük probleminin dolayı parantez içinde verilen substrat konsantrasyonu kullanıldı) tirozinaz enzimi için inhibisyon çalışmalarında substrat konsantrasyonu olarak kullanılmıştır.

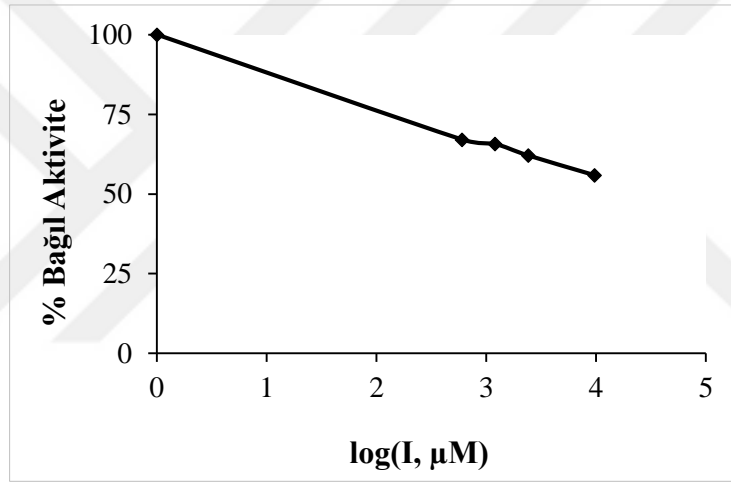
3.2. Enzim İnhibisyon Çalışmaları

3.2.1. α -Amilaz İnhibisyonu Çalışmaları

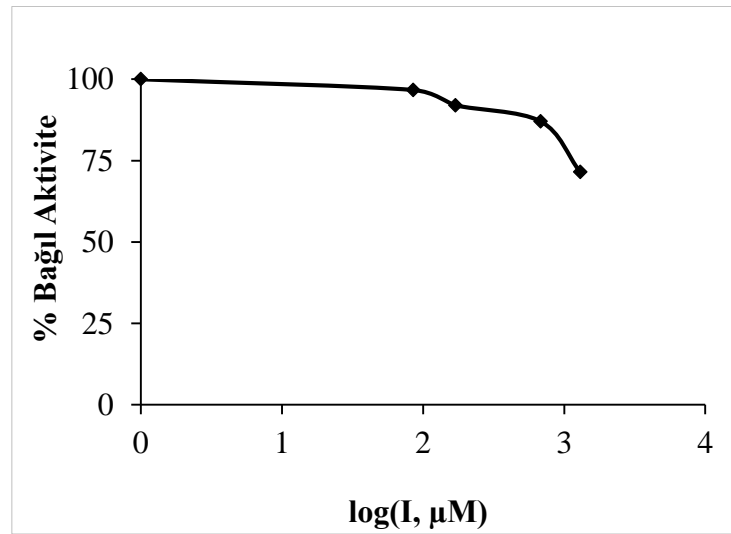
α -Amilaz inhibisyonu çalışmaları için A1-A4, A14-A17 bileşikleri ve referans inhibitör molekülü olarak da akarboz kullanıldı. İnhibisyon çalışmaları Bölüm 2.2.2.1.'de anlatıldığı gibi ve 0,35 mg/mL nişasta substratı varlığında yapıldı. Elde edilen sonuçlarla her bir organik molekül için $\log[I]$ -%Bağlı Aktivite grafiği çizildi ve aktivitenin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlendi (Şekiller 25-32, Tablo 11).



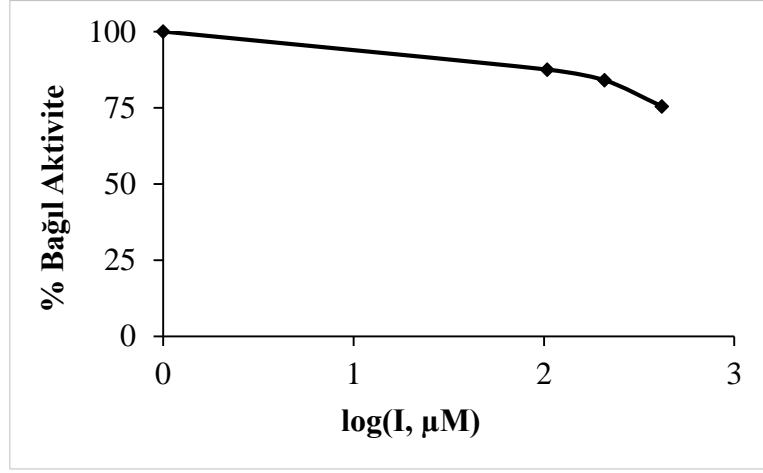
Şekil 25. A1 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi



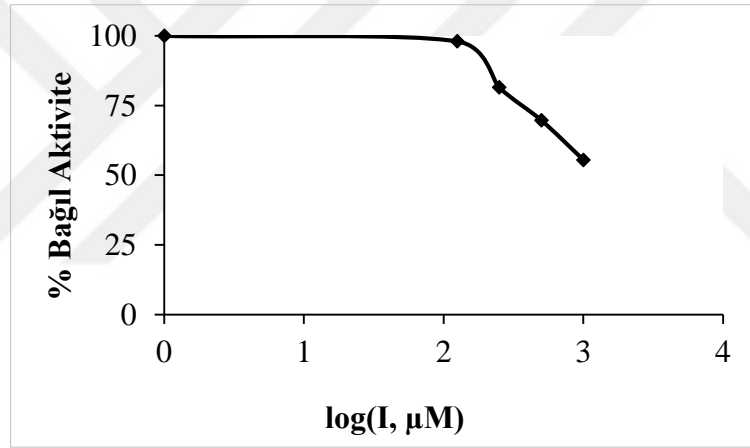
Şekil 26. A2 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi



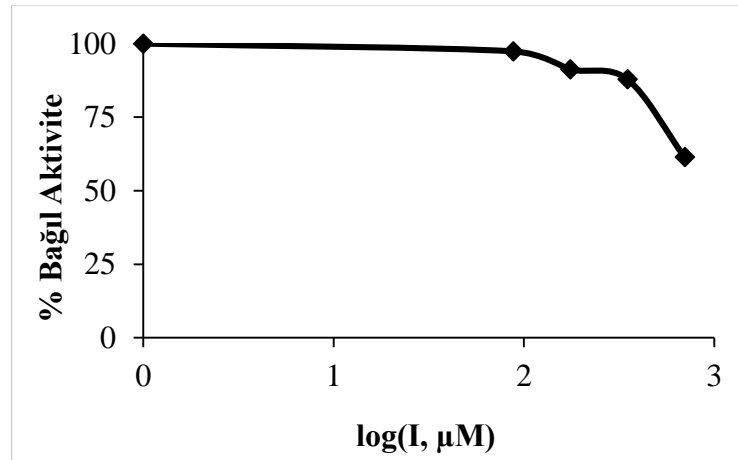
Şekil 27. A3 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi



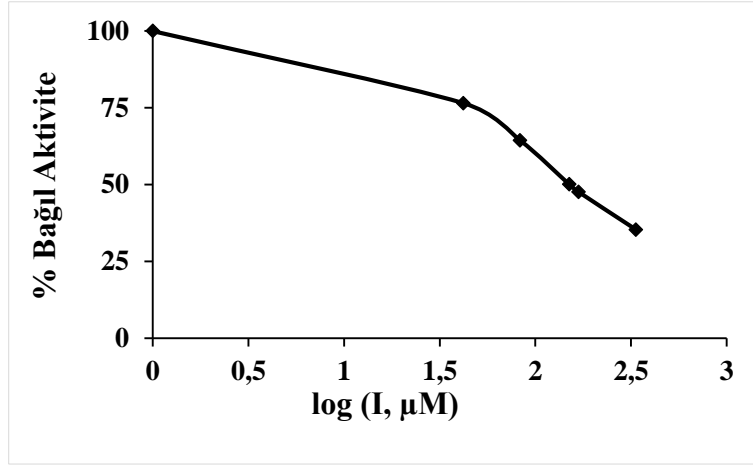
Şekil 28. A4 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi



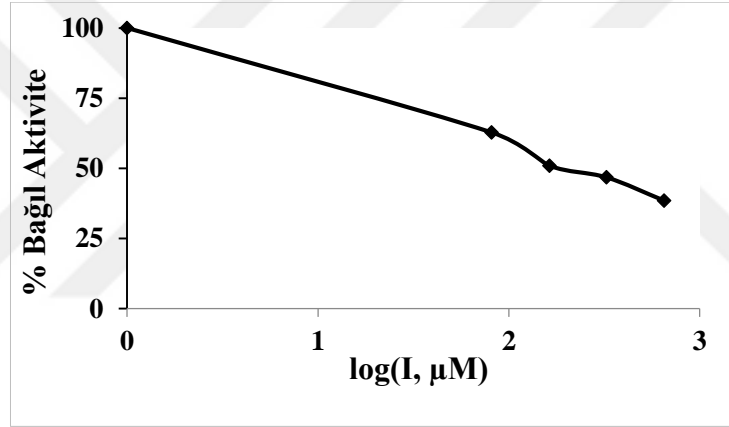
Şekil 29. A14 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 30. A15 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 31. A16 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi

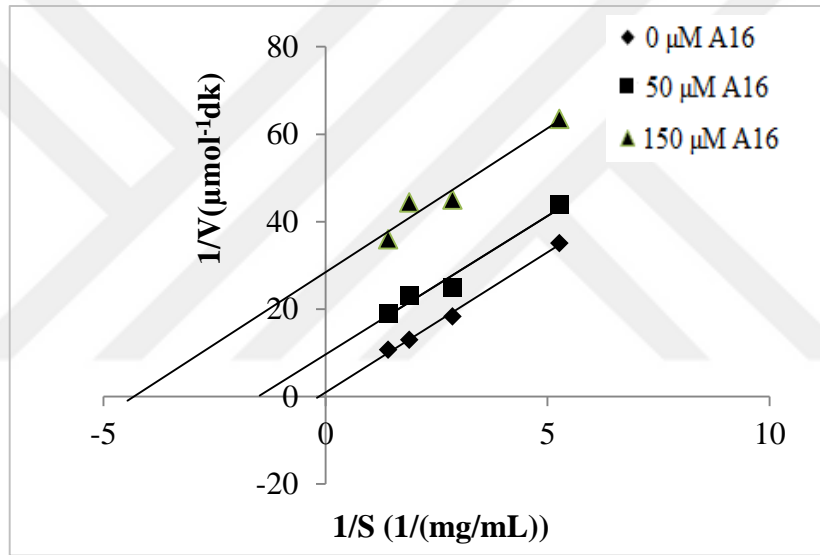


Şekil 32. A17 molekülünün α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi

Tablo 11. İnhibitör moleküllerinin α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ , μM	Maks. İnhibisyon	
		%	[I], μM
A1	>540	33,1±0,2	540
A2	>9626	45,0±0,1	9626
A3	>1300	29,0±0,1	1300
A4	>417	25,2±0,1	417
A14	>1000	45,3±3,6	1000
A15	>700	39,2±0,1	700
A16	150	84,2±1,7	670
A17	163	62,1±0,2	650
Akarboz	235	53,7±1,1	240

Tablo 11’de görüldüğü üzere çalışılan moleküller içinde en düşük IC_{50} değerine sahip olan A16 bileşiği için IC_{50} değeri $150 \mu\text{M}$ olarak belirlendi. Dolayısıyla en etkili inhibisyonun gözlendiği A16 bileşiği için α -amilazın inhibisyon türünün belirlenmesi çalışmaları yapıldı. Bunun için inhibitör yokluğunda ve A16 bileşiğinin iki farklı konsantrasyonunda ($50 \mu\text{M}$ ve $150 \mu\text{M}$) ve $0,2-0,7 \text{ mg/mL}$ nişasta substratı varlığında bir seri α -amilaz aktivitesi tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlardan Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibitör varlığında ve yokluğunda K_m ve V_{max} değerleri belirlendi (Şekil 33, Tablo 12). Buna göre A16 bileşiği varlığında α -amilaz yarışmasız olarak inhibe olmuşken K_i değeri $6,43 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı.



Şekil 33. A16 bileşiği varlığında α -amilaz inhibisyon türünün belirlenmesi

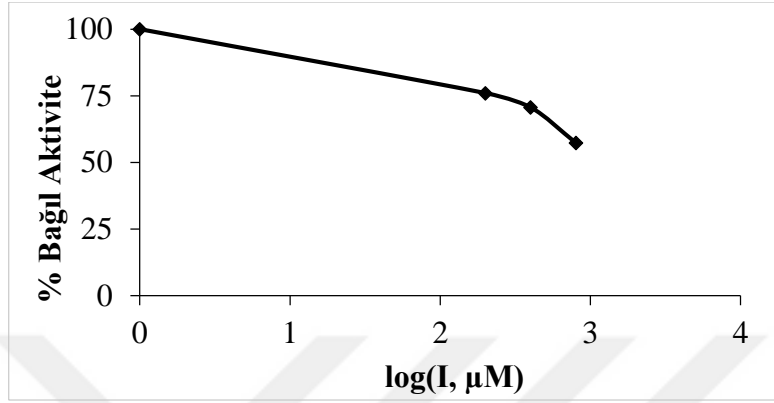
Tablo 12. A16 bileşiği varlığında α -amilaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değeri

İnhibitör (μM)	K_m (mg/mL)	V_{max} ($1/(\mu\text{mol/dk})$)	İnhibisyon türü	K_i (μM)
0	0,68	0,66		
50	0,07	0,12	Yarışmasız	$6,43 \pm 0,12$
150	0,03	0,04		

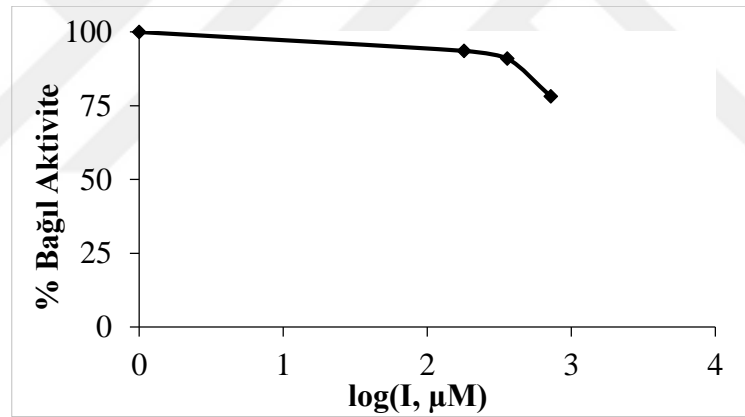
3.2.2. Tirosinaz İnhibisyonu Çalışmaları

Tirosinaz inhibisyonu çalışmaları için A6, A8, A15, B5, B9, B13, C1-C4 bileşikleri ve referans inhibitör molekülü olarak da kojik asit kullanıldı. İnhibisyon çalışmaları Bölüm

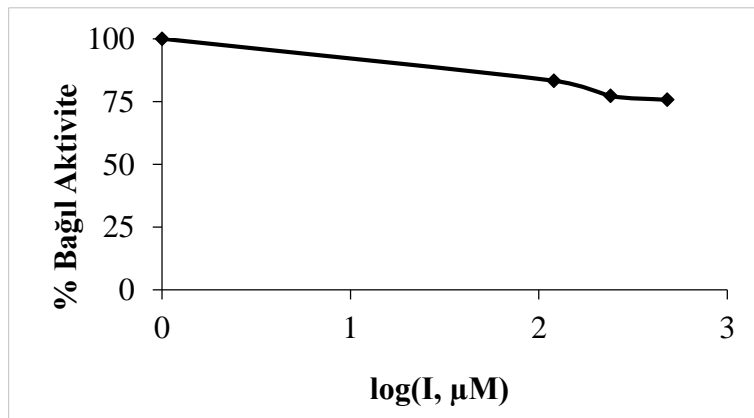
2.2.2.2’de anlatıldığı gibi ve 0,14 mM *L*-tirosin substratı varlığında yapıldı. Elde edilen sonuçlarla her bir organik molekül için $\log[I]$ -%Bağlı Aktivite grafiği çizildi ve aktivitenin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlendi (Şekil 34-43, Tablo 13).



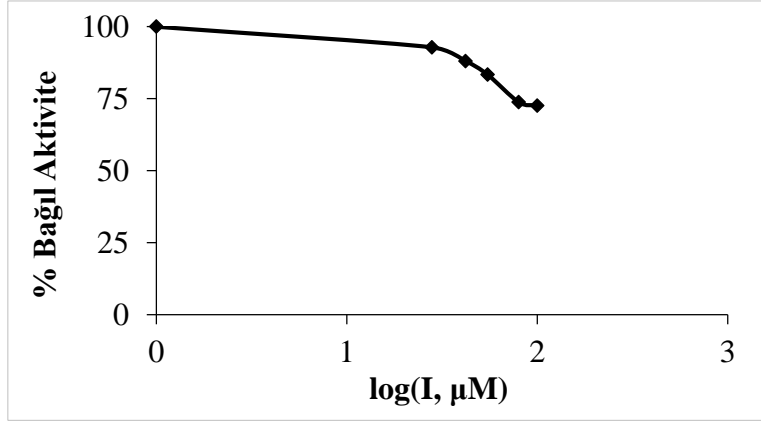
Şekil 34. Tirosinaz aktivitesi üzerine A6 molekülünün etkisi



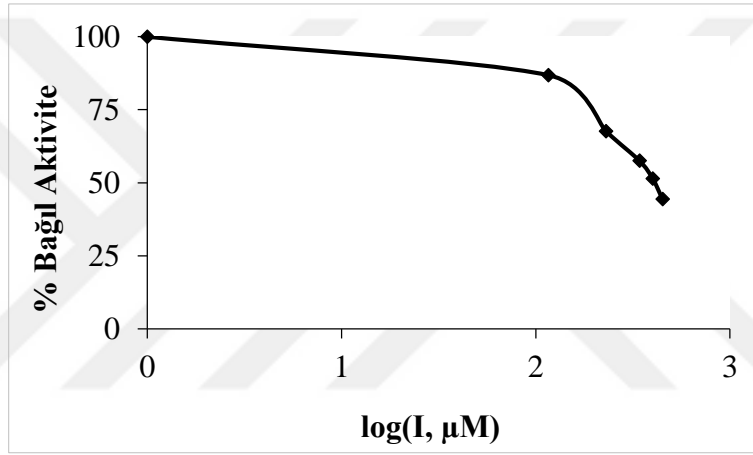
Şekil 35. Tirosinaz aktivitesi üzerine A8 molekülünün etkisi



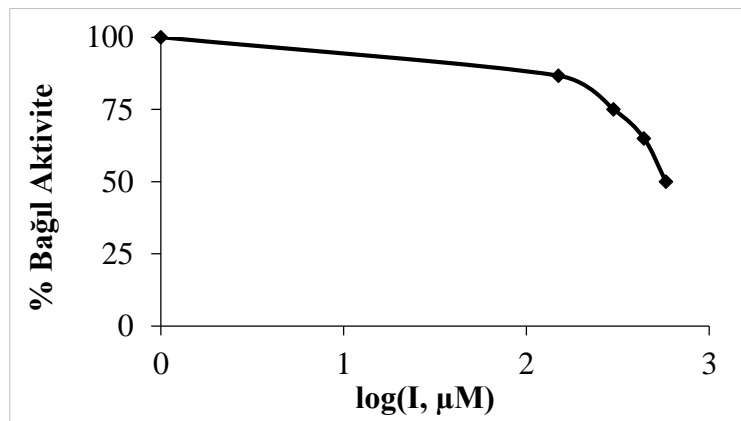
Şekil 36. Tirosinaz aktivitesi üzerine A15 molekülünün etkisi



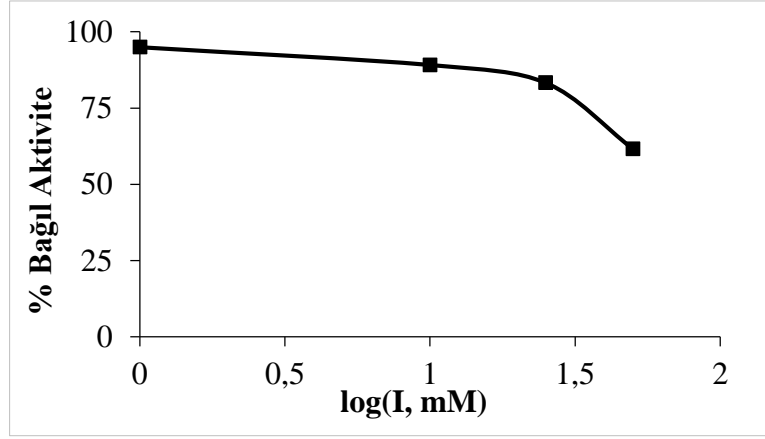
Şekil 37. Tirosinaz aktivitesi üzerine B5 molekülünün etkisi



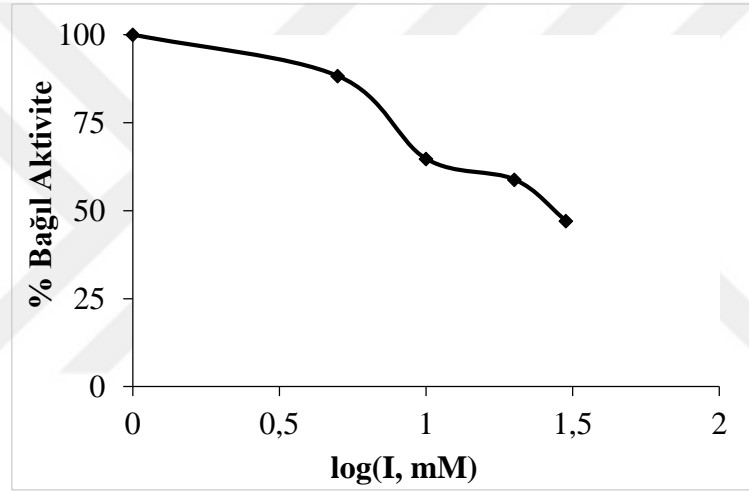
Şekil 38. Tirosinaz aktivitesi üzerine B9 molekülünün etkisi



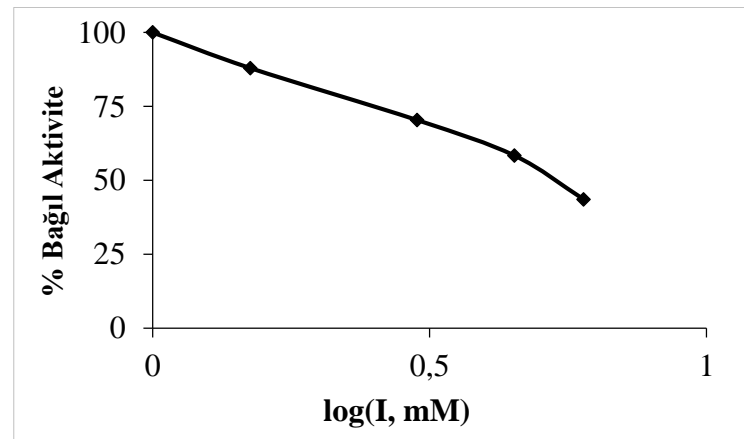
Şekil 39. Tirosinaz aktivitesi üzerine B13 molekülünün etkisi



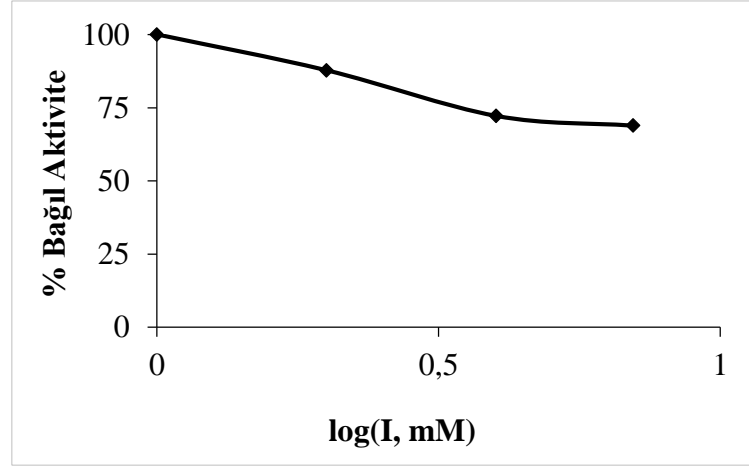
Şekil 40. Tirosinaz aktivitesi üzerine C1 molekülünün etkisi



Şekil 41. Tirosinaz aktivitesi üzerine C2 molekülünün etkisi



Şekil 42. Tirosinaz aktivitesi üzerine C3 molekülünün etkisi



Şekil 43. Tirosinaz aktivitesi üzerine C4 molekülünün etkisi

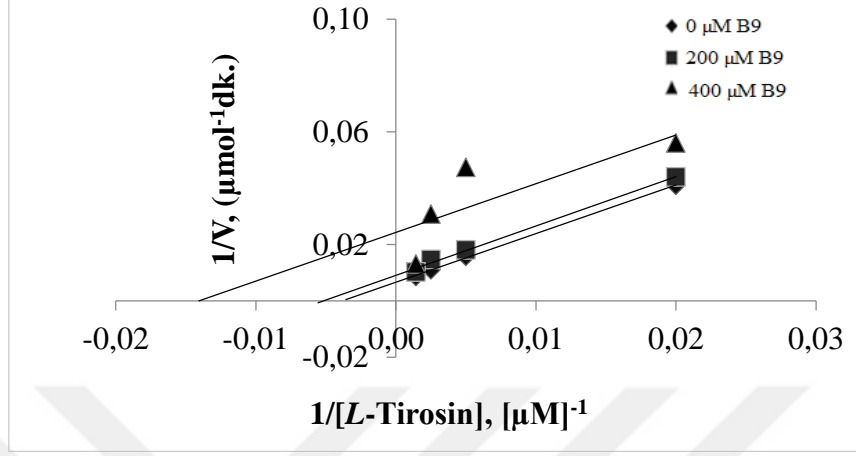
Tablo 13. Tirosinaz aktivitesi üzerine inhibitör moleküllerinin etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ , µM	Maks. İnhibisyon	
		%	[I], µM
A6	>800	44,2±0,8	800
A8	>720	20,1±0,5	720
A15	>480	28,3±1,4	480
B5	>108	29,7±2,5	108
B9	400	55,2±0,7	450
B13	580	50,1±0,4	580

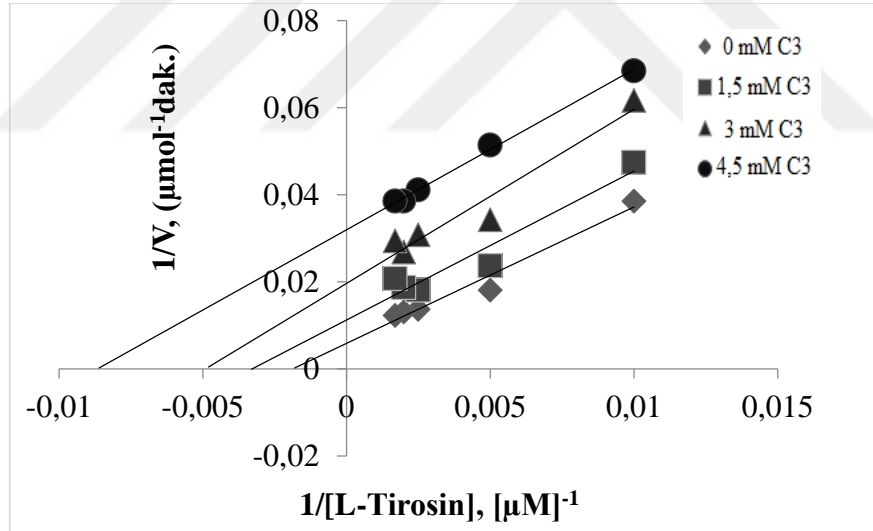
İnhibitör	IC ₅₀ , mM	Maks. İnhibisyon	
		%	[I], mM
C1	>100	38,3±0,9	100
C2	25	52,9±0,1	30
C3	5	56,5±0,9	6
C4	>7	31,1±0,1	7
Kojik asit	18	97,2±0,2	1000

Tablo 13’de görüldüğü üzere çalışılan moleküller içinde en düşük IC₅₀ değerine sahip olan B9 ve C3 bileşikleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 400 µM ve 5 mM olarak belirlendi. Dolayısıyla en etkili inhibisyonun gözlemlendiği B9 ve C3 bileşikleri için tirosinaz inhibisyon türünün belirlenmesi çalışmaları yapıldı. Bunun için inhibitör yokluğunda, organik bileşiklerin değişen konsantrasyonunda (B9 için 0,2 mM ve 0,4 mM, C3 için 1,5 mM, 3 mM ve 4,5 mM) ve 0,05-0,7 mM *L*-tirosin substratı varlığında bir seri tirosinaz aktivitesi tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlardan Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibitör varlığında ve yokluğunda K_m ve V_{max} değerleri belirlendi (Şekil 44, 45 ve Tablo 14). Buna göre her iki

bileşğin varlığında da tirozinaz yarışmasız olarak inhibe olmuşken K_i değerleri B9 ve C3 bileşikleri için sırasıyla olan $370,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$, $1,71 \pm 0,45 \text{ mM}$ olarak hesaplandı.



Şekil 44. B9 molekülü ile tirozinaz inhibisyon türünün belirlenmesi



Şekil 45. C3 molekülü ile tirozinaz inhibisyon türünün belirlenmesi

Tablo 14. B9 ve C3 bileşikleri varlığında tirozinaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değeri

	İnhibitör [μM]	K_m (μM)	V_{max} (1/(μmol/dk))	İnhibisyon türü	K_i (μM)
B9	0	257,9	149,3	Yarışmasız	370,7 \pm 0,3
	200	193	109,9		
	400	71	41,2		
	İnhibitör (mM)	K_m (μM)	V_{max} (1/(μmol/dk))	İnhibisyon türü	K_i (mM)
*C3	0	530,7	169,4	Yarışmasız	1,71 \pm 0,45
	1,5	305,4	89,2		
	3	204,2	51,0		
	4,5	115,3	31,2		

*C3 molekülü atfedilen ilgili makalede 4b şeklinde adlandırılmaktadır [195].

3.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları

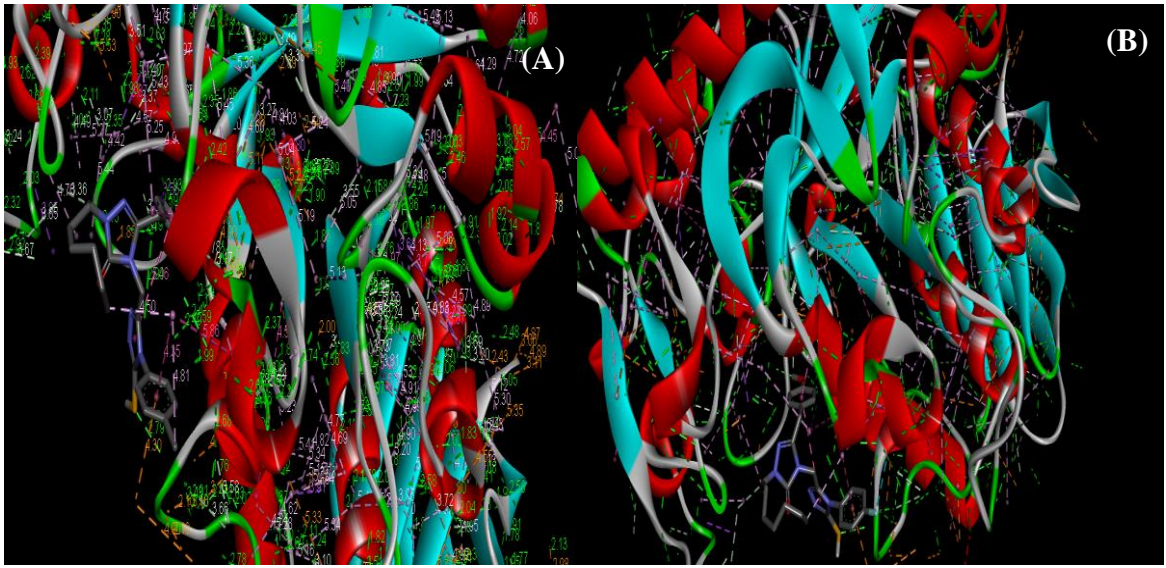
α -Amilaz ve tirozinaz inhibisyonu için potansiyel olabileceği düşünülen tüm inhibitör molekülleri için modelleme hesapları Bölüm 2.2.3.'de anlatıldığı gibi yapıldı. Öncelikle moleküllerin Gaussian 03 programı ile moleküller modelleme çalışmaları için optimize edildi. Program tarafından çoklu verilen konformasyon önerilerinden gaz fazında en düşük enerjili 10 konformasyon seçildi.

Moleküler modelleme hesaplamaları için Scripps Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen açık lisanslı AutoDock Vina ve Autodock tools programları kullanıldı [207]. *Bacillus subtilis*'den elde edilen α -amilaz için PDB banktaki 1BAG kodlu 2,5 Å° çözünürlüğe sahip X-ray Kristal yapısı kullanıldı [206]. *Agaricus bisporus* mantar tirozinazı için PDB banktan indirilen 2,78 Å° çözünürlüğe sahip 2Y9X kodlu X-ray kristal yapısı kullanılmıştır [126]. Modelleme denemelerinde protein ve ligand esnek tutuldu. Seçilen bu konformasyonlar ve kristal yapıli enzimler aktif bölgede etkileştirilerek bağlanma enerjileri program vasıtasıyla teorik olarak hesaplandı (Tablo 15-16). Bu hesaplara göre tirozinaz ve α -amilaz enzimleri için en etkili inhibitör molekülü aktif bölge bağlanma enerjisi en düşük olan molekül olarak belirlendi.

Buna göre α -amilaz enzimi için en güçlü inhibitör A17 molekülü olarak belirlenirken tirozinaz enzimi için B13 ve C1 en etkili inhibitör molekülü olarak belirlendi ve bu moleküllerin ilgili enzimlerle aktif bölgede yaptıkları etkileşim gösterildi (Şekil 46-48).

Tablo 15. α -Amilaz varlığında çalışılan inhibitör moleküllerinin bağlanma enerjileri

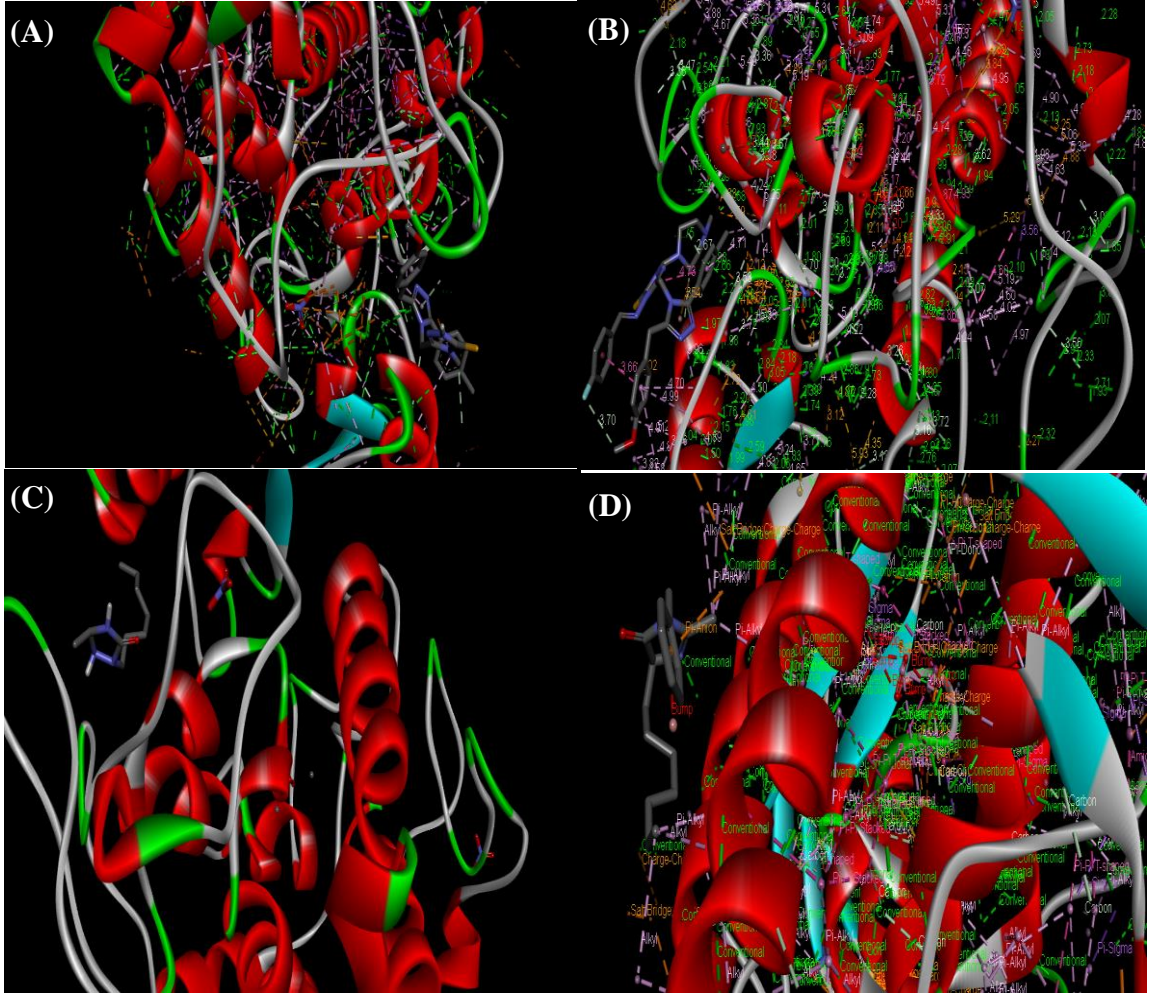
Bileşikler	ΔG (kcal/mol)
A1	-7,4
A2	-7,3
A3	-6,7
A4	-8,0
A14	-7,5
A15	-7,9
A16	-8,2
A17	-8,3



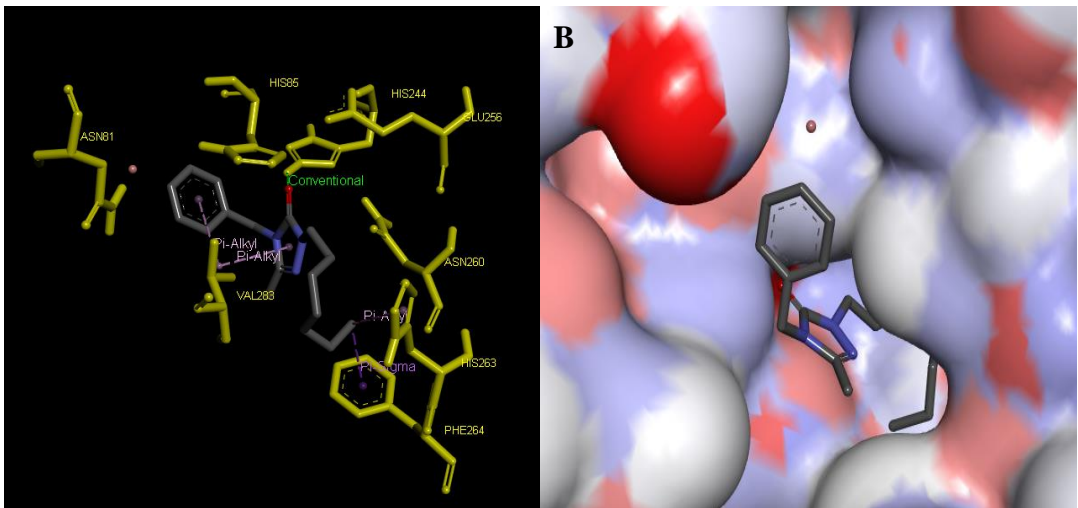
Şekil 46. α -Amilaz enzimi ile A17 (A) ve A16 (B) moleküllerinin etkileşimi

Tablo 16. Tirosinaz varlığında çalışılan inhibitör moleküllerinin bağlanma enerjileri

Bileşikler	ΔG (kcal/mol)
A6	-7,5
A8	-6,7
A15	-5,5
B5	-7,0
B9	-7,6
B13	-8,1
C1	-11,1
C2	-9,5
C3	-5,9
C4	-7,7



Şekil 47. Tirosinaz enzimi ile B13 (A), B9 (B), C1 (C) ve C3 (D) moleküllerinin etkileşimi



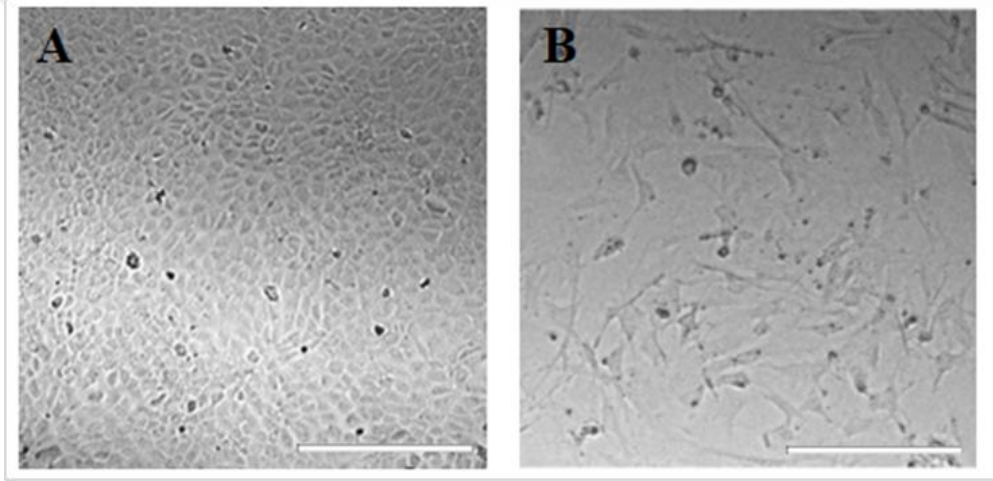
Şekil 48. Tirosinaz enzimi ile C3 molekülünün tahmin edilen konformasyonu (A), (B)

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. α -Amilaz İnhibisyon Çalışması

3.4.1.1. AR42J ve MEF Hücrelerinin Kültür Edilmesi, Çoğaltılması ve Stoklanması

AR42J ve MEF hücre serileri Bölüm 2.2.4.1.'de anlatıldığı gibi kültür edildi ve stoklanabilir sayıda hücre elde edildi. Kültür kabına yerleşerek, çoğalan hücrelerin morfolojik görüntüleri ışık mikroskobu altındaki fotoğrafları 40× büyütme oranı ile verildi (Şekil 49).

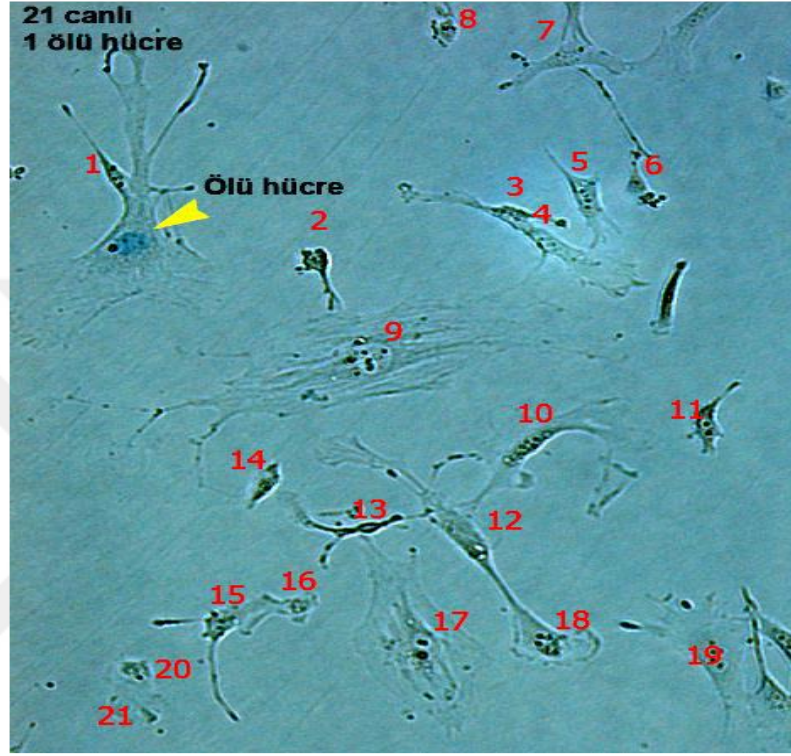


Şekil 49. AR42J (A) ve MEF (B) hücre serilerinin aydınlık alan mikroskop görüntüleri, ölçek aralığı 10 μ m'dur.

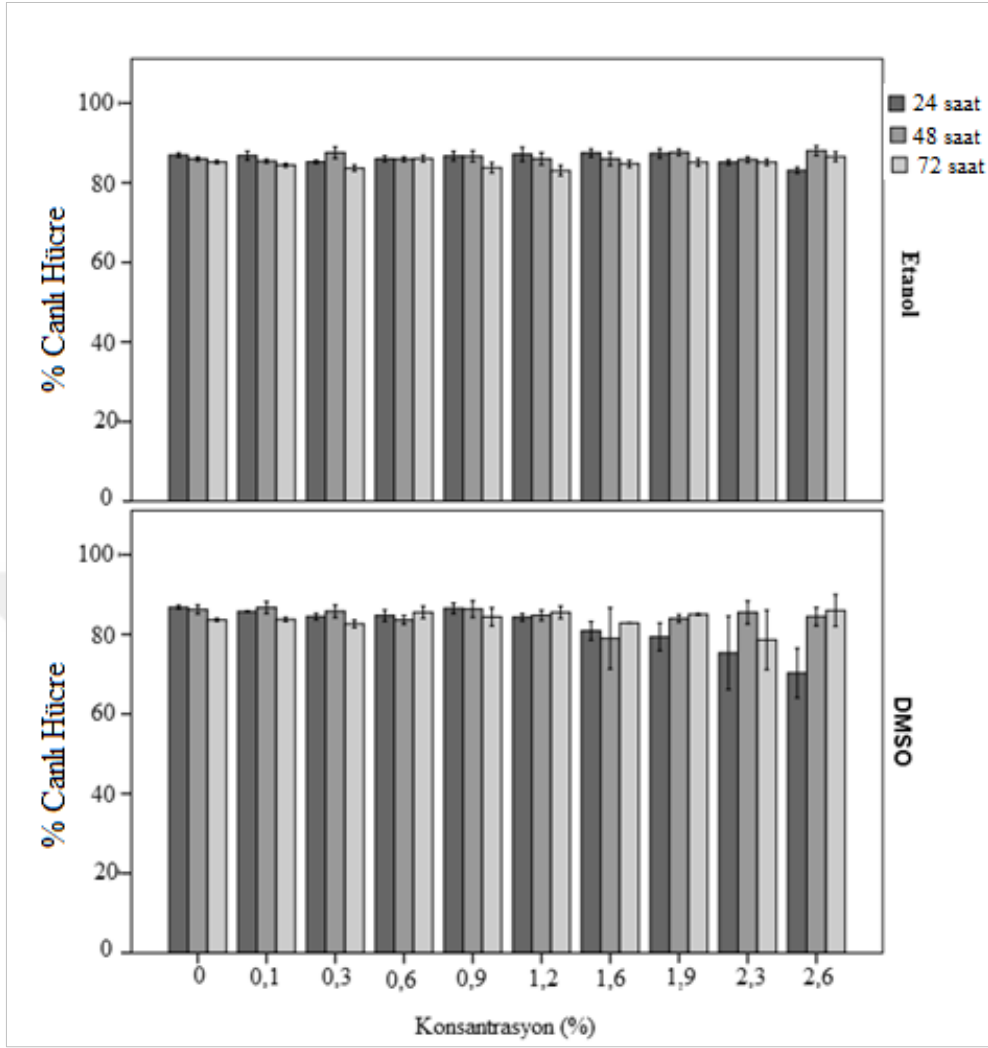
3.4.1.2. AR42J ve MEF Hücreleri Üzerinde Çözücülerin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

AR42J ve MEF hücre serileri üzerinde çözücü ilavesiyle hücre canlılığındaki değişim fiksatif ile desteklenmiş tripan mavisi boyası metodu ile belirlendi. Bu metot ile ışık mikroskobu altında ölü hücreler, hücre zar geçirgenlikleri bozulduğu için tripan mavisi boyasını içeri alarak mavi renkte görünmektedir. Çekilen fotoğraflardan ölü ve canlı hücre sayma Photoshop programının sayma özelliği kullanılarak sayıldı (Şekil 50). AR42J hücrelerinde kullanılan etanol ve DMSO stok konsantrasyonları mutlak olup kültür ortamına ilave sırasında %0,1-2,6, MEF hücrelerinde ise %0,1-2 aralığında seyreltmeler yapıldı. Kontrol amacı ile bazı kuyucuklar çözücü ile muamele edilmedi. Her iki hücre grubunda da

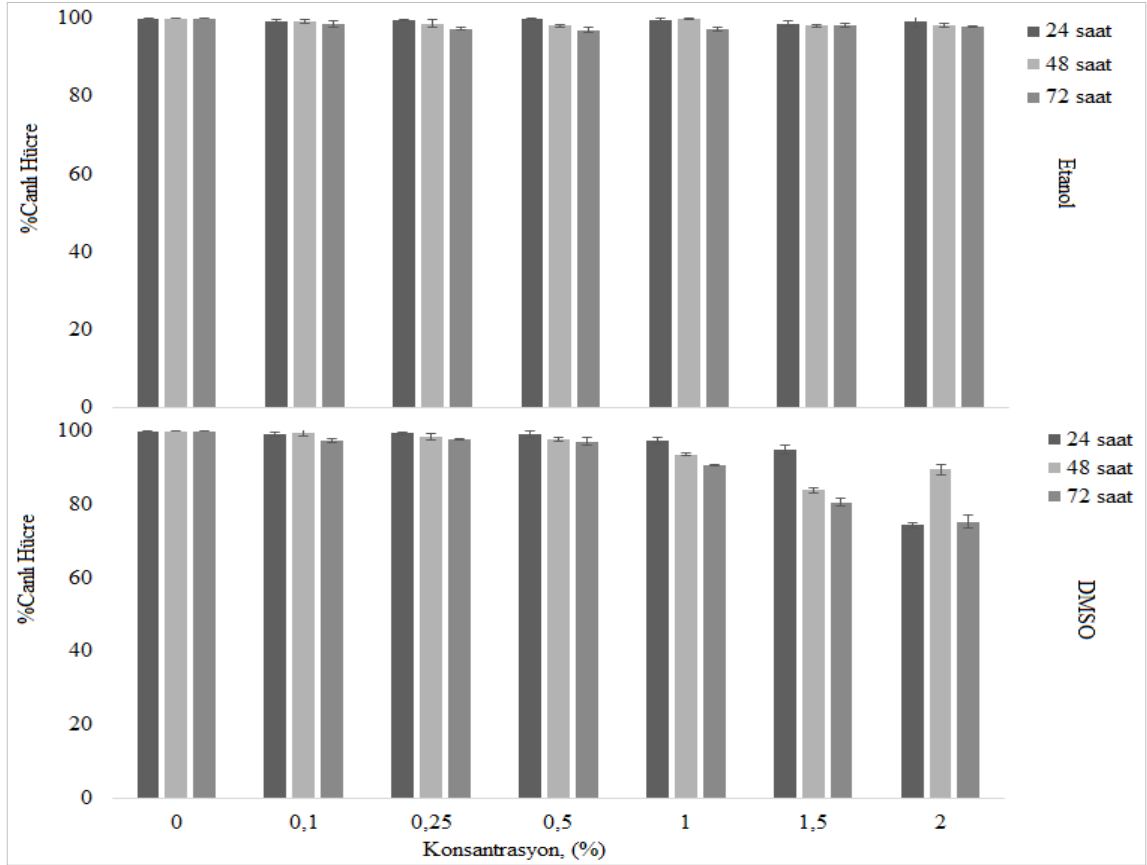
konsantrasyon ve çözücü tipleri arasında anlamlı farklar bulunmadı ($p>0,05$, Şekil 50-52). Ancak %0,5 DMSO'nun kullanılmasına karar verildi çünkü katı formda bulunan organik moleküller DMSO'da daha kolay çözünebilmektedir. Zaten DMSO aynı amaç için benzer konsantrasyonlarda sıklıkla tercih edilmektedir [235, 236].



Şekil 50. Photoshop programı ile sayılan canlı (kırmızı rakamlı) ve ölü (sarı ok) hücreler



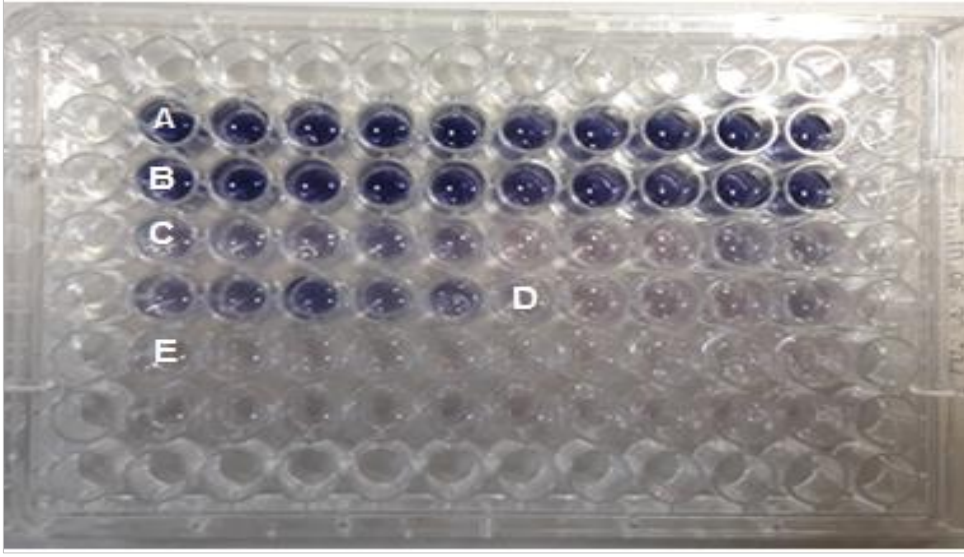
Şekil 51. Çözücülerin AR42J hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi



Şekil 52. Çözücülerin MEF hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi

➤ *α-Amilaz İnhibisyon Çalışması İçin Nişasta ve iyot Çözeltisi Konsantrasyonunun Optimize Çalışması*

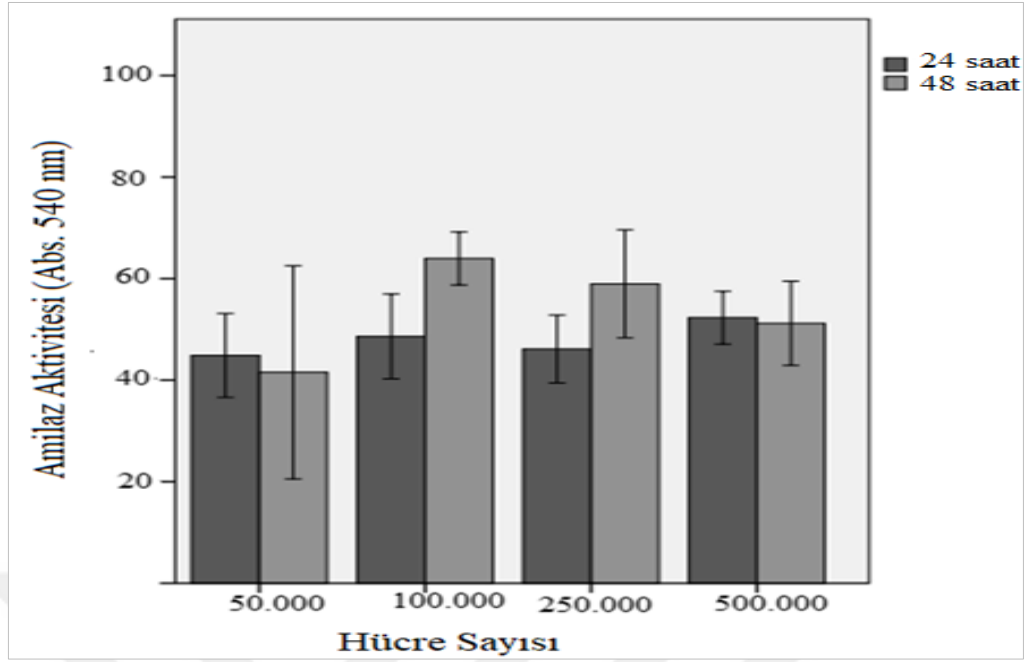
α -Amilaz inhibisyonunu AR42J hücreleri üzerinde gözlemleyebilmek için nişasta ve iyot çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarıyla hazırlanan çözeltiler 96 kuyucuklu pleyte ilave edilerek mikroyuvar okuyucuda 540 nm'de ölçüm alındı (Şekil 53). Şekil 53' de A: nişasta (%1)+ iyot (1:1), B: nişasta (%1)+iyot (1:1), C:nişasta (%0,5)+iyot (1:10), D: nişasta (%0,5)+iyot (1:100), E:nişasta (%0,25)+iyot (1:100) olarak kuyucuklara ilave edildi ve ölçüm alındı [111, 213].



Şekil 53. İyot ve nişasta çözeltisi optimizasyonu

3.4.1.3. α -Amilaz İnhibisyon Çalışması için Optimum Hücre Sayısının Tespiti

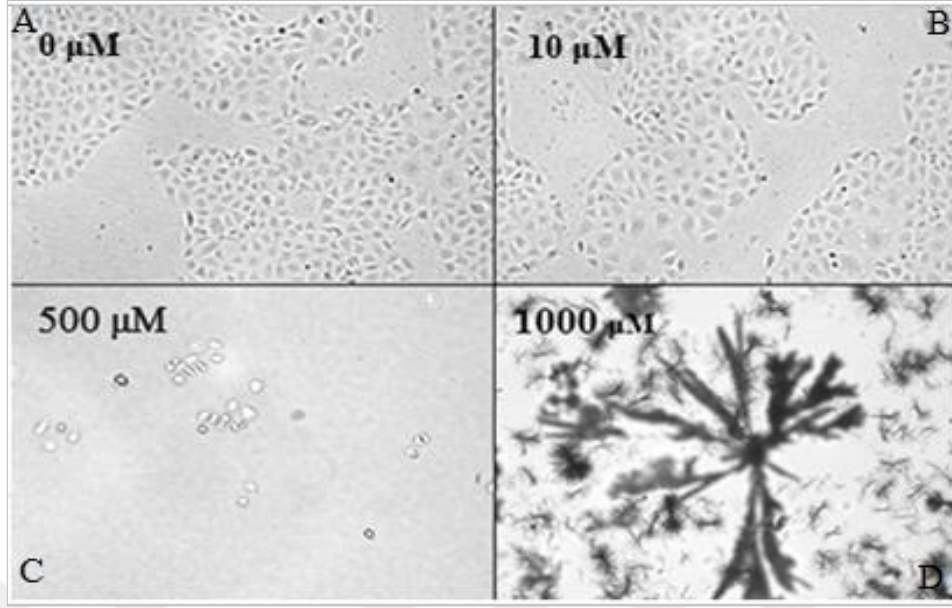
α -Amilaz inhibisyonunu gözlemlemek için öncelikle kullanılacak hücre sayısının optimize edildi. Bunun için AR42J hücresi 50.000, 100.000, 250.000, 500.000 sayılarında 24 ve 48 saat boyunca kültüre edildi. Ardından Bölüm 2.2.4.1.'de anlatıldığı gibi işlemler sırasıyla yapıldı. Spektrofotometrede okumalar yapıldıktan sonra sonuçlar Hücre Sayısı-% Amilaz Aktivitesi olarak grafiğe geçirildi (Şekil 54). Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p < 0,05$).



Şekil 54. α -Amilaz inhibisyon çalışması için optimum hücre sayısı AR42J'de belirleme çalışmaları

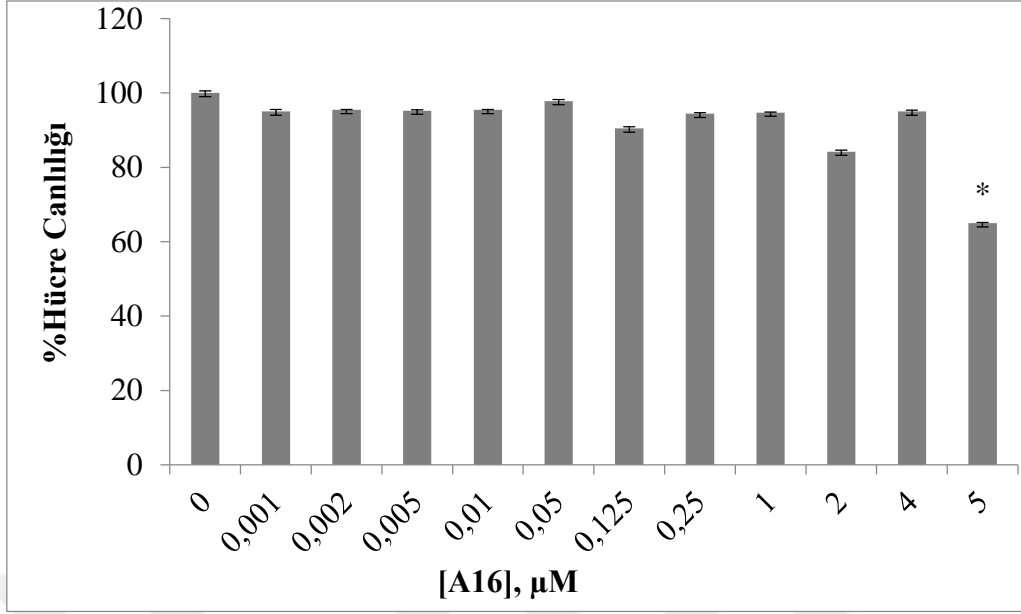
3.4.1.4. AR42J Hücre Serisi Üzerinde A16 Molekülünün α -Amilaz İnhibisyon Çalışmaları

A16 molekülü 0,001-1000 μ M konsantrasyon aralığında AR42J hücresi üzerinde α -amilaz inhibisyon çalışmaları gerçekleştirildi. A16 molekülünün 10-1000 μ M aralığında kontrol ile kıyaslandığında hücre yoğunluğuna ışık mikroskobu altında gözle görülür bir düşüşe sebep olduğu belirlendi (Şekil 55). Bu yüzden çalışmalara 0,001-5 μ M konsantrasyon aralığında devam edildi. İnhibitör eklenmeyen hücreler ile A16 molekülünün 0,001-4 μ M konsantrasyonları eklenenler arasında hücre canlılığı oranında fark gözlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 56). Dolayısıyla çalışmalar bu aralıkta α -amilaz etkinliğini %50 azaltan konsantrasyonu belirleme şeklinde sürdürüldü. Molekülün 0,001-2 μ M konsantrasyon aralığında IC_{50} değeri gözlenmemişken (Şekil 57), 4 μ M konsantrasyonunda hem kontrol hücreleri ile kıyaslandığında hücre canlılığında anlamlı bir düşüşe sebep olmadığı tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 56) hem de bu konsantrasyonda IC_{50} değeri belirlendi (Şekil 57).

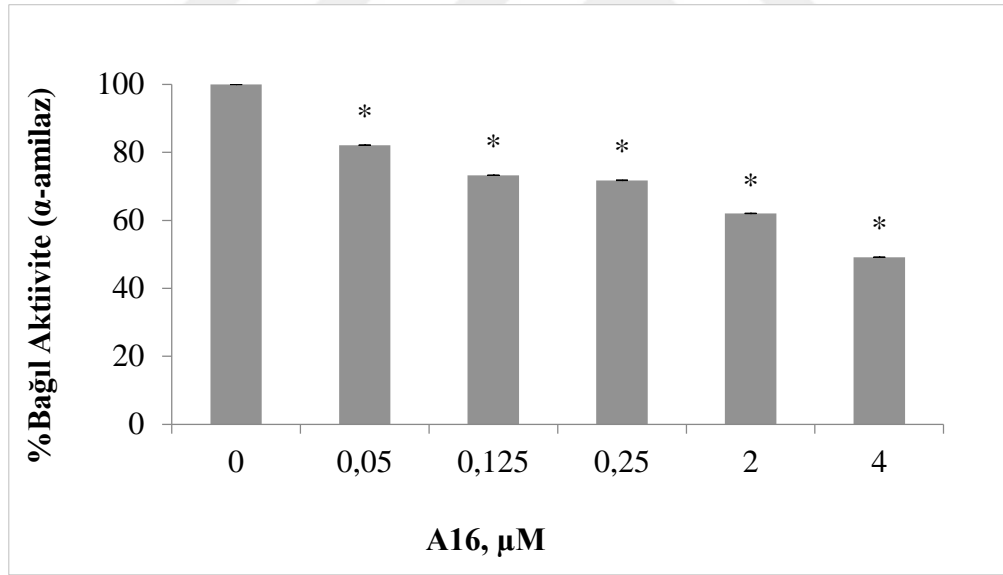


Şekil 55. AR42J hücresi üzerinde farklı konsantrasyonlarda [10-1000 μM] A16 bileşiği

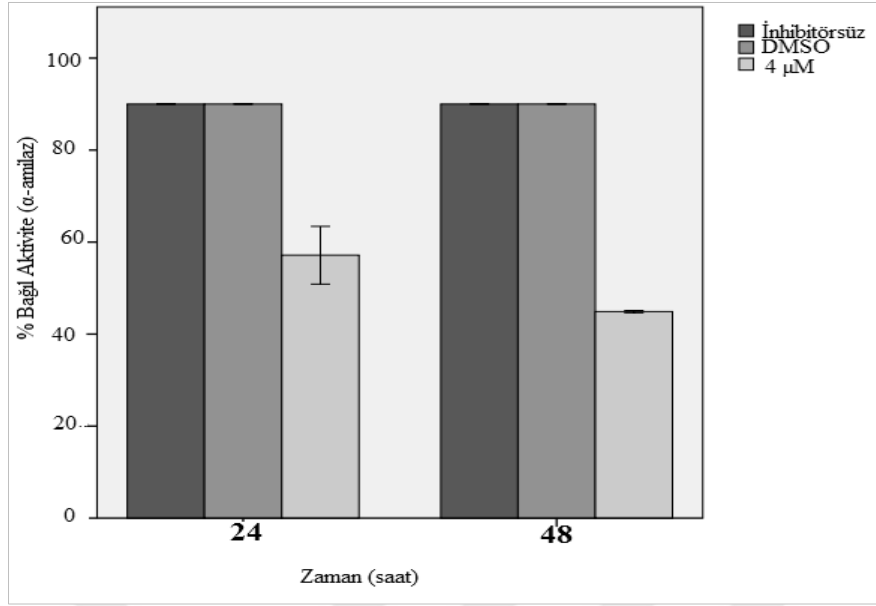
A16 bileşiğinin belirlenen bu konsantrasyonunda daha önce karar verildiği gibi AR42J hücreleri üzerinde 24 ve 48 saat aralıklarında α -amilaz inhibisyon çalışmaları yapıldı. Ve sonuçlarda anlamlı bir fark bulunduğu istatistiksel olarak tespit edildi ($p < 0,05$) (Şekil 58). Ayrıca pozitif kontrol molekülü olarak akarboz kullanıldı. Akarbozun 0,05, 0,5, 5, 25, 50, 250, 500 μM arasında yapılan seyreltmeleriyle AR42J hücreleri üzerinde α -amilaz inhibisyon çalışmaları sonucu IC_{50} değeri 186,2 μM bulundu (Şekil 59).



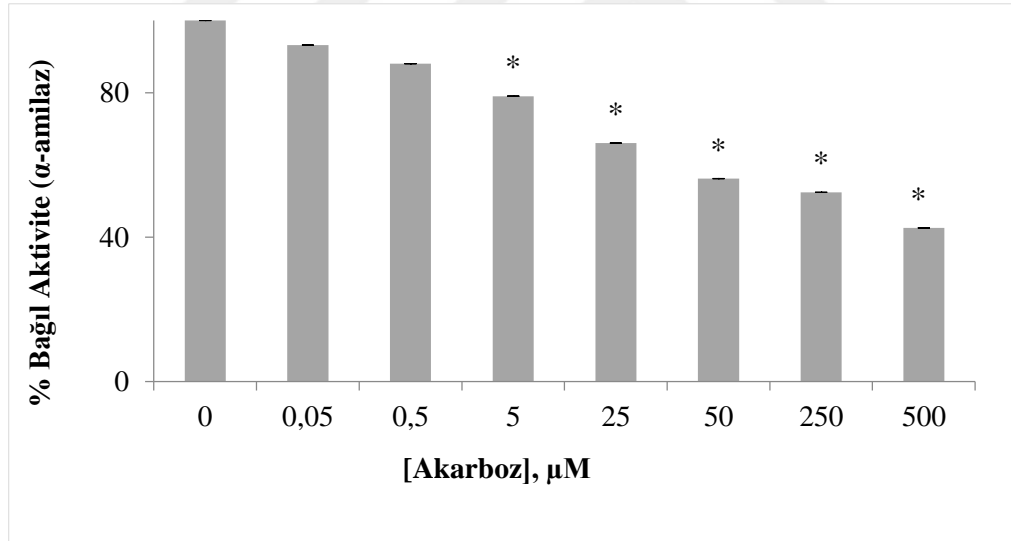
Şekil 56. AR42J hücre canlılığı üzerinde A16 bileşiğinin etkisi *(Negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark, $p < 0,05$)



Şekil 57. AR42J üzerinde farklı konsantrasyonlarda 48 saat sonunda A16 bileşiğinin α-amilaz inhibisyonu üzerine etkisi *(Negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark, $p < 0,05$)



Şekil 58. AR42J hücre serisi üzerinde A16 molekülünün farklı inkübasyon sürelerinde (24 ve 48 saat) α -amilaz inhibisyonu üzerine etkisi

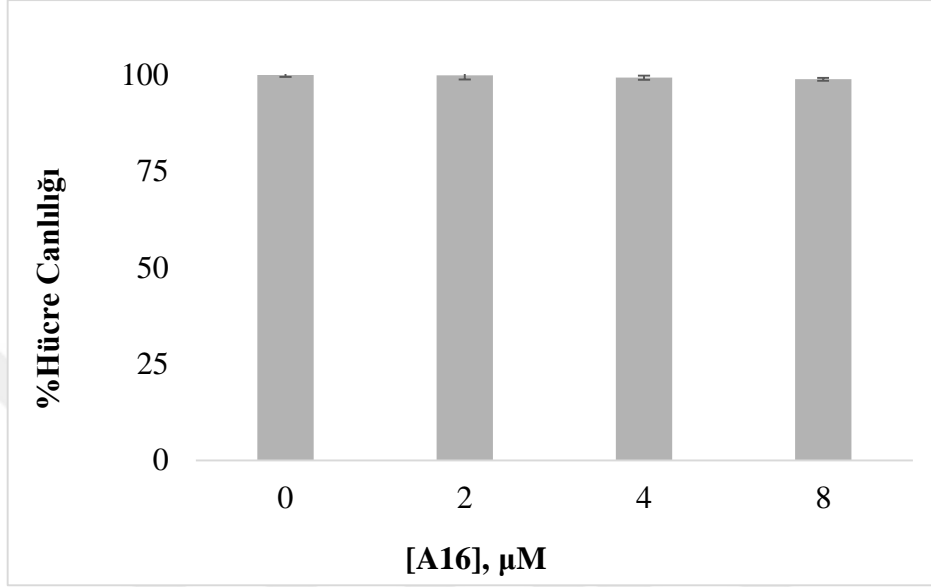


Şekil 59. AR42J hücre serisi üzerinde akarboz molekülünün α -amilaz inhibisyon çalışmaları *(Negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark, $p < 0,05$)

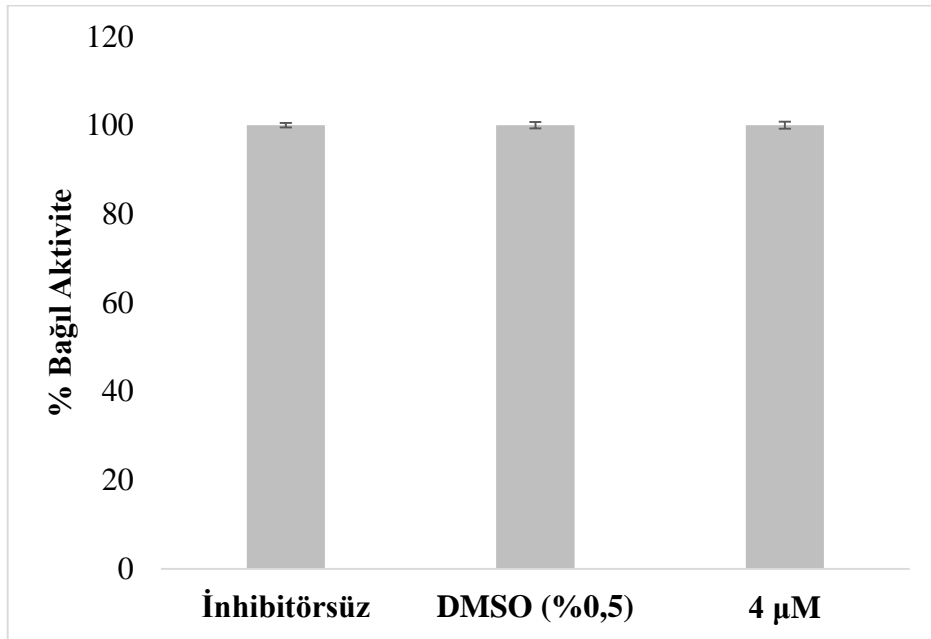
3.4.1.5. MEF Hücre Serisi Üzerinde A16 Molekülünün α -Amilaz İnhibisyon Çalışmaları

MEF hücreleri de AR42J ile aynı muamelelere tabi tutuldu. Hem akarboz hemde A16 molekülünün MEF hücrelerinde hücre canlılığında bir kayba sebep olmadığı gözlemlendi (Şekil 60). Ayrıca bu konsantrasyonda AR42J'nin aksine absorbans değerleri arasında fark

bulunmadı (Şekil 61). Negatif kontrol olarak kullanılan MEF hücrelerinde herhangi bir amilaz inhibisyonunun tespit edilememiş olması AR42J için yapılan ölçümlerin spesifitesini göstermektedir.



Şekil 60. A16 bileşiğinin MEF hücrelerinin canlılık üzerine etkisi

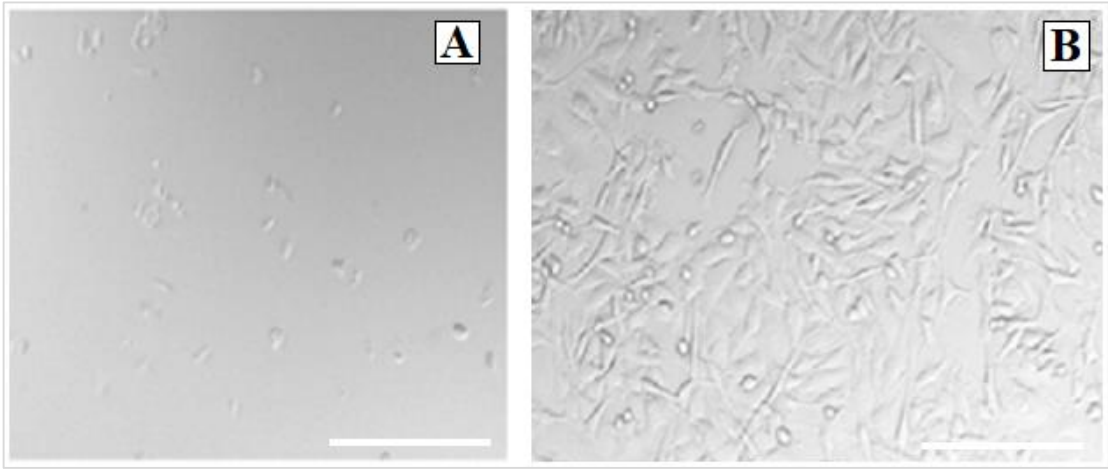


Şekil 61. A16 molekülünün MEF hücreleri üzerinde α -amilaz inhibisyon etkisi

3.4.2. VMM917 Hücreleri Üzerinde Tirosinaz İnhibisyon Çalışmaları

3.4.2.1. VMM917 Hücre Serisi Optimizasyonu

Melanin sentezinde kilit nokta olarak bulunan tirosinaz inhibisyonunu gözlemlemek için sunulan çalışmalarda kullanılacak olan VMM917 hücre serisi kültür edildi. Hücrelerin kültür başlangıcında ve sonundaki çoğalma profili ve morfolojik görüntüleri 40x büyütme ile Şekil 62’de gösterilmektedir.

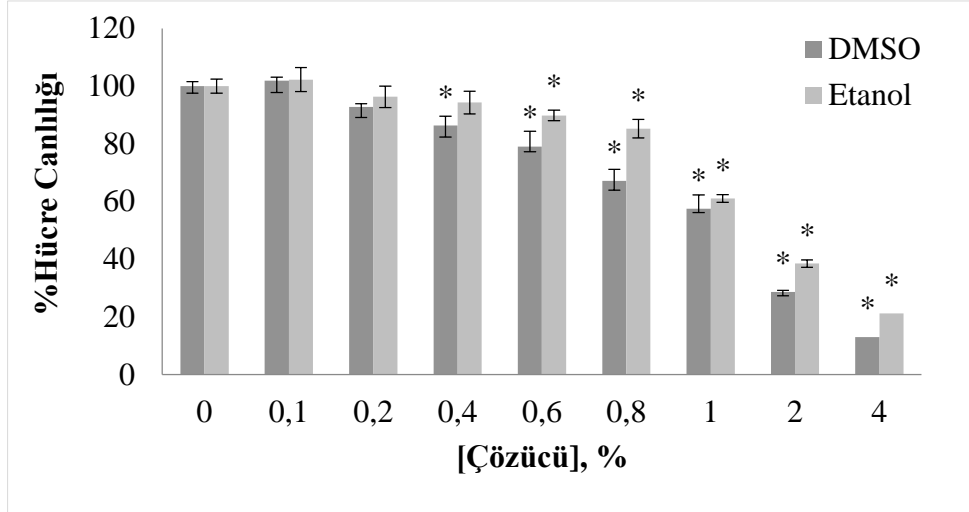


Şekil 62. VMM917 hücre serisinin çoğaltılma aşamaları A) yeni kültür edilmiş B) konflüent hücreler, ölçek aralığı 10 µm'dur.

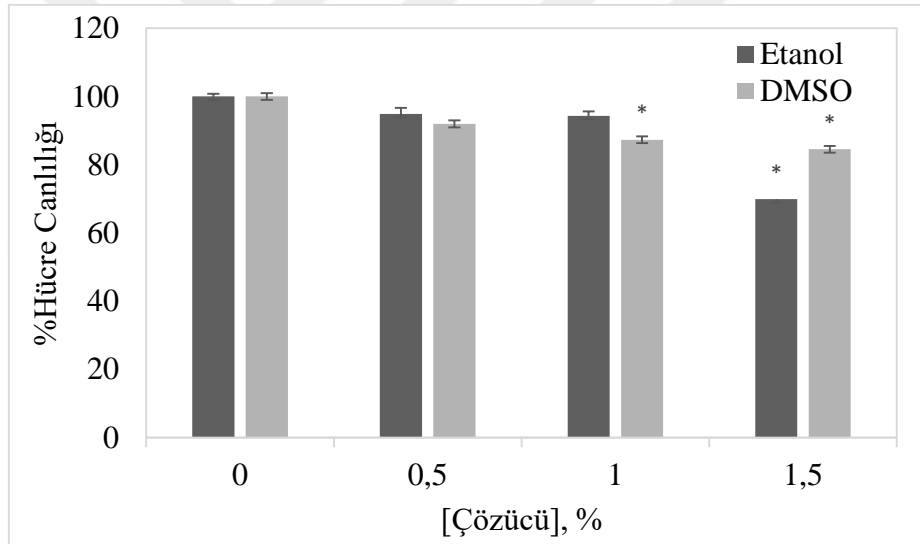
3.4.2.2. VMM917 ve BJ Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Çalışmaları

3.4.2.2.1. VMM917 ve BJ Hücreleri Üzerinde Çözücünün Sitotoksik Etkisi

VMM917 ve BJ hücreleri üzerinde çözücü etkisi MTT (Şekil 63) ve tripan mavisi (Şekil 64) testi ile değerlendirildi.



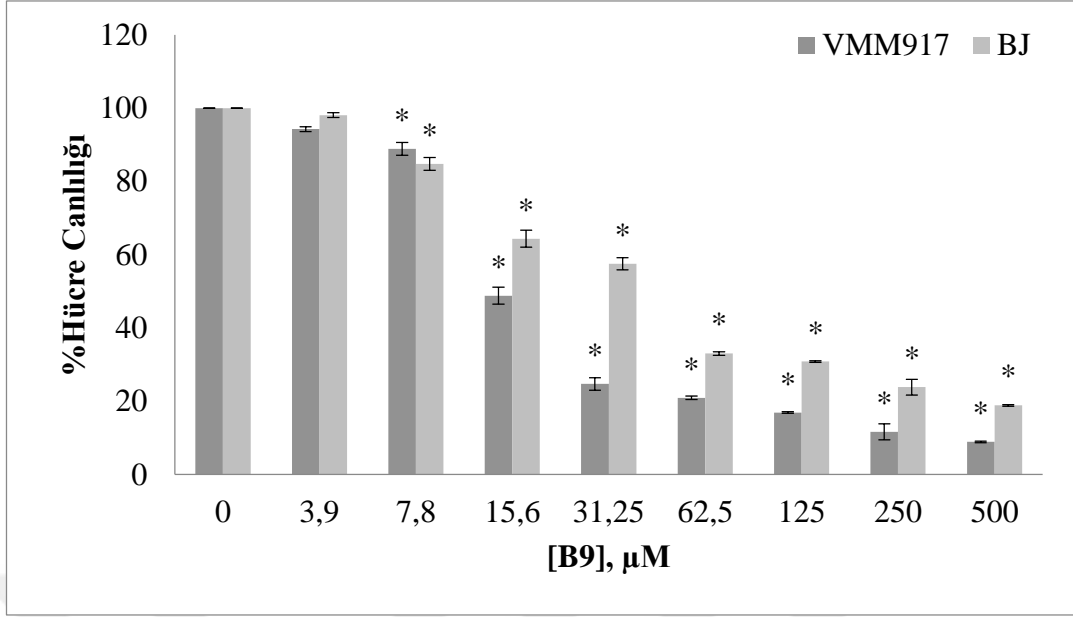
Şekil 63. DMSO ve etanolün VMM917 hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi



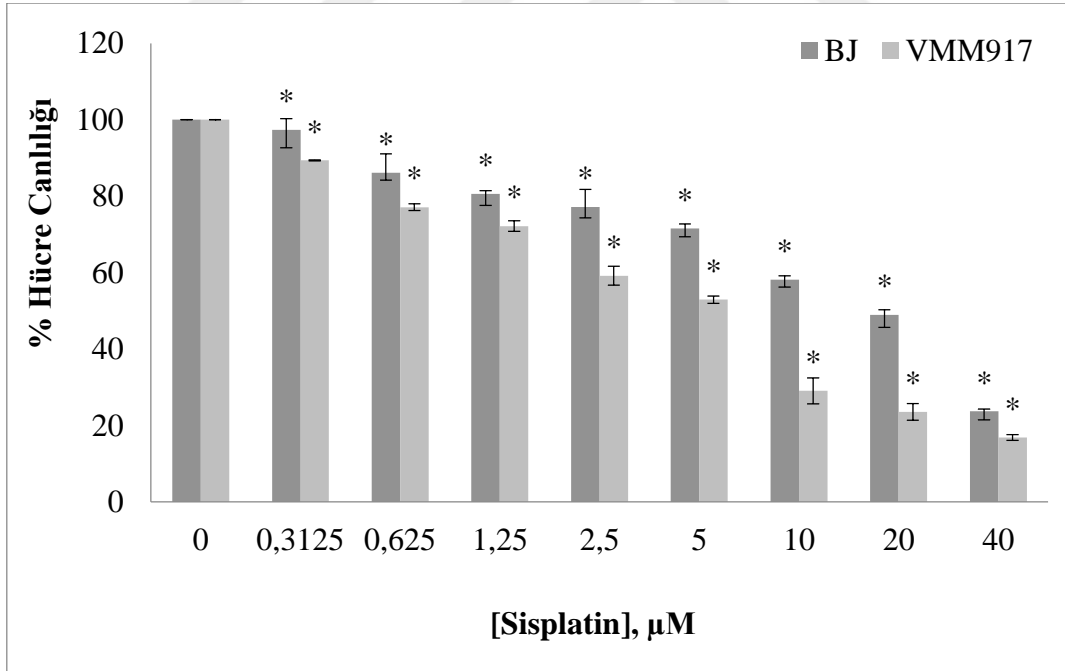
Şekil 64. DMSO ve etanolün BJ hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi

3.4.2.2.2. VMM917 ve BJ Hücre Serileri Üzerinde B9, Sisplatin ve Kojik Asit Moleküllerinin Sitotoksosite Çalışmaları

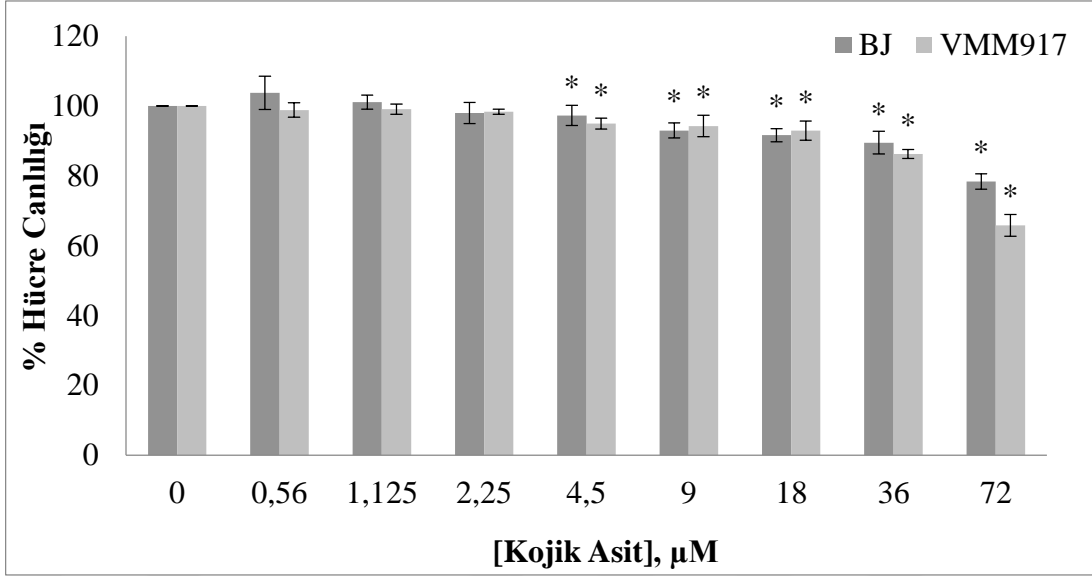
VMM917 ve BJ hücreleri üzerinde B9, sisplatin ve kojik asit molekülleri için, MTT testiyle sitotoksik etkinliği negatif kontrol grubuna oranlanarak değerlendirildi. Sonuçlar moleküllerin farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan %Hücre Canlılığı grafiği ile sırasıyla Şekil 65-67’de verildi.



Şekil 65. B9 bileşiğinin VMM917 ve BJ hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite çalışması *(B9 bileşiği ile muamele edilmemiş negatif kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı fark $p < 0,05$ gözlenmiştir)



Şekil 66. Sisplatinin VMM917 ve BJ hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite çalışması *(Sisplatin ile muamele edilmemiş negatif kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı fark $p < 0,05$ gözlenmiştir)



Şekil 67. Kojik asitin VMM917 ve BJ hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite çalışması
*(Kojik asit ile muamele edilmemiş negatif kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı fark $p < 0,05$ gözlenmiştir)

3.4.2.2.3. Sitotoksosite Sonuçlarına Göre IC₅₀ Değerleri ve Seçicilik İndeksleri

B9, sisplatin ve kojik asit bileşikleri için VMM917 ve BJ hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmalarının hesaplanan IC₅₀ değerleri ve seçicilik indeksleri Tablo 17’de verildi.

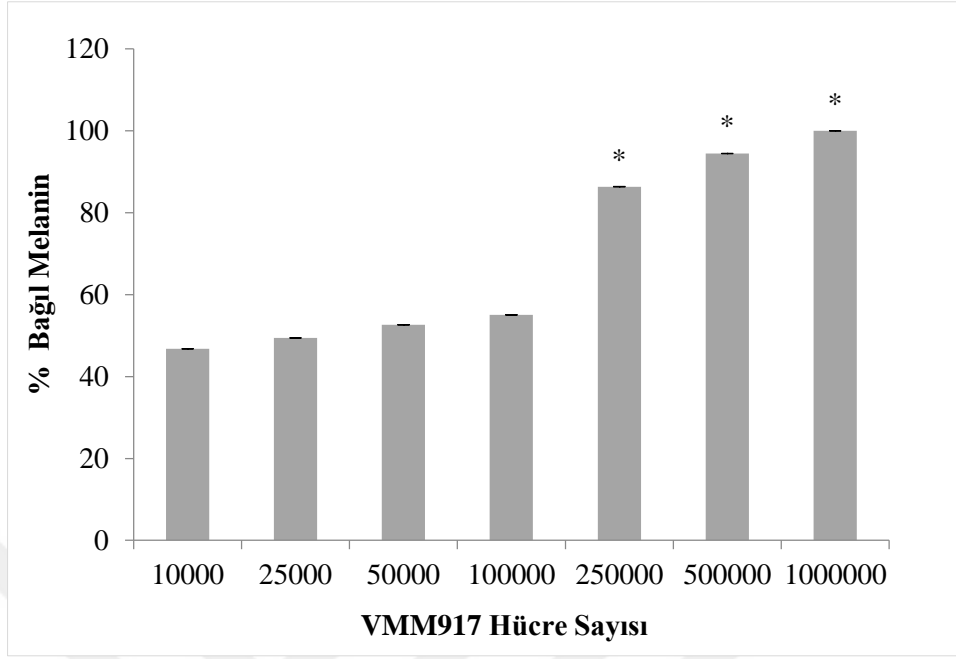
Tablo 17. IC₅₀ değerleri ve seçicilik indeksleri

Molekül	VMM917 Hücre Serisi IC ₅₀	BJ Hücre Serisi IC ₅₀	Seçicilik İndeksi
B9	16,8±0,7	82,59±6,43	4,91
Sisplatin	8,02±0,64	17,1±1,1	2,08
Kojik Asit	>72	>72	T.E.*

*T.E.: Tespit edilemedi.

3.4.2.2.4. VMM917 Hücre Serisinde Melanin Miktarının Optimizasyonu

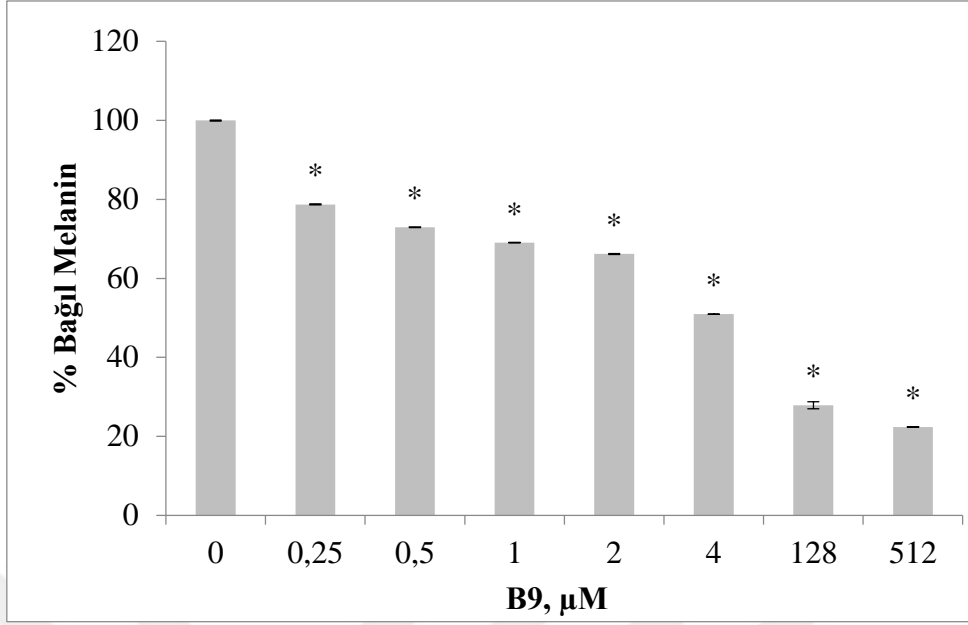
Tirosinaz inhibisyonunu dolaylı olarak gözlemleyebilmek için VMM917 hücresinde sentezlenen melanin miktarının spektrofotometrik olarak ölçülebilecek uygun konsantrasyonunun bulunabilmesi için optimize edildi, sonuçlar VMM917 Hücre Sayısı-% Bağlı Melanin grafiği şeklinde verildi (Şekil 68).



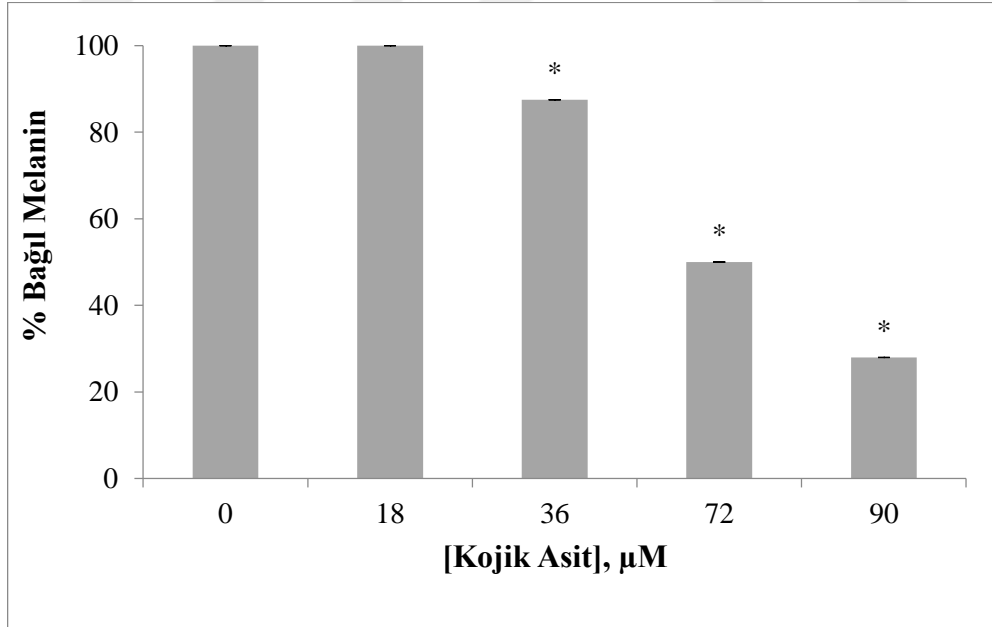
Şekil 68. Melanin miktarı optimizasyonu

3.4.2.2.5. VMM917 Hücresinde B9, Kojik Asit, A8 Moleküllerinin Tirosinaz İnhibisyon Etkisi

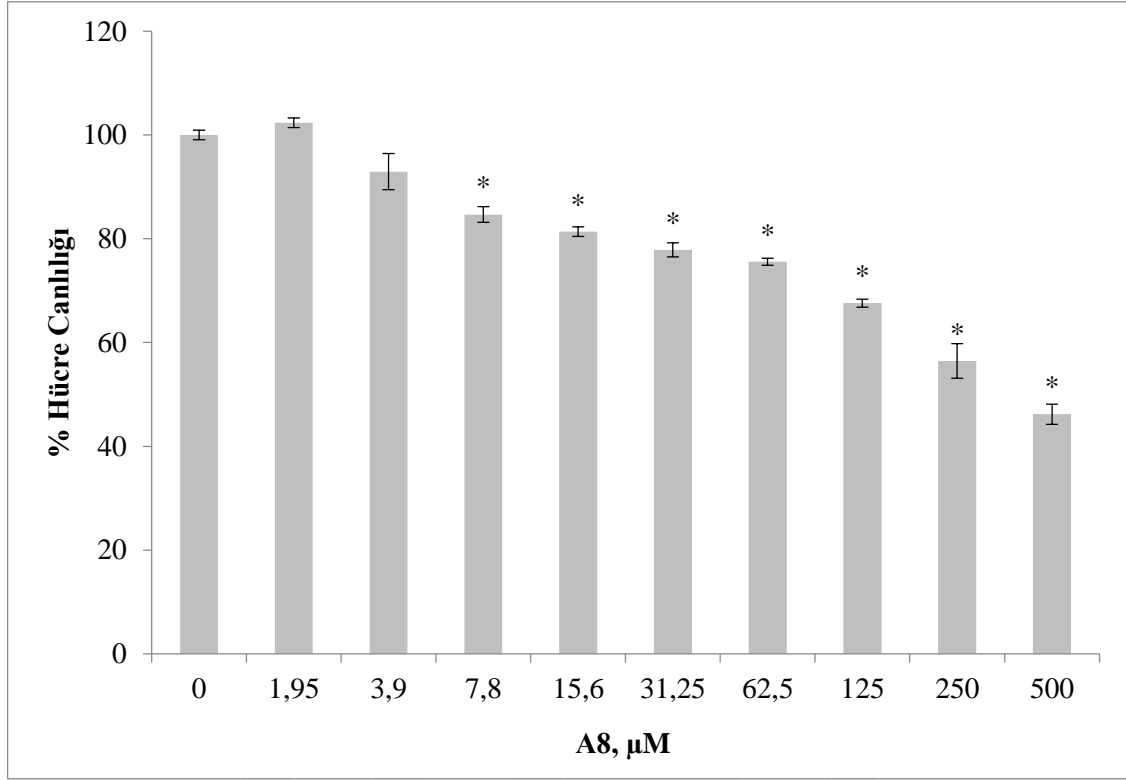
VMM917 hücresinde sentezlenen melanin miktarının B9 molekülü varlığında %50 azalmaya sebep olduğu konsantrasyon tirosinaz inhibisyonu olarak değerlendirildi. Sonuçlar B9 molekülünün konsantrasyonuna karşı hem her çalışma öncesi tekrarlanan sentetik melanin kalibrasyon grafiği varlığında hesaplanan mg/mL cinsinden hesaplanan melanin miktarı, hem de % Bağlı Melanin şeklinde verildi (Şekil 69, 70). Buna göre B9 molekülünün 4 μ M konsantrasyonu IC_{50} olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan kojik asit içinde % Bağlı Melanin grafiği çizildi ve IC_{50} değeri 72 μ M olarak hesaplandı (Şekil 71). Negatif kontrol olarak kullanılan A8 molekülü içinde % Bağlı Melanin grafiği çizildi fakat IC_{50} değeri gözlenemedi (Şekil 72).



Şekil 69. VMM917 hücresi üzerinde B9 bileşiği ile inhibisyon çalışması *(B9 bileşiği ile muamele edilmemiş negatif kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı fark $p < 0,05$ gözlenmiştir)



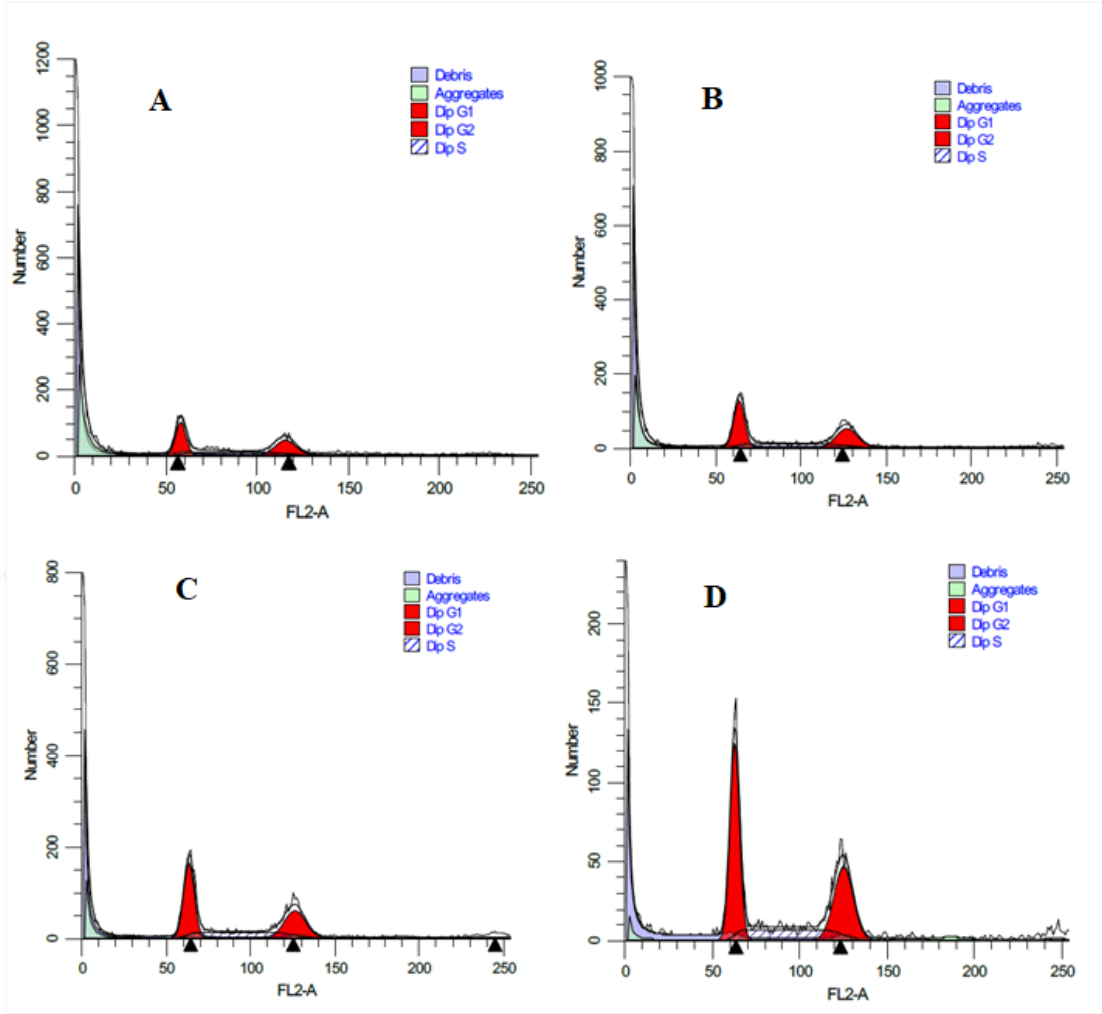
Şekil 70. VMM917 hücrenin kojik asit ile melanin miktarı değişimi *(Kojik asit ile muamele edilmemiş negatif kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı fark $p < 0,05$ gözlenmiştir)



Şekil 71. VMM917 hücrelerin A8 ile melanin miktarı değişimi

3.4.2.2.6. VMM917 Hücre Serisinde B9 Bileşiminin Hücre Döngüsüne Etkisi

VMM917 hücre serisi üzerinde B9 molekülünün hücre döngüsü üzerinde etkisini görebilmek için DNA içerik kiti kullanıldı. Akım sitometrik analizler gerçekleştirildi. Negatif kontrol grubuna B9 molekülünün çözücüsü olan DMSO uygulandı. 24 saatin sonunda alınan sonuçlar Şekil 73’de verildi. Ayrıca hücre döngüsü analiz sonuçları Tablo 18’de sunuldu.



Şekil 72. Farklı konsantrasyonlarda B9 bileşiği ile 24 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analizi A) Kontrol grubu B) 8 μ M B9 bileşiği C) 16 μ M B9 bileşiği D) 32 μ M B9 bileşiği

Tablo 18. VMM917 hücresinde B9 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda hücre döngüsü analizi sonuçlarının karşılaştırılması

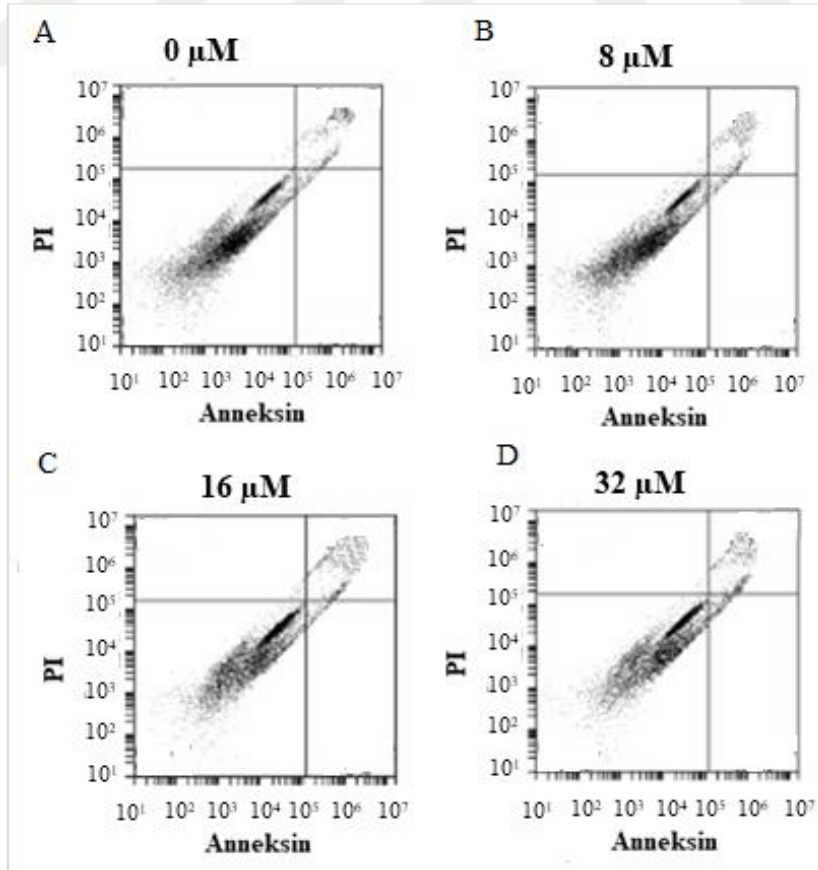
	Kontrol	8 μ M	16 μ M	32 μ M
G₁ Evresi	46,6 \pm 1,55	43,1 \pm 0,521 ^a	41,8 \pm 0,945 ^b	36,2 \pm 1,82 ^b
p değeri		(0,012)	(0,001)	(0,0001)
G₂/M Evresi	31,9 \pm 2,07	31,9 \pm 0,491	31,9 \pm 1,48	32,1 \pm 1,75
p değeri		(1,00)	(1,00)	(0,996)
S Evresi	21,5 \pm 1,05	25,0 \pm 0,271	26,4 \pm 2,23 ^a	31,7 \pm 3,13 ^b
p değeri		(0,118)	(0,022)	(0,0001)
Sub-G₁ Evresi	20,3 \pm 2,10	27,1 \pm 1,69 ^b	38,7 \pm 1,83 ^b	35,8 \pm 2,85 ^b
p değeri		(0,004)	(0,0001)	(0,0001)

p, "One-Way ANOVA testi" ne göre verildi. Grup içindeki Post-Hoc değerlendirmeler "Tukey" ile testi yapıldı. ^a Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, ^b Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,01.

Hücre döngüsü çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, B9 molekülünün konsantrasyon ile orantılı olarak G₁ fazındaki hücre popülasyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı ($p<0,05$), S fazındaki hücre popülasyonunu ise istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde artırdığı belirlendi ($p<0,05$). Aynı zamanda molekülün sub-G₁ fazındaki popülasyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı belirlendi ($p<0,01$). Bu veriler B9 molekülünün sitotoksik etkisinin VMM917 hücrelerinde hücre döngüsünü S fazında durdurabildiğini ve apoptozu indükleyebildiğini göstermektedir.

3.4.2.2.7. VMM917 Hücre Serisi Üzerinde B9 Bileşiğinin Apoptotik Etkisi

VMM917 hücre serisi üzerinde B9 molekülünün apoptotik etkisini görebilmek için Anneksin V-FITC kiti kullanıldı. Flow sitometrik analizler gerçekleştirildi. Negatif kontrol grubuna B9 molekülünün çözücüsü olan DMSO uygulandı. 24 saatin sonunda alınan sonuçlar Şekil 74’de verildi. Ayrıca apoptoz analizinin toplu sonuçları Tablo 19’da sunuldu.



Şekil 73. B9 varlığında apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarının analizi

Tablo 19. B9 varlığında apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarının karşılaştırılması

	Kontrol	8 μM	16 μM	32 μM
Sağlam Hücre	93,3 \pm 1,05	93,1 \pm 3,29	89,6 \pm 1,88 ^a	88,8 \pm 1,76 ^b
p değeri		(0,471)	(0,012)	(0,005)
Nekrotik Hücre	0,450 \pm 0,191	0,575 \pm 0,096	1,33 \pm 0,275 ^b	0,375 \pm 0,126
p değeri		(0,777)	(0,0001)	(0,939)
Apoptotik Hücre	4,20 \pm 1,1	6,55 \pm 3,17	9,03 \pm 2,05 ^a	10,8 \pm 1,95 ^b
p değeri		(0,463)	(0,040)	(0,006)

p, "One-Way ANOVA testi" ne göre verildi. Grup içindeki Post-Hoc değerlendirmeler "Tukey" ile testi yapıldı. ^a Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, ^b Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,01.

Apoptoz analizi sonucu elde edilen veriler ışığında, B9 molekülünün özellikle 16 ve 32 μ M konsantrasyonunun apoptotik hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı gözlenmiştir (p<0,01). B9 molekülünün 8 μ M konsantrasyonu apoptotik ve nekrotik hücre sayısını sayısal olarak artırmasına rağmen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05). Bu sonuçlar hücre döngüsü analizinde sub-G₁ fazında görülen apoptotik hücreler için elde edilen sonuçları desteklemektedir.

4. TARTIŞMA

İnsanlar bugün tarihte benzeri görülmemiş bir yaşam süresine ve kalitesine sahiptirler. Gelişmiş dünyadaki yaşam süresindeki artışın çoğu özellikle kaliteli beslenme, modern sağlık hizmetleri ve iyileştirilmiş sağlık koşullarına bağlanmaktadır [200]. Günümüzde, insanoğluna zarar veren sayısız hastalığı tedavi etmek için kullanılan farmasötik ajanların geliştirilmesi ve kullanıcıya iletilmesi de insan sağlığını iyileştirmeye çok önemli bir katkı sağlamaktadır [29]. İlaç araştırmaları ilacın konsantrasyonu ile etkisi arasındaki ters orantının kuvvetine ve ilacın yan etkisinin azaltılmasına odaklanmaktadır. Araştırmacılar özellikle kimyagerler ve biyologlar sıklıkla terapötik bir molekülün çözünürlük ve proteinlere bağlanma potansiyelinin hedef doğrulamının öneminden bahsetmektedirler. Fakat bunların yanında asıl önemli olanın ilacın biyokimyasal mekanizması olduğu vurgulanmaktadır [33].

Günümüzde klinik kullanımda olan ve biyolojik olarak oral yoldan alınan terapötik ilaçlar, enzim inhibitörleri olarak işlev gören hayati önem taşıyan etkili ilaçlar olarak değerlendirilmektedir. Aynı şekilde keşfedilmiş ve geliştirilmeye çaba harcanılan ilaçların çoğu, spesifik enzim hedeflerinin inhibisyonu ile etki eden ilaç adaylarının belirlenmesi ve optimize edilmesi üzerine odaklanmaktadır. Doğadaki metabolik süreçler enzimlerin katalitik gücüne bağımlıdır [237]. Enzimlerin ilaçlar için önemli hedef molekül olmaları onların hastalık süreçlerinde yüksek spesifiteye sahip hedef tanımlama ve izlenebilirliğinden kaynaklanmaktadır. Enzim inhibitörleri enfeksiyon, metabolik, kardiyovasküler, nörolojik hastalıklar ve kanser gibi pek çok patoloji için biyolojik bir silah olarak görülmektedir [5].

İlaç keşfi enzimolojisindeki uzman görüşleri, mevcut uygulamalar ve geleceğe dair yönlendirmeler, konformasyonel olarak farklı enzim formlarının güçlü spesifiteye sahip yüksek seçicilik gösteren inhibitörlerinin keşfedilmesi için spesifik enzim hedeflerinin katalitik mekanizmasının detaylı olarak anlaşılması ve bu bölge ile etkileşime giren küçük moleküllü bileşiklerin tanımlanarak optimize edilmesini vurgulamaktadır [29, 200]. Teröpatik ilaçlarla ilgilenen pek çok araştırmacı oral yolla alınan onaylı, özellikle organik sentez yapılı enzim inhibitörleri olan ilaçların molekül kütlesi, hidrojen bağ donörü ile alıcı sayısı ve apolar yüzey alanı gibi fizikokimyasal özellikleriyle ilgilenmektedir [238-240]. Günümüzde hastalıkların tedavi süreçlerinde enzim inhibitörü olarak ilaç olma potansiyeline sahip küçük molekül ağırlıklı organik sentez moleküllerinin çoğunun hedeflenen enzimlere

dönüşümlü olarak zayıf etkileşimlerle bağlandıkları bildirilmektedir. Dönüşümlü olarak bağlanabilen inhibitör molekülü, enzim-substrat kompleksine, serbest enzime veya hem enzime hem substrata aynı anda bağlanabilmektedir. Bunu anlamak için molekülün IC_{50} değerinin, denge ayrışma sabiti olan K_i 'nin ve bağlanmaya ait Gibbs serbest enerjisinin belirlenmesi gerekmektedir [33, 200, 241, 242].

Ticari olarak piyasaya sürülmeye değer görülen potansiyel ilaç olabilecek moleküllerin çoğu beş üyeli heterosiklik halkaya sahip sentez bileşiklerinden oluşmaktadır. Heteroatomların halka içerisindeki konumuna göre pek çok izomer oluşmaktadır. Bu izomerlerden günümüzde en aktif ve araştırılmaya hala devam edilen moleküller 1,2,4-triazol, 1,3,4-oksadiazol ve 1,3,4-tiyadiazol türevleridir. Geçmişten günümüze bu heterosiklik bileşiklerin başta anti-kanser olmak üzere anti-fungal, anti-inflamatuvar, anti-tüberküloz, diüretik, analjezik, anti-bakteriyel, anti-viral, anti-koagulant, anti-depresan, anti-oksidan ve anti-hipertansif özellikleri ortaya konulmuştur [243-257].

Farmakolojik özelliğe sahip klinik değerlendirmeler açısından değerli görülen özellikle etkili enzim inhibisyonuna sebep olan bu bileşiklerin 1,2,4-triazol ve türevleri moleküller olduğu belirtilmektedir. Bir sentez molekülünde enzim inhibitörü olarak aranan ilk özelliklerden biri molekülün enzimin substratına benzemesidir [258]. 1,2,4-triazol halkalı bileşiklerin Schiff ve Mannich bazı türevleri kolay sentezlenebildikleri, çoklu ve hızlı türevlendirmelerle içerikleri zenginleştirilebildiği için klinik alanda sıklıkla kullanılmakta ve bu durum onları oldukça değerli kılmaktadır [259-262].

Bu çalışmada kullanılan 1,2,4-triazol türevi bileşiklerin çeşitli özellikleri daha önce ele alınmış olmasına rağmen, klinik açıdan önemli olan α -amilaz ve tirozinaz enzimlerini inhibe edebilme yetenekleri incelenmemiştir. Bu moleküllerden A6, B5 ve B9 lipaz inhibisyonu [184, 185], B5 ve B9 üreaz inhibisyonu [185], A6 ve A8 α -glukozidaz inhibisyonu [166] açısından incelenmiştir. Buna ilave olarak A1-4, A14-17 molekülleri için de anti-mikrobiyal aktivite çalışmaları yapılmıştır [184].

Bu çalışmada önceki çalışmalardan farklı olarak sentezlenen bileşiklerden α -amilaz ve tirozinaz inhibisyonu açısından sadece IC_{50} değerleri belirlenmekle kalmamış, bunun yanında inhibisyon türü ve K_i değerleri de belirlenmiştir. Ayrıca moleküler modelleme çalışmalarıyla bu triazol moleküllerinin inhibisyon potansiyelleri teorik olarak da değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda α -amilaz ve tirozinaz enzimlerini ve tirozinaz enzimleri üzerinde inhibitör etkinliği yüksek bulunan A16 (α -amilaz) ve B9 (tirozinaz)

molekülleri ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Burada moleküllerin hücre kültürü ortamında inhibitör ve sitotoksik etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmaları sırasında inhibisyon özellikleri incelenen organik moleküllerin tirozinaz ve α -amilaz enzimleri üzerindeki etkisini belirlemek için öncelikle enzimlerin, enzim-substrat etkileşimi ile kimyasal reaksiyonların meydana geldiği aktif bölge yapısı ve her bir enzime özel daha önce literatürde etkisi belirlenen standart inhibitör olarak kullanılan inhibitör moleküllerinin kimyasal yapısı dikkate alınmıştır. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda belli bir başlangıç molekülünden türeyen ve belli pozisyondaki değişken gruplarla türevlendirilen bileşiklerin inhibitör etkinliklerinin ve mekanizmalarının muhtemelen benzer olacağı bildirilmektedir [31, 200].

Sunulan çalışmada kullanılan katı formdaki organik moleküllerin çalışmalar sırasında reaksiyon ortamına eklenmeden önce çözelti haline getirilmesi gerekmektedir. Bu yüzden organik çözücü tipinin ve konsantrasyonun reaksiyon şartları üzerindeki etkisi de inhibisyon çalışmaları yapılırken göz önünde bulundurularak çalışılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda kullanılan organik çözücülerden DMSO ve etanolün reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonu %1'i geçmeyecek şekilde ayarlanmıştır. Literatürde organik çözücülerin genel olarak hem biyokimyasal olarak hem de hücre kültüründe yapılan enzim inhibisyonu çalışmalarında %3'ün altında kullanılması gerektiği belirtilmiştir [219, 263].

Tez çalışmaları sırasında kullanılan α -amilaz ve tirozinaz enzimlerinin çözücü olarak kullanılan DMSO ile belli oranlarda inhibe olduğu görülmüştür. Bu yüzden organik çözücülerle çalışılan tüm ölçümlerde çözücüden kaynaklı olumsuzlukları gözlemleyebilmek için kontrol çözeltileri hazırlanmıştır [242]. Ayrıca yine enzim inhibisyonu ile ilgili yapılan çalışmalar sırasında bazı organik moleküllerin yüksek konsantrasyondaki çözeltilerinin reaksiyon karışımının tampon çözelti içeren sulu ortam olması sebebiyle çöktükleri görülmüştür. Bu sebeple enzim inhibisyon çalışmaları sırasında her bir organik molekül için tek bir konsantrasyon referans alınmamış olup, kullanılan moleküllerin farklı konsantrasyon aralıkları ile ölçümler alınmıştır.

α -Amilaz inhibisyon çalışmaları için seçilen moleküllerden sadece A16 ve A17 bileşiği için sırasıyla 150 μ M, 163 μ M olan IC_{50} değerleri belirlenebilmiştir. IC_{50} değerleri belirlenebilen bileşiklerin inhibisyon gücünü kıyaslamak için pozitif kontrol olarak literatüre uyumlu α -amilaz inhibitörü olan akarboz kullanılmıştır [61, 264, 265].

Buna göre IC_{50} değerine sahip A16 bileşiği için inhibisyon mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla inhibitörün yokluğunda ve farklı

konsantrasyonlarının varlığında yapılan aktivite ölçümlerinin sonucunda K_m ve V_{max} değerleri kıyas yapılmıştır. Buna göre A16 bileşiğinin α -amilaz enziminin substratla etkileşime girdiği aktif bölgede değil, bu bölgenin dışında bir bölgede zayıf bir etkileşimle enzim-substrat kompleksine dönüşümlü olarak bağlanarak yarışmasız inhibisyon türüne sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışma neticesinde K_i değeri 6,43 μM olarak hesaplanmıştır. Güçlü ve spesifik olarak etkili bir inhibitörün, inhibisyon mekanizmasını, K_m , V_{max} ve K_i gibi kinetik parametrelerle değerlendirmek inhibitörün başarısını gözlemlemeye katkı sağlamaktadır [200].

4-amino-3-(D-glukopentitol-1-il)-5-merkaptio-1,2,4-triazoller ve bunların 3-metil analogları ile yapılan bir α -amilaz inhibisyon çalışmasında yarışmasız inhibisyon gözlenmiş olup K_i değeri 0,363 mM olarak hesaplanmıştır [249]. Hameed ve arkadaşları (2019) sentezlenen benzotriazol türevi 33 adet bileşik ile α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarında enzimin etkinliğini %50 azaltan inhibitör konsantrasyonunu sırasıyla 2,04-5,72 μM ve 2,00-5,6 μM olarak bulmuşlardır. Belirlenen IC_{50} değerlerinin ardından inhibisyon türü belirleme çalışmaları ile α -amilaz için yarışmalı glukozidaz için yarışmasız inhibisyon türünü bulmuşlardır [61].

Taha ve arkadaşları (2019) sülfonamid türevlerinin α -amilaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkiliği değerlendirmişlerdir. Bu moleküller için IC_{50} değerleri 1,19- 3,01 μM arasında bulunmuştur [264]. Ponnusamy ve arkadaşları (2015) *Azadirachta indica*'dan saflaştırdıkları limonoidler ile α -amilaz enzimi aktivitesini %50 azaltan değerleri 22,2–133,1 μM arasında gözlemlemişlerdir. Ayrıca inhibisyon mekanizması değerlendirilmiş yarışmasız olarak bulunmuş ve K_i değerleri 75,8, 37,4 μM olarak hesaplanmıştır [267]. *Pithecellobium dulce* ile yapılan bir α -amilaz inhibisyon çalışmasında inhibisyon türü yarışmasız olarak belirlenmiştir [268]. Buğday kepeği ile yapılan bir başka çalışmada ise K_i değerinin 17,24 $\mu g/mL$ ve inhibisyon türünün yarışmasız olduğu bildirilmiştir [269]. Tiyazol türevi 25 adet karbohidrazid ile α -amilaz inhibisyonunun etkinliği incelenen bir çalışmada moleküllerin IC_{50} değerleri 1,71-3,05 μM aralığında bulunduğu bildirilmektedir [270]. Literatür incelendiğinde α -amilaz inhibisyonunun sıklıkla doğal ürünlerden saflaştırılarak elde edilen komplekslerle çalışıldığı görülmektedir [267, 271, 272]. Sunulan çalışmada kullanılan A16 molekülü gibi literatürde triazol halkalı yapılar ile α -amilaz aktivitesi üzerine yapılan çalışmalara sık rastlanamamıştır. Bu durumun çalışmamızı özgün ve sonuçlarımızı değerli kıldığı düşünülmektedir.

Tirosinaz inhibisyon çalışmaları için seçilen molekülden B9, B13, C2 ve C3 bileşikleri için IC_{50} değerleri belirlenebilmiştir. Literatüre uyumlu olarak çalışmada referans inhibitör molekül olarak kojik asit kullanılmıştır [273, 274]. Çalışmada kullanılan B9, B13 ve C3 bileşiklerinin kojik aside kıyasla daha güçlü tirosinaz inhibitörleri olduğu belirlenmiştir. İnhibitör moleküllerinin çözünürlük problemleri nedeniyle Tablo 13'de verilen maksimum konsantrasyon değerlerinden daha yüksek konsantrasyonlar kullanılamamıştır. IC_{50} değeri belirlenebilen bileşiklerden en düşük IC_{50} değerine sahip bileşiklerden B9 ve C3 bileşikleri için inhibisyon mekanizması deneyleri yapılmıştır [195]. B9 ve C3 bileşikleri için seçilen farklı konsantrasyonlarda inhibitörlerin varlığında ve yokluğunda yapılan aktivite ölçümlerinin sonucunda K_m ve V_{max} değerleri kıyas yapılarak her iki bileşik içinde yarışmasız inhibisyon türü öngörülmüştür. Ayrıca bu çalışma neticesinde K_i değerleri matematiksel olarak hesaplanmış ve B9 ve C3 için sırasıyla 370,7 μM , 1,71 mM şeklinde bulunmuştur. İnhibisyon çalışmaları sırasında IC_{50} değerine ilave olarak inhibisyon türü aydınlatılmasına yönelik çalışmalar inhibitörün tirosinaz enzimine olan ilgisini belirlemek ve literatürle kıyas yapabilmek için başvurulan bir yöntem olarak görülmektedir [159].

Hamidian ve arkadaşları (2013) sülfonilazo bileşikleri ile yaptıkları tirosinaz enzim inhibisyonu çalışmalarında yeni sentezlenen 6 farklı molekülün tirosinaz inhibitörü olarak değerlendirilmesi sonucunda IC_{50} değerlerinin 1,71 μM ve 4,39 μM arasında değiştiğini bildirmişlerdir [143]. Niu ve arkadaşları (2015) ise aromatik halkaya sahip kalkanlarla gerçekleştirdikleri çalışmalarında kullanılan 15 yeni sentez molekülüne ait IC_{50} değerlerinin 31,4-85,8 μM arasında değiştiğini bildirmişlerdir [275]. Geçmişten günümüze tirosinaz inhibisyonu üzerine çalışmaların sıklıkla meyve suyu, boz darı, aloe vera, doğal bileşenlerden elde edildiği görülmektedir [139, 276-278]. Sentetik olarak elde edilen moleküllerin ise tirosinazın standart inhibitörü olan kojik asit türevine benzer yapılardan yola çıktıkları görülmektedir [87]. Son yapılan bir çalışmada 1,2,3 triazol halkalı kojik asit türevli 16 molekül ile tirosinaz inhibisyonu üzerine yapılan değerlendirmede IC_{50} değerleri 0,06-6,80 μM arasında değiştiği görülmektedir. Bu durum triazol bileşiklerini tirosinaz inhibisyonu açısından önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir [274]. Ancak literatürde 1,2,4 triazol bileşiklerinin tirosinaz aktivitesi üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu durum tez çalışmaları kapsamında kullanılan inhibitör organik moleküller varlığında ulaşılan sonuçları değerli kılmaktadır.

α -Amilaz ve tirozinaz için deneysel olarak yapılan enzim inhibisyon çalışmalarının yanında teorik olarak da moleküler modelleme çalışmalarıyla enzim inhibitör etkileşiminin aktif bölge bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. Burada inhibitör potansiyeli en yüksek molekülü enzimin aktif bölgesine en düşük bağlanma enerjisiyle bağlanan ve böylece en güçlü etkileşimi yapan molekül olarak seçilmiştir. Bu hesaplamalara göre, tirozinaz enzimi için iki grup şeklinde incelenen moleküllerden aktif bölgeye bağlanabilecek olan en potansiyel moleküller B13 ve C1 iken, α -amilaz için A17 molekülünün olduğu tespit edilmiştir. Tez çalışmaları sırasında kullanılan tirozinaz ve α -amilaz enzimleri için deneysel ve teorik olarak yapılan inhibisyon türü belirleme çalışmalarının sonuçları karşılaştırıldığında ilgili sonuçların birbiri ile örtüşmediği görülmüştür. Bu durumun pek çok sebebi olabilir, bunlardan ilki moleküler modelleme çalışmaları sırasında inhibitör moleküllerinin potansiyelini gözlemlemek için sadece serbest enzimin aktif bölgesi ile etkileşimi üzerine çalışılmıştır. Ancak enzimlerle yapılan deneysel çalışmalar sonucu bize açıkça inhibitör moleküllerinin serbest enzimin aktif bölgesine değil aktif bölge dışında bir bağlanma bölgesine yarışmasız bir mekanizma ile bağlanarak enzim-substrat kompleksinin oluştuğunu göstermiştir. Teorik çalışmaların deneysel çalışmalarla çakışmamasının bir başka sebebi de inhibitör moleküllerinin tamamı öncelikle Gaussian programı ile optimize edilirken, gaz fazında 100 farklı enzim inhibitör aktif bölge etkileşimi sonucu oluşan konformasyondan en düşük bağlanma enerjisine sahip olan bileşiklerden 10 tanesi seçilmiştir. Burada diğer konformasyon önerileriyle enzimlerin etkileştirilmesi durumunda deneysel ve teorik sonuçların birbiri ile uyumlu sonuçlar vermesi ihtimal dahilindedir. Ayrıca teorik çalışmalar sırasında gelişen bir başka dezavantaj reaksiyon şartları tampon çözelti içeren sulu bir ortam iken, program ile gaz fazında ölçümler alınmıştır. Sulu ve gaz fazındaki moleküllerin farklı kararlılığa sahip olabileceği öngörüldüğünden sonuçlarda uyumsuzluk olması durumu söz konusu olmuş olabilir. Bu sonuçlar deneysel çalışmaların teorik çalışmalara göre gerçeği daha iyi yansıttığı ve kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Biyokimyasal olarak gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültürü çalışmalarıyla desteklenmesi ilaç olma potansiyeline sahip organik molekülün etkinliğini test etmek için önemli bir adım olarak literatürde sıklıkla görülmektedir. Klinik denemelere geçilebilmesi için öncelikle *in vitro* çalışmaların uygulanabilir sonuçlar olduğunun kanıtlanması gerektiği literatürde önerilmektedir [224, 279-281].

Dünyada diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklar ile Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıkların giderek çok hızlı bir şekilde artmakta olduğu

bildirilmektedir. Bu hastalıkları tedavi etmek için kullanılan ilaçların hala istenen düzeyde etkili ve güvenilir değildir [266]. Bu yüzden hücre temelli tahliller kullanılarak potansiyel ilaç olabilecek etken maddelerin klinik uygulamalardan önce etkinlik ve güvenlikleri açısından test edilmektedir. Diyet yoluyla alınan karbohidratların parçalanmasını engellemek obezite ve diyabet gibi metabolik hastalıkların tedavisi için kullanılan bir yöntemdir [282]. AR42J fare pankreatik kanser hücre serisi, yüksek oranda amilaz enzimi ürettiği için amilaz inhibisyonunun gözlemlenmesi açısından kullanılan bir hücre serisidir [267, 271]. Bu nedenle A16 molekülünün α -amilaz enzimi üzerindeki inhibitör etkinliği AR42J hücrelerinde test edilmiştir [272]. AR42J ve negatif kontrol hücrelerinde öncelikli olarak yine sitotoksositeye sebep olmayan çözücü konsantrasyon aralığı belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmalar %0,1'lik DMSO çözeltisi kullanılarak sürdürülmüştür [284]. İnhibitör özelliğini gözlemek için nişasta ve iyot miktarlarını belirlemek adına literatürde bulunan metotlar modifiye edilerek kullanılmıştır [111, 271]. Nişasta çözeltisinin nihai konsantrasyonu %0,125 olacak şekilde, hazırlanan stok iyot çözeltisi ise 1:100 (v/v) seyreltilmiş halde kullanılmıştır. A16 molekülünün AR42J hücresinde tripan mavisi metoduyla sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır [285]. Molekülün 5 μM 'da hücre canlılığını %40 oranında azalttığı, 4 μM seviyesinde ise hücre canlılığını etkilemediği belirlenmiştir. Ardından optimum hücre sayısı belirleme deneyleri yapılmış ve *in vitro* çalışmalarda kullanılması gereken hücre sayısı 50.000 olarak belirlenmiştir. AR42J hücre serisi üzerinde A16 molekülü ile yapılan çalışmada hücre dışına salınan α -amilaz miktarını %50 azaltan IC_{50} değeri 4 μM olarak bulunmuştur. Belirlenen hücre sayısı ve nişasta-iyot çözeltisi literatür ile uyum içerisindedir. Öyle ki, Ngoh ve arkadaşları benekli fasulyeden saflaştırarak elde ettikleri peptitlerin AR42J hücresi üzerinde α -amilaz inhibisyonu deneylerini 20.000 hücre üzerinde gerçekleştirerek IC_{50} değerini 8 mM olarak hesaplanmıştır [286]. Ayrıca saflaştırılarak elde edilen limonoid türevleriyle yapılan çalışmalarda öncelikle domuz pankreatik amilazı üzerinde inhibisyon çalışmaları yapılmış ve Azadiradion'un IC_{50} değeri 138,4 μM bulunmuş ve AR42J hücre serisi üzerinde amilaz inhibisyonu gözlenmeye çalışılmış fakat 3,5 μM 'da %41,8 inhibisyon gözlenebilmiştir [286].

Kanser kronik bir hastalık olup sayısız terapötik yaklaşımın mevcudiyetine rağmen hala yüzyılın en önemli sağlık sorunlarından birisi olarak görülmektedir [287]. Dünyada kanser hastaları üzerinde yapılan anket çalışmalarına göre 2000 yılında kanser hastalığından ölüm oranı dokuzuncu sıradayken, son yıllarda yapılan çalışmalar bu oranın altıncı sıraya

yükseldiğini göstermektedir. Ayrıca dünyada her yıl en az 9 milyon kişinin bu sebeple öldüğü bildirilmektedir [241, 281, 288]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) verilerine göre 2012 yılında dünya genelinde 14,1 milyon yeni kanser vakası ve 8,2 milyon ölüm bildirilmiş olup, bu sayının 2030'da 21,7 milyon kanser vakası tanısı ve 13 milyon ölüm şeklinde olacağını öngörülmüştür [289]. Günümüzde kanserle mücadele için cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon replasmanı ve immunoterapi gibi pek çok tedavi şekli uygulanmaktadır. Fakat bu tedavilerin farklı yan etkilerinin olabileceği bilinmektedir [290]. Bu durum yeni ilaç moleküllerinin sentezlenmesine, karakterize edilmesine ve etkili ilaç konsantrasyonunun belirlenebilmesi için *in vitro* çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir [200, 280, 291].

Melanoma, melanositlerde meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak cilt, göz ve iç kulak gibi bölgelerde aşırı pigment üretimi ile karakterize bir kanser türüdür. Melanoma tüm cilt malign tümörlerinin yaklaşık %1'ini oluştursa da, kütanöz malign melanoma en agresif ve en ölümcül cilt kanseri formunu temsil etmektedir. Tümörün özelliklerine bağlı olarak cerrahi işlem, kemoterapi, radyoterapi, fotodinamik tedavi (PDT), immunoterapi veya hedefe yönelik tedavi gibi seçenekler bulunmaktadır [292, 293]. Özellikle ilerlemiş melanomada kemoterapiye sıklıkla başvurulmakla birlikte kemoterapinin mide bulantısı, baş ağrısı, gastrit, anoreksi, oral ülserasyon, kabızlık, ishal, alopesi ve nöropati oluşturma gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır [292]. Bunların yanında melanoma hücrelerinde zamanla kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gelişimi ve/veya kemoterapötiklerin zamanla sağlıklı hücrelere de zarar verebilmesi başarı oranını düşürmektedir [294]. Bu nedenle özellikle ilaç endüstrisinde sentetik veya doğal ürün kaynaklı yeni nesil anti-kanser ajanların geliştirilme çalışmaları yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Bu ajanlar içerisinde özellikle heterosiklik bileşikler son zamanlarda kanser tedavisi için yeni alternatifler olarak kabul görmektedir [287]. Buradan hareketle B9 molekülünün melanoma hücre serilerindeki sitotoksik etkisi MTT metoduyla değerlendirildi ve IC_{50} değeri $16,8 \mu M$ olarak hesaplandı.

Etkili ve kabul edilebilir bir anti-kanser ajanın karşılaması gereken en önemli kriter normal hücrelerde toksik etki göstermemesi ya da minimal düzeyde göstermesi olarak tanımlanmıştır ve selektif indeks hesaplamaları bu amaçla yol gösterici olmaktadır [295]. Buradan hareketle B9 molekülünün sitotoksik etkisi melanoma hücreleri ile eş zamanlı olarak normal insan fibroblast hücreleri üzerinde de çalışıldı ve IC_{50} değeri $82,59 \mu M$ olarak hesaplandı. Sitotoksikite deneylerinde deneysel kurgunun güvenilirliğinin ortaya

konabilmesi adına melanoma tedavisinde kullanılan bir kemoterapötik olan sisplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır [296].

B9 molekülünün ve sisplatinin melanoma ve fibroblast hücreleri için elde edilen IC_{50} değerlerinin birbirine oranlanması ile seçicilik indeksleri hesaplanmış ve B9 molekülünün melanoma hücrelerinde sisplatine kıyasla yaklaşık iki kat daha yüksek bir seçicilik gösterdiği belirlenmiştir. Literatürdeki 1,2,4 triazol bileşikleri ile melanoma hücre serileri üzerinde gerçekleştirilen sitotoksikite çalışmaları incelendiğinde, Bekircan ve arkadaşları asimetrik 3,5-diaril-4*H*-1,2,4-triazol türevlerinin melanoma hücre serileri üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini ve IC_{50} değerlerinin 6,18-19,6 μ M aralığında değiştiğini bildirmişlerdir [297]. Georgiyants ve arkadaşları ise 1,2,4-triazol (4*H*) türevleri bileşiklerin lösemi (CCRF-CEM, HL-60, RPMI-8226, SR, K-562 ve MOLT-4), akciğer (HOP-92), böbrek (UO-31), prostat (PC-3), meme (MCF-7), over (OVCAR-4), kolon (KM-12) ve melanoma (UACC-62, MDA-MB-43, SK-MEL-5 ve MALME-3M) kanser hücre serilerindeki sitotoksik etkilerini inceledikleri bir çalışmada en zayıf sitotoksik etkinin melanoma hücre serilerinde gözlendiğini raporlamışlardır [298]. 4,5-disubstituted-1,2,4-triazole-3-tion bileşiğinin S-benzil türevinin lösemi (CCRF-CEM, RPMI-8226 ve SR), akciğer (HOP-92), melanoma (UACC-62) ve böbrek (UO-31) kanseri hücre serilerinde sitotoksik etki sergileyebildiği bildirilirken [299], bir başka çalışmada Furan C-2 kinolin yapısına eşlenik 1,2,4-triazol grubu içeren türev bileşiklerin melanoma (A375) hücre serisi üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve IC_{50} değerlerinin 2,9-207,1 μ g/mL değerleri arasında değiştiği gösterilmiştir [300]. Mioc ve arkadaşları 5-merkapt-1,2,4-triazol türevlerinin melanoma (A375 ve B164A5), meme (MDA-MB-231) ve akciğer (A549) kanseri hücre serilerindeki sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmada bileşiklerin melanoma hücreleri üzerinde zayıf sitotoksik etki gösterdiğini bildirirlerken [301], Quattrini ve arkadaşları 1,2,4-triazol türevi bileşiklerin melanoma kanser hücre serilerinde (A2058 ve WM266-4) konsantrasyona bağımlı sitotoksik etki sergilediklerini belirlemişler ve IC_{50} değerlerinin 9,65-11,41 μ M arasında değiştiğini göstermişlerdir [302]. Buradan hareketle sitotoksikite verilerimizin olumlu bulunduğu literatürdeki diğer melanoma üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarla benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Ancak söz konusu çalışmalarda normal hücre serilerinin kullanılmaması seçicilik açısından bir karşılaştırma yapılmasını mümkün kılmamıştır.

1,2,4 triazol merkezli bileşiklerinin renal (UO-31) ve serviks (HeLa) kanser hücre serilerinde de sitotoksik etkilerinin olduğu daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [303]. Hatta literatür incelemelerinde 1,2,4-triazol bileşikleri ile gerçekleştirilen *in vivo*

çalışmaların da başladığı görülmektedir. Lin ve arkadaşları 1-*açıl-1H*-[1,2,4]triazol-3,5-diamin türevlerinin melanoma (A375) kanser hücre serisi üzerinde güçlü sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. A375 implantasyonu ile bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde oluşturulan ksenograft modelinde de bileşiğin 30 günlük tedavide *in vivo* tümör büyümesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir [304].

Etkili ve kabul edilebilir bir anti-kanser ajanın karşılaması gereken en önemli ikinci kriterin bileşiğin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin mekanizmasının tanımlanmasıdır [295]. Buradan hareketle B9 bileşiğinin melanoma hücrelerindeki sitotoksik etkisinin mekanizması hücre döngüsü ve apoptoz yönünden değerlendirildi. Hücre döngüsü, bir hücreden iki yeni hücrenin oluşması ile sonuçlanan son derece organize bir süreçtir. Her hücre döngüsü evresindeki olaylar ve bir evreden diğerine geçiş hücre döngüsü kontrol noktaları olarak bilinen sensör mekanizmaları tarafından kontrol edilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda kanser hücrelerinde hücre döngüsü kontrol noktalarının gerektiği gibi çalışmadığı ortaya konulmuş ve buna bağlı olarak kanser “kontrol edilemeyen hücre döngüsü hastalığı” olarak tanımlanmıştır. Bundan dolayı kanser hücrelerinin hücre döngüsünün durdurulması kanser tedavisinin hedef mekanizmalarından biri olarak kabul edilmiştir [305]. Bundan yola çıkarak B9 molekülünün melanoma hücre döngüsü üzerindeki etkileri akım sitometrisi yöntemi ile belirlendi ve molekülün melanoma hücre döngüsünü S evresinde durdurduğu ve sub-G₁ popülasyonunu oluşturan apoptotik hücre sayısını artırdığı görüldü. Literatürde 1,2,4 triazol bileşiklerinin melanoma hücre döngüsü üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte 1,2,4 triazol bileşiklerinin kanser hücre döngüsü üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, Purohit ve arkadaşları bis-1,2,4 triazol türevi bileşiklerin lösemi (MOLT-4) kanser hücre serisinde hücre döngüsünü durdurmadan sub-G₁ fazındaki hücre popülasyonunu artırarak apoptotik özellikler sergilediğini bildirirlerken [306], Mioc ve arkadaşları ise S-substituted 1H-5-merkapt-1,2,4-triazol türevi bileşiklerin insan kolon kanseri (HT-29) hücrelerinde sub-G₁ popülasyonundaki hücre sayısını artırarak ve hücre döngüsünü G₁ fazında durdurarak anti-proliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir [307].

Azalmış apoptoz kapasitesi kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden birisidir. Bu nedenle potansiyel anti-kanser ajan geliştirme çalışmalarında bileşiğin apoptozu indükleyebilmesi en önemli stratejik hedeflerden bir tanesidir [308]. Bu yüzden B9 molekülünün melanoma hücre serilerindeki sitotoksik etkisinin mekanizması ayrıca apoptoz yönünden değerlendirildi ve molekülün konsantrasyona bağlı olarak apoptotik hücre sayısını

artırdığı belirlendi. Literatürde 1,2,4 triazol bileşiklerinin melanoma hücrelerinde apoptoz üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte 1,2,4 triazol bileşiklerinin kanser hücrelerindeki apoptoz üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, Coşkun ve arkadaşları 1,2,4-triazol-3-thion bileşiklerinin prostat (PC-3), kolon (HCT-116) ve meme (T47D) kanser hücre serilerinde pro-apoptotik etki sergilediğini bildirirken [309], Sun ve arkadaşları 4,5-bis(substituted fenil)-4H-1,2,4-triazol-3-amin bileşiklerinin akciğer kanseri (A549) hücrelerinde Bcl-2 proteinini baskılayarak ve anneksin-V pozitif hücre sayısını artırarak pro-apoptotik etki sergilediğini bildirmişlerdir [310]. Das ve arkadaşları 3-(3',4',5'-trimetoksifenil)-5-(N-metil-3'-indol)-1,2,4-triazol bileşiklerinin meme kanseri (MCF-7) hücre serisinde normal meme (MCF-10A) hücrelerine göre seçici sitotoksik etki gösterdiğini ve bileşiklerin *in vivo* meme kanseri modelinde de apoptozu artırarak tümör büyümesini engellediğini göstermişlerdir [311]. Abuelizz ve arkadaşları 4-(1H-1,2,4-triazol-1-il)benzoik asit hibritlerinin meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde anneksin-V pozitif hücre sayısını artırarak pro-apoptotik etki sergilediği gösterilmişlerdir [312].

1,2,4 triazol bileşiklerinin kanser hücrelerinde hücre döngüsü ve apoptoz üzerine etkilerinin beraber değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde, Romagnoli ve arkadaşları 1-(3',4',5'-trimetoksifenil)-5-aryl-1,2,4-triazol bileşiklerinin serviks (HeLa) ve lösemi (Jurkat) kanser hücrelerinde anneksin-V pozitif hücre sayısını artırarak ve hücre döngüsünü G₂/M evresinde tutuklayarak anti-proliferatif etki gösterdiklerini bildirilmişlerdir [313]. Liu ve arkadaşları 7-hidroksi-4-fenilkromen-2-on bağlı 1,2,4-triazol moleküllerinin mide kanseri (AGS) hücrelerinde anneksin-V pozitif hücre sayısını artırarak ve hücre döngüsünü G₂/M fazında durdurarak anti-proliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir [314]. Tokala ve arkadaşları 1,2,4-triazol-bağlı üre/tiyoüre konjugatlarının meme (MCF-7 ve MDA-MB-231), akciğer (A549), prostat (DU145) ve melanoma (B16-F10) kanser hücre serilerindeki sitotoksik etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında en güçlü sitotoksik etkiyi MCF-7 hücre serisi üzerinde saptamışlardır. Bileşiğin sitotoksik etki mekanizmasını hücre döngüsü ve anneksin-V apoptoz analizi ile araştırmışlar ve bileşiğin konsantrasyona bağlı olarak hücre döngüsünü G₁ fazında durdurduğunu ve anneksin-V pozitif hücre sayısını artırdığını ortaya koymuşlardır [315]. Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada ise El-Sherief ve arkadaşları 1,2,4-triazol-3-tion aromatik keton bileşiklerinin akciğer kanseri (A549) hücrelerinde anneksin-V pozitif hücre sayısını artırarak ve hücre döngüsünü G₂/M evresinde durdurarak anti-proliferatif etki sergilediğini bildirmişlerdir [316]. Hücre döngüsü ve apoptoz analizi

sonuçları literatürdeki 1,2,4 triazol bileşikleri ile gerçekleştirilmiş araştırma sonuçları ile benzer olmakla birlikte, özellikle hücre döngüsü analizlerinde hücrelerin durdurulduğu evrelerin farklı olmasının çalışılan hücre serisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sitotoksisite çalışmalarını B9 bileşiğinin VMM917 hücresindeki melanin miktarındaki etkisini anlamak için yapılan çalışmalar izlemiştir. Bu çalışmada kojik asit çözeltisi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır [127]. Literatürde bununla ilgili benzer yaklaşımlar bulunmaktadır. Örneğin, Ashooriha ve arkadaşları melanoma hücresi (B16) üzerinde kojik asit ile yapılan çalışmada IC₅₀ değeri 144,4 µM olarak bulmuşlardır [274]. Chen ve arkadaşları (2019) kojik asit türevleriyle fare melanoma (B16F10) hücreleri üzerinde yapmış oldukları sitotoksisite çalışmalarında 5-200 µM arasında değişen konsantrasyonlarda hücre canlılığını etkilemediği görülmüştür. Aynı anda bu moleküllerin hücreler üzerinde 75 µg/mL değerinde tirozinaz etkinliğini %50 düşürdüğü görülmüşken 60 µg/mL değerinde melanin miktarında %50 azalttığı bildirilmiştir [224]. Wang ve arkadaşları (2010) insan melanosit hücreleri üzerinde N-formil türeviyle yaptıkları çalışmada melanin miktarındaki %50 azalmayı 100 µM, aynı değerde pozitif kontrol olarak kullanılan kojik asitte ise %50 azalma görülemediği [230].

Günümüzde kanser tipleri arasında cilt kanseri olan melanomanın ölüm oranı payının giderek arttığı görülmektedir. Bu yüzden üzerinde pek çok çalışma yapılmasına rağmen tez çalışmaları sırasında kullanılan VMM917 hücresi üzerinde literatürde triazol halkalı bileşiklerle yapılan sitotoksisite ve tirozinaz inhibisyon çalışmalarına rastlanamamıştır. Bu da çalışmaların sonuçlarını değerli kılmaktadır. Bulunan değerler ve seçicilik indeksinin yüksek olması sebebiyle anti-kanser ilacı olarak B9 molekülünü potansiyel hale getirdiği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

- Tez çalışmaları sırasında öncelikli olarak inhibisyonları incelenecek olan sırasıyla, ticari olarak satın alınan α -amilaz ve tirozinaz enzimlerinin aktivite çalışmaları literatüre uygun olarak sırasıyla enzim ve substrat konsantrasyonu, pH ve sıcaklık değerleri açısından optimize edilmiştir (Tablo 10; Şekil 26-30; Şekil 31-35).

- α -Amilaz ve tirozinaz enzimleri için inhibitör bileşikleri varlığında yapılan çalışmalarda her bir bileşik için IC_{50} değeri belirlenmeye çalışılmıştır. Bulunan IC_{50} değerleri pozitif kontrolleri ile kıyaslandığında kontrollerden daha etkili olduğu görülmüştür (Tablo 11, 13; Şekil 36-43; Şekil 45-54).

- IC_{50} değeri belirlenebilen α -amilaz enzimi için A16 ve tirozinaz enzimi için B9 ve C3 bileşiklerine ait inhibisyon türü yarışmasız olarak belirlenmiş olup ayrıca çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilen değerlerle çizilerek matematiksel olarak K_i değerleri hesaplanmıştır. Bulunan K_i değerlerinin μM seviyesinde olması umut vadedicidir (Şekil 44, 55, 56, Tablo 12, 14).

- Tablo 5'deki her bir enzim için gruplara ayrılan tüm moleküller için teorik hesaplamalar yapılmıştır. Bu sonuçlara göre α -amilaz için A16-17 ve tirozinaz için B9, B13, C1 ve C3 bileşikleri aktif bölge bağlanma enerjisi düşük olan dolayısıyla enzimle güçlü etkileşim yapan moleküller olarak bulunmuştur (Şekil 50-51, Tablo15, 16).

- Potansiyel olarak öngörülen inhibitör moleküllerinden α -amilaz için A16 ile AR42J hücreleri üzerinde ve tirozinaz için B9 ile VMM917 hücreleri üzerinde *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar yapılırken negatif kontrol hücresi olarak AR42J için MEF ve VMM917 için BJ hücreleri seçilmiştir. Ayrıca çalışmalar esnasında pozitif kontrol molekülü olarak α -amilaz için akarboz, tirozinaz için kojik asit kullanılmıştır. Ayrıca B9 bileşiğinin VMM917 hücreleri üzerinde anti-kanser özelliğini kıyaslamak adına pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılmıştır.

- AR42J hücresi üzerinde A16 bileşiğinin α -amilaz inhibisyon etkinliği değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol ile kıyaslandığında daha etkili olduğu görülmüştür (Tablo 17, Şekil 67-72).

- B9 bileşiğinin VMM917 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisinin normal fibroblast hücrelerine göre seçici olduğu gözlenmiştir. Bu bileşiğin VMM917 hücrelerini hücre

döngüsünün S fazında durdurduğu ve apoptoz analiz sonuçlarında bu durumu desteklediği görülmüştür (Tablo18,19, Şekil 77-82).

- VMM917 hücre üzerinde B9 bileşiğinin sitotoksik etkiye sebep olmayan konsantrasyonun da tirosinaz inhibisyon etkinliği çalışılmıştır. Melanin miktarındaki azalma tespit edilmiştir. Pozitif kontrolü ile kıyaslandığından çok daha etkili olduğu görülmüştür (Tablo 17, Şekil 84-86).

- Tüm bu çalışmaların sonucunda α -amilaz enzimi için A16 bileşiği, tirosinaz enzimi için B9 bileşiği ilgili enzimler için potansiyel inhibitör molekülleri olarak değerlendirilebilirken (Tablo 17), ayrıca B9 molekülü anti-kanser etkinliği açısından aday molekül olarak öngörülmektedir.



6. ÖNERİLER

Yapılan deneysel ve teorik çalışmaların ardından potansiyel olarak α -amilaz enzimi için A16 ve tirozinaz enzimi için B9 moleküllerinin bundan sonra ki çalışmalarda;

- *İn vitro* şartlar altında belirlenen konsantrasyonların kullanılan hücreler üzerinde metabolik süreçlerdeki mekanizmalarının aydınlatılması,
- Dünyada yaygın olan farklı kanser hücre serileri üzerinde çalışmaların devam ettirilmesinin prelinik çalışmaların öncülü olabileceği,
- *İn vivo* ortamda moleküllerin transdermal, oral, intravenöz olarak farklı konsantrasyonlarda uygulanarak apoptotik süreçlere etkisinin mekanizmasının aydınlatması,
- Bu çalışmalardan da elde edilecek olan verilerle A16 ve B9 bileşiklerinin teröpatik ilaç olarak ilaç endüstrisinde kansere karşı kullanılabileceği öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Huisman, G.W. ve Collier, S.J., On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis, Current Opinion in Chemical Biology, 17,2 (2013) 284-292.
2. Tomsho, J.W., Pal, A., Hall, D.G. ve Benkovic, S.J., Ring structure and aromatic substituent effects on the pK(a) of the benzoxaborole pharmacophore, Acs Medicinal Chemistry Letters, 3,1 (2012) 48-52.
3. Kaur, R. ve Sekhon, S.B., Enzymes as drugs: an overview, Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 3,2 (2012) 29-41.
4. Drews, J., Drug discovery: A historical perspective, Science, 287,5460 (2000) 1960-1964.
5. Robertson, J.G., Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs, Biochemistry, 44,15 (2005) 5561-5571.
6. Wang, Y.C., Wang, X.B., Yang, Z.X. ve Deng, N.Y., Prediction of enzyme subfamily class via pseudo amino acid composition by incorporating the conjoint triad feature, Protein and Peptide Letters, 17,11 (2010) 1441-1449.
7. Ferrier, D.R., Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, R.A. Harvey editor, R.A. Harvey editor, 6, 1108, 2014.
8. 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.
9. Ademiluyi, A.O. ve Oboh, G., Soybean phenolic-rich extracts inhibit key-enzymes linked to type 2 diabetes (alpha-amylase and alpha-glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting enzyme) in vitro, Experimental and Toxicologic Pathology, 65,3 (2013) 305-309.
10. Gonzaga, D., Senger, M.R., da Silva, F.D., Ferreira, V.F. ve Silva, F.P., 1-Phenyl-1H- and 2-phenyl-2H-1,2,3-triazol derivatives: Design, synthesis and inhibitory effect on alpha-glycosidases, European Journal of Medicinal Chemistry, 74 (2014) 461-476.
11. Alyar, S., Sen, T., Ozmen, U.O., Alyar, H., Adem, S. ve Sen, C., Synthesis, spectroscopic characterizations, enzyme inhibition, molecular docking study and DFT calculations of new Schiff bases of sulfa drugs, Journal of Molecular Structure, 1185 (2019) 416-424.

12. Pillaiyar, T., Manickam, M. ve Namasivayam, V., Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors, J Enzyme Inhib Med Chem, 32,1 (2017) 403-425.
13. 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.
14. Lama, L., Adura, C., Xie, W., Tomita, D., Kamei, T., Kuryavyi, V., Gogakos, T., Steinberg, J.I., Miller, M., Ramos-Espiritu, L., Asano, Y., Hashizume, S., Aida, J., Imaeda, T., Okamoto, R., Jennings, A.J., Michino, M., Kuroita, T., Stamford, A., Gao, P., Meinke, P., Glickman, J.F., Patel, D.J. ve Tuschl, T., Development of human cGAS-specific small-molecule inhibitors for repression of dsDNA-triggered interferon expression, Nature Communications, 10 (2019) 2261.
15. Zheng, W., Thorne, N. ve McKew, J.C., Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery, Drug Discovery Today, 18,21-22 (2013) 1067-1073.
16. De Rycker, M., Baragana, B., Duce, S.L. ve Gilbert, I.H., Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases, Nature, 559,7715 (2018) 498-506.
17. Ensor, C.M., Holtsberg, F.W., Bomalaski, J.S. ve Clark, M.A., Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG(20,000) (mw)) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas in vitro and in vivo, Cancer Research, 62,19 (2002) 5443-5450.
18. Imming, P., Sinning, C. ve Meyer, A., Opinion - Drugs, their targets and the nature and number of drug targets, Nature Reviews Drug Discovery, 5,10 (2006) 821-834.
19. Krasikov, V.V., Karelov, D.V. ve Firsov, L.M., alpha-Glucosidases, Biochemistry-Moscow, 66,3 (2001) 267-281.
20. Miller, W.R., Aromatase inhibitors: Mechanism of action and role in the treatment of breast cancer, Seminars in Oncology, 30,4 (2003) 3-11.
21. Guerciolini, R., Mode of action of orlistat, International Journal of Obesity, 21 (1997) S12-S23.
22. Hofmann, J., Modulation of protein kinase C in antitumor treatment, Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, 142 (2001) 1-96.
23. Srivastava, P., Hancock, J. ve Abebe, A.G., Targeting membrane-bound dimer of cRaf kinase in search of anti-cancer drugs, Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 257 (2019).
24. Fisone, G., Borgkvist, A. ve Usiello, A., Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action, Cellular and Molecular Life Sciences, 61,7-8 (2004) 857-872.
25. Bartholini, G. ve Pletscher, A., Decarboxylase inhibitors, Pharmacology & Therapeutics Part B-General & Systematic Pharmacology, 1,3 (1975) 407-421.

26. Brunin, T., Henichart, J.P. ve Rigo, B., Towards new camptothecins. Part 2: Synthesis of the ABCD ring scaffold substituted by a carboxyl group in the 5-position, Tetrahedron, 61,33 (2005) 7916-7923.
27. 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.
28. Gilli, R., Lopez, C., Sari, J.C. ve Briand, C., Thermodynamic study of the interaction of methotrexate, its metabolites, and new antifolates with thymidylate synthase - influence of Fdmp, Biochemical Pharmacology, 40,10 (1990) 2241-2246.
29. Hopkins, A.L. ve Groom, C.R., The druggable genome, Nature Reviews Drug Discovery, 1,9 (2002) 727-730.
30. Golicnik, M., 'Die kinetik der invertinwirkung' of L. Michaelis and ML Menten revisited after 100 years: Closed-form solutions of genuine invertase-reaction dynamics, Match-Communications in Mathematical and in Computer Chemistry, 70,1 (2013) 63-72.
31. Westley, A.M. ve Westley, J., Enzyme inhibition in open systems - Superiority of uncompetitive agents, Journal of Biological Chemistry, 271,10 (1996) 5347-5352.
32. Rodwell, V.W. ve Kennelly, P.J., Harper's Illustrated Biochemistry, Enzymes: Kinetics, 8, 26, 2003.
33. Swinney, D.C., Biochemical mechanisms of drug action: what does it take for success?, Nature Reviews Drug Discovery, 3,9 (2004) 801-808.
34. Walsh, C.T., Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery, Second Edition, 2013.
35. Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. ve Mehta, P.K., Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, 3 Biotech, 6 (2016).
36. Radzicka, A. ve Wolfenden, R., Transition-state and multisubstrate analog inhibitors, Enzyme Kinetics and Mechanism, Pt D, 249 (1995) 284-312.
37. Patel, M.P., Liu, W.S., West, J., Tew, D., Meek, T.D. ve Thrall, S.H., Kinetic and chemical mechanisms of the fabG-encoded *Streptococcus pneumoniae* beta-ketoacyl-ACP reductase, Biochemistry, 44,50 (2005) 16753-16765.
38. Schramm, V.L., Transition states, analogues, and drug development, Acs Chemical Biology, 8,1 (2013) 71-81.
39. Schramm, V.L., Transition states and transition state analogue interactions with enzymes, Accounts of Chemical Research, 48,4 (2015) 1032-1039.

40. De Cesco, S., Kurian, J., Dufresne, C., Mittermaier, A.K. ve Moitessier, N., Covalent inhibitors design and discovery, European Journal of Medicinal Chemistry, 138 (2017) 96-114.
41. Pham, T.V., Murkin, A.S., Moynihan, M.M., Harris, L., Tyler, P.C., Shetty, N., Sacchettini, J.C., Huang, H.L. ve Meek, T.D., Mechanism-based inactivator of isocitrate lyases 1 and 2 from Mycobacterium tuberculosis, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114,29 (2017) 7617-7622.
42. Krishnaswamy, S. ve Betz, A., Exosites determine macromolecular substrate recognition by prothrombinase, Biochemistry, 36,40 (1997) 12080-12086.
43. Keshwani, M.M., Gao, X.X. ve Harris, T.K., Mechanism of PDK1-catalyzed Thr-229 phosphorylation of the S6K1 protein kinase, Journal of Biological Chemistry, 284,34 (2009) 22611-22624.
44. Davidson, W., Frego, L., Peet, G.W., Kroe, R.R., Labadia, M.E., Lukas, S.M., Snow, R.J., Jakes, S., Grygon, C.A., Pargellis, C. ve Werneburg, B.G., Discovery and characterization of a substrate selective p38 alpha inhibitor, Biochemistry, 43,37 (2004) 11658-11671.
45. Earnshaw, D.L., Bacon, T.H., Darlison, S.J., Edmonds, K., Perkins, R.M. ve Hodge, R.A.V., Mode of antiviral action of penciclovir in Mrc-5 cells infected with herpes-simplex virus type-1 (Hsv-1), Hsv-2, and Varicella-Zoster virus, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36,12 (1992) 2747-2757.
46. Petersen, E.N., The pharmacology and toxicology of disulfiram and its metabolites, Acta Psychiatrica Scandinavica, 86 (1992) 7-13.
47. 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.
48. Pizzolato, J.F. ve Saltz, L.B., The camptothecins, Lancet, 361,9376 (2003) 2235-2242.
49. Supuran, C.T., Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment and prophylaxis of obesity, Expert Opinion on Therapeutic Patents, 13,10 (2003) 1545-1550.
50. 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.
51. Malani, A.H., Makwana, A.H. ve Makwana, H., A brief review article: Various synthesis and therapeutic importance of 1, 2, 4-triazole and its derivatives., Moroccan Journal of Chemistry, 5,1 (2017) 41-58.

52. Kokil, G.R., Rewatkar, P.V., Gosain, S., Aggarwal, S., Verma, A., Kalra, A. ve Thareja, S., Synthesis and in vitro evaluation of novel 1, 2, 4-triazole derivatives as antifungal agents, Letters in Drug Design & Discovery, 7,1 (2010) 46-49.
53. Yengoyan, A.P., Pivazyan, V.A., Chazaryan, E.A. ve Hakobyan, R.S., Synthesis of new thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole derivatives and preliminary evaluation of their biological activity, Russian Journal of General Chemistry, 89,1 (2019) 32-36.
54. Liu, C.J., Liu, Y.P., Yu, S.L., Dai, X.J., Zhang, T. ve Tao, J.C., Syntheses, cytotoxic activity evaluation and HQSAR study of 1,2,3-triazole-linked isosteviol derivatives as potential anticancer agents, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 26,22 (2016) 5455-5461.
55. Siddiqui, A.A., Arora, A., Siddiqui, N. ve Misra, A., Synthesis of some 1,2,4-triazoles as potential antifungal agents, Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, 44,4 (2005) 838-841.
56. Ibrahim, D.A., Synthesis and biological evaluation of 3,6-disubstituted [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole derivatives as a novel class of potential anti-tumor agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 44,7 (2009) 2776-2781.
57. Jadhav, G.R., Shaikh, M.U., Kale, R.P., Shiradkar, M.R. ve Gill, C.H., SAR study of clubbed [1,2,4]-triazolyl with fluorobenzimidazoles as antimicrobial and antituberculosis agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 44,7 (2009) 2930-2935.
58. Jin, H.G., Sun, X.Y., Chai, K.Y., Piao, H.R. ve Quan, Z.S., Anticonvulsant and toxicity evaluation of some 7-alkoxy-4,5-dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoline-1(2H)-ones, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14,20 (2006) 6868-6873.
59. Jordao, A.K., Afonso, P.P., Ferreira, V.F., de Souza, M.C.B.V., Almeida, M.C.B., Beltrame, C.O., Paiva, D.P., Wardell, S.M.S.V., Wardell, J.L., Tiekink, E.R.T., Damaso, C.R. ve Cunha, A.C., Antiviral evaluation of N-amino-1,2,3-triazoles against Cantagalo virus replication in cell culture, European Journal of Medicinal Chemistry, 44,9 (2009) 3777-3783.
60. Narayana, B., Raj, K.K.V., Ashalatha, B.V. ve Kumari, N.S., Synthesis of some new substituted triazolo [4,3-a] [1,4] benzodiazepine derivatives as potent anticonvulsants, European Journal of Medicinal Chemistry, 41,3 (2006) 417-422.
61. Hameed, S., Kanwal, Seraj, F., Rafique, R., Chigurupati, S., Wadood, A., Rehman A., Venugopal, V., Salar, U., Taha, M. ve Khan, M.K., Synthesis of benzotriazoles derivatives and their dual potential as α -amylase and α -glucosidase inhibitors in vitro: Structure-activity relationship, molecular docking, and kinetic studies, European Journal of Medicinal Chemistry, 183 (2019) 111677.
62. Banerjee, G. ve Ray, A.K., Impact of microbial proteases on biotechnological industries, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 33,2 (2017) 119-143.

63. Jiang, H.J., Huang, Y.A. ve You, Z.H., Predicting drug-disease associations via using Gaussian interaction profile and Kernel-Based autoencoder, Biomed Research International, 2019 (2019) 2426958.
64. Malik, N.N., Drug discovery: past, present and future, Drug Discovery Today, 13,21-22 (2008) 909-912.
65. Nantasenamat, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Naenna, T. ve Prachayasittikul, V., A practical overview of quantitative structure-activity relationship, Excli Journal, 8 (2009) 74-88.
66. Perkins, R., Fang, H., Tong, W.D. ve Welsh, W.J., Quantitative structure-activity relationship methods: Perspectives on drug discovery and toxicology, Environmental Toxicology and Chemistry, 22,8 (2003) 1666-1679.
67. Hansch, C., Leo, A., Mekapati, S.B. ve Kurup, A., QSAR and ADME, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 12,12 (2004) 3391-3400.
68. Prachayasittikul, V., Pingaew, R., Worachartcheewan, A., Nantasenamat, C., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S. ve Prachayasittikul, V., Synthesis, anticancer activity and QSAR study of 1,4-naphthoquinone derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 84 (2014) 247-263.
69. Nantasenamat, C., Monnor, T., Worachartcheewan, A., Mandi, P., Isarankura-Na-Ayudhya, C. ve Prachayasittikul, V., Predictive QSAR modeling of aldose reductase inhibitors using Monte Carlo feature selection, European Journal of Medicinal Chemistry, 76 (2014) 352-359.
70. Worachartcheewan, A., Prachayasittikul, S., Pingaew, R., Nantasenamat, C., Tantimongcolwat, T., Ruchirawat, S. ve Prachayasittikul, V., Antioxidant, cytotoxicity, and QSAR study of 1-adamantylthio derivatives of 3-picoline and phenylpyridines, Medicinal Chemistry Research, 21,11 (2012) 3514-3522.
71. Worachartcheewan, A., Nantasenamat, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C. ve Prachayasittikul, V., Predicting antimicrobial activities of benzimidazole derivatives, Medicinal Chemistry Research, 22,11 (2013) 5418-5430.
72. Worachartcheewan, A., Mandi, P., Prachayasittikul, V., Toropova, A.P., Toropov, A.A. ve Nantasenamat, C., Large-scale QSAR study of aromatase inhibitors using SMILES-based descriptors, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 138 (2014) 120-126.
73. Worachartcheewan, A., Nantasenamat, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C. ve Prachayasittikul, V., Probing the origins of anticancer activity of chrysin derivatives, Medicinal Chemistry Research, 24,5 (2015) 1884-1892.
74. Hughes, J.P., Rees, S., Kalindjian, S.B. ve Philpott, K.L., Principles of early drug discovery, British Journal of Pharmacology, 162,6 (2011) 1239-1249.

75. Anderson, A.C., The process of structure-based drug design, Chemistry & Biology, 10,9 (2003) 787-797.
76. Barker, A., Kettle, J.G., Nowak, T. ve Pease, J.E., Expanding medicinal chemistry space, Drug Discovery Today, 18,5-6 (2013) 298-304.
77. Dandapani, S. ve Marcaurelle, L.A., Accessing new chemical space for 'undruggable' targets, Nature Chemical Biology, 6,12 (2010) 861-863.
78. Chrysina, E.D., Bokor, E., Alexacou, K.M., Charavgi, M.D., Oikonomakos, G.N., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Oikonomakos, N.G. ve Laszlo, S., Amide-1,2,3-triazole bioisosterism: the glycogen phosphorylase case, Tetrahedron-Asymmetry, 20,6-8 (2009) 733-740.
79. Pingaew, R., Prachayasittikul, V., Mandi, P., Nantasenamat, C., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S. ve Prachayasittikul, V., Synthesis and molecular docking of 1,2,3-triazole-based sulfonamides as aromatase inhibitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 23,13 (2015) 3472-3480.
80. Prachayasittikul, V., Pingaew, R., Anuwongcharoen, N., Worachartcheewan, A., Nantasenamat, C., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S. ve Prachayasittikul, V., Discovery of novel 1,2,3-triazole derivatives as anticancer agents using QSAR and in silico structural modification, Springerplus, 4 (2015) 571.
81. Hellberg, M.R., Namil, A., Delgado, P., David, K.C., Kessler, T.L., Graff, G., Haggard, K.S. ve Nixon, J.C., Novel esters and amides of nonsteroidal antiinflammatory carboxylic acids as antioxidants and antiproliferative agents, Journal of Medicinal Chemistry, 42,2 (1999) 267-276.
82. Lengauer, T. ve Rarey, M., Computational methods for biomolecular docking, Current Opinion in Structural Biology, 6,3 (1996) 402-406.
83. Wang, H., Dommert, F. ve Holm, C., Optimizing working parameters of the smooth particle mesh Ewald algorithm in terms of accuracy and efficiency, Journal of Chemical Physics, 133,3 (2010) 034117.
84. Seeliger, D. ve de Groot, B.L., Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina, Journal of Computer-Aided Molecular Design, 24,5 (2010) 417-422.
85. Ashraf, Z., Mahmood, T., Hassan, M., Afzal, S., Rafique, H., Afzal, K. ve Latip, J., Dexibuprofen amide derivatives as potential anticancer agents: synthesis, in silico docking, bioevaluation, and molecular dynamic simulation, Drug Design Development and Therapy, 13 (2019) 1643-1657.

86. Chrobak, E., Kadela-Tomanek, M., Bebenek, E., Marciniak, K., Wietrzyk, J., Trynda, J., Pawelczak, B., Kusz, J., Kasperczyk, J., Chodurek, E., Padaszynski, P. ve Boryczka, S., New phosphate derivatives of betulin as anticancer agents: Synthesis, crystal structure, and molecular docking study, Bioorganic Chemistry, 87 (2019) 613-628.
87. Karakaya, G., Ture, A., Ercan, A., Oncul, S. ve Aytemir, M.D., Synthesis, computational molecular docking analysis and effectiveness on tyrosinase inhibition of kojic acid derivatives, Bioorganic Chemistry, 88 (2019) 102950.
88. Janecek, S., alpha-amylase family: Molecular biology and evolution, Progress in Biophysics & Molecular Biology, 67,1 (1997) 67-97.
89. van der Maarel, M.J.E.C., van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H. ve Dijkhuizen, L., Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family, Journal of Biotechnology, 94,2 (2002) 137-155.
90. Gupta, R., Beg, Q.K. ve Lorenz, P., Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, Applied Microbiology and Biotechnology, 59,1 (2002) 15-32.
91. Yang, H.Q., Liu, L., Shin, H.D., Chen, R.R., Li, J.H., Du, G.C. ve Chen, J., Structure-based engineering of histidine residues in the catalytic domain of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* for improved protein stability and catalytic efficiency under acidic conditions, Journal of Biotechnology, 164,1 (2013) 59-66.
92. Kirk, O., Borchert, T.V. ve Fuglsang, C.C., Industrial enzyme applications, Current Opinion in Biotechnology, 13,4 (2002) 345-351.
93. D'Amico, S., Gerday, C. ve Feller, G., Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent alpha-amylases, Gene, 253,1 (2000) 95-105.
94. Kaur, J. ve Sharma, R., Directed evolution: An approach to engineer enzymes, Critical Reviews in Biotechnology, 26,3 (2006) 165-199.
95. Wolfenden, R., Lu, X.D. ve Young, G., Spontaneous hydrolysis of glycosides, Journal of the American Chemical Society, 120,27 (1998) 6814-6815.
96. Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W. ve Kakudo, M., Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A, Journal of Biochemistry, 95,3 (1984) 697-702.
97. Svensson, B., Jensen, M.T., Mori, H., Bak-Jensen, K.S., Bonsager, B., Nielsen, P.K., Kramhoft, B., Praetorius-Ibba, M., Nohr, J., Juge, N., Greffe, L., Williamson, G. ve Driguez, H., Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13, Biologia, 57 (2002) 5-19.

98. Uitdehaag, J.C.M., Mosi, R., Kalk, K.H., van der Veen, B.A., Dijkhuizen, L., Withers, S.G. ve Dijkstra, B.W., X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family, Nature Structural Biology, 6,5 (1999) 432-436.
99. Nielsen, J.E. ve Borchert, T.V., Protein engineering of bacterial alpha-amylases, Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1543,2 (2000) 253-274.
100. <https://www.3dsbiovia.com>. Tirosinaz va amilazın kristal yapısı. 12 Kasım 2019.
101. Whelan, W.J. ve Roberts, P.J.P., The mechanism of carbohydrase action. Part II. alpha-amylolysis of linear substrates, Journal of the Chemical Society, (1953) 1298-1304.
102. Warren, F.J., Butterworth, P.J. ve Ellis, P.R., The surface structure of a complex substrate revealed by enzyme kinetics and Freundlich constants for alpha-amylase interaction with the surface of starch, Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 1830,4 (2013) 3095-3101.
103. Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Arshad, M.K.M., LakshmiPriya, T., Voon, C.H., Hashim, U. ve Chinni, S.V., Biotechnological processes in microbial amylase production, Biomed Research International, (2017) 1272193.
104. Zhang, C., Liu, H.G., Chen, S.W. ve Luo, Y.K., Evaluating the effects of IADHFL on inhibiting DPP-IV activity and expression in Caco-2 cells and contributing to the amount of insulin released from INS-1 cells in vitro, Food & Function, 9,4 (2018) 2240-2250.
105. Ogurtsova, K., Fernandes, J.D.D.R., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N.H., Cavan, D., Shaw, J.E. ve Makaroff, L.E., IDF diabetes atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040, Diabetes Research and Clinical Practice, 128 (2017) 40-50.
106. Hanhineva, K., Torronen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H. ve Poutanen, K., Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism, International Journal of Molecular Sciences, 11,4 (2010) 1365-1402.
107. Eichler, H.G., Korn, A., Gasic, S., Pirson, W. ve Businger, J., The effect of a new specific alpha-amylase inhibitor on post-prandial glucose and insulin excursions in normal subjects and type-2 (non-insulin-dependent) diabetic-patients, Diabetologia, 26,4 (1984) 278-281.
108. Creutzfeldt, W., The [pre-] history of the incretin concept, Regulatory Peptides, 128,2 (2005) 87-91.
109. Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Analytical Chemistry, 31,3 (1959) 426-428.

110. Man, Y.B.C., Setiowaty, G. ve van de Voort, F.R., Determination of iodine value of palm oil by Fourier transform infrared spectroscopy, Journal of the American Oil Chemists Society, 76,6 (1999) 693-699.
111. Kruatian, T. ve Jitmanee, K., Simple spectrophotometric method for determination of iodine value of vegetable oils, Chiang Mai Journal of Science, 40,3 (2013) 419-426.
112. Gibson, K., Park, J.S., Nagai, Y., Hwang, S.K., Cho, Y.C., Roh, K.H., Lee, S.M., Kim, D.H., Choi, S.B., Ito, H., Edwards, G.E. ve Okita, T.W., Exploiting leaf starch synthesis as a transient sink to elevate photosynthesis, plant productivity and yields, Plant Science, 181,3 (2011) 275-281.
113. Sajilata, M.G., Singhal, R.S. ve Kulkarni, P.R., Resistant starch - A review, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5,1 (2006) 1-17.
114. Okuda, T., Kawai, E., Harada, J., Inoue, E., Hisamoto, M. ve Watanabe-Saito, F., Inhibition of polyphenol oxidase by quercetin derivatives in grape skin, American Journal of Enology and Viticulture, 70,1 (2019) 109-113.
115. Mayer, A.M., Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review, Phytochemistry, 67,21 (2006) 2318-2331.
116. Raber, H.S., The aerobic oxidases, Physiological Reviews, 8,2, (1928) 245-282.
117. Mason, H.S., Oxidases, Annual Review of Biochemistry, 34 (1965) 595-634.
118. Sherman, T.D., Vaughn, K.C. ve Duke, S.O., A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase, Phytochemistry, 30,8 (1991) 2499-2506.
119. Sugumaran, M., Molecular mechanisms for cuticular sclerotization, Advances in Insect Physiology, 21 (1988) 179-231.
120. Lerner, A.B. ve Fitzpatrick, T.B., Biochemistry of melanin formation, Physiological Reviews, 30,1 (1950) 91-126.
121. Dummett, C.O. ve Bolden, T.E., Postsurgical clinical repigmentation of the cingivae., Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 16(3) (1963) 353-365.
122. Rich, S. ve Horsfall, J.G., Relation of polyphenol oxidases to fungitoxicity, Phytopathology, 43,9 (1953) 482-483.
123. McClendon, J.H., The intracellular localization of enzymes in tobacco leaves. II. Cytochrome oxidase, catalase, and polyphenol oxidase, American Journal of Botany, 40,4 (1953) 260-266.
124. Yada, R., Y., Jackman, R., L., ve Smith, J., L., Protein structure-function relationships in foods, s. ed editor, 38, Chapman and Hall, London, 1994.

125. Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H. ve Sugiyama, M., Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis, Journal of Biological Chemistry, 281,13 (2006) 8981-8990.
126. 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.
127. Cabanes, J., Chazarra, S. ve Garciacarmona, F., Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 46,12 (1994) 982-985.
128. Brooks, S.J., Doyle, E.M., Hewage, C., Malthouse, J.P.G., Duetz, W. ve O'Connor, K.E., Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F6, Applied Microbiology and Biotechnology, 64,4 (2004) 486-492.
129. Fitzpatrick, T.B., The evolution of concepts of melanin biology, Archives of Dermatology, 96, (1967) 305-323.
130. Korner, A. ve Pawelek, J., Mammalian tyrosinase catalyzes 3 reactions in the biosynthesis of melanin, Science, 217,4565 (1982) 1163-1165.
131. Hearing, V.J., Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase) - purification, properties, and reactions catalyzed, Methods in Enzymology, 142 (1987) 154-165.
132. Moon, J.Y., Yim, E.Y., Song, G., Lee, N.M. ve Hyun, C.G., Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants Eurasian Journal of Biosciences, 4 (2010) 41-53.
133. Ikehata, K. ve Nicell, J.A., Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols, Bioresource Technology, 74,3 (2000) 191-199.
134. Das, J.R., Bhat, S.G. ve Gowda, L.R., Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the kew cultivar of Indian pineapple fruit, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45,6 (1997) 2031-2035.
135. Barrett, A.W. ve Scully, C., Human oral mucosal melanocytes - a review, Journal of Oral Pathology & Medicine, 23,3 (1994) 97-103.
136. Cichorek, M., Wachulska, M. ve Stasiewicz, A., Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes, Central European Journal of Biology, 8,4 (2013) 315-330.
137. Wasmeier, C., Hume, A.N., Bolasco, G. ve Seabra, M.C., Melanosomes at a glance, Journal of Cell Science, 121,24 (2008) 3995-3999.

138. Monsalvegonzalez, A., Barbosacanovas, G.V., Cavalieri, R.P., Mcevely, A.J. ve Iyengar, R., Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods - 4-hexylresorcinol as anti-browning agent, Journal of Food Science, 58,4 (1993) 797-800.
139. Castaner, M., Gil, M.I., Artes, F. ve TomasBarberan, F.A., Inhibition of browning of harvested head lettuce, Journal of Food Science, 61,2 (1996) 314-316.
140. Manta, C., Peralta-Altier, G., Gioia, L., Mendez, M.F., Seoane, G. ve Ovsejevi, K., Synthesis of a thiol-beta-cyclodextrin, a potential agent for controlling enzymatic browning in fruits and vegetables, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61,47 (2013) 11603-11609.
141. Kubo, I. ve Kinst-Hori, I., Tyrosinase inhibitors from cumin, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46,12 (1998) 5338-5341.
142. Miyazawa, M., Oshima, T., Koshio, K., Itsuzaki, Y. ve Anzai, J., Tyrosinase inhibitor from black rice bran, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51,24 (2003) 6953-6956.
143. Hamidian, H., Synthesis of novel compounds as new potent tyrosinase inhibitors, Biomed Research International, (2013) 207181.
144. Ghani, U. ve Ullah, N., New potent inhibitors of tyrosinase: Novel clues to binding of 1,3,4-thiadiazole-2(3H)-thiones, 1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thiones, 4-amino-1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, and substituted hydrazides to the dicopper active site, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 18,11 (2010) 4042-4048.
145. Li, S.B., Nie, H.L., Zhang, H.T., Xue, Y., Chris, B.W. ve Zhu, L.M., Inhibitory kinetics of a trifluoromethyl-containing 1,2,3-triazole derivative on mushroom tyrosinase activity, Acta Physico-Chimica Sinica, 26,1 (2010) 215-220.
146. Cabanes, J., Garciacanovas, F. ve Garciacarmona, F., Chemical and enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and absence of l-serine - spectrophotometric determination of intermediates, Biochimica Et Biophysica Acta, 914,2 (1987) 190-197.
147. Valero, E., Garciamoreno, M., Varon, R. ve Garciacarmona, F., Time-dependent inhibition of grape polyphenol oxidase by tropolone, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39,6 (1991) 1043-1046.
148. Morrison, J.F., The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalyzed reactions, Trends in Biochemical Sciences, 7,3 (1982) 102-105.
149. Kubo, I. ve Kinst-Hori, I., Tyrosinase inhibitory activity of the olive oil flavor compounds, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47,11 (1999) 4574-4578.
150. Quevedo, W.C. ve Fleischmann, R.D., Developmental biology of mammalian melanocytes, Journal of Investigative Dermatology, 75,1 (1980) 116-120.

151. Kollias, N., Sayre, R.M., Zeise, L. ve Chedekel, M.R., Photoprotection by melanin, Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 9,2 (1991) 135-160.
152. Hearing, V.J. ve Tsukamoto, K., Enzymatic control of pigmentation in mammals, Faseb Journal, 5,14 (1991) 2902-2909.
153. Sarkar, R., Jain, R.K. ve Puri, P., Melasma in Indian males, Dermatologic Surgery, 29,2 (2003) 204-204.
154. Kim, S., Jung, S.H. ve Cho, C.W., Physicochemical studies of a newly synthesized molecule, 6-methyl-3-phenethyl-3,4-dihydro-1h-quinazoline-2-thione (JSH18) for topical formulations, Archives of Pharmacal Research, 31,10 (2008) 1363-1368.
155. Mendonca, C.O., Holmes, S. ve Burden, A.D., Absent lentigines in psoriatic plaques, British Journal of Dermatology, 147,5 (2002) 1044-1045.
156. 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.
157. Sanchezferrer, A., Rodriguezlopez, J.N., Garciacanovas, F. ve Garciacarmona, F., Tyrosinase - a comprehensive review of its mechanism, Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1247,1 (1995) 1-11.
158. Funayama, M., Arakawa, H., Yamamoto, R., Nishino, T., Shin, T. ve Murao, S., Effects of alpha-arbutin and beta-arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 59,1 (1995) 143-144.
159. Kim, Y.J. ve Uyama, H., Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, Cellular and Molecular Life Sciences, 62,15 (2005) 1707-1723.
160. 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.
161. Dewey, D.L., Butcher, F.W. ve Galpine, A.R., Hydroxyanisole-induced regression of harding-passey melanoma in mice, Journal of Pathology, 122,3 (1977) 117-127.
162. Becker, S.W., Melanin pigmentation through the ages, Journal of Investigative Dermatology, 8,1 (1947) 50-51.
163. Hazes, B., Magnus, K.A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K.H. ve Hol, W.G.J., Crystal-structure of deoxygenated limulus-polyphemus subunit-Ii hemocyanin at 2.18-Angstrom resolution - Clues for a Mechanism for Allosteric Regulation, Protein Science, 2,4 (1993) 597-619.

164. Hazes, B., Magnus, K.A., Kalk, K.H., Bonaventura, C. ve Hol, W.G.J., Nitrate binding to *Limulus polyphemus* subunit type II hemocyanin and its functional implications, Journal of Molecular Biology, 262,4 (1996) 532-542.
165. Nakagawa, M., Kawai, K. ve Kawai, K., Contact allergy to kojic acid in skin care products, Contact Dermatitis, 32,1 (1995) 9-13.
166. <https://www.who.int>. Dünya kanser istatistikleri. 12 Kasım 2019.
167. <https://www.iarc.fr>. Kanser gelişimini etkileyen faktörler. 12 Kasım 2019.
168. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D. ve Bray, F., Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012 (Reprinted), European Journal of Cancer, 51,9 (2015) 1201-1202.
169. <https://www.cancerresearchuk.org>. Birleşik Krallık kanser istatistikleri. 12 Kasım 2019.
170. Trilla-Fuertes, L., Gamez-Pozo, A., Prado-Vazquez, G., Zapater-Moros, A., Diaz-Almiron, M., Fortes, C., Ferrer-Gomez, M., Lopez-Vacas, R., Blanco, V.P., Marquez-Rodas, I., Soria, A., Vara, J.A.F. ve Espinosa, E., Melanoma proteomics suggests functional differences related to mutational status, Scientific Reports, 9,1, (2019) 7217.
171. Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. ve Garcíacanos, F., A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase, Analytical Biochemistry, 231,1 (1995) 237-246.
172. Singh, R., Letai, A. ve Sarosiek, K., Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 20,3 (2019) 175-193.
173. Wong, R.S.Y., Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 30 (2011).
174. Pfeffer, C.M. ve Singh, A.T.K., Apoptosis: A target for anticancer therapy, International Journal of Molecular Sciences, 19,2 (2018) E448.
175. Adams, J.M. ve Cory, S., The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival, Science, 281,5381 (1998) 1322-1326.
176. Yip, K.W. ve Reed, J.C., Bcl-2 family proteins and cancer, Oncogene, 27,50 (2008) 6398-6406.
177. Banfalvi, G., Methods to detect apoptotic cell death, Apoptosis, 22,2 (2017) 306-323.

178. Foster, I., Cancer: A cell cycle defect, Radiography, 14 (2008) 144-149.
179. Hartwell, L.H. ve Kastan, M.B., Cell cycle control and cancer, Science, 266,5192 (1994) 1821-1828.
180. Manisalıgil, Y.A. ve Yurt, A., Cellular and molecular effects of ionizing radiation, Duzce Medical Journal, 20 (2018) 50-53.
181. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. ve Berneman, Z.N., The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, Cell Proliferation, 36,3 (2003) 131-149.
182. Williams, G.H. ve Stoeber, K., The cell cycle and cancer, Journal of Pathology, 226,2 (2012) 352-364.
183. Visconti, R., Della Monica, R. ve Grieco, D., Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 35 (2016) 153.
184. Bekircan, O., Mentese, E. ve Ulker, S., Synthesis and pharmacological activities of some new 2-[1-heptyl-3-(4-methoxybenzyl)-5-oxo-1,5-dihydro-4h-1,2,4-triazol-4-yl]acetohydrazide derivatives, Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences, 69,9-10 (2014) 969-981.
185. Bekircan, O., Mentese, E., Ulker, S. ve Kucuk, C., Synthesis of some new 1,2,4-triazole derivatives starting from 3-(4-chlorophenyl)-5-(4-methoxybenzyl)-4H-1,2,4-triazol with anti-lipase and anti-urease activities, Archiv Der Pharmazie, 347,6 (2014) 387-397.
186. Bekircan, O., Ulker, S. ve Mentese, E., Synthesis of some novel heterocyclic compounds derived from 2-[3-(4-chlorophenyl)-5-(4-methoxybenzyl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl]acetohydrazide and investigation of their lipase and alpha-glucosidase inhibition, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 30,6 (2015) 1002-1009.
187. Bernfeld, P., Amylases, alpha and beta, Methods in Enzymology, 1 (1955) 149-158.
188. Somogyi, M., Notes on sugar determination, Journal of Biological Chemistry, 195,1 (1952) 19-23.
189. 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, alpha-amylase inhibitory potential and molecular docking study of indole derivatives, Bioorganic Chemistry, 80 (2018) 36-42.
190. Kwon, Y.I., Apostolidis, E. ve Shetty, K., In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension, Bioresource Technology, 99,8 (2008) 2981-2988.

191. Kolcuoglu, 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 caldxylosilyticus* TK4, Process Biochemistry, 45,6 (2010) 821-828.
192. Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A. ve Guner, S., Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae), Food Chemistry, 77,1 (2002) 1-7.
193. Colak, A., Ozen, A., Dincer, B., Guner, S. ve Ayaz, F.A., Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits at an early stage of maturation, Food Chemistry, 90,4 (2005) 801-807.
194. Nasiri, R., Moghimi, A., Alijanianzadeh, M. ve Rabiee, S., Inhibition of mushroom tyrosinase by phenol derivative (HDNOS) ligand, International Journal of Chemical and Biochemical Sciences, 4 (2013) 57-65.
195. Akin, S., Demir, E.A., 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.
196. Kolcuoglu, 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.
197. Demir, E.A., Colak, 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.
198. Si, Y.X., Wang, Z.J., Park, D., Chung, H.Y., Wang, S.F., Yan, L., Yang, J.M., Qian, G.Y., Yin, S.J. ve Park, Y.D., Effect of hesperetin on tyrosinase: Inhibition kinetics integrated computational simulation study, International Journal of Biological Macromolecules, 50,1 (2012) 257-262.
199. Sheliya, M.A., Rayhana, B., Ali, A., Pillai, K.K., Aeri, V., Sharma, M. ve Mir, S.R., Inhibition of alpha-glucosidase by new prenylated flavonoids from *euphorbia hirta* L. herb, Journal of Ethnopharmacology, 176 (2015) 1-8.
200. 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.
201. Si, Y.X., Yin, S.J., Park, D., Chung, H.Y., Yan, L., Lu, Z.R., Zhou, H.M., Yang, J.M., Qian, G.Y. ve Park, Y.D., Tyrosinase inhibition by isophthalic acid: Kinetics and computational simulation, International Journal of Biological Macromolecules, 48,4 (2011) 700-704.

202. Hehre, W.J., Ditchfield, R. ve Pople, J.A., Self-consistent molecular-orbital methods. XII. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular-orbital studies of organic-molecules, Journal of Chemical Physics, 56,5 (1972) 2257-2261.
203. Lee, C.T., Yang, W.T. ve Parr, R.G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density, Physical Review B, 37,2 (1988) 785-789.
204. Becke, A.D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, Journal of Chemical Physics, 98,7 (1993) 5648-5652.
205. Goldfeder, M., Kanteev, M., Adir, N. ve Fishman, A., Influencing the monophenolase/diphenolase activity ratio in tyrosinase, Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 1834,3 (2013) 629-633.
206. Fujimoto, Z., Takase, K., Doui, N., Momma, M., Matsumoto, T. ve Mizuno, H., Crystal structure of a catalytic-site mutant alpha-amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose, Journal of Molecular Biology, 277,2 (1998) 393-407.
207. 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, Journal of Computational Chemistry, 31,2 (2010) 455-461.
208. Ringsdorf, H., Simon, J. ve Winnik, F.M., Hydrophobically-modified poly(N-isopropylacrylamides) in water - probing of the microdomain composition by nonradiative energy-transfer, Macromolecules, 25,20 (1992) 5353-5361.
209. Laskowski, R.A. ve Swindells, M.B., LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery, Journal of Chemical Information and Modeling, 51,10 (2011) 2778-2786.
210. Ahnerthilger, G. ve Wiedenmann, B., The ampicrine pancreatic-cell line, AR42J, secretes gaba and amylase by separate regulated pathways, Febs Letters, 314,1 (1992) 41-44.
211. Koc, E., Celik-Uzuner, S., Uzuner, U. ve Cakmak, R., The detailed comparison of cell death detected by annexin V-PI counterstain using fluorescence microscope, flow cytometry and automated cell counter in mammalian and microalgae cells, Journal of Fluorescence, 28,6 (2018) 1393-1404.
212. Uzuner Çelik, S., Development of a direct trypan blue exclusion method to detect cell viability of adherent cells into ELISA plates, Celal Bayar University Journal of Science, 14,1 (2017) 99-104.
213. Martins, R., Davids, W., Al-Soud, W., Levander, F., Rådström, P. ve Hatti-Kaul, R., Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes, Extremophiles, 5,2 (2001) 135-144.

214. Hseu, Y.C., Cheng, K.C., Lin, Y.C., Chen, C.Y., Chou, H.Y., Ma, D.L., Leung, C.H., Wen, Z.H. ve Wang, H.M.D., Synergistic effects of linderanotide B combined with arbutin, PTU or kojic acid on tyrosinase inhibition, Current Pharmaceutical Biotechnology, 16,12 (2015) 1120-1126.
215. Yang, X., Yu, Y.J., Huang, X., Chen, Q.X., Wu, H., Wang, R., Qi, R.G., Miao, Y.F. ve Qiu, Y.M., Delivery of platinum (II) drugs with bulky ligands in trans-geometry for overcoming cisplatin drug resistance, Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 96 (2019) 96-104.
216. Lin, J.Y. ve Tang, C.Y., Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation, Food Chemistry, 101,1 (2007) 140-147.
217. Turan, I., Demir, S., Kilinc, K., Yaman, S.O., Misir, S., Kara, H., Genc, B., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y. ve Deger, O., Cytotoxic effect of Rosa canina extract on human colon cancer cells through repression of telomerase expression, Journal of Pharmaceutical Analysis, 8,6 (2018) 394-399.
218. Zdravkovic, B., Zdravkovic, T.P., Zdravkovic, M., Strukelj, B. ve Ferk, P., The influence of nano-TiO₂ on metabolic activity, cytotoxicity and ABCB5 mRNA expression in WM-266-4 human metastatic melanoma cell line, Journal of BUON, 24,1 (2019) 338-346.
219. Worley, S.L., Vaughn, B.J., Terry, A.I., Gardiner, C.S. ve DeKrey, G.K., Time- and dose-dependent effects of ethanol on mouse embryonic stem cells, Reproductive Toxicology, 57 (2015) 157-164.
220. Danciu, C., Pinzaru, I., Coricovac, D., Andrica, F., Sizemore, I., Dehelean, C., Baderca, F., Lazureanu, V., Soica, C., Mioc, M. ve Radeke, H., Betulin silver nanoparticles qualify as efficient antimelanoma agents in in vitro and in vivo studies, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 134 (2019) 1-19.
221. Bernard, M., Jubeli, E., Bakar, J., Saunier, J. ve Yagoubi, N., Impact of simulated biological aging on physicochemical and biocompatibility properties of cyclic olefin copolymers, Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 97 (2019) 377-387.
222. Farajzadeh, D., Karimi-Gharigh, S., Jalali-Kondori, P. ve Dastmalchi, S., Design and construction of a novel humanized single-chain variable- fragment antibody against the tumor necrosis factor alpha, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 18,1 (2019) 308-319.
223. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological Methods, 65,1-2 (1983) 55-63.

224. Chen, Y.M., Su, W.C., Li, C., Shi, Y., Chen, Q.X., Zheng, J., Tang, D.L., Chen, S.M. ve Wang, Q., Anti-melanogenesis of novel kojic acid derivatives in B16F10 cells and zebrafish, International Journal of Biological Macromolecules, 123 (2019) 723-731.
225. Abdi, K., Hadadzadeh, H., Weil, M. ve Salimi, M., Mononuclear copper(II) complex with terpyridine and an extended phenanthroline base, [Cu(tpy)(dppz)](2+): Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity, Polyhedron, 31,1 (2012) 638-648.
226. Demir, S., Aliyazicioglu, Y., Turan, I., Misir, S., Mentese, A., Yaman, S.O., Akbulut, K., Kilinc, K. ve Deger, O., Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line, Nutrition and Cancer-An International Journal, 68,1 (2016) 165-172.
227. Chang, C.J., Dai, R.Y., Leu, Y.L. ve Tsai, T.Y., Effects of the melanogenic inhibitor, uracil, derived from *Lactobacillus plantarum* TWK10-fermented soy milk on anti-melanogenesis in B16F0 mouse melanoma cells, Journal of Functional Foods, 17 (2015) 314-327.
228. Cha, S.H., Ko, S.C., Kim, D. ve Jeon, Y.J., Screening of marine algae for potential tyrosinase inhibitor: Those inhibitors reduced tyrosinase activity and melanin synthesis in zebrafish, Journal of Dermatology, 38,4 (2011) 343-352.
229. Hu, D.N., Methodology for evaluation of melanin content and production of pigment cells in vitro, Photochemistry and Photobiology, 84,3 (2008) 645-649.
230. Wang, H.M., Chen, C.Y., Chen, C.Y., Ho, M.L., Chou, Y.T., Chang, H.C., Lee, C.H., Wang, C.Z. ve Chu, I.M., (-)-N-Formylanonaine from *Michelia alba* as a human tyrosinase inhibitor and antioxidant, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 18,14 (2010) 5241-5247.
231. Ulukaya, E., Acilan, C., Ari, F., Ikitimur, E. ve Yilmaz, Y., A glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively, Turkish Journal of Biochemistry-Türk Biyokimya Dergisi, 36,3 (2011) 261-269.
232. Dunphy, C.H., Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology, Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 128,9 (2004) 1004-1022.
233. Demirel, D., Flow sitometrik DNA analizinin temel prensipleri., Türk Patoloji Dergisi, 11(2) (1995) 64-65.
234. Taneli, F., Methodology of flow cytometry and its role in clinical laboratory., Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 5(2) (2007) 75-82.
235. Rodriguez-Burford, C., Oelschlager, D.K., Talley, L.I., Barnes, M.N., Partridge, E.E. ve Grizzle, W.E., The use of dimethylsulfoxide as a vehicle in cell culture experiments using ovarian carcinoma cell lines, Biotechnic & Histochemistry, 78,1 (2003) 17-21.

236. Hoj, T.H., Robinson, R.J., Burton, J.C., Densley-Ure, R.A., Olson, T.V., Williams, L.K., Coward, L., Gorman, G. ve Hansen, M.D.H., Small molecules revealed in a screen targeting epithelial scattering are inhibitors of microtubule polymerization, Journal of Biomolecular Screening, 21,7 (2016) 671-679.
237. Miller, B.G. ve Wolfenden, R., Catalytic proficiency: The unusual case of OMP decarboxylase, Annual Review of Biochemistry, 71 (2002) 847-885.
238. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. ve Feeney, P.J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings (Reprinted from Advanced Drug Delivery Reviews, vol 23, pg 3-25, 1997), Advanced Drug Delivery Reviews, 46,1-3 (2001) 3-26.
239. Ajay, 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.
240. Veber, D.F., Johnson, 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.
241. Zhuang, C.L., Guan, X.H., Ma, H., Cong, H., Zhang, W.N. ve Miao, Z.Y., Small molecule-drug conjugates: A novel strategy for cancer-targeted treatment, European Journal of Medicinal Chemistry, 163 (2019) 883-895.
242. 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.
243. Aliabadi, A., 1,3,4-thiadiazole based anticancer agents, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 16,10 (2016) 1301-1314.
244. Gao, F., Wang, T.F., Xiao, J.Q. ve Huang, G., Antibacterial activity study of 1,2,4-triazole derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 173 (2019) 274-281.
245. Madhavilatha, B., Bhattacharjee, D., Sabitha, G., Reddy, B.V.S., Yadav, J.S., Jain, N. ve Reddy, B.J.M., Synthesis and in vitro anticancer activity of novel 1,3,4-oxadiazole-linked 1,2,3-triazole/isoxazole hybrids, Journal of Heterocyclic Chemistry, 55,4 (2018) 863-870.
246. 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.

247. El-Sherief, H.A.M., Youssif, B.G.M., Abdelazeem, A.H., Abdel-Aziz, M. ve Abdel-Rahman, H.M., Design, synthesis and antiproliferative evaluation of novel 1,2,4-triazole/schiff base hybrids with EGFR and B-RAF inhibitory activities, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 19,5 (2019) 697-706.
248. 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.
249. 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.
250. Buscemi, S., Pace, A., Vivona, N. ve Caronna, T., Photoinduced molecular rearrangements. Some comments on the ring-photoisomerization of 1,2,4-oxadiazoles into 1,3,4-oxadiazoles, Journal of Heterocyclic Chemistry, 38,3 (2001) 777-780.
251. Rollas, S., Kalyoncuoglu, N., Suraltiner, D. ve Yegenoglu, Y., 5-(4-aminophenyl)-4-substituted-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thiones-synthesis and antibacterial and antifungal activities, Pharmazie, 48,4 (1993) 308-309.
252. Malbec, F., Milcent, R., Vicart, P. ve Bure, A.M., Synthesis of new derivatives of 4-amino-2,4-dihydro-1,2,4-triazol-3-one as potential antibacterial agents, Journal of Heterocyclic Chemistry, 21,6 (1984) 1769-1774.
253. Herbrecht, R., Posaconazole: a potent, extended-spectrum triazole anti-fungal for the treatment of serious fungal infections, International Journal of Clinical Practice, 58,6 (2004) 612-624.
254. Williamson, D.J., Hill, R.G., Shephard, S.L. ve Hargreaves, R.J., The anti-migraine 5-HT_{1B/1D} agonist rizatriptan inhibits neurogenic dural vasodilation in anaesthetized guinea-pigs, British Journal of Pharmacology, 133,7 (2001) 1029-1034.
255. 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.
256. Gursoy-Kol, O. ve Ayazoglu, E., Antioxidant activities and acidic properties of some novel 4-[3,4-di-(4-nitrobenzoxy)-benzylidenamino]-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives, Arabian Journal of Chemistry, 10 (2017) S2881-S2889.
257. Calderone, V., Giorgi, I., Livi, O., Martinotti, E., Mantuano, E., Martelli, A. ve Nardi, A., Benzoyl and/or benzyl substituted 1,2,3-triazoles as potassium channel activators. VIII, European Journal of Medicinal Chemistry, 40,6 (2005) 521-528.

258. Kaur, R., Dwivedi, A.R., Kumar, B. ve Kumar, V., Recent developments on 1,2,4-triazole nucleus in anticancer compounds: a review, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 16,4 (2016) 465-489.
259. Kalluraya, B., Rahiman, A., Asma ve Manju, N., Synthesis, characterization, pharmacological and antimicrobial studies of Schiff and Mannich bases, Heterocyclic Letters, 7,4 (2017) 1001-1014.
260. Unver, Y., Deniz, S., Celik, F., Akar, Z., Kucuk, M. ve Sancak, K., Synthesis of new 1,2,4-triazole compounds containing Schiff and Mannich bases (morpholine) with antioxidant and antimicrobial activities, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31 (2016) 89-95.
261. Ceylan, S., Synthesis and biological evaluation of new Mannich and Schiff bases containing 1,2,4-triazole and 1,3,4-oxadiazole nucleus, Medicinal Chemistry Research, 25,9 (2016) 1958-1970.
262. Chen, G., Ning, Y., Zhao, W., Zhang, Y.Q., Zhang, Y., Hao, X.J., Wang, Y. ve Mu, S.Z., Synthesis, Neuro-protection and anti-cancer activities of simple Isatin Mannich and Schiff bases, Letters in Drug Design & Discovery, 13,5 (2016) 395-400.
263. Maddila, S., Pagadala, R. ve Jonnalagadda, S.B., 1,2,4-triazoles: A review of synthetic approaches and the biological activity, Letters in Organic Chemistry, 10,10 (2013) 693-714.
264. Taha, M., Noreen, T., Imran, S., Nawaz, F., Chigurupati, S., Selvaraj, M., Rahim, F., Ismail, N.H., Kumar, A., Mosaddik, A., Alghamdi, A.M., Alqahtani, Y.A.N. ve Alqahtani, A.A.N., Synthesis, alpha-amylase inhibition and molecular docking study of bisindolylmethane sulfonamide derivatives, Medicinal Chemistry Research, 28,11 (2019) 2010-2022.
265. Park, M.H., Ju, J.W., Park, M.J. ve Han, J.S., Daidzein inhibits carbohydrate digestive enzymes in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice, European Journal of Pharmacology, 712,1-3 (2013) 48-52.
266. Balbaa, M., Mansour, H., El-Sawy, H. ve El-Ashry, E.S.H., Inhibition of some hepatic glycosidases by the diseco nucleoside, 4-amino-3-(D-glucopentitol-1-yl)-5-mercapto-1,2,4-triazole and its 3-methyl analog, Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids, 21,10 (2002) 695-708.
267. Ponnusamy, S., Haldar, S., Mulani, F., Zinjarde, S., Thulasiram, H. ve RaviKumar, A., Gedunin and Azadiradione: Human pancreatic alpha-amylase inhibiting limonoids from neem (*Azadirachta indica*) as anti-diabetic agents, Plos One, 10,10 (2015) 1-19.
268. Nagmoti, D.M. ve Juvekar, A.R., In vitro inhibitory effects of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. seeds on intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase Journal of Biochemical Technology 4,3 (2013) 616-621.

269. Tu, J., Chen, J., Zhu, S.Y., Zhang, C.X., Chen, H. ve Liu, Y.B., Inhibition of wheat bran and its active components on α -glucosidase in vitro, Pharmacognosy Magazine, 9,36 (2013) 309-314.
270. 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, (2019) 1-8.
271. Siow, H.L., Tye, G.J. ve Gan, C.Y., Pre-clinical evidence for the efficacy and safety of alpha-amylase inhibitory peptides from cumin (*Cuminum cyminum*) seed, Journal of Functional Foods, 35 (2017) 216-223.
272. de Sales, P.M., de Souza, P.M., Simeoni, L.A., Magalhaes, P.D. ve Silveira, D., alpha-Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source, Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 15,1 (2012) 141-183.
273. Sariri, R., Moghimi, R. ve Ranjbar, R.B., Inhibition of tyrosinase activity on dopamine hydrochloride by kojic acid, Asian Journal of Chemistry, 18,1 (2006) 15-19.
274. 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.
275. Niu, C., Li, G., Tuexuntayi, A. ve Aisa, H.A., Synthesis and bioactivity of new chalcone derivatives as potential tyrosinase activator based on the click chemistry, Chinese Journal of Chemistry, 33,4 (2015) 486-494.
276. Chan, C.F., Huang, C.C., Lee, M.Y. ve Lin, Y.S., Fermented broth in tyrosinase- and melanogenesis inhibition, Molecules, 19,9 (2014) 13122-13135.
277. Gupta, S.D. ve Masakapalli, S.K., Mushroom tyrosinase inhibition activity of Aloe vera L. gel from different germplasms, Chinese Journal of Natural Medicines, 11,6 (2013) 616-620.
278. Huang, W.Y., Chen, H.J., Lin, C.C., Chen, C.S. ve Lin, Y.S., Kinetics investigation on mushroom tyrosinase inhibition of Proso Millet, Journal of Chemistry, (2018) 1-5.
279. Sunil, D., Isloor, A.M., Shetty, P., Chandrakantha, B. ve Satyamoorthy, K., Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic properties of some new Schiff and Mannich bases in HepG2 cells, Medicinal Chemistry Research, 20,7 (2011) 1024-1032.

280. Vyas, K.M., Jadeja, R.N., Patel, D., Devkar, R.V. ve Gupta, V.K., A new pyrazolone based ternary Cu(II) complex: Synthesis, characterization, crystal structure, DNA binding, protein binding and anti-cancer activity towards A549 human lung carcinoma cells with a minimum cytotoxicity to non-cancerous cells, Polyhedron, 65 (2013) 262-274.
281. Montana, M., Mathias, F., Terme, T. ve Vanelle, P., Antitumoral activity of quinoxaline derivatives: A systematic review, European Journal of Medicinal Chemistry, 163 (2019) 136-147.
282. Umezawa, K., Kojima, I., Simizu, S., Lin, Y., Fukatsu, H., Koide, N., Nakade, Y. ve Yoneda, M., Therapeutic activity of plant-derived alkaloid conophylline on metabolic syndrome and neurodegenerative disease models, Human Cell, 31,2 (2018) 95-101.
283. Tundis, R., Loizzo, M.R. ve Menichini, F., Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 10,4 (2010) 315-331.
284. Gonzalez, A., Nunez, A.M., Granados, M.P., Pariente, J.A. ve Salido, G.M., Ethanol impairs CCK-8-evoked amylase secretion through Ca²⁺-mediated ROS generation in mouse pancreatic acinar cells, Alcohol, 38,1 (2006) 51-57.
285. Perry, S.W., Epstein, L.G. ve Gelbard, H.A., In situ Trypan Blue staining of monolayer cell cultures for permanent fixation and mounting, Biotechniques, 22,6 (1997) 1020-1024.
286. Ngoh, Y.Y., Tye, G.J. ve Gan, C.Y., The investigation of alpha-amylase inhibitory activity of selected Pinto bean peptides via preclinical study using AR42J cell, Journal of Functional Foods, 35 (2017) 641-647.
287. Hernandez-Vazquez, E., Chavez-Riveros, A., Romo-Perez, A., Ramirez-Apan, M.T., Chavez-Blanco, A.D., Morales-Barcenas, R., Duenas-Gonzalez, A. ve Miranda, L.D., Cytotoxic activity and structure-activity relationship of triazole-containing bis(aryl ether) macrocycles, Chemmedchem, 13,12 (2018) 1193-1209.
288. Govindarajan, M., Amphiphilic glycoconjugates as potential anti-cancer chemotherapeutics, European Journal of Medicinal Chemistry, 143 (2018) 1208-1253.
289. Kim, C. ve Kim, B., Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER Stress-mediated apoptosis: a review, Nutrients, 10,8 (2018) E1021.
290. Chen, X.F., Guo, L., Ma, Q., Chen, W., Fan, W.X. ve Zhang, J., Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-acylhydrazone bond linked heterobivalent beta-carbolines as potential anticancer agents, Molecules, 24,16 (2019) E2950.
291. Brueggemeier, R.W., Hackett, J.C. ve Diaz-Cruz, E.S., Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer, Endocrine Reviews, 26,3 (2005) 331-345.

292. Domingues, B., Lopes, J.M., Soares, P. ve Populo, H., Melanoma treatment in review, Immunotargets and Therapy, 7 (2018) 35-49.
293. Oyenihi, A.B. ve Smith, C., Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anti-cancer success?, Journal of Ethnopharmacology, 229 (2019) 54-72.
294. Turan, I., Demir, S., Kilinc, K., Burnaz, N.A., Yaman, S.O., Akbulut, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y. ve Deger, O., Antiproliferative and apoptotic effect of Morus nigra extract on human prostate cancer cells, Saudi Pharmaceutical Journal, 25,2 (2017) 241-248.
295. Galati, G. ve O'Brien, P.J., Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties., Free Radical Biology and Medicine, 37 (2004) 287-303.
296. Luke, J.J. ve Schwartz, G.K., Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma, Clinics in Dermatology, 31(3) (2013) 290-297.
297. Bekircan, O., Kucuk, M., Kahveci, B. ve Bektas, H., Synthesis and anticancer evaluation of some new 4-amino-3-(p-methoxybenzyl)-4,5-dihydro-1,2,4-triazole-5-one derivatives, Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences, 63,11 (2008) 1305-1314.
298. Georgiyants, V., Perekhoda, L., Narzullo, S. ve Kadamov, I., Docking studies and biological evaluation of anti-cancer activity of new 1,2,4-triazole-4H derivatives, Scripta Scientifica Pharmaceutica, 2 (2014) 46-53.
299. Cihan-Ustundag, G., Simsek, B., Ilhan, E. ve Capan, G., Synthesis, characterization, antimycobacterial and anticancer evaluation of new 1,2,4-triazole derivatives, Letters in Drug Design & Discovery, 11,3 (2014) 290-296.
300. Anantacharya, R., Satyanarayan, N.D., Kalal, B.S. ve Pai, V.R., Cytotoxic, DNA cleavage and pharmacokinetic parameter study of substituted novel furan C-2 quinoline coupled 1, 2, 4-triazole and its analogs, The Open Medicinal Chemistry Journal, 12 (2018) 60-72.
301. Mioc, M., Soica, C., Bercean, V., Avram, S., Balan-Porcarasu, M., Coricovac, D., Ghiulai, R., Muntean, D., Andrica, F., Dehelean, C., Spandidos, D.A., Tsatsakis, A.M. ve Kurunczi, L., Design, synthesis and pharmaco-toxicological assessment of 5-mercapto-1,2,4-triazole derivatives with antibacterial and antiproliferative activity, International Journal of Oncology, 50,4 (2017) 1175-1183.
302. Quattrini, L., Coviello, V., Sartini, S., Di Desidero, T., Orlandi, P., Ke, Y.Y., Liu, K.L., Hsieh, H.P., Bocci, G. ve La Motta, C., Dual Kit/Aur Inhibitors as Chemosensitizing Agents for the Treatment of Melanoma: Design, Synthesis, Docking Studies and Functional Investigation, Scientific Reports, 9 (2019) 9943.

303. Ahsan, M.J., Synthesis and cytotoxicity evaluation of [(2,4-dichlorophenoxy)methyl]-5-aryl-1,3,4-oxadiazole/4 H-1,2,4-triazole analogues, Turkish Journal of Chemistry, 42,5 (2018) 1334-1343.
304. Lin, R.H., Connolly, P.J., Huang, S.L., Wetter, S.K., Lu, Y.H., Murray, W.V., Emanuel, S.L., Gruninger, R.H., Fuentes-Pesquera, A.R., Rugg, C.A., Middleton, S.A. ve Jolliffe, L.K., 1-acyl-1H-[1,2,4]triazole-3,5-diamine analogues as novel and potent anticancer cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and evaluation of biological activities, Journal of Medicinal Chemistry, 48,13 (2005) 4208-4211.
305. Diaz-Moralli, S., Tarrado-Castellarnau, M., Miranda, A. ve Cascante, M., Targeting cell cycle regulation in cancer therapy, Pharmacology and Therapeutics, 138 (2013) 255-271.
306. Purohit, M.N., Panjamurthy, K., Elango, S., Hebbar, K., Mayur, Y.C. ve Raghavan, S.C., IN-vitro cytotoxicity and cell cycle analysis of two novel bis-1, 2, 4-triazole derivatives: 1,4-bis[5-(5-mercapto-1,3,4-oxadiazol-2-yl-methyl)-thio-4-(p-tolyl) 1,2,4-triazol-3-yl]-butane (MNP-14) and 1,4-bis[5-(carbethoxy-methyl)-thio-4-(p-ethoxy phenyl)-1,2,4-triazol-3-yl]-butane (MNP-16), Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids, 30,11 (2011) 873-885.
307. Mioc, M., Avram, S., Bercean, V., Kurunczi, L., Ghiulai, R.M., Oprean, C., Coricovac, D.E., Dehelean, C., Mioc, A., Balan-Porcarasu, M., Tatu, C. ve Soica, C., Design, synthesis and biological activity evaluation of S-substituted 1H-5-mercapto-1,2,4-triazole derivatives as antiproliferative agents in colorectal cancer, Frontiers in Chemistry, 6 (2018) 373.
308. Reed, J.C., Dysregulation of apoptosis in cancer, Journal of Clinical Oncology, 17 (1999) 2941-2953.
309. Coskun, G.P., Djikic, T., Hayal, T.B., Turkel, N., Yelekci, K., Sahin, F. ve Kucukguzel, S.G., Synthesis, molecular docking and anticancer activity of diflunisal derivatives as cyclooxygenase enzyme inhibitors, Molecules, 23,8 (2018) E1969.
310. Sun, X.Y., Zhong, C.Y., Qiu, Q.Q., Li, Z.W., Liu, M.Y., Wang, X. ve Jin, C.H., Synthesis, activity evaluation, and pro-apoptotic properties of novel 1,2,4-triazol-3-amine derivatives as potent anti-lung cancer agents, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 34,1 (2019) 1210-1217.
311. Das, A., Narayanam, M.K., Paul, S., Mukherjee, P., Ghosh, S., Dastidar, D.G., Chakrabarty, S., Ganguli, A., Basu, B., Pal, M., Chatterji, U., Banerjee, S.K., Karmakar, P., Kumar, D. ve Chakrabarti, G., A novel triazole, NMK-T-057, induces autophagic cell death in breast cancer cells by inhibiting secretase-mediated activation of Notch signaling, Journal of Biological Chemistry, 294,17 (2019) 6733-6750.

312. Abuelizz, H.A., Awad, H.M., Marzouk, M., Nasr, F.A., Alqahtani, A.S., Bakheit, A.H., Naglah, A.M. ve Al-Salahi, R., Synthesis and biological evaluation of 4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzoic acid hybrids as anticancer agents, RSC Advances, 9,33 (2019) 19065-19074.
313. Romagnoli, R., Baraldi, P.G., Cruz-Lopez, O., Cara, C.L., Carrion, M.D., Brancale, A., Hamel, E., Chen, L.C., Bortolozzi, R., Basso, G. ve Viola, G., Synthesis and antitumor activity of 1,5-disubstituted 1,2,4-triazoles as cis-restricted combretastatin analogues, Journal of Medicinal Chemistry, 53,10 (2010) 4248-4258.
314. Liu, C.F., Shen, Q.K., Li, J.J., Tian, Y.S. ve Quan, Z.S., Synthesis and biological evaluation of novel 7-hydroxy-4-phenylchromen-2-one-linked to triazole moieties as potent cytotoxic agents, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 32,1 (2017) 1111-1119.
315. Tokala, R., Bale, S., Janrao, I.P., Vennela, A., Kumar, N.P., Senwar, K.R., Godugu, C. ve Shankaraiah, N., Synthesis of 1,2,4-triazole-linked urea/thiourea conjugates as cytotoxic and apoptosis inducing agents, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 28,10 (2018) 1919-1924.
316. El-Sherief, H.A.M., Youssif, B.G.M., Bukhari, S.N.A., 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.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Sürmene’de doğdu. Lise öğrenimini 2003 yılında Trabzon Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümünü kazandı. 2009 yılında Kimya Bölümü bitirerek kimyager unvanı aldı. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü Tezsiz Yüksek Lisans öğrenimine hak kazandı. 2011 yılında Yüksek Lisans Eğitimi tamamladıktan sonra aynı yıl Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine hak kazandı. 2013 yılında Yüksek Lisans Eğitimi tamamladıktan sonra 2014 yılı bahar döneminde Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Anabilim Dalı’nda doktora programına başladı. Yabancı dili İngilizcedir. Evli ve bir çocuk annesidir.

TEZ İLE İLGİLİ YAYINLAR

1. Akin S, **Ayazoglu Demir E**, Colak A, Kolcuoglu Y, Yildirim N, Bekircan O (2019). 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 (SCI, IF=2), 1175: 280-286.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.07.065>
2. **Ayazoglu Demir E**, Colak A, Kalfa A, Yasar A, Bekircan O, Yildirim Akatin M (2019). Investigation of tyrosinase inhibition by some 1,2,4 triazole derivative compounds: in vitro and in silico mechanisms. Turkish Journal of Biochemistry. (SCI-Exp, IF=0,3), 44(4): 473–481.
<https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0273>