



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DPP4, α -AMİLAZ VE α -GLUKOSİDAZ
ENZİMLERİNİN İNHİBİSYONUNU
HEDEFLEYEN YENİ HETEROSİKLİK
BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, *İN VİTRO* VE *İN
SİLİKO* ÇALIŞMALARI**

NAZENİN AKIN

DOKTORA TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Serap DEMİR

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2025



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DPP4, α -AMİLAZ VE α -GLUKOSİDAZ
ENZİMLERİNİN İNHİBİSYONUNU
HEDEFLEYEN YENİ HETEROSİKLİK
BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, *İN VİTRO* VE *İN
SİLİKO* ÇALIŞMALARI**

NAZENİN AKIN

(720618002)

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap DEMİR

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2025

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Öğrencisi Nazenin AKIN'ın “**DPP4, α -Amilaz ve α -Glukosidaz Enzimlerinin İnhibisyonunu Hedefleyen Yeni Heterosiklik Bileşiklerin Sentezi, *In Vitro* ve *In Siliko* Çalışmaları**” başlıklı tez çalışması, 25.08.2025 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Serap DEMİR (Danışman)
Marmara Üniversitesi (İMZA).....

Prof. Dr. Özkan DANIŞ (Üye)
Marmara Üniversitesi (İMZA).....

Doç. Dr. Vildan ATALAY (Üye)
İstanbul Teknik Üniversitesi (İMZA).....

Prof. Dr. Emrah ÇAKMAKÇI (Üye)
Marmara Üniversitesi (İMZA).....

Doç. Dr. Aslı BEYLER ÇİĞİL (Üye)
Gazi Üniversitesi (İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı ile Nazenin AKIN'ın Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Doktora derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Bülent MERTOĞLU



Sevgili Annem ve Babama...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın danışmanlığını yürüten, bu sürecin tüm aşamalarda bilgi ve desteği ile her zaman yanımda olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Serap DEMİR'e,

Doktora eğitimimde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ikinci danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN'a teşekkür ederim.

Deneysel ve teorik çalışmalarım sırasında her zaman bilgilerine başvurduğum Prof. Dr. Safiye ERDEM, Prof. Dr. Özkan DANIŞ, Doç. Dr. Vildan ENİSOĞLU ATALAY, Prof. Dr. Emrah ÇAKMAKÇI ve üzerimde emeği olan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Erciyes Üniversitesi Öğretim Üyesi yüksek lisans tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhan Özer İLHAN'a ve desteğini bildiğim akademik arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Mehmet Çadır'a teşekkür ederim.

Sevgi ve anlayışlarıyla, maddi ve manevi olarak şartlar ne olursa olsun yanımda olan bana inanan destekleyen sevgili annem Belgin ÇALIŞ AKIN ve merhum babam Gürsel AKIN'a şükranlarımı sunarım. Ayrıca Kimya bilimiyle tanışmamı sağlayan sevgili Hocam ve dostum Hasan ŞAHİN'e ve her zaman yanımda olan sabırla sürecimi takip eden Simin Günday, Burak ZÜLFÜKAR, Beril SAÇIK ve tüm dostlarıma teşekkürü borç bilirim.

Bu süreçte her zaman yanımda olan, her konuda bana destek olan arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Özgün AKDAĞ'a teşekkürü borç bilirim. Manevi desteği ile her zaman yanımda olan Fizikokimya yüksek lisans öğrencisi Elif BİLGİN'e, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Biyokimya yüksek lisans öğrencisi Garen KARABURUN, lisans öğrencisi Sena YAPAR, Dr. Safinaz ŞAHİN ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu araştırmayı FDK-2022-10871 kodu ile destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi yetkililerine teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca 100/2000 YÖK doktora burs programı kapsamında maddi olarak beni destekleyen Yükseköğretim Kurumu'na teşekkür ederim.

Ağustos 2025

Nazenin AKIN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
YENİLİK BEYANI.....	xi
SEMBOLLER	xiii
KISALTMALAR	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
TABLO LİSTESİ	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	2
1.1.1. Diyabet	2
1.1.2. Diyabette Etkin olan Enzimler	4
1.1.2.1. Dipeptidil Peptidaz-4 Enzimi	5
1.1.2.2. α -Amilaz Enzimi	6
1.1.2.3. α -Glukosidaz Enzimi	8
1.1.3. İlaç taşıma sisteminde albümin	9
1.1.4. Hedef Bileşiklerin Sentez Stratejisi	11
1.1.5. ADME	12

1.1.6. Moleküler yerleştirme	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
2.1. Deneyselerde kullanılan kimyasallar	15
2.2. Deneyselerde kullanılan cihazlar ve bilgisayar programları	15
2.3. Deneysel Yöntemler	16
2.3.1. Hedef bileşiklerin sentez yöntemleri.....	17
2.3.1.1. (3) Bileşiğinin sentezi.....	20
2.3.1.2. (3a) Bileşiğinin sentezi	20
2.3.1.3. (3b) Bbileşiğinin sentezi.....	21
2.3.1.4. (3c) Bileşiğinin sentezi	21
2.3.1.5. (3d) Bileşiğinin sentezi.....	22
2.3.1.6. (7) Bileşiğinin sentezi.....	22
2.3.1.7. (7a) Bileşiğinin sentezi	23
2.3.1.8. (7b) Bileşiğinin sentezi.....	23
2.3.1.9. (7c) Bileşiğinin sentezi	24
2.3.2. İnhibisyon Yöntemleri	24
2.3.2.1. DPP4 Enzimi İnhibisyon Çalışmaları.....	25
2.3.2.2. α -Amilaz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları.....	27
2.3.2.3. α -Glukosidaz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları	29
2.3.3. BSA bağlanma çalışmaları	31
2.3.4. ADME özelliklerinin incelenmesi.....	33
2.3.5. Moleküler yerleştirme çalışmaları.....	33
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35

3.1. Sentez Çalışmaları	35
3.1.1. 3-(2,5-dimetoksifenil)-5-(4-metoksifenil)-2-fenil-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol (3a) .	35
3.1.2. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (3b)	38
3.1.3. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karbotiyoamid (3c)	41
3.1.4. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (3d)	45
3.1.5. (<i>E</i>)-3-(3-(3,5-dimetoksifenil)akril)-4-hidroksi-2 <i>H</i> -kumarin-2-on (7).....	48
3.1.6. 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-3-yl)-4-hidroksi-2 <i>H</i> -kumarin-2-on (7a)	51
3.1.7. 5-(3,5-dimetoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2 <i>H</i> -kumarin-3-yl)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karbotiyo amid (7b).....	54
3.1.8. 5-(3,5-dimethoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2 <i>H</i> -kumarin-3-yl)- <i>N</i> -fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (7c).....	57
3.2. İnhibisyon Çalışmaları	61
3.2.1. DPP4 İnhibisyon sonuçları.....	64
3.2.2. α -Amilaz enzimi inhibisyon sonuçları	66
3.2.3. α -Glukosidaz enzimi inhibisyon çalışmaları.....	69
3.3. BSA bağlanma Çalışmaları.....	71
3.4. Hesapsal Çalışmalar.....	78
3.4.1. Bileşiklerin ADME özellikleri	78
3.4.2. Moleküler yerleştirme Çalışmaları.....	80
3.4.2.1. DPP4 enzimi ile (3b) ve (7a) bileşiklerine ait etkileşim sonuçları.....	83
3.4.2.2. α -Amilaz enzimi ile (3a),(3c),(3d),(7a),(7b) ve (7c) bileşiklerine ait etkileşim	

sonuçları	86
3.4.2.3. BSA proteini ile (3a), (3d), (7) ve (7a) bileşiklerine ait etkileşim sonuçları	92
4. SONUÇLAR.....	97
KAYNAKLAR.....	101



ÖZET

DPP4, α -AMİLAZ VE α -GLUKOSİDAZ ENZİMLERİNİN İNHİBİSYONUNU HEDEFLEYEN YENİ HETEROSİKLİK BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO* ÇALIŞMALARI

Tip 2 diyabet, insulin hormonunun yetmezliği veya etkinliğinin azalması sonucu ortaya çıkan; kan şekerinin yükselmesi ile ilişkili kronik bir hastalıktır. Diyabetli hasta sayısındaki artış hızı oral hipoglisemik ilaç piyasasını da hızla büyütmemekte, diyabetin kontrolü için yeni ve daha az yan tesirli ajanların bulunmasını zorunlu kılmaktadır. Çalışmamızda heterosiklik halkaya sahip özgün maddeler sentezlenerek karakterize edilmiş ve dipeptidil peptidaz-4 (DPP4), α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri üzerindeki olası inhibisyon etkileri *in siliko* ve *in vitro* yöntemlerle incelenmiş ve inhibisyon aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmamızın *in siliko* kısmında sentezlenen bileşiklerin farmasötik olarak uygunluğu araştırılmış; moleküler yerleştirme yöntemi ile DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz enzimlerinin aktif bölgelerindeki amino asit etkileşimleri incelenmiş, bağlanma enerjileri bulunmuştur. Moleküler yerleştirme çalışmaları ile deneysel çalışmaların sonuçların birbirini destekleyip desteklemediği araştırılmıştır. *İN siliko* ve *in vitro* çalışmalarda bilinen DPP4 inhibitörlerinden biri olan sitagliptin, literatürde en çok rastlanan α -amilaz inhibitörü olan akarboz, α -glukosidaz için ise kuarsetin, model olarak seçilmiştir. Bileşiklerin DPP-4 ve glukosidaz üzerinde kayda değer bir inhibisyon aktivitesine sahip olmadığı ancak (3a), (3d), (7) ve (7a)'nın dikkat çekici şekilde α -amilazı inhibe ettiği gözlemlenmiş olup; inhibisyon çalışmalarına ek olarak en iyi inhibisyonu veren bu dört bileşik ile *in vitro* ve *in siliko* yöntemler kullanılarak Sığır Serum Albümin (BSA) ile bağlanma çalışmaları yapılmıştır. BSA bağlanma çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde bağlanmanın negatif ΔG değerine sahip olduğu hesaplanmış BSA ile 3a, 3d, 7 ve 7a bileşikleri arasındaki etkileşimlerin kendiliğinden gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Çalışmamız sonucunda yukarıda saydığımız bileşiklerin fonksiyonel grupları modifiye edilerek *in vivo* çalışmalarla desteklendiğinde Tip 2 diyabet hastalığı tedavisinde kullanılan ilaçlara alternatif olabilir ve yeni ilaçların geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

ABSTRACT

SYNTHESIS, *IN VITRO*, AND *IN SILICO* STUDIES OF NOVEL HETEROCYCLIC COMPOUNDS TARGETING THE INHIBITION OF DPP4, α -AMYLASE, AND α -GLUCOSIDASE ENZYMES

Type 2 diabetes is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both. The oral hypoglycemic drug market is expanding as the number of diabetic patients increases significantly. For the control of diabetes, the discovery of new antidiabetic agents with less side effects is obligatory. In this context, original compounds having heterocyclic structures were synthesized and characterized and their inhibitory activities on Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), α -amylase and α -glucosidase were investigated by *in silico* and *in vitro* methods, and their inhibitory activities were expressed as IC₅₀ values. In the *in silico* part of our study, pharmaceutical suitability of these unique compounds were analyzed, and their interactions with amino acids at the active sites of DPP4, α -amylase and α -glucosidase were examined using molecular docking method and binding energies were also determined. It has been investigated whether the results of molecular docking studies and experimental studies support each other. In both *in silico* and *in vitro* studies, sitagliptin, which is one of the well known DPP4 inhibitors, acarbose and quercetin the most common inhibitors in literature; for α -amylase and α -glucosidase simultaneously were selected as model compounds. Compounds had no considerable inhibitory activity on DPP4 and α -glucosidase but it was observed that compounds; **(3a)**, **(3d)**, **(7)** and **(7a)** had the most remarkable α -amylase inhibitory activity; in addition to the inhibition studies, *in vitro* and *in silico* Bovine Serum Albumin (BSA) binding studies were performed with these four compounds. When the results of the BSA binding studies were evaluated, it was concluded that the binding had a negative ΔG value, indicating that the interactions between BSA and compounds **3a**, **3d**, **7** and **7a** occurred spontaneously. In light of these findings, modifying the functional groups of these novel compounds and supporting them with *in vivo* studies may contribute to the development of new drugs for the treatment of Type 2 diabetes.

YENİLİK BEYANI

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) diyabetin hızla arttığını ve son verilere göre dünyadaki hasta sayısının 422 milyona ulaştığını rapor etmiştir. Diyabetli hasta sayısındaki artış hızı oral hipoglisemik ilaç piyasasını da hızla büyütmemekte, diyabetin kontrolü için yeni ve daha az yan etkili ajanların bulunmasını zorunlu kılmaktadır. Bu kapsamda α -amilaz ve α -glukosidaz inhibitörleri ve 2006 yılından beri de DPP4 inhibitörleri diyabet tedavisinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Çok büyük bir pazar payı olan antidiyabetik ilaç piyasasında daha az yan etkili ve emniyetli ilaçlar büyük ilgi görmektedir. Halen tedavide kullanılan en etkili ilaç grupları bile hipoglisemi riskini arttırmakta, bağımlılık yapmakta ve kilo alımına sebep olmaktadır. Bu ilaçların en önemli yan etkisi ise kardiyovasküler sisteme zarar vermesidir. Yukarıda saydığımız sebeplerden dolayı daha iyi farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahip, daha az maliyetli yeni ilaçları keşfetmeye gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı antidiyabetik ilaç piyasasının büyüklüğü göz önüne alınarak tedaviye yönelik alternatif DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz inhibitörü olma potansiyeli taşıyan yeni bileşiklerin araştırılmasıdır. Daha önce sentezlenmemiş özgün bileşiklerin literatüre kazandırılmasının yanı sıra bu enzimler üzerindeki potansiyel inhibisyon etkilerinin hem *in vitro* hem de *in siliko* yöntemlerle aydınlatılması çalışmamızın temelini oluşturmaktadır. Ayrıca bu enzimler üzerinde en etkili inhibisyona sahip olan bileşiklerin BSA ile etkileşimleri spektroskopik yöntemlerle incelenmiş olup, bu bağlanma sistemlerine ait etkileşimler moleküler yerleştirme yöntemi ile desteklenmiştir.

Yapılan araştırmalardan elde edilen temel bilgiler pirazol ve kumarin halkalarının çalıştığımız enzimler üzerinde önemli inhibisyon etkisinin olduğunu göstermektedir. Elde edilen bilgiler ışığında kumarin ve pirazol halkalarının birbirine bağlanmasıyla yeni bir farmakofor şablon oluşturulmuş ve bu halkalı aktif yapılarla birlikte α , β -doymamış karbonil grubu ve amid bağı iskeletinin farklı kombinasyonlarına sahip özgün yapılar tasarlanmıştır. Yapılar bir araya geldiklerinde hem çok aktif ve küçük moleküller olmaları hem de kolaylıkla sentezlenip türevlendirilebilmelerinden dolayı geniş bir etki yelpazesine sahip olabilmektedirler. Bu özellikleri ile potansiyel ilaç adayı olarak enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri tartışılmış; sentez ve inhibisyon çalışmalarına katkı sağlamıştır.

SEMBOLLER

α	:	Alfa
Å	:	Angström
β	:	Beta
Δ	:	Delta
g	:	Gram
mg	:	miligram
mL	:	mililitre
μL	:	mikrolitre
μM	:	mikromolar
$^{\circ}\text{C}$:	Santigrad derece
U	:	Ünite
%	:	Yüzde

KISALTMALAR

ADME	: Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Atılım
Ka	: Bağlanma sabiti
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNS	: 3,5'-dinitro salisilik asit
DPP4	: Dipeptidil peptidaz-4
FractionCsp3	: Doygunluk
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EtOH	: Etil alkol
PBS	: Fosfat tamponu
POCl ₃	: Fosforil klorür
FTIR	: Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GIP	: Gastrik inhibe edici polipeptid
GIA	: Gastrointestinal emilim
ΔG	: Gibbs enerjisi
GLP-1	: Glukagon-benzeri peptid-1
HCl	: Hidroklorik asit
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
BBB	: Kan beyin bariyeri

^{13}C -NMR	: Karbon nükleer manyetik rezonans
QTOF	: Kütle spektrometresi
LogP	: Lipofiliklik ölçüsü
MA	: Molekül ağırlığı
MetOH	: Metil alkol
^1H -NMR	: Proton nükleer manyetik rezonans
ROT	: Reaktif oksijen türleri
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaCl	: Sodyum klorür
BSA	: Sığır serum albümin
TPSA	: Topolojik polar yüzey alanı
IC ₅₀	: Yüzde elli inhibisyon sağlayan inhibitör konsantrasyonu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. a:DPP4 enziminin bilinen inhibitörlerinden sitagliptin; b: α -Amilaz enziminin bilinen inhibitörlerinden akarboz; c: α -Glukosidaz enziminin bilinen inhibitörlerinden kuersetin.	5
Şekil 1.2. DPP4 enzim (PDB kodu: 4FFW) kristal yapısı.	6
Şekil 1.3. α -Amilaz enzim (PDB kodu: 1B2Y) kristal yapısı.	7
Şekil 1.4. α -Glukosidaz enzim (PDB kodu:3A4A) kristal yapısı.....	9
Şekil 1.5. BSA proteini (PDB kodu: 4F5S) kristal yapısı.	11
Şekil 1.6. Claisen-Schmidt Kondenzasyonu ile kalkon iskeletine sahip bileşiklerin reaksiyon mekanizması.	12
Şekil 1.7. Kalkon iskeletine sahip yapıların nükleofilik katılma ile halka kapanması reaksiyon mekanizması (X:O, S).	12
Şekil 2.1. Tez çalışması akış şeması.....	17
Şekil 2.2. Sentezlenen birinci grup bileşikler (Grup-A).....	18
Şekil 2.3. (7) bileşiğinin iki basamakta gerçekleşen sentez tepkimesi.	19
Şekil 2.4. Tez kapsamında sentezlenen ikinci grup bileşikler (Grup-B).....	19
Şekil 2.5. (3) Bileşiğinin sentez tepkimesi.	20
Şekil 2.6. (3a) Bileşiğinin sentez tepkimesi.	20
Şekil 2.7. (3b) Bileşiğinin sentez tepkimesi.	21
Şekil 2.8. (3c) Bileşiğinin sentez tepkimesi.	21
Şekil 2.9. (3d) Bileşiğinin sentez tepkimesi.	22
Şekil 2.10. (7) Bileşiğinin sentez tepkimesi.	23
Şekil 2.11. (7a) Bileşiğinin sentez tepkimesi.	23
Şekil 2.12. (7b) Bileşiğinin sentez tepkimesi.	24

Şekil 2.13. (7c) Bileşiğinin sentez tepkimesi.	24
Şekil 2.14. DPP4 Enzimi aktivitesinin ölçüm prensibi.	25
Şekil 2.15. α -Amilaz enzimi aktivite ölçüm prensibi.	27
Şekil 2.16. α -Glukosidaz enzimi aktivite ölçüm prensibi.....	30
Şekil 3.1. 3-(2,5-dimetoksifenil)-5-(4-metoksifenil)-2-fenil-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol (3a) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.	36
Şekil 3.2. 3-(2,5-dimetoksifenil)-5-(4-metoksifenil)-2-fenil-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol (3a) Bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.	36
Şekil 3.3. 3-(2,5-dimetoksifenil)-5-(4-metoksifenil)-2-fenil-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol (3a) Bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.	37
Şekil 3.4. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (3b) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.....	39
Şekil 3.5. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (3b) Bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	40
Şekil 3.6. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (3b) Bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	41
Şekil 3.7. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karbotiyoamid (3c) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.....	42
Şekil 3.8. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karbotiyoamid (3c) Bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	43
Şekil 3.9. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karbotiyoamid (3c) Bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.	44
Şekil 3.10. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-N-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (3d) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.	45
Şekil 3.11. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-N-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (3d) Bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.	46

Şekil 3.12. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-N-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (3d) Bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	47
Şekil 3.13. (<i>E</i>)-3-(3-(3,5-dimetoksifenil)akril)-4-hidroksi-2 <i>H</i> -kumarin-2-on (7) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.....	49
Şekil 3.14. (<i>E</i>)-3-(3-(3,5-dimetoksifenil)akril)-4-hidroksi-2 <i>H</i> -kumarin-2-on (7) Bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	50
Şekil 3.15. (<i>E</i>)-3-(3-(3,5-dimetoksifenil)akril)-4-hidroksi-2 <i>H</i> -kumarin-2-on (7) Bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.	51
Şekil 3.16. 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-3-yl)-4-hidroksi-2 <i>H</i> -kumarin-2-on (7a) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.	52
Şekil 3.17. 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-3-yl)-4-hidroksi-2 <i>H</i> -kumarin-2-on (7a) Bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.	53
Şekil 3.18. 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-3-yl)-4-hidroksi-2 <i>H</i> -kumarin-2-on (7a) Bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.	54
Şekil 3.19. 5-(3,5-dimetoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2 <i>H</i> -kumarin-3-yl)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karbotiyo amid (7b) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.....	55
Şekil 3.20. 5-(3,5-dimetoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2 <i>H</i> -kumarin-3-yl)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karbotiyo amid (7b) Bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	56
Şekil 3.21. 5-(3,5-dimetoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2 <i>H</i> -kumarin-3-yl)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karbotiyo amid (7b) Bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.	57
Şekil 3.22. 5-(3,5-dimethoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2 <i>H</i> -kumarin-3-yl)-N-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (7c) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.	58
Şekil 3.23. 5-(3,5-dimethoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2 <i>H</i> -kumarin-3-yl)-N-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (7c) Bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu.	59
Şekil 3.24. 5-(3,5-dimethoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2 <i>H</i> -kumarin-3-yl)-N-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-karboksi amid (7c) Bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu.	60

Şekil 3.25. DPP4 enziminin bilinen inhibitörlerinden Sitagliptin ile %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafiği.	63
Şekil 3.26. α -Amilaz enziminin bilinen inhibitörlerinden Akarboz ile %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafiği.	63
Şekil 3.27. α -Glukosidaz enziminin bilinen inhibitörlerinden Kuersetin ile %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafiği.....	64
Şekil 3.28. DPP4 enzimi ile <i>a</i> : Bileşik 3a; <i>b</i> : Bileşik 3b; <i>c</i> : Bileşik 3c ve <i>d</i> : Bileşik 3d'nin %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.	66
Şekil 3.29. DPP4 enzimi ile <i>a</i> : Bileşik 7; <i>b</i> : Bileşik 7a; <i>c</i> : Bileşik 7b ve <i>d</i> : Bileşik 7c'nin %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.	66
Şekil 3.30. α -Amilaz enzimi ile <i>a</i> : Bileşik 3a; <i>b</i> : Bileşik 3b; <i>c</i> : Bileşik 3c ve <i>d</i> : Bileşik 3d'nin %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.	68
Şekil 3.31. α -Amilaz enzimi ile <i>a</i> : Bileşik 7; <i>b</i> : Bileşik 7a; <i>c</i> : Bileşik 7b ve <i>d</i> : Bileşik 7c'nin %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.	68
Şekil 3.32. α -Glukosidaz enzimi ile <i>a</i> : Bileşik 3a; <i>b</i> : Bileşik 3b; <i>c</i> : Bileşik 3c ve <i>d</i> : Bileşik 3d'nin %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.....	70
Şekil 3.33. α -Glukosidaz enzimi ile <i>a</i> : Bileşik 7; <i>b</i> : Bileşik 7a; <i>c</i> : Bileşik 7b ve <i>d</i> : Bileşik 7c'nin %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.	70
Şekil 3.34. BSA-(3a) sistemine ait UV-VİS absorpsiyon grafiği.....	71
Şekil 3.35. BSA-(3d) sistemine ait UV-VİS absorpsiyon grafiği.....	72
Şekil 3.36. BSA-(7) sistemine ait UV-VİS absorpsiyon grafiği.....	73
Şekil 3.37. BSA-(7a) sistemine ait UV-VİS absorpsiyon grafiği.....	74
Şekil 3.38. BSA-(3a) sistemine ait Benesi-Hildebrand grafiği.	75
Şekil 3.39. BSA-(3d) sistemine ait Benesi-Hildebrand grafiği.	76
Şekil 3.40. BSA-(7) sistemine ait Benesi-Hildebrand grafiği.	77

Şekil 3.41. BSA-(7a) sistemine ait Benesi-Hildebrand grafiği.	78
Şekil 3.42. Bileşiklere ait BOILED-Egg grafiği.	79
Şekil 3.43. DPP4 enziminin kristal yapısındaki ligandının moleküler yerleştirme sonucu etkileşimleri.	81
Şekil 3.44. DPP4 enziminin kristal yapısındaki ligandının pozu ile doklanmış pozun karşılaştırması.	82
Şekil 3.45. α -amilaz enziminin kristal yapısındaki ligandının moleküler yerleştirme sonucu etkileşimleri.	82
Şekil 3.46. α -amilaz enzimlerinin kristal yapısındaki ligandının pozu ile doklanmış pozun karşılaştırması.	83
Şekil 3.47. DPP4-(3b) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	84
Şekil 3.48. DPP4-(7a) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	84
Şekil 3.49. α -Amilaz-(3a) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	86
Şekil 3.50. α -Amilaz-(3c) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	87
Şekil 3.51. α -Amilaz-(3d) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	88
Şekil 3.52. α -Amilaz-(7a) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	89
Şekil 3.53. α -Amilaz-(7b) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	89
Şekil 3.54. α -Amilaz-(7c) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	90
Şekil 3.55. BSA-(3a) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	92
Şekil 3.56. BSA-(3d) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	93
Şekil 3.57. BSA-(7) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	94
Şekil 3.58. BSA-(7a) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.	95

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. DPP4 inhibisyon deney protokolü.	26
Tablo 2.2. α -Amilaz enzimi inhibisyon deney protokolü.....	29
Tablo 2.3 α -Glukosidaz Enzimi İnhibisyon Deney protokolü.....	31
Tablo 2.4. BSA bağlanma deneyi yöntem protokolü.	32
Tablo 3.1. Sentezlenen bileşiklerin kapalı formülleri, kodları, molekül ağırlıkları, % verimleri ve erime noktaları.	61
Tablo 3.2. Yeni sentezlenen bileşiklerin ve bilinen inhibitörlerin DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri üzerindeki inhibitör aktivitelerinin <i>in vitro</i> deneylerle hesaplanan sonuçları.	62
Tablo 3.3. Bileşik (3a), (3d), (7) ve (7a)'ya ait termodinamik parametreler.....	75
Tablo 3.4. Bileşiklerin ADME özellikleri.	80
Tablo 3.5. DPP4 enzimi ve bileşiklerin bağlanma enerjileri, bağlanma bölgesinde yer alan amino asit kalıntıları ve inhibisyon sabiti değerleri.	85
Tablo 3.6. α -Amilaz enzimi ve bileşiklerin bağlanma enerjileri, bağlanma bölgesinde yer alan amino asit kalıntıları ve inhibisyon sabiti değerleri.	91

1. GİRİŞ

Diyabet, insülin hormonunun salgılanmasında, etkisinde veya her ikisinde de bozukluk sonucu gelişen, kronik hiperglisemi ile seyreden metabolik bir hastalık grubudur. Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasını etkileyen bu durum, dünya genelinde hızla artan önemli bir halk sağlığı sorunudur [1-3].

Diyabet hastalığında kanda yüksek glukoz konsantrasyonu sonucu glukoz oto oksidasyona uğrar ve damar yapısının oksidatif hasarına yol açan serbest radikaller oluşurken antioksidan kapasite azalır. Uzun süreli diyabette göz ve böbrek gibi çeşitli organlarda işlev bozukluğu ve yetersizlik, sinir sistemi ve kalp ve damar sisteminde hasar görülür [4].

Antidiyabetik ilaçlar, kan şekeri kontrolünü sağlamak, insülin direncini azaltmak, pankreasın insülin salgılama kapasitesini desteklemek ve diyabete bağlı komplikasyonları önlemek amacıyla kullanılan farmakolojik ajanlardır. Tip 1 diyabette mutlak insülin eksikliği olduğu için insülin tedavisi zorunludur. Tip 2 diyabette ise tedavi basamakları yaşam tarzı değişiklikleri, oral antidiyabetik ilaçlar ve gerektiğinde insülin tedavisi şeklinde ilerler [5].

Antidiyabetik ilaç pazarı geniş bir paya sahip olup, daha az yan etkiye sahip güvenli ilaçlara duyulan gereksinim giderek artmaktadır. Mevcut ilaçların çeşitli yan etkileri, bağımlılık riski ve yüksek maliyetleri, araştırmacıları daha iyi farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahip yeni ilaçlar geliştirmeye yönlendirmektedir.

Literatürde, özellikle heterosiklik halka, amid bağı, kumarin halkası, metoksi sübstitüentleri ve benzen halkasının birlikte bulunduğu yapıların incelendiği benzer çalışmalarda, özellikle kumarin halkasında belirli amino grup sübstitüsyonları bulunan ve amid bağı içeren bileşiklerin belirgin olarak diyabet ile ilişkili enzimler üzerinde etkili inhibitör aktiviteye sahip olduğu vurgulanmaktadır [6-8].

Bu çalışmada antidiyabetik ilaç piyasasının büyüklüğü göz önüne alınarak tedaviye yönelik alternatif Dipeptidil Peptidaz-4 (DPP4), α -amilaz ve α -glukosidaz inhibitörü olma potansiyeli taşıyan yeni bileşikler araştırılmıştır. Mevcut biyolojik olarak aktif iskeletlerin türevlendirilmesi, rasyonel ilaç tasarımında en etkili stratejilerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda, DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz enzimlerinin potansiyel

inhibitörleri olarak bir dizi bileşik (3a, 3b, 3c, 3d, 7, 7a, 7b ve 7c) tasarlanmıştır. Daha önce sentezlenmemiş bu özgün bileşikler literatüre kazandırılmış; söz konusu enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri *in siliko* ve *in vitro* yöntemlerle aydınlatılmış, en iyi inhibisyon gösteren bileşiklerin BSA ile etkileşimleri incelenmiştir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Diyabet

Diyabet, insülin hormonunun eksikliği veya etkisizliği sonucu ortaya çıkan; kan şekerinin yükselmesi (hiperglisemi) ile ilişkili kronik bir hastalıktır [2, 3].

Sağlıklı bireylerde kan glukoz düzeyi, başlıca pankreasın β hücrelerinden salgılanan insülin ve α hücrelerinden salgılanan glukagon hormonları ile dengede tutulur. Karbonhidrat içeren bir öğünden sonra kan glukoz düzeyi yükselir; bu durum pankreastan insülin salınımını uyarır. İnsülin, hücre yüzeyindeki insülin reseptörlerine bağlanarak glukozun başta kas ve yağ hücreleri olmak üzere çeşitli dokulara taşınmasını ve glikojen, yağ asidi ile protein sentezini teşvik eder [9].

Öte yandan, kan glukoz düzeyi düştüğünde (örneğin açlıkta) pankreas α hücrelerinden glukagon salgılanır. Glukagon, karaciğerde glikojen yıkımını (glikojenoliz) ve yeni glukoz sentezini (glukoneogenez) uyararak kan glukoz düzeyini yükseltir. Böylece insülin ve glukagon, birbirine zıt fakat tamamlayıcı etkilerle glukoz homeostazını sağlar. Bu hassas denge bozulduğunda, glukoz düzeyleri uzun süreli olarak normal sınırların dışına çıkar ve diyabet tablosu ortaya çıkar [6].

Genel olarak Tip 1 ve Tip 2 diyabeti olarak sınıflandırılan diyabet hastalığında Tip 1, pankreastaki β hücrelerinin otoimmün yıkımı ile sonuçlanan mutlak insülin eksikliği olarak tanımlanmaktadır. Tip 1'de hayatın devamlılığı için insülin enjeksiyonu şarttır. Tip 2 diyabet ise insülin salgılanmasının azalması, kilo alımına bağlı olarak miktarının yetmemesi ve vücut dokularının salgılanan insüline yeterince yanıt verememesidir. İnsülin direnci olarak adlandırılan bu durumda glukoz hücreye giremediği için sürekli kan dolaşımında kalmaktadır [9]. Kontrolsüz ve uzun süreli diyabette, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozulmalar, glukozun non-enzimatik reaksiyonları ile proteinlere bağlanması sonucu göz,

böbrek, sinir sistemi ile kalp ve damar sisteminde hasarlar ve işlev bozukluğu görülür. Retinopati, nefropati ve nöropati gelişir ve kardiyovasküler hastalık riski artar [3, 10]. Tip 2 diyabette tedavi belirli bir sıra izleyerek ilerler, öncelikle tedavi olarak anti oksidan takviyeli uygun beslenme ve egzersiz programı verilir. Bunların yetersiz kalması durumunda oral ilaç tedavisi uygulanır ve bu uygulamada başarılı olunmazsa bir sonraki aşama son çare olan insülin enjeksiyonuna geçilir.

Tip 2 diyabet tedavisi için halen klinik kullanımda olan pek çok oral tedavi ajanı bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla insülin salgılatıcılar, mide-barsak sisteminden karbonhidrat emilimini geciktiriciler ve insüline duyarlılığı arttırıcılar olarak sınıflandırılabilir [9, 11].

İnsülin salgılatıcılar; sülfonilüre reseptörlerine bağlanarak pankreatik beta hücrelerinden insülin salgılanmasını arttırır. Piyasada var olan sülfonüre grubu ilaçlara; glibenklamid, glipizid, klorpropamid, tolbutamid ve glimepirid örnek olarak verilebilir. Kısa etki süresi ve yarılanma ömrü olan, yemekten önce alınarak insülinin etkisini taklit eden sülfonilüre benzeri ajanlar ise repaglinid ve nateglinid [12]. Bu ilaçlara ek olarak son yıllarda DPP4 inhibitörleri de katılmıştır.

Mide-barsak sisteminden karbonhidrat emilimini geciktiriciler; karbonhidrat sindiriminde yer alan enzimleri inhibe eden inhibitörlerdir. Bu gruba örnek olarak nişasta ve glikojenin sindiriminde rol oynayan α -amilaz inhibitörü akarboz ve miglitol ve α -glukosidaz inhibitörü kuersetin verilebilir [13, 14].

İnsüline duyarlılığı arttırıcılar: biguanid türevi ilaçlar, hepatik glukoneojenezi yavaşlatır. Dolayısı ile hepatik glukoz üretimini azaltarak insülin duyarlılığını artırır. Metformin bu gruba örnek olarak verilebilir. Metformin aynı zamanda kaslarda glukoz alımını da uyararak periferel insülin duyarlılığını çoğaltır. Bir diğer grup olan tiyazolidindion gurubu ilaçlar rosiglitazon ve pioglitazon içerirler. Bu maddeler glukoz alımında etkili olan proteinleri aktive ederek glukoz seviyesini düşürürler [6, 15].

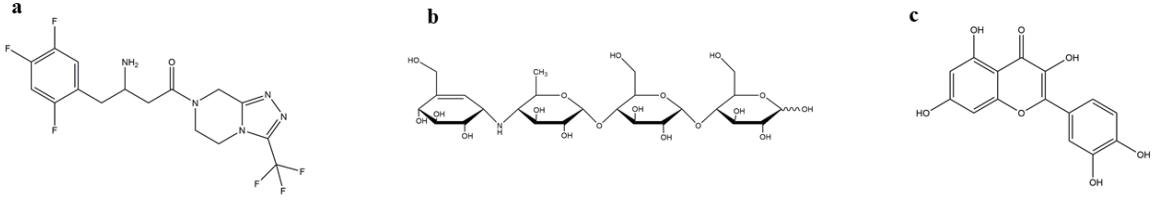
Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan ilaçların bazı yan tesirleri bulunmaktadır. Birinci grup insülin salgılatıcılar grubundan olan sülfonilüre grubu ilaçların istenmeyen en önemli yan etkileri; hipoglisemi, bulantı, kusma, asidoz ve uzun süre kullanımında ise vitamin B₁₂

eksikliğidir. İkinci ilaç grubu olan mide-barsak sisteminden karbonhidrat emilimini geciktirici; α -glukosidaz inhibitörleri ise açlık kan şekerini bariz bir şekilde indirme; son 2-3 aylık ortalama kan şekeri seviyenizi gösteren önemli bir test olan hemoglobin A1c (HbA1c) seviyesini düşürürler. Üçüncü grup olan insüline duyarlılığı artırıcılar grubundaki ilaçların en önemlisi metformin türevleridir. Halen tedavide kullanılan en etkili ilaç grubu olmasına rağmen hipoglisemi riskini arttırmakta ve kilo alımına sebep olmaktadır. Ayrıca en önemli yan etkisi ise kardiyovasküler sisteme zarar verebilmesidir.

Çalışmamızda sentezlediğimiz maddelerin diyabet tedavisinde yaygın olarak öne çıkan DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir.

1.1.2. Diyabette Etkin olan Enzimler

Oral farmakolojik tedaviler, başlıca insülin duyarlılaştırıcılar (metformin ve tiazolidindionlar), diyetle alınan karbonhidratların parçalanmasını inhibe eden ajanlar (α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörleri) ve insülin sekretagogları (sülfonilüreler ve glinidler) gibi grupları içermektedir. Son yıllarda, diyabet tedavi stratejilerinde önemli gelişmeler yaşanmış olup, glisemik kontrolü iyileştiren ve ek terapötik faydalar sağlayan yeni ilaç sınıfları ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında DPP4 inhibitörleri, glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistleri ve sodyum-glukoz kotransporter-2 inhibitörleri yer almaktadır. DPP4 inhibitörleri (sitagliptin) (**Şekil 1.1**), tip 2 diyabet tedavisinde alternatif bir seçenek sunmakta ve metformine eklenen makul bir ikinci basamak tedavi olarak değerlendirilmektedir. α -Amilaz inhibitörleri 1996 yılından beri diyabet tedavisinde kullanılmaktadır; α -amilazın inhibisyonu ile yemek sonrası glukoz yükselişinin kontrol altına alınması hedeflenmektedir. Bu, Tip 2 diyabet için yaygın bir strateji sağlamaktadır. α -Glukosidaz ise yemek sonrası glukoz düzeylerini yükselttiği için, bu enzimin inhibisyonu da Tip 2 diyabet tedavisinde etkili bir yaklaşım sunmaktadır. α -amilaz ve α -glukozidazın başlıca inhibitörleri olan akarboz, miglitol ve kuersetin (**Şekil 1.1**), klinik olarak bağırsaklarda basit karbonhidratların sindirilmesini ve emilmesini yavaşlatmak amacıyla önerilmektedir [16-18].



Şekil 1.1. a:DPP4 enziminin bilinen inhibitörlerinden sitagliptin; b: α -Amilaz enziminin bilinen inhibitörlerinden akarboz; c: α -Glukosidaz enziminin bilinen inhibitörlerinden kuesetin.

Çalışmamızda sentezlediğimiz maddelerin diyabet tedavisinde yaygın olarak öne çıkan DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir.

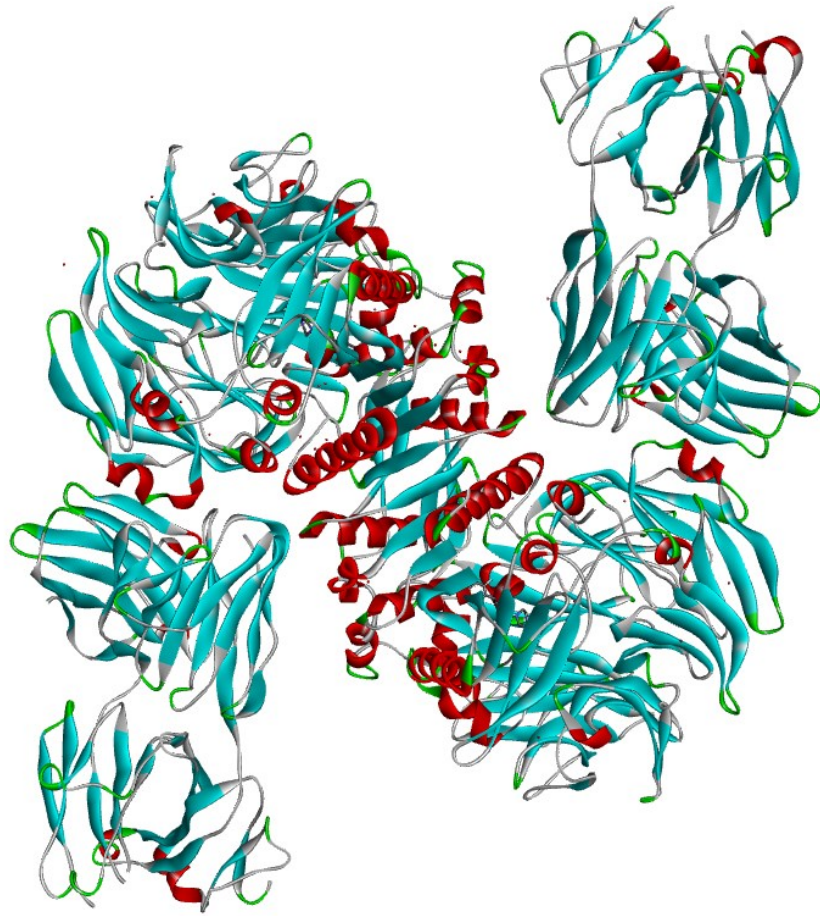
1.1.2.1. Dipeptidil Peptidaz-4 Enzimi

Bir serin ekzopeptidaz olan Dipeptidil Peptidaz-4 (DPP4, E.C. 3.4.14.5) (**Şekil 1.2**) gastrointestinal sistemde, diyetle alınan besinlere cevap olarak glukoz homeostazını korumak için salınan inkretin hormonlarını hedef alır [19, 20].

Belli başlı inkretin hormonları gastrik inhibe edici polipeptid (GIP) ve glukagon-benzeri peptid (GLP-1)'dir. Öğün esnasında, ince barsaktan, GLP-1 ve GIP inkretinleri kana salınırlar. Bu hormonlar, insülin salgılanmasını glukozla bağlı bir şekilde düzenlerler. GLP-1; insülin biyosentezinde, glukagonun inhibisyonunda ve pankreasın β -hücreleri adacıklarının rejenerasyonunda rol oynar [1, 21, 22]. DPP4 enzimi tarafından katalizlenen inaktivasyon reaksiyonuna bağlı olarak, GLP-1 ve GIP hormonlarının oldukça kısa yarı-ömürleri vardır. DPP4'ün inhibisyonu, hormonların inaktivasyonunu yavaşlatarak etkilerinin daha uzun süreli olmasını sağlar ve plazma glukoz seviyesini düşürür. Bu etkilerinden dolayı DPP4 inhibitörleri son yıllarda insüline duyarlılığı artırıcı ilaçlarla birlikte verilerek Tip 2 diyabet hastalığının tedavisinde kullanılmaktadırlar [20, 23].

Bir homodimer (zincir-A ve zincir-B) kristal yapıya sahip DPP4, 766 amino asitten oluşmaktadır. S1, S2, S1' ve S2' olarak toplamda 4 ana bağlanma bölgesine sahiptir. Burada S1 cebi Tyr631, Val656, Trp659, Tyr662, Tyr666, Val711, His740 amino asitlerini içermektedir. Bu bölge hidrofobik özellik gösterirken; S2 cebi Glu205, Glu206, Tyr662,

Tyr666 amino asitlerini içerir. Bu bölge ise oldukça asidik yapıdadır ve substratın N-terminalindeki pozitif yüklü gruplarla (örn. amin grubu) elektrostatik etkileşime girmektedir. DPP-4 inhibitörlerinden sitagliptin özellikle bu bölge ile hidrojen bağı kurmaktadır. S1' ve S2' yan cepleri ise Ser630 (katalitik), Asn710, His740 amino asitlerini içermektedir. Bu bölgeler substratın C-terminal kısmıyla etkileşir ve bağlanma gücünü artırmak için önemli yan ceplerdir. Moleküler yerleştirme çalışmaları genellikle S1 ve S2 cepleri üzerine yoğunlaşır, çünkü bu bölgeler hem doğal substrat bağlanmasını hem de küçük moleküllerin yüksek afinite ile tutunmasını sağlamaktadır [24, 25].



Şekil 1.2. DPP4 enzim (PDB kodu: 4FFW) kristal yapısı.

1.1.2.2. α -Amilaz Enzimi

Tükürük ve pankreastan salgılanan α -amilaz (E.C.3.2.1.1) (**Şekil 1.3**) nişastanın maltoz ve glukozaya parçalanmasında görev yapan bir enzimdir. pH 6-7 aralığında etkili olan amilaz,

nişastadaki α -1,4-glikozid bağlarını kırarak nişastanın ağızda ve gastrointestinal sistemde maltoz ve glukoz alt birimlerine parçalanmasını sağlamaktadır [26].

Tükürük amilazı nişastayı daha küçük parçalara ayırır fakat α -amilaz sadece α -1-4 bağlarında etkilidir. İşlem, ince bağırsakta devam eder; burada pankreatik amilaz dekstrinleri maltoza ve glukozu hidrolize eder. İnce bağırsakta devam eden sindirimde pankreatik α -amilaz nişasta veya glikojen zincirlerindeki α -(1-4) glikozidik bağları kırar ancak; doğrudan dallanma noktalarındaki α -(1-6) glikozidik bağları kıramaz. Bu enzimin inhibisyonu ile ince bağırsakta glukoz salınımı ve emilimi geciktirilmektedir. Bağırsakta gerçekleşen bu olayda enzimlerin inhibitörleri tarafından karbohidrat sindiriminin geciktirilmesi ile hiperglisemi düzeyi azaltılmaktadır. Yemek sonrası hiperglisemiye azaltmaları nedeniyle α -amilaz inhibitörleri diyabet tedavisinde oldukça önemli bir role sahiptir. Diyabet ve obezite gibi hastalıkların tedavisinde α -amilaz inhibitörleri -akarboz, miglitol ve vogliboz- glukoz emilimini önlemek amacıyla yaygın kullanılan ilaçlardır [18, 26, 27].



Şekil 1.3. α -Amilaz enzim (PDB kodu: 1B2Y) kristal yapısı.

Tipik olarak (β/α) katlanma motifine sahip amilazın aktif bölgesinde üç ana amino asit etkileşimde bulunmaktadır. Bunlar Asp197, Glu233 ve Asp300'dür. Bu amino asitler nişastanın α -1,4-glikozidik bağlarını kıran mekanizmada etkilidir: Asp197 nükleofilik

saldırını başlatır, Glu233 proton vericisi rolündedir ve Asp300 geçiş durumunu kontrol eder [13, 28]. Moleküler yerleştirme çalışmalarında etkileşimde olduğu bilinen diğer aktif bölge amino asitleri ise His201, His299, Tyr62, Trp59, Trp58 (aromatik yüzeyler ile substrat ve inhibitörlerin halkalarıyla π - π etkileşim kurar), Asp356 ve His305 (hidrojen bağı ve polar etkileşimler) olarak verilmektedir. Bilinen inhibitörlerden akarboz aktif bölgeyi kısmen ya da tamamen kaplayarak su molekülünün girişini engeller. Flavonoidler genellikle Trp59, Tyr62 gibi aromatik kalıntıları ile yığın-yığın (stacking) etkileşimler kurar ve Asp197/Glu233 ile hidrojen bağı yapar. Metoksi ve hidroksi grupları ise aktif bölgedeki polar amino asitlerle H-bağı kurarak bağlanma enerjisine etki eder [28-31].

1.1.2.3. α -Glukosidaz Enzimi

Glukozil hidrolaz familyasına dahil olan α -glukosidaz enzimi (E.C.3.2.1.20) (Şekil 1.4) kompleks karbonhidratların yapı taşlarına parçalanmasından sorumlu enzimdir [32].

Polisakkaritlerin (nişasta, glikojen) ve disakkaritlerin (maltoz) yapısında bulunan α -1,4-glikozidik bağlarının hidrolizinde görev alarak serbest glukoz monomerlerini açığa çıkarır. Böylelikle hücrel enerji üretiminde (ATP sentezi) glukozun kullanılabilir hale gelmesine yardımcı olarak enerji metabolizmasında kritik bir rol oynar.

Hem biyokimyasal hem de klinik açıdan büyük öneme sahip olan α -glukosidaz enzimi Tip 2 diyabet tedavisinde etkilidir; α -glukosidaz inhibitörleri (kuersetin, akarboz, miglitol), karbonhidratların sindirimi ve emilimini yavaşlatarak, kan şekerinin daha yavaş yükselmesini sağlar. α -Glukosidazın inhibisyonu ile ince bağırsaktaki çalışma mekanizmasını tersine çevirerek monosakkarit oluşumunu önlemektedir. Böylece monosakkaritlerin kana geçişi geciktirilmiş olur ve kandaki glukoz düzeyleri azalır. Bu tür ilaçlar, özellikle yemeklerden sonra kan şekerini düzenleyerek diyabetin yönetiminde yaygın olarak kullanılır. Laboratuvar araştırmaları için maya, bakteri veya diğer organizmalardan izole edilebilir. α -Glukosidaz hayvanlarda karaciğer, ince bağırsak ve kas dokusunda bulunur [33-35].

Asp404, Asp518, Asp616, His674, Arg600, Trp406, Phe601, Tyr605, Ile441, Thr443, Val446 ve Ser676 amino asit kalıntıları α -glukosidaz enziminde aktif bölgeyi temsil

etmektedir. İnsan α -glukosidazın yüksek çözünürlüklü PDB yapısı sınırlı olması nedeni ile moleküler yerleştirme çalışmalarında genellikle *Saccharomyces cerevisiae* α -glukosidase (örn. PDB: 3A4A) tercih edilmektedir [17, 30].



Şekil 1.4. α -Glukosidaz enzim (PDB kodu:3A4A) kristal yapısı.

1.1.3. İlaç taşıma sisteminde albümin

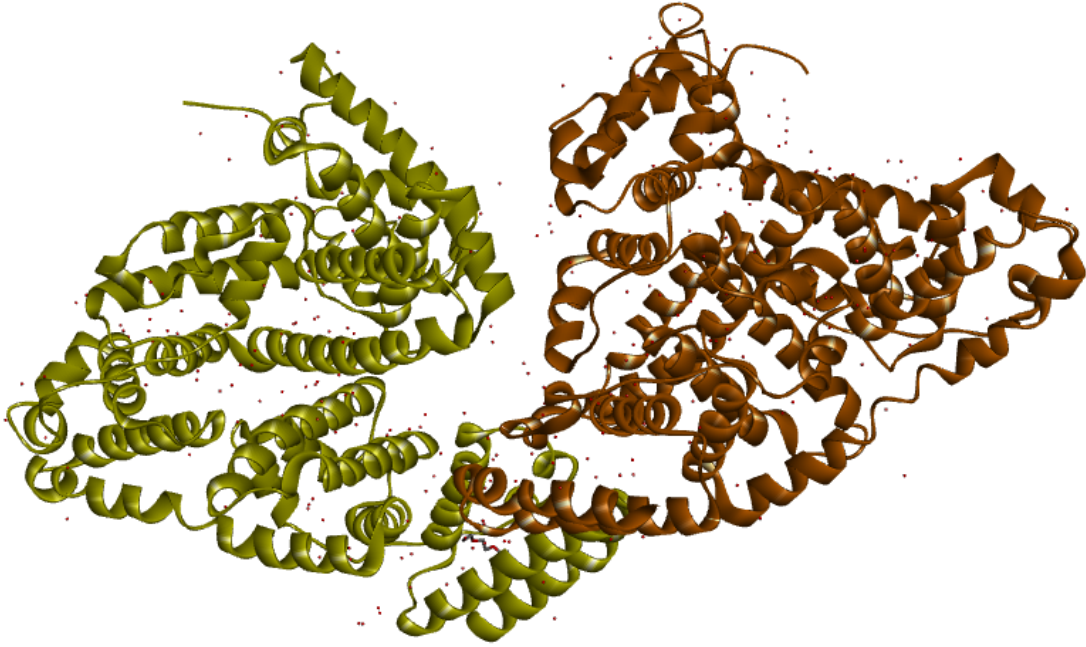
Kan plazmasında yoğun olarak bulunan proteinlerden serum albumin, ozmotik basıncın ve kan pH'nın ayarlanması gibi önemli fizyolojik görevlerinin yanı sıra; kanda bulunan yağ asitleri, ilaçlar ve metabolitler vb. maddelerin taşınmasında da görevli olan önemli bir proteindir [36, 37].

İlaçlar hedeflerine ulaşmak için kan plazmasında serum albümin ile etkileşime girerek taşınmaktadır. Bu etkileşimlerin incelenmesi ilaç kimyasında, tıpta, biyoteknolojide ve biyokimyada önemli bilgiler sağlamaktadır [38, 39]. Serum albümin ilaçlar, hormonlar, yağ

asitleri ve diğerk moleküller için yüksek bir bağlanma kapasitesine sahiptir. Ayrıca hidrofobik bağlanma bölgeleri ile hidrofobik ilaç moleküllerini bağlayarak taşınmalarını kolaylaştırır. Böylece ilaçlar, hedef dokulara etkili bir şekilde taşınabilir ve vücuttaki dolaşımını sürdürebilirler. Serum albüminine bağlanan ilaçlar, genellikle inaktif formdadır. Ancak, ilaçlar serbest kaldığında aktif olarak etki gösterebilirler. İlaç-albümin etkileşimlerinde albümin, bir depo görevi görerek ilaçları hedef dokuya taşıyarak kontrollü olarak serbest bırakılmasını sağlar. Özellikle klinik açıdan dozaj ayarlanmasında serum albümin etkileşimleri önem taşımaktadır. Buna bağlı olarak da ilaç taşıma çalışmalarından yararlanılarak hedefe yönelik tedaviler geliştirilebilir [36].

Sığır serum albümin (BSA) (Şekil 1.5), 582 amino asit kalıntısından oluşan ve insan serum albümini ile yüksek benzerliği olan bir proteindir. Düşük maliyetli olmasından dolayı yaygın olarak bulunabilmesi BSA'yı araştırmacılar tarafından ligandların proteine bağlanma çalışmalarında tercih edilen bir model haline getirmiştir [36, 37]. Absorbsiyon spektroskopisi, basitliği nedeniyle protein-ligand etkileşimini incelemeye en uygun yöntemlerden biridir. Lambert-Beer yasasına dayanan bu yöntem, polipeptid ortamındaki en küçük değişikliklere (ligandın bağlanması, yapısal veya atomların oksidasyon durumundaki değişiklikler) çok duyarlıdır.

BSA, hem yüksek bağlanma kapasitesine hem de farklı tip ligandlara uyum sağlayabilecek çok sayıda bağlanma cebine sahiptir. IB, IIA ve IIIA olmak üzere BSA'nın üç ayrı bağlanma bölgesi vardır. İlaçlar genellikle IIA ve IIIA bölgeleri ile etkileşimdedir. IIA bölgesinde daha çok hidrofobik aromatik ligandlar ve bazı ilaçlar (warfarin, fenilbutazon vb.) etkileşimde olduğu bilinmektedir [40]. Bu bölgedeki önemli amino asitler: Trp213, Leu219, Phe223, Leu238, His242, Arg256 ve Tyr150 olarak verilmektedir. Etkileşimlerde hem hidrofobik etkileşimler hem de hidrojen bağları rol oynamaktadır. Subdomain IIIA ise Ibuprofen bağlanma bölgesi olarak bilinmektedir. Daha çok küçük, aromatik ve hidrofobik moleküller buraya bağlanmaktadır. Bölgede etkileşimde bulunan önemli amino asitler Tyr411, Lys414, Val432, Leu453 ve Ser489 olarak verilmektedir [38, 40-42].



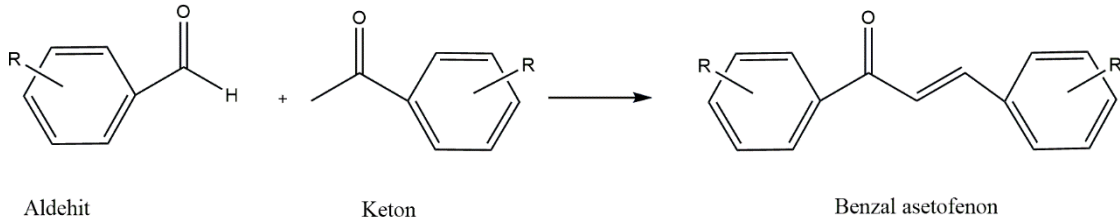
Şekil 1.5. BSA proteini (PDB kodu: 4F5S) kristal yapısı.

1.1.4. Hedef Bileşiklerin Sentez Stratejisi

Çeşitli metabolik bozuklukların tedavisinde etkinliği kanıtlanmış heteroatomlu bileşikler; antidepresan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antikanser, antianksiyete, antiobezite, antikoagülan ve analjezik gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteleri sayesinde ilaç kimyası alanında önemli bir yer tutmaktadır. Heteroatom içeren halkalı yapılar, oksijen, azot veya kükürt gibi atomların varlığı sayesinde biyolojik hedeflerle yüksek afinite ile etkileşime girebilir. Bu nedenle, yapısal çeşitlilikleri ve fonksiyonel gruplar açısından zengin olmaları onları modern ilaç geliştirme çalışmalarında kilit konuma getirmektedir [43-46].

Bu bağlamda, kalkonlar heterohalkalı bileşiklerin sentezinde önemli öncül yapılardır. Kimyasal formülü $C_6H_5C(O)CH=CHC_6H_5$ olan kalkon, genellikle *E* ve *Z* izomerlerinin karışımı hâlinde bulunur; *E* izomeri daha kararlı ve baskın formdur. Konjuge sistemleri ve elektrofilik özellikleri sayesinde kalkonlar, çeşitli organik dönüşümlerde değerli ara maddeler olarak görev yapar [47, 48]. Aromatik bir keton türevidir ve aromatik bir aldehit türevinin baz veya asit katalizi altında kondenzasyonu ile sentezlenirler. Bu yüksek kemoselektif reaksiyon, aldol kondenzasyonunun özel bir türü olan Claisen–Schmidt kondenzasyonu (Şekil 1.6) olarak bilinir [49]. Mekanizma, bazın ketonun α -hidrojenini

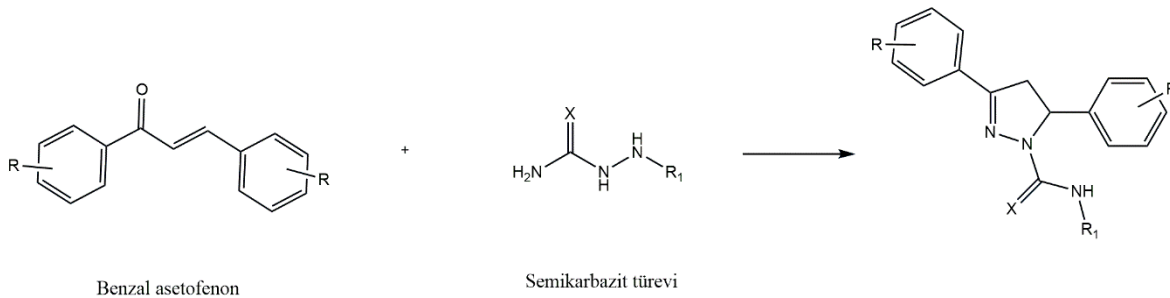
çekmesiyle oluşan rezonansla stabilize enolat iyonunun, aldehitin elektrofilik karbonil karbonuna nükleofilik saldırısı ile başlar. Ardından β -hidroksi keton ara ürünü oluşur ve baz etkisiyle gerçekleşen dehidrasyon sonucunda α,β -doymamış keton yapısındaki kalkon elde edilir [50, 51].



Şekil 1.6. Claisen-Schmidt Kondenzasyonu ile kalkon iskeletine sahip bileşiklerin reaksiyon mekanizması.

Bu geniş biyolojik etkinlik yelpazesi içerisinde, özellikle yapısında pirazol halkası (**Şekil 1.7**) barındıran bileşikler hem kimyasal özellikleri hem de farmakolojik potansiyelleri ile dikkat çekmektedir. İki azot atomu ve doymamış bir bağ içeren pirazol halkası, bazik ve asidik NH grupları sayesinde çok sayıda hidrojen bağı oluşturabilir ve güçlü bir donör işlevi görür. Bu özellikleri, pirazol türevlerini ilaç keşfi ve tasarımında değerli kılmaktadır [46].

Sentez kolaylığı, yapısal modifikasyona elverişliliği, düşük molekül ağırlığı ve geniş biyolojik aktivite potansiyeli nedeniyle kalkonlar ve pirazol gibi heterohalkalı bileşikler, yeni farmasötik adayların geliştirilmesinde vazgeçilmez yapı taşlarıdır [43, 44, 50, 52-55].



Şekil 1.7. Kalkon iskeletine sahip yapıların nükleofilik katılma ile halka kapanması reaksiyon mekanizması (X:O, S).

1.1.5. ADME

Uzun bir süreci kapsayan ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında çok sayıda yeni ve farklı molekül tasarlanarak Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Atılım (ADME) özellikleri incelenir. Bu yeni yapıların; farmakokinetik ve fizikokimyasal parametrelerinden yola

çıkarak ilaç-benzerlik testi olarak bilinen Lipinski'nin Beşli kuralına uymaları ve düşük toksisite ile birlikte yüksek biyolojik aktivite göstermeleri istenir [56, 57].

Bu özelliklerden fizikokimyasal özellikler Molekül ağırlığı (M.A., g/mol), Doygunluk (Fraction Csp3) molekülün toplam karbon sayısına göre sp hibritleşmiş karbonların oranı, Döndürülebilir bağlar, Hidrojen bağı alıcısı ve vericisi, Topolojik Polar Yüzey Alanı (TPSA(Å²)), n-Oktanol ve su (logPO/W) arasındaki dağılım katsayısı olarak tanımlanan Lipofiliklik ölçüsüdür (Log P) ve bunların yanı sıra Gastrointestinal emilim (GIA), Kan-beyin bariyeri (BBB) geçirgenliğidir. Bu grafiksel bir gösterim (BOILED-Egg) olarak sunulmaktadır. İki fizikokimyasal tanımlayıcı olan ADME parametresi ile -TPSA/LogP-'ye ait grafiğin istatistiksel sonucu olarak verilmektedir. BOILED-Egg grafiğinde sarı alan BBB geçirgenliği, beyaz alan ise GIA emilimini temsil etmektedir [56, 58, 59].

1.1.6. Moleküler yerleştirme

Bilgisayar destekli çalışmalarda moleküler yerleştirme, ilaç adayı olabilecek bir öncü bileşiğin ve biyolojik hedefi olan makromolekül arasındaki etkileşim gücünü yüksek verimli tarama yaparak hesaplamaktadır [57, 60, 61]. Moleküler yerleştirme, bir bileşiğin hedef makromoleküle non-kovalent etkileşimle kararlı bir kompleks oluşturmasını ve buna göre tercih ettikleri konformasyonunu, bu kompleksin oluşumuna etki eden amino asit kalıntılarını ve bağlanma ilgilerini tahmin ederek, enzim-ligand ilişkisini incelemek için kullanılan bir simülasyondur [62, 63].

Hesaplamalı kimya ve modelleme çalışmalarının laboratuvar deneyleri ile aktif halde birlikte yürütülmesi ve *in vitro* ve *in siliko* çalışmaların birbirini desteklemesi ilaç geliştirme çalışmalarında hedeflenen sonuçlara ulaşmak için büyük önem taşımaktadır.

En çok tercih edilen moleküler yerleştirme programlarından biri olan Autodock Vina enzim-ligand kompleksinin uygun konformasyonlarının Gibbs serbest bağlanma enerjilerini (kcal/mol) hesaplar [30, 63]. Bağlanma enerjisi (ΔG)'nin (+) olması söz konusu bağlanmanın kompleks oluşumunu desteklemediğini ve (-) değerinde olması ise bu kompleksin oluşumunu desteklediğini diğer bir ifade ile tepkimenin ürünler lehine olduğunu böylece yapıların kompleks halinde kararlı olduğunun bilgisini vermektedir.

Moleküler yerleştirme çalışmaları aşağıdaki sırayı takip eder:

- Protein (enzim) dosyalarının hazırlanması
- Ligand dosyalarının hazırlanması
- Konfigürasyon dosyalarının hazırlanması
- Moleküler yerleştirme işleminin doğrulanması (RMSD)
- Discovery Studio ile sonuçlarının ve etkileşimlerinin görüntülenmesi



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Deneylerde kullanılan kimyasallar

İnhibisyon deneylerinde kullanılan α -Amilaz (hog amylase, 23.3 U/mg), α -Glukosidaz (Cat No. 5003-1KU Type I; *Saccharomyces cerevisiae* kaynaklı), akarboz, kuarsetin, 3,5'-dinitro salisilik asit (DNS), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum klorür (NaCl), fosfat (PBS) tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan sodyum potasyum tartarat, sentezlerde kullanılan reaktifler (4'-metoksi asetofenon, 2,5'-dimetoksi benzaldehit, 3,5'-dimetoksi benzaldehit, 4'-hidroksi kumarin, fenil hidrazin, semikarbazit, tiyo semikarbazit, 4'-fenil semikarbazit) ve etanol (EtOH), metanol (MetOH), dimetil sülfoksit (DMSO), asetik asit, hidroklorik asit (HCl), fosforil klorür (POCl₃), piperidin, dietil eter vb. çözücüler; analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) veya Merck (Darmstadt, Germany) firmalarından temin edilmiştir. Ayrıca DPP4 enziminin inhibisyonu için çalışmalarda Abcam (ON, Canada) DPP4 inhibitor screening Kit (ab133081) kullanılmıştır.

2.2. Deneylerde kullanılan cihazlar ve bilgisayar programları

Bu tez kapsamında bileşiklerin sentezinde ve *in vitro* çalışmalarda aşağıdaki cihazlardan gerektiği yerlerde yararlanılmıştır.

- Hassas Terazî (AND, $\pm 0,0001$)
- Destile Su Cihazı (Millipore, MilliQ)
- Etüv (Genlab, Midi/2/AL (0-100))
- Manyetik Karıştırıcı (Chiltren, Isıtıcı HS 31)
- Otomatik Pipetler (Rainin)
- Erime noktası (Electrothermal 9200)
- Vorteks Cihazı (Fisons, Whirlimixer)
- pH Metre (ToledoMettler)
- Buzdolabı (Siemens KD40NA04NE,A+)

- -80 °C Derin Dondurucu (Thermo Electron Corp., Forma ULT)
- UV-VİS spektrofotometre cihazı (Helios Zeta)
- Epoch UV plaka okuyucu (Biotek)
- Floresans Mikroplaka okuyucu (FLX800™)

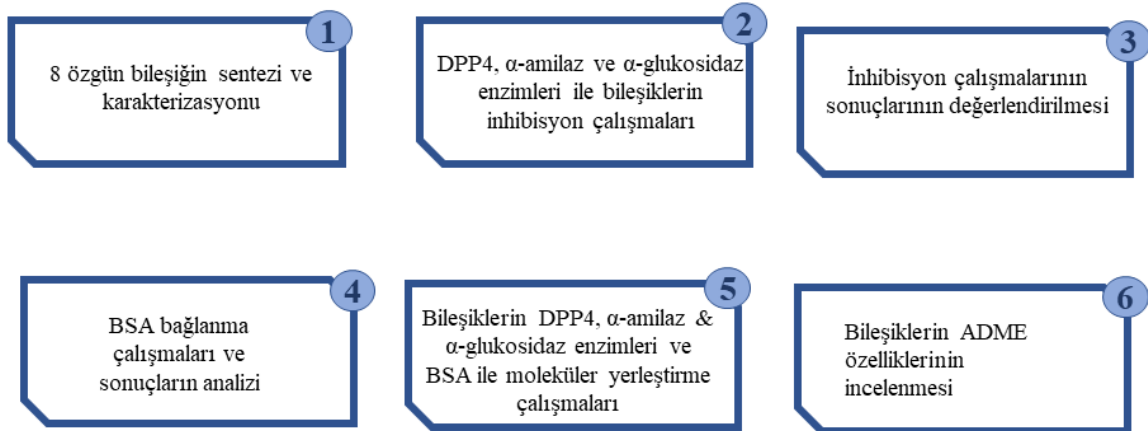
Sentezlenen tüm bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında yararlanılan kütle analizi T.C. Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, FTIR spektrumları, ¹H ve ¹³C-NMR spektrumları ise Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nde aldırılmıştır. Cihazların özellikleri aşağıda verilmiştir:

- QTOF dört kutuplu uçuş süreli kütle spektrometresi, (6530B LC Q-TOF)
- FTIR Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Shimadzu 8400 FTIR Spectrometer)
- Proton nükleer manyetik rezonans (¹H-NMR) ve Karbon nükleer manyetik rezonans (¹³C-NMR) (Bruker Avance (400 MHz))

Ayrıca hesapsal çalışmalarda kullanılan bilgisayar programları ise Auto Dock Tools1.5.6, Discovery 2021 Client, Spartan '14 V1.1.4, MestReNova, Notepad++ ve ChemDraw, ve *in vitro* çalışmalarda ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde OriginPro8.5, GraphPad Prism-9, Gen5 veri analiz yazılımı ve SpectraGryph 1.2'den yararlanılmıştır.

2.3. Deneysel Yöntemler

Deneysel çalışmalar **Şekil 2.1**'de gösterilen aşamalardan oluşmaktadır.

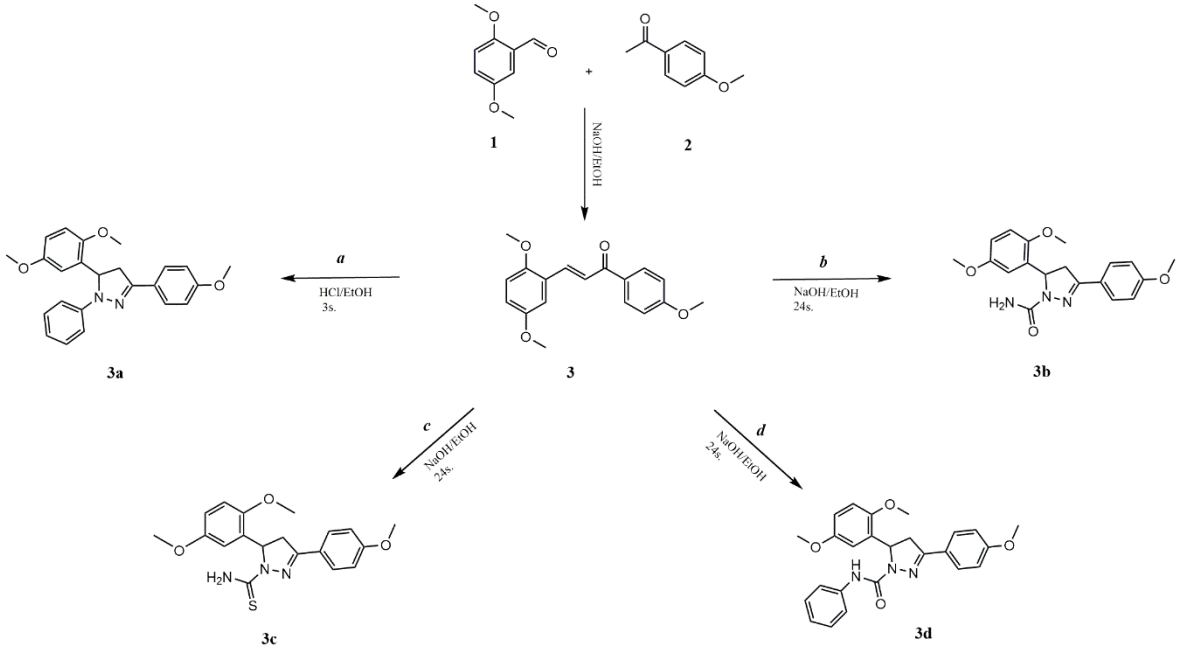


Şekil 2.1. Tez çalışması akış şeması.

2.3.1. Hedef bileşiklerin sentez yöntemleri

Tasarlanan yapılar Grup-A ve Grup-B olarak ikiye ayrılmıştır; Grup-A benzen halkası ve heterosiklik bir halka içermektedir. Grup-B ise hem benzen halkası ve heterosiklik bir yapı hem de kumarin halkası içermektedir.

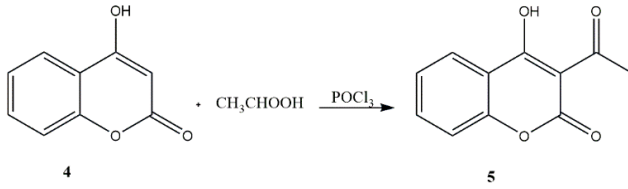
Grup-A'nın sentezi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada; Claisen-Schmidt kondenzasyon tepkimesine göre stokiyometrik oranlarda alınan aril keton ve aromatik aldehitin bazik ve soğuk ortamda karıştırılması ile literatüre uygun şekilde bileşik (3) sentezlenmiştir [47, 54]. İkinci aşamada α,β -doymamış keton yapısı içeren 3 numaralı bileşik, fenilhidrazinin, semikarbazit, tiyosemikarbazit ve 4-fenil semikarbazitin siklik kondenzasyonu sonucunda 5'li heterohalkalı yapıya sahip 3a, 3b, 3c ve 3d bileşikleri sentezlenmiştir (Şekil 2.2). İzlenen yöntemde, reaktifler ile 3 numaralı bileşik bir reaksiyon balonunda bazik ortamda uygun çözücü ilave edilerek manyetik karıştırıcıda geri soğutucu sistemde ısıtılmıştır. Yeni ürünün varlığı ince tabaka kromatografisi (TLC) ile belirli aralıklarla kontrol edilir. Çöken madde süzülerek alınmış, vakum desikatöründe kurutulduktan sonra saflaştırma işlemi için literatüre uygun şekilde önce genel çözücüler ile (EtOH, MeOH vb.) yıkanmış ve kristallendirme işlemi yapılmıştır [43, 44, 52, 55, 64].



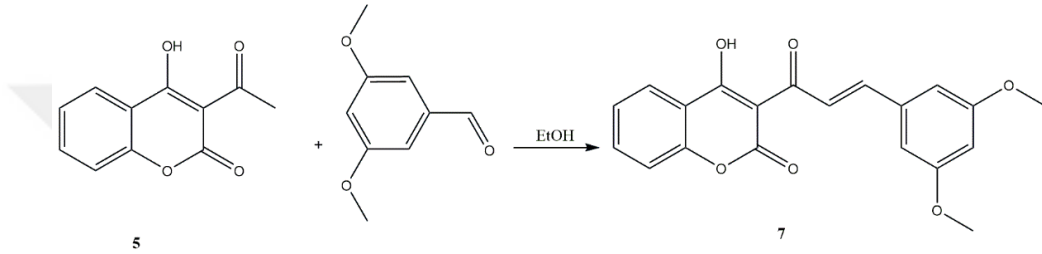
Şekil 2.2. Sentezlenen birinci grup bileşikler (Grup-A).

Grup-B'nin sentez çalışmaları üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada 4-hidroksi kumarinin (4) POCl₃ varlığında ikili bağa katılma tepkimesi sonucu keton yapısı içeren 3-asetil-4-hidroksi kumarin (5) bileşiği elde edilmiş olup [65]; ikinci aşamada bu keton türevi ve 3,5'-dimetoksi benzaldehitin (6) pirimidinli ortamında tepkimesi ile kalkon iskeleti içeren özgün 7 bileşiği sentezlenmiştir (Şekil 2.3). Üçüncü aşamada ise bu özgün yapının (7) fenilhidrazinin, tiyo semikarbazit ve 4-fenil semikarbazit ile siklik kondenzasyonu sonucunda 5'li halkaya sahip 7a, 7b ve 7c yapıları sentezlenmiştir (Şekil 2.4). İşlem için, reaktifler ile kalkon türevi bir reaksiyon balonunda bazik ortamda EtOH ilave edilerek manyetik karıştırıcıda geri soğutucu sistemde ısıtılmıştır. Yeni ürünün saflığı ve varlığı ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ortamdan belirli aralıklarla alınan örneklerle kontrol edilmiştir. Tepkime sonrasında ortama soğuk su eklenerek katı maddenin çökmesi sağlanmış ve çöken katı süzöldükten sonra safsızlıkların giderilmesi için EtOH/MetOH ile kristallendirilip kurutulmuştur [7, 8, 66].

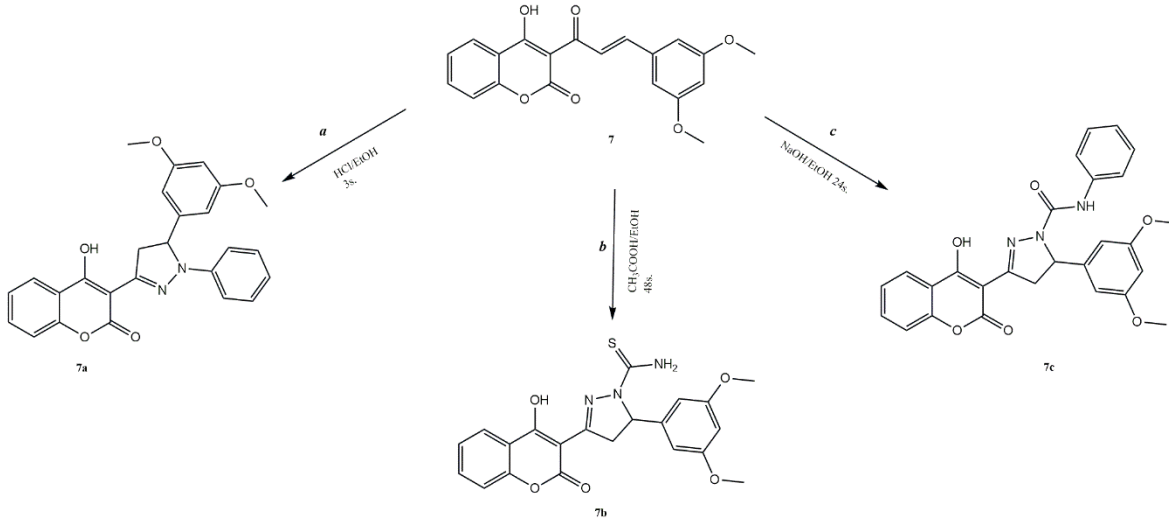
1. Basamak



2. Basamak



Şekil 2.3. (7) bileşiğinin iki basamakta gerçekleşen sentez tepkimesi.

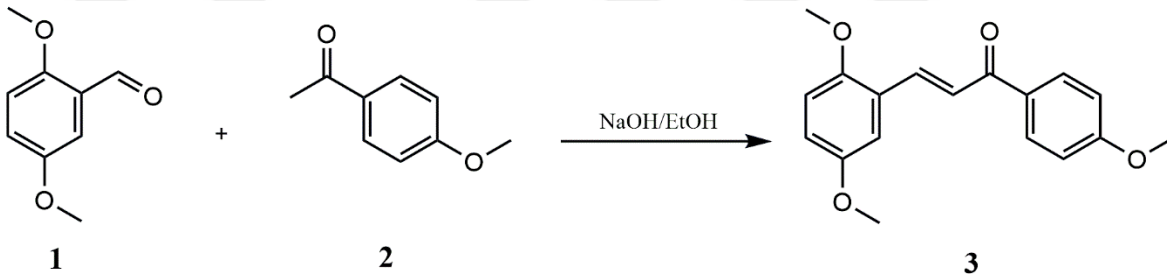


Şekil 2.4. Tez kapsamında sentezlenen ikinci grup bileşikler (Grup-B).

Sentez çalışmaları sonucunda elde edilen bileşiklerin yapılarının aydınlatılması için FTIR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve QTOF karakterizasyon yöntemlerinden yararlanılmıştır. Bunlar için yapıların karakteristik pikleri incelenmiş ve literatürdeki benzer yapılarla kıyaslanmıştır. Ayrıca bileşiklerin QTOF analiz sonuçlarına göre bileşiğe ait kapalı formül, molekül ağırlığı ve yüzde verim hesabı yapılmış, ayırt edici bir diğer fiziksel özellik olan erime noktası tayin edilmiş ve IUPAC adlandırma sistemine göre adlandırılmıştır [7, 8, 43, 44, 52, 55, 64-66].

2.3.1.1. (3) Bileşiğinin sentezi

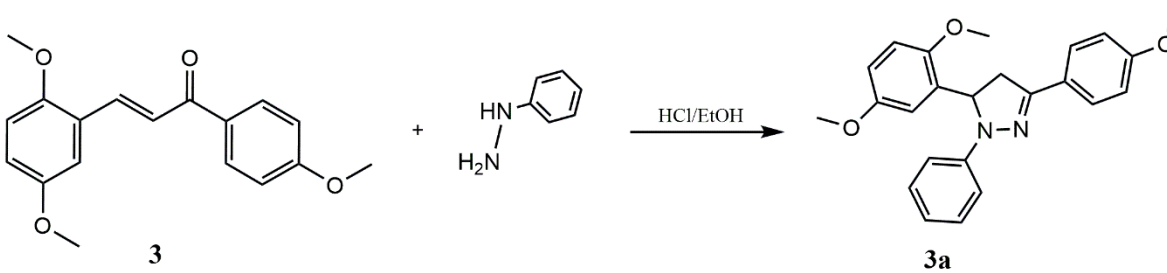
(E)-3-(2,5-dimetoksifenil)-1-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-one (3) bileşiği Bai ve arkadaşlarının yöntemine göre sentezlenmiştir [47]. Buna göre 4'-metoksi asetofenon (1) (0.55g, 3.67 mmol) ve 2,5'-dimetoksi benzaldehit (2) (0.6g, 3.64 mmol) etanolik sodyum çözeltisinde (0.15 g, 3.75 mmol) çözülerek 24 saat süreyle oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Tepkime sonunda HCl ile tepkime ortamı pH 7'ye ayarlanarak tekrar oda sıcaklığında 24 saat süreyle karışmaya bırakılmıştır. Süre sonunda çöken (3) bileşiği süzülerek toplanmış ve soğuk suyla yıkanmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. (3) Bileşiğinin sentez tepkimesi.

2.3.1.2. (3a) Bileşiğinin sentezi

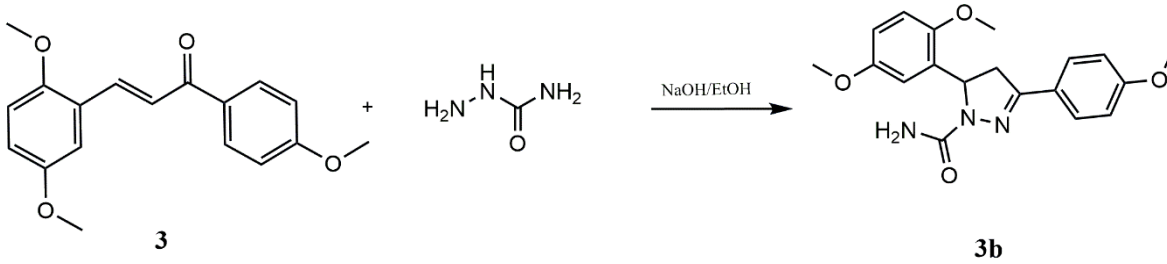
(3) (0.3 g, 1 mmol) ve fenilhidrazin (0.3 g, 2.08 mmol) etil alkolde çözülerek 5 saat süreyle geri soğutucu sistemde ısıtılarak karışmaya bırakılmıştır. Reaksiyonun tamamlandığını kontrol etmek için belirli aralıklarla TLC yapılmıştır. Bu süre sonunda tepkime ortamına buz atılarak çöktürme sağlanmış olup; 20 °C'de 24 saat karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı (3a) süzülerek toplanıp safsızlıkların giderilmesi için etil alkolde kristallendirilmiştir (Şekil 2.6) [43, 44, 52, 55, 64].



Şekil 2.6. (3a) Bileşiğinin sentez tepkimesi.

2.3.1.3. (3b) Bileşiğinin sentezi

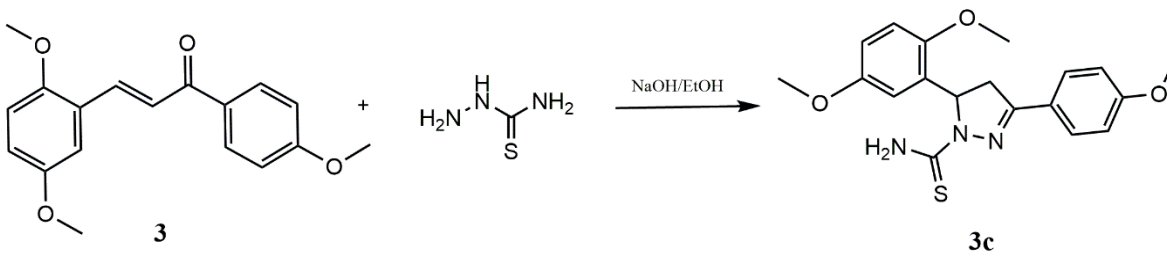
(3) (0.3 g, 1 mmol) ve semikarbazit (0.11 g, 1 mmol) etil alkol NaOH (0.04 g, 1.54 mmol) karışımında çözülerek 24 saat süreyle geri soğutucu sistemde ısıtılarak karışmaya bırakılmıştır. Reaksiyonun tamamlandığını kontrol etmek için belirli aralıklarla TLC yapılmıştır. Bu sürenin sonunda ortama buz atılarak oda sıcaklığında 24 saat karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı (3b) süzülerek toplanmış ve safsızlıkların giderilmesi için etil alkolle kristallendirilmiştir (Şekil 2.7) [43, 44, 52, 55, 64].



Şekil 2.7. (3b) Bileşiğinin sentez tepkimesi.

2.3.1.4. (3c) Bileşiğinin sentezi

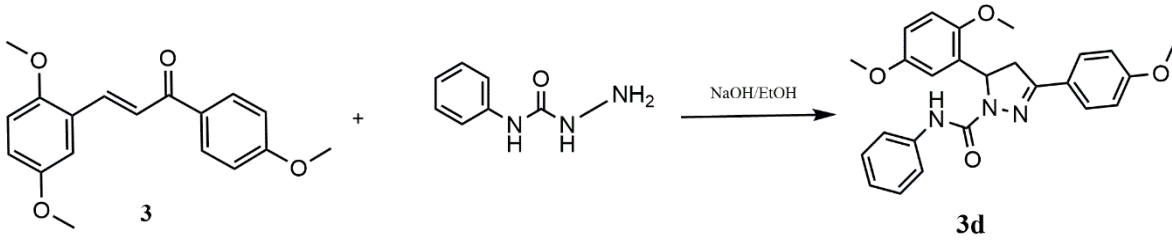
(3) (0.3 g, 1 mmol) ve tiyo semikarbazit (0.3 g, 2.08 mmol) etil alkol NaOH (0.04 g, 1.54 mmol) karışımında çözülerek geri soğutucu sistemde 24 saat süre ısıtılarak karışmaya bırakılmıştır. Yeni ürünün saflığı ve varlığı reaksiyon ortamından belirli aralıklarla alınan örnekler ile TLC yöntemi uygulanarak kontrol edilmiş olup bu süre sonunda çöktürme için ortama buz atılarak 20°C'de 24 saat ile karışmaya bırakılmıştır. Çöken madde (3c) süzülerek toplanmış ve safsızlıkların giderilmesi için etil alkolde kristallendirilmiştir (Şekil 2.8) [43, 44, 52, 55, 64].



Şekil 2.8. (3c) Bileşiğinin sentez tepkimesi.

2.3.1.5. (3d) Bileşiminin sentezi

(3) (0.3 g, 1 mmol) ve 4'-fenil semikarbazit (0.15 g, 1 mmol) etil alkol NaOH (0.04 g, 1.54 mmol) karışımında çözülerek geri soğutucu sistemde 24 saat ile ısıtılarak karışmaya bırakılmıştır. Yeni ürünün saflığı ve varlığı reaksiyon ortamından belirli aralıklarla alınan örnekler ile TLC yöntemi uygulanarak kontrol edilmiş olup bu süre sonunda çöktürme için ortama buz atılarak 20°C'de 24 saat ile karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı madde (3d) süzülerek toplanmış ve safsızlıkların giderilmesi için etil alkolde kristallendirilmiştir (Şekil 2.9) [43, 44, 52, 55, 64].

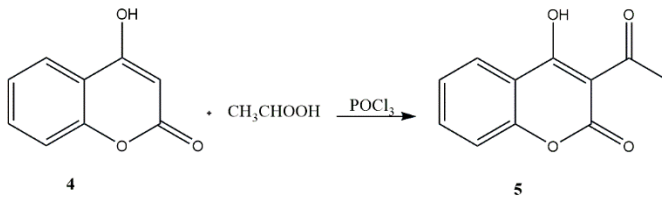


Şekil 2.9. (3d) Bileşiminin sentez tepkimesi.

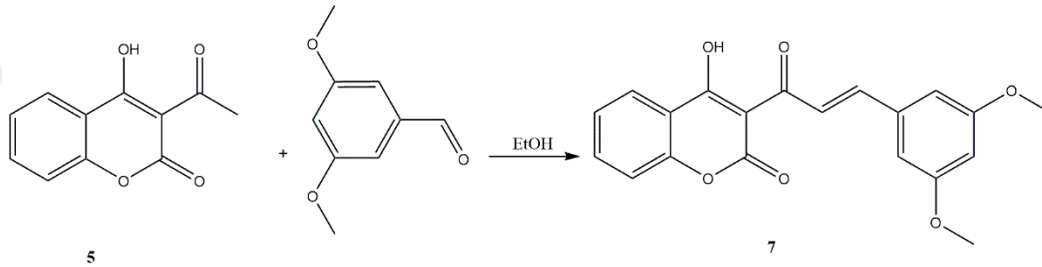
2.3.1.6. (7) Bileşiminin sentezi

4'-hidroksi kumarin (4) (3 g, 18.5 mmol) oda sıcaklığında 20 mL asetik asitte çözüldükten sonra 5 mL POCl₃ eklenmiştir. Bu karışım 2 saat süreyle geri soğutucu sistemde ısıtıldıktan sonra 20°C'de 24 saat karışmaya bırakılmış ve çöken katı madde (5) safsızlıkların giderilmesi için soğuk etil alkolle yıkanarak süzülüp toplanmıştır. Toz halindeki (5) (0.3 g, 1.47 mmol) ve 3,5'-dimetoksi benzaldehit (6) (0.2 g, 1.2 mmol) etil alkol (15 mL)/piperidin (2 mL) karışımında çözülerek geri soğutucu sistemde 24 saat süreyle ısıtılarak karıştırılmıştır. Yeni ürünün saflığı ve varlığı TLC yöntemi uygulanarak reaksiyon ortamından alınan örnek ile kontrol edilmiştir ve bu sürenin sonunda çözücü evaporatörle uzaklaştırılıp dietil eter eklenip çöken katı (7) ürün süzülerek toplanmıştır (Şekil 2.10) [7, 8, 65].

1. Basamak



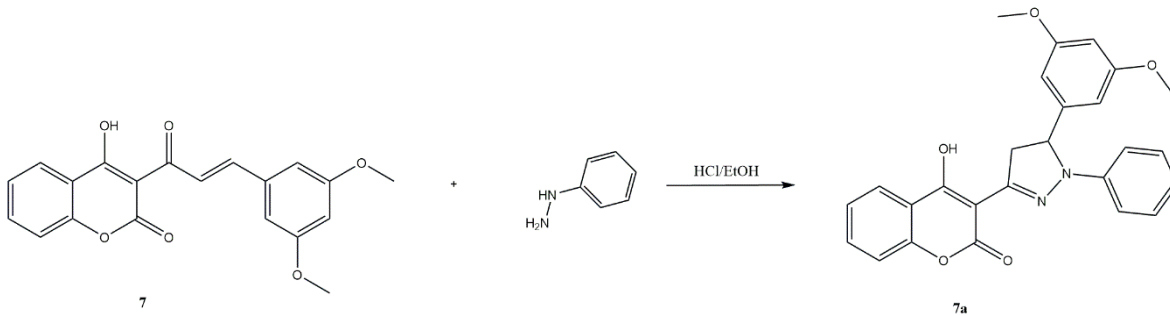
2. Basamak



Şekil 2.10. (7) Bileşiğinin sentez tepkimesi.

2.3.1.7. (7a) Bileşiğinin sentezi

(7) (0.2 g, 0.57 mmol) ve fenil hidrazin (0.08 g, 0.55 mmol) etanolde çözülerek geri soğutucu sistemde 3 saat süre ile ısıtılarak karıştırılmıştır. Yeni ürünün saflığı ve varlığı reaksiyon ortamından belirli aralıklarla alınan örnekler ile TLC yöntemi uygulanarak kontrol edilmiş olup bu süre sonunda çöktürme için ortama buz atılarak 20°C'de 24 saat süre ile karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı madde (7a) süzülerek toplanmış ve safsızlıkların giderilmesi için etil alkolde kristallendirilmiştir (Şekil 2.11) [7, 8, 65, 66].

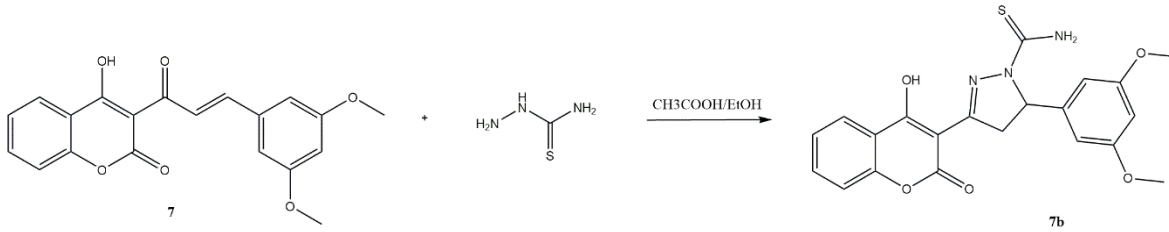


Şekil 2.11. (7a) Bileşiğinin sentez tepkimesi.

2.3.1.8. (7b) Bileşiğinin sentezi

(7) (0.2 g, 0.57 mmol) ve tiyo semikarbazit 15mL etil alkol, 2mL asetik asit karışımında

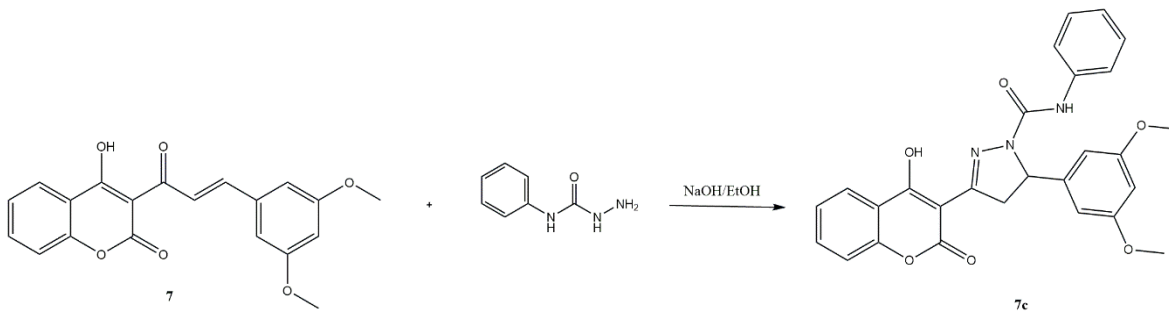
çözülerek geri soğutucu sistemde 24 saat süre ile ısıtılarak karıştırılmıştır. Yeni ürünün saflığı ve varlığı reaksiyon ortamından belirli aralıklarla alınan örnekler ile TLC yöntemi uygulanarak kontrol edilmiş olup bu süre sonunda çöktürme için ortama buz atılarak 20°C'de 24 saat ile karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı madde (**7b**) süzülerek toplanır ve safsızlıkların giderilmesi için metil alkolde kristallendirilmiştir (**Şekil 2.12**) [7, 8, 65, 66].



Şekil 2.12. (**7b**) Bileşiğinin sentez tepkimesi.

2.3.1.9. (**7c**) Bileşiğinin sentezi

(**7**) (0.2 g, 0.57 mmol) ve 4'-fenil semikarbazit (0.3 g, 2.08 mmol) etil alkol ve NaOH (0.02 g, 0.57 mmol) karışımında çözülerek geri soğutucu sistemde 24 saat süre ile ısıtılarak karışmaya bırakılmıştır. Yeni ürünün saflığı ve varlığı reaksiyon ortamından belirli aralıklarla alınan örnekler ile TLC yöntemi uygulanarak kontrol edilmiş bu süre sonunda çöktürme için ortama buz atılarak 20°C'de 24 saat süre ile karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı madde (**7c**) süzülerek toplanmış ve safsızlıkların giderilmesi için etil alkolde kristallendirilmiştir (**Şekil 2.13**) [7, 8, 65, 66].



Şekil 2.13. (**7c**) Bileşiğinin sentez tepkimesi.

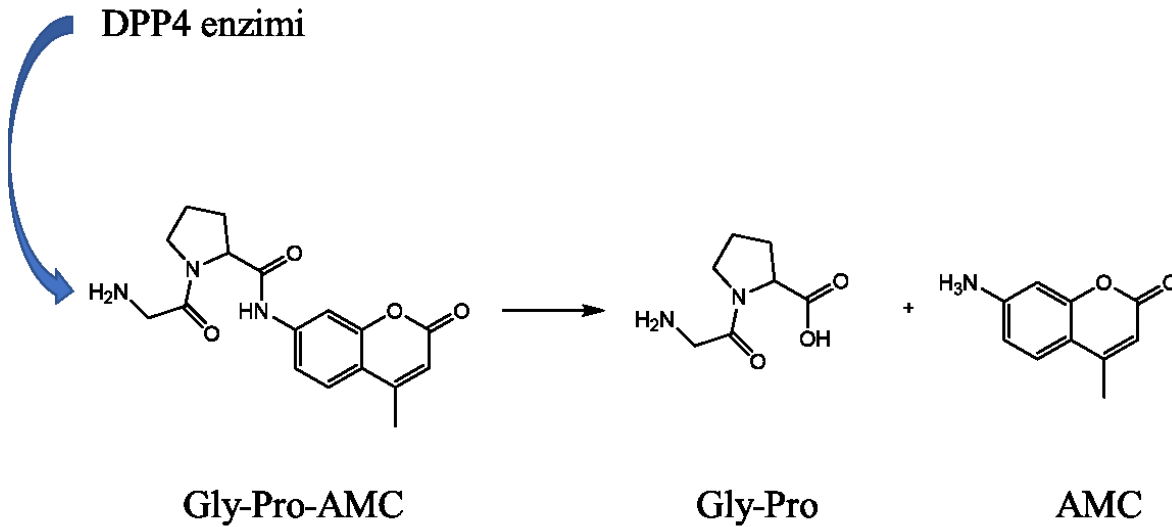
2.3.2. İnhibisyon Yöntemleri

Enzim inhibisyonu, bir bileşiğin enzimin aktif bölgesiyle kimyasal etkileşimleri nedeniyle varlığından etkilenen enzim-substrat reaksiyonlarının incelenmesidir. Hastalıkların tedavi

stratejilerinde önemli bir rol oynayan enzim inhibisyonu, enzimin aktif bölgesiyle kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler kuran küçük moleküllerin etkisiyle gerçekleşir. Tez çalışmalarımızda deney protokolleri enzim-substrat etkileşiminin spektrofotometrik veya florometrik yöntemlerle analizinin prensiplerine göre kurgulanmıştır.

2.3.2.1. DPP4 Enzimi İnhibisyon Çalışmaları

DPP4 enziminin aktivitesi, floresan olmayan Gly-Pro-7-Amido-4-Metil kumarin (H-Gly-Pro-AMC) substratının parçalanmasıyla açığa çıkan ve floresan bir bileşik olan 7-Amino-4-metil kumarinin (AMC) ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 2.14) ($\lambda_{ex} = 360/\lambda_{em} = 460$ nm) [67-69]. İnhibisyon çalışmalarında pozitif kontrol olarak enzimin bilinen inhibitörlerinden sitagliptin kullanılmıştır.



Şekil 2.14. DPP4 Enzimi aktivitesinin ölçüm prensibi.

DPP4 enzimi inhibisyon çalışmaları Abcam inhibisyon kit prosedürüne göre düzenlemeler ve denemeler yapılarak çalışılmıştır.

Deneyde kullanılan çözeltiler aşağıda verildiği şekilde hazırlanmıştır:

Tampon çözeltisi: Stok çözeltilerden; 3mL alınıp 27mL saf su ile seyreltilmiştir (20mM Tris HCl pH 8, 100mM NaCl/1mM EDTA). Hazırlanan çalışma tamponu -20°C’de saklanmıştır.

Enzim çözeltisi: 120µL stok enzim çözeltisine 480µL tampon çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan enzim çözeltisi ile 2 saat süre ile buz üstünde çalışılmıştır.

Substrat: 300µL (5mM AMC-Gly-Pro) stok substrattan 120 µL alınarak 2880 µL çalışma tamponu ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Buna göre örneklerin (sentezlediğimiz bileşiklerimizin) kuyunun içindeki nihai konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde DMSO'da çözüldükten sonra 10 ila 100 µM konsantrasyon aralığına seyreltilmiştir. Kuyular 39 µL tampon çözelti, 10 µL tampon ile 1:4v/v seyreltilmiş DPP4 enzimi, 1 µL örnek içerecek şekilde hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Ön inkübasyondan sonra tüm kuyulara 50 µL substrat eklenmiş ve 37°C'de karanlıkta 30 dakika süreyle ikinci kez inkübe edilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. DPP4 inhibisyon deney protokolü.

	Kör	Kontrol	Örnek
Tampon	49 µL	39 µL	39 µL
Enzim	-	10 µL	10 µL
Çözücü (DMSO)	1 µL	1 µL	-
Örnek	-	-	1 µL
	<i>Birinci inkübasyon</i>	<i>5 dk., karanlıkta, 37°C</i>	
Substrat	50 µL	50 µL	50 µL
	<i>İkinci inkübasyon</i>	<i>30 dk., karanlıkta, 37°C</i>	

Floresans değerleri 360 nm'lik bir uyarma dalga boyunda ve 460 nm'lik bir emisyon dalga boyunda okunarak kaydedilmiş; %İnhibisyon değerleri aşağıdaki Denklem 2.1'e göre hesaplanmıştır:

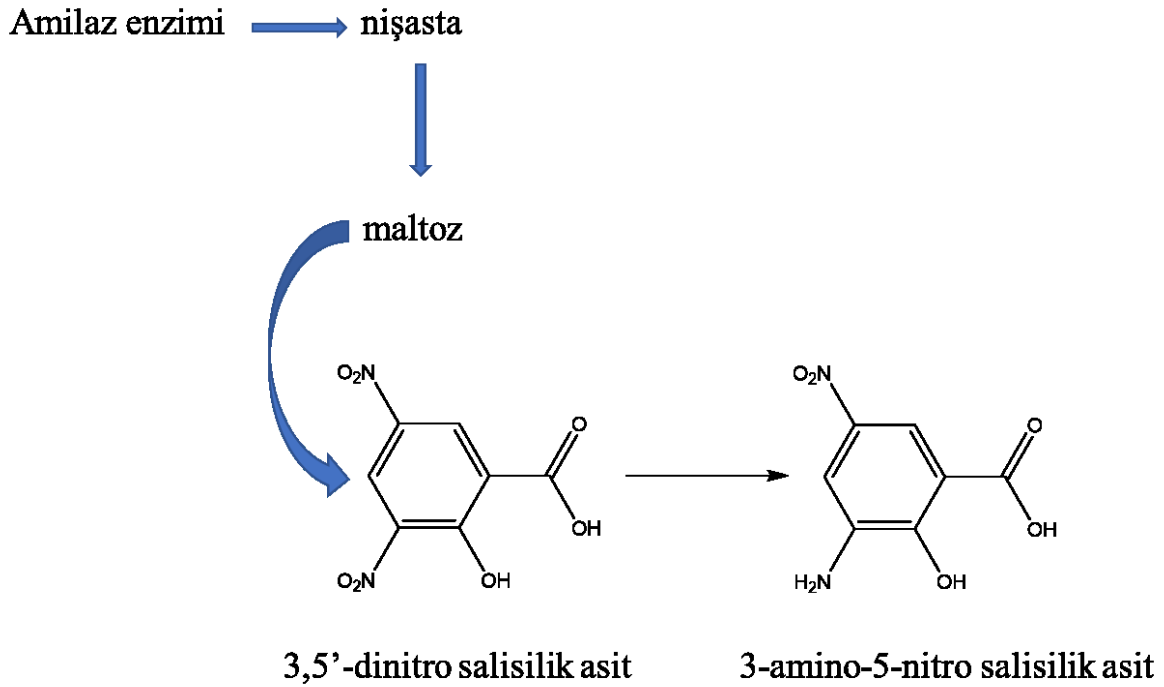
$$\% \text{ inhibisyon} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) * 100 \quad (2.1)$$

* A_{kontrol} = Kontrol grubu Absorsans değeri; $A_{\text{örnek}}$ = Örnek Absorbans değeri

log[C]'nin %inhibisyona karşı verdiği eğrinin doğrusal olmayan regresyon analizi ile %50 inhibisyon veren bileşik konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hem sentezlenen bileşikler hem de pozitif kontrol için hesaplanmıştır.

2.3.2.2. α -Amilaz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları

α -Amilaz enziminin aktivasyon ölçümü; α -amilazın nişastadan açığa çıkarttığı maltozların 3,5-dinitro salisilik asidi (DNS) indirgemesine dayanmaktadır. α -Amilaz aktivitesi 3,5-dinitro salisilik asidin spektrofotometrik olarak 540 nm’de ölçümü ile hesaplanmaktadır. Nişastanın parçalanması ile oluşan indirgen şekerdeki aldehit grupları karboksilik aside dönüşürken; 3,5-dinitrosalisilik asit de 3- amino-5-nitrosalisilik aside indirgenmektedir (Şekil 2.15) [68, 70]. İnhibisyon çalışmalarında pozitif kontrol olarak enzimin bilinen inhibitörlerinden akarboz kullanılmıştır.



Şekil 2.15. α -Amilaz enzimi aktivite ölçüm prensibi.

α -Amilaz inhibisyon deneyleri Ramírez Fuentes ve ark., 2021'nin [71] önerdiği yöntemeye göre denemeler ve değişiklikler yapılarak çalışılmıştır.

Deneyde kullanılan çözeltiler aşağıda verildiği şekilde hazırlanmıştır:

Tampon çözeltisi: 20mM, pH 6.9 fosfat tamponu (PBS) 6mM NaCl içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Enzim çözeltisi: 23.3U/mg stok şişeden 5.39 mg tartılmış 25mL tamponda çözülerek 5U

enzim çalışma stoğu hazırlanmış ve 1 mL'lik hacimlerde -80°C'de saklanmıştır. Çalışma esnasında bu stoktan 0.5U'ya seyreltilerek çalışma çözeltisi hazırlanır.

Substrat: %1'lik nişasta çözeltisi hazırlanmıştır. Stok yerine günlük çalışılması uygundur.

DNS: 0.5g DNS 10mL 2N NaOH çözeltisinde çözülmüş ve üzerine 25mL 15g NaK tartarat çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Hazırlanan DNS çözeltisi koyu renk bir şişede oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

Buna göre örneklerin (sentezlediğimiz bileşiklerimizin) kuyunun içindeki nihai konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde DMSO'da çözüldükten sonra 10 ila 100 µM konsantrasyon aralığına seyreltilmiştir. Deney ortamı 118 µL of tampon çözelti (20mM, pH 6.9 fosfat tamponu), 40 µL tampon ile seyreltilmiş α-amilaz (125 U/mL), 2 µL örnek içerecek şekilde hazırlandıktan sonra 37°C'de 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ön inkübasyondan sonra 40 µL substrat (1%nişasta çözeltisi) eklenmiş ve tekrar 37°C'de 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İkinci inkübasyondan sonra 100 µL DNS çözeltisi eklenmiş üçüncü kez 5 dakika süreyle 100°C'de kaynar suda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ortamı soğutmak için 900 µL saf su eklenmiş (**Tablo 2.2**) ve 540 nm'de köre karşı absorbansı okunarak kaydedilmiş ve %İnhibisyon değerleri aşağıdaki Denklem 2.1'e göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ inhibisyon} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) * 100 \quad (2.1)$$

*A_{kontrol} = Kontrol grubu Absorans değeri; A_{örnek} = Örnek Absorans değeri

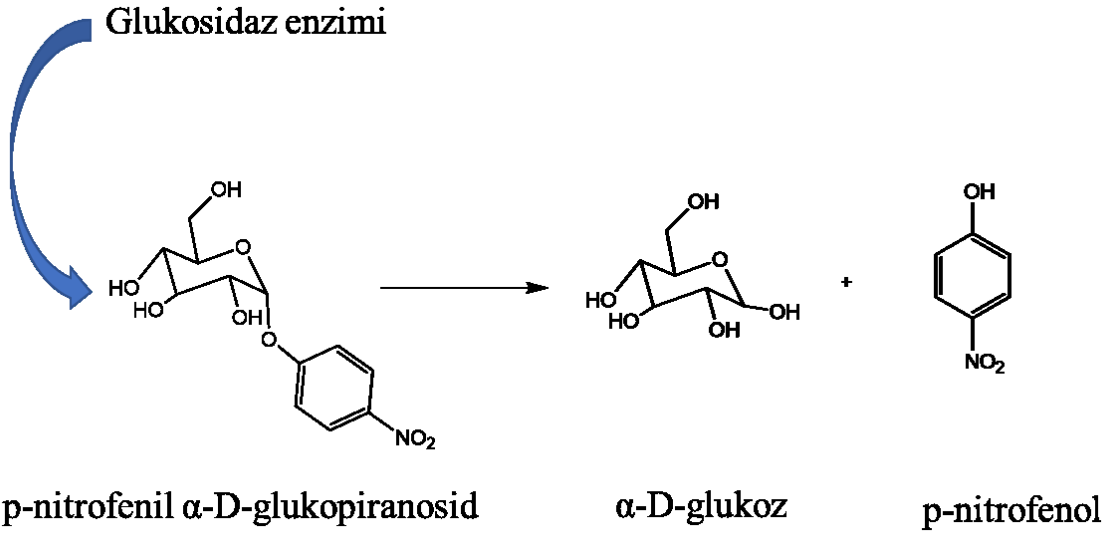
log[C]'nin %inhibisyona karşı verdiği eğrinin doğrusal olmayan regresyon analizi ile %50 inhibisyon veren bileşik konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri) hem sentezlenen bileşikler hem de pozitif kontrol için hesaplanmıştır.

Tablo 2.2. α -Amilaz enzimi inhibisyon deney protokolü.

	Kör	Kontrol	Örnek
Tampon	158 μ L	118 μ L	118 μ L
Enzim	-	40 μ L	40 μ L
Çözücü (DMSO)	2 μ L	2 μ L	-
Örnek	-	-	2 μ L
	<i>Birinci inkübasyon</i>	<i>10 dk., su banyosu, 37°C</i>	
Substrat	40 μ L	40 μ L	40 μ L
	<i>İkinci inkübasyon</i>	<i>10 dk., su banyosu, 37°C</i>	
DNS	100 μ L	100 μ L	100 μ L
	<i>Üçüncü inkübasyon</i>	<i>5 dk., su banyosu, 100°C</i>	
Saf su	900 μ L	900 μ L	900 μ L

2.3.2.3. α -Glukosidaz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları

α -Glukosidaz enziminin aktivasyon ölçüm prensibi p-nitrofenil-D-glukopiranosidin (p-NPG) α -glukosidaz ile hidroliz reaksiyonu sonucu açığa çıkan p-nitrofenolün bir mikrolaka okuyucu kullanılarak 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. İnhibisyon deneylerinde pozitif kontrol olarak enzimin bilinen inhibitörlerinden kuersetin kullanılmıştır (Şekil 2.16) [33, 71, 72].



Şekil 2.16. α -Glukosidaz enzimi aktivite ölçüm prensibi.

α -Glukosidaz enzimi inhibisyon deneyleri Chaudhry ve ark., 2017'a [33] göre denemeler ve değişiklikler yapılarak çalışılmıştır.

Deneyde kullanılan çözeltiler aşağıda verildiği şekilde hazırlanmıştır:

Tampon çözeltisi: 10mM, pH 6.8 fosfat tamponu hazırlanmıştır.

Enzim çözeltisi: 10 U enzim çalışma çözeltisi 100U/mg stok şişeden 1 mg alınarak 5mL tamponda hazırlanmış ve 0.5 mL'lik hacimlerde -80°C 'de saklanmıştır.

Substrat: 0.0008g 4-nitrofenil α -D-glukopiranosid (301.25g/mol) 0.5 mM pH 5mL tamponda hazırlanmıştır.

Buna göre örneklerin (sentezlediğimiz bileşiklerimizin) kuyunun içindeki nihai konsantrasyonu 100 μM olacak şekilde DMSO'da çözüldükten sonra 10 ila 100 μM konsantrasyon aralığına seyreltilmiştir. Kuyular 5 μL örnek, 10 μL α -glukosidaz çözeltisi (5 mL, 10U stok) ve 60 μL fosfat tamponu (10mM pH 6.8) içerecek şekilde hazırlandıktan sonra 37°C 'de 10 dakika süreyle ön inkübasyon uygulanmıştır. 0.5 mM 25 μL p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid çözeltisi eklenmiş ve 37°C 'de 10 dakika süreyle ikinci inkübasyon uygulanmış (**Tablo 2.3**) ve 405 nm'de çoklu plaka okuyucuda absorbans ölçümü alınmıştır. %İnhibisyon değerleri aşağıdaki denklem 2.1'e göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ inhibisyon} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) * 100 \quad (2.1)$$

* A_{kontrol} = Kontrol grubu Absorpsiyon değeri; $A_{\text{örnek}}$ = Örnek Absorpsiyon değeri

log[C]'nin %inhibisyona karşı verdiği eğrinin doğrusal olmayan regresyon analizi ile %50 inhibisyon veren bileşik konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hem sentezlenen bileşikler hem de pozitif kontrol için hesaplanmıştır.

Tablo 2.3 α -Glukosidaz Enzimi İnhibisyon Deney protokolü.

	Kör	Kontrol	Örnek
Tampon	70 μ L	60 μ L	60 μ L
Enzim	-	10 μ L	10 μ L
Çözücü (DMSO)	5 μ L	5 μ L	-
Örnek	-	-	5 μ L
	<i>Birinci inkübasyon</i>	<i>10 dk., 37°C</i>	
Substrat	25 μ L	25 μ L	25 μ L
	<i>İkinci inkübasyon</i>	<i>10 dk., 37°C</i>	

2.3.3. BSA bağlanma çalışmaları

BSA-ligand kompleksinin oluşumunu araştırmak için BSA'nın yapısal değişikliğini takip etmek amacı ile UV-Vis spektroskopisi çalışmaları yapılmıştır. UV-Vis spektroskopisi potansiyel ilaç molekülü ile bir protein arasındaki kompleksin oluşumunu tespit etmenin basit ve etkili bir yöntemidir. Bağlanma çalışmalarında proteinin konformasyonundaki değişikliklerin gözlemlenmesi için, proteinlerdeki aromatik amino asitlerden triptofan ve tirozin amino asit kalıntılarının 280 nm'de absorpsiyonundan yararlanılmaktadır [73].

Protein-ligand etkileşiminin incelenmesi için BSA'nın spektrofotometrik olarak maksimum absorpsiyon dalga boyundaki değişiklikler analizlenmiştir. BSA'nın sahip olduğu maksimum absorpsiyon dalga boyunda ($\lambda=280$ nm) ligandın artan konsantrasyonlarına karşı gerçekleşen değişiklikler izlenmiştir.

Deneyde kullanılan çözeltiler aşağıda verildiği şekilde hazırlanmıştır:

Tampon çözeltisi: 20mM pH 7.4 fosfat tamponu hazırlanmıştır.

Stok BSA çözeltisi: 100 mL 3 μ M BSA (66430g/mol) çözeltisi 20mM pH 7.4 fosfat tamponunda hazırlanmıştır.

Ligand stok çözeltileri: Sentezlediğimiz bileşiklerin son konsantrasyonları 4000 μ M olacak şekilde hesaplanarak tartılmış ve DMSO'da çözülerek stokları hazırlanmıştır.

Tablo 2.4. BSA bağlanma deneyi yöntem protokolü.

	Ligand (μM)	Ligand (μL)	BSA (μL)	Tampon (μL)
Vial 1	<i>BSA</i>	-	2000	2000
Vial 2	5	5	2000	1995
Vial 3	10	10	2000	1990
Vial 4	15	15	2000	1985
Vial 5	20	20	2000	1980
Vial 6	25	25	2000	1975
Vial 7	30	30	2000	1970
Vial 8	35	35	2000	1965
Vial 9	40	40	2000	1960
Vial 10	45	45	2000	1955
Vial 11	50	50	2000	1950
Vial 12	<i>Ligand</i>	10	-	3990

Spektroskopik ölçümlerde sabit BSA konsantrasyonu (1.5 μ M) ile ligandın 5 μ M'dan 50 μ M aralığında farklı konsantrasyonları karıştırılarak ölçüm yapılmıştır (**Tablo 2.4**). Absorpsiyon spektroskopisinde oda sıcaklığında çalışılmış [36, 37] ve absorpsiyon spektrumu 200-600 nm aralığında okunmuştur.

Reddy ve ark. göre (2018) [36], bağlanma sabitini (K_a) bulmak için için, her bileşiğe ait okunan absorpsiyon değerine karşı konsantrasyon ($A_0/(A-A_0)^*$ 'a karşı $1/[C \text{ bileşik}]$) grafiği çizilmiştir. Bu grafiğin eğimi, bağlanma sabiti K_a 'dır. Sistemlere ait Gibbs enerjisi (ΔG) değeri, Gibbs-Helmholtz Denklem 2.2 ile hesaplanmıştır.

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (2.2)$$

* $R = 8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ (gaz sabiti); $T = \text{Sıcaklık (298K)}$; $K_a = \text{Bağlanma sabiti}$

2.3.4. ADME özelliklerinin incelenmesi

ADME parametreleri bileşiklerin ilaç olma olasılığını gösteren fizikokimyasal aralıklar olarak tanımlanmaktadır. Hesapsal çalışmalarımızda bu 8 özgün bileşiğin ADME özellikleri ve Lipinski 5 kuralına uygunlukları ile incelenmiştir. Bileşiklerin ilaç benzeri özelliklerini gösteren ADME (emilim, dağıtım, metabolizma ve atılım) özellikleri, SwissADME çevrimiçi sunucusu kullanılarak analiz edilmiştir [56].

Bu özellikler:

- Molekül ağırlığı (M.A., g/mol) $150 < MA < 500$,
- Doygunluk (Fraction Csp3) $0.25 < \text{Fraksiyon Csp3} < 1$,
- Döndürülebilir bağlar $0 < \text{Flex} < 9$,
- Hidrojen bağı alıcısı ve vericisi,
- Topolojik polar yüzey alanı (TPSA(\AA^2)) $20 < \text{TPSA} < 130$,
- Lipofiliklik ölçüsü (Log P) $-0.7 < XLOGP < +0.5$,
- Gastrointestinal emilim (GIA),
- Kan-beyin bariyeri (BBB) geçirgenliğidir.

2.3.5. Moleküler yerleştirme çalışmaları

İn *siliko* çalışmalar kapsamında moleküler yerleştirme ile enzim-ligand bağlanma ilişkileri incelenmiştir. Hesapsal çalışmalarda Autodock4 yöntemi uygulanmıştır.

Sentezlenen yeni bileşiklerin Spartan programı yarı-deneysel PM6 yöntemi ile konformasyonel taramaları yapılmış; taraması sonunda en kararlı konformasyon seçilerek optimize edilmiştir. Enzim-ligand bağlanma enerjileri Autodock4 ile hesaplanmıştır. Moleküler yerleştirme işlemi için enzimlerin kristal yapıları pdb uzantısıyla protein databank web sitesinden indirilmiştir, PDB kodları; DPP4 enzimi, α -amilaz ve BSA için sırası ile 4FFW,1B2Y ve 4F5S'dir. Enzim ve ligand dosyalarının hazırlanması için BIOVIA Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0-2013 programı kullanılmıştır [63, 74]. Etkileşim sonuçları Notepad++ programında kaydedilmiş ve enzim-ligand etkileşimleri BIOVIA Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0-2013 yazılımı ile ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin doklama işlemlerinden önce programların validasyonları için DPP4'ün bilinen inhibitörü sitagliptin ve α -amilaz enzimi için de akarboz model olarak seçilmiştir [30, 75, 76]. DPP4 enziminin validasyonu için enziminin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları seçilerek -Arg123, Glu203, Glu204, Val205, Phe206, Ser207, Phe355, Arg356, Gly550, Pro551, Cys552, Ser553, Ser631, Tyr632, Val657, Tyr663, Tyr667, Val712 ve His741- 'grid box' boyutu 50x50x50 ve X-Y-Z koordinatları sırasıyla 20.149, -10.398, 50.397 olarak ayarlanmıştır. α -Amilaz enziminin validasyonu için enziminin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları seçilerek -Trp59, Glu233, Gln63, Lys200, Tyr62, Thr163, Arg195, GLy306, Asp300, Thr163, Asp197, His305, His299, Ile235 ve Tyr62- 'grid box' boyutu 50x50x50 ve X,Y,Z koordinatları sırasıyla 20.046, 7.448, 48.821 olarak ayarlanmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Sentez Çalışmaları

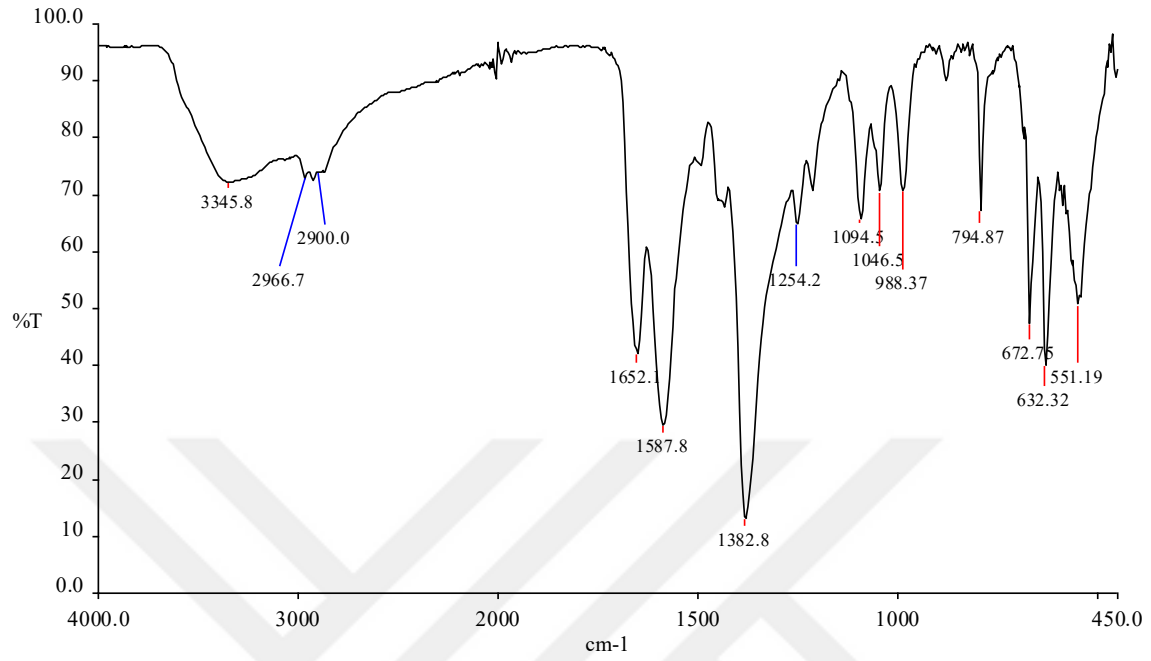
Sentez çalışmalarımızda her bir reaksiyon için sıcaklık, tepkime süresi, madde miktarı, çözücü ve katalizör gibi parametreler göz önüne alınarak, en uygun reaksiyon şartlarını belirlemek amacı ile çok sayıda deneme yapılmıştır. Bütün reaksiyonlar kurutma başlığı takılı geri soğutucu sistemde ve ortam koşulları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Yeni ürünün oluşumu ve saflığı ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemi kullanılarak tepkime ortamından alınan örnek ve başlangıç maddeleri ile kıyaslanarak takip ve kontrol edilmiştir. Uygun çözücülerde kristallendirme ve çöz-çöktür yöntemleriyle ürünler saflaştırılmış olup, bileşiklerin yapı aydınlatılması için FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve QTOF spektroskopilerinden faydalanılmıştır. Ayrıca bileşiklere ait yapılar, molekül ağırlıkları, erime noktaları, yüzde verimleri hesaplanmış ve ilgili başlıklar altında verilmiştir.

3.1.1. 3-(2,5-dimetoksifenil)-5-(4-metoksifenil)-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazol (3a)

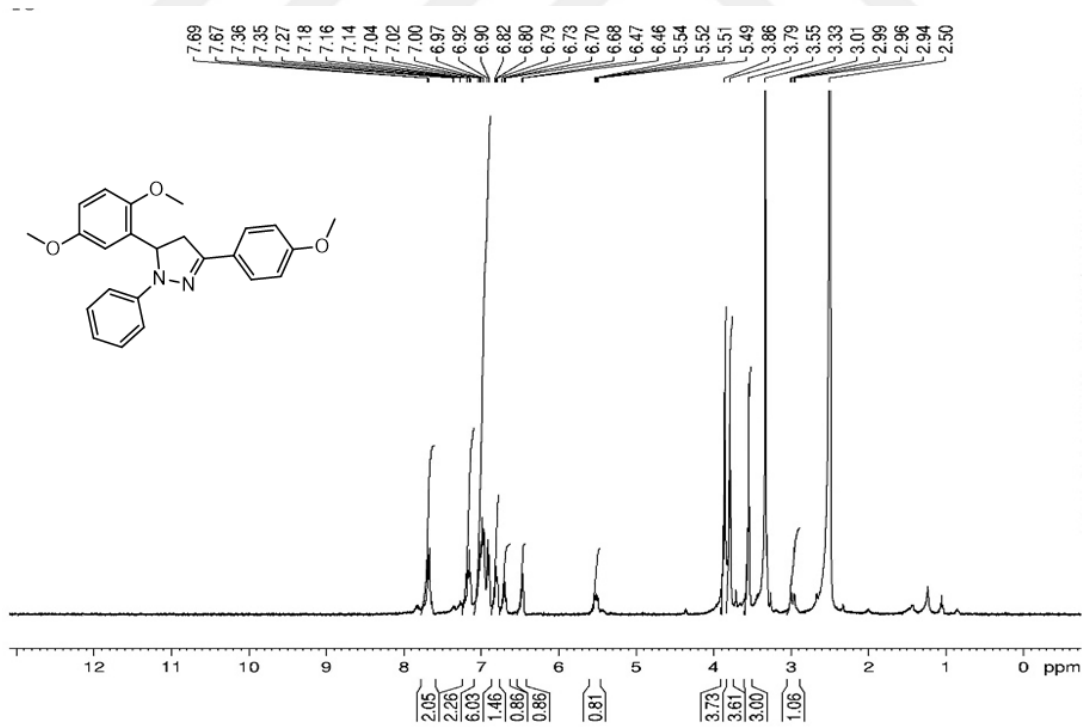
Stokiyometrik oranlar Bölüm 2.3.1.2’de sunulmuştur. Buna göre (3) bileşiği ve fenilhidrazin etil alkolde çözülerek soğutucu sistemde ısıtılmıştır. Yeni ürünün varlığı ve saflığı TLC ile takip ve kontrol edilip bu sürenin sonunda ortama buz atılarak oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı süzülerek alınıp safsızlıkların giderilmesi için etil alkolde kristallendirilmiştir.

Bileşiğin karakterizasyonu için FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR analizleri yaptırılmış olup; spektral analizlere ait grafikler incelendiğinde gözlenen piklerin kaynaklarda belirtilen spektrumlarla benzer olduğu görülmüştür [43, 44, 52, 55, 64].

FTIR (ATR) spektrumuna göre (Şekil 3.1) pirazol halkasına ait -N=C grubunun 3345.8 cm⁻¹’de yayvan bir pik verdiği, aromatik -CH gerilimlerinin 2966.7-2900.0 cm⁻¹’de pik verdiği ve bu sp² hibritleşmesi yapmış olan C=C titreşimlerinin 1652.1-1587.8 cm⁻¹’de pik verdiğini ayrıca 1382.8 cm⁻¹’deki piklerinde alifatik -CH titreşimlerini temsil ettiği görülmüştür.

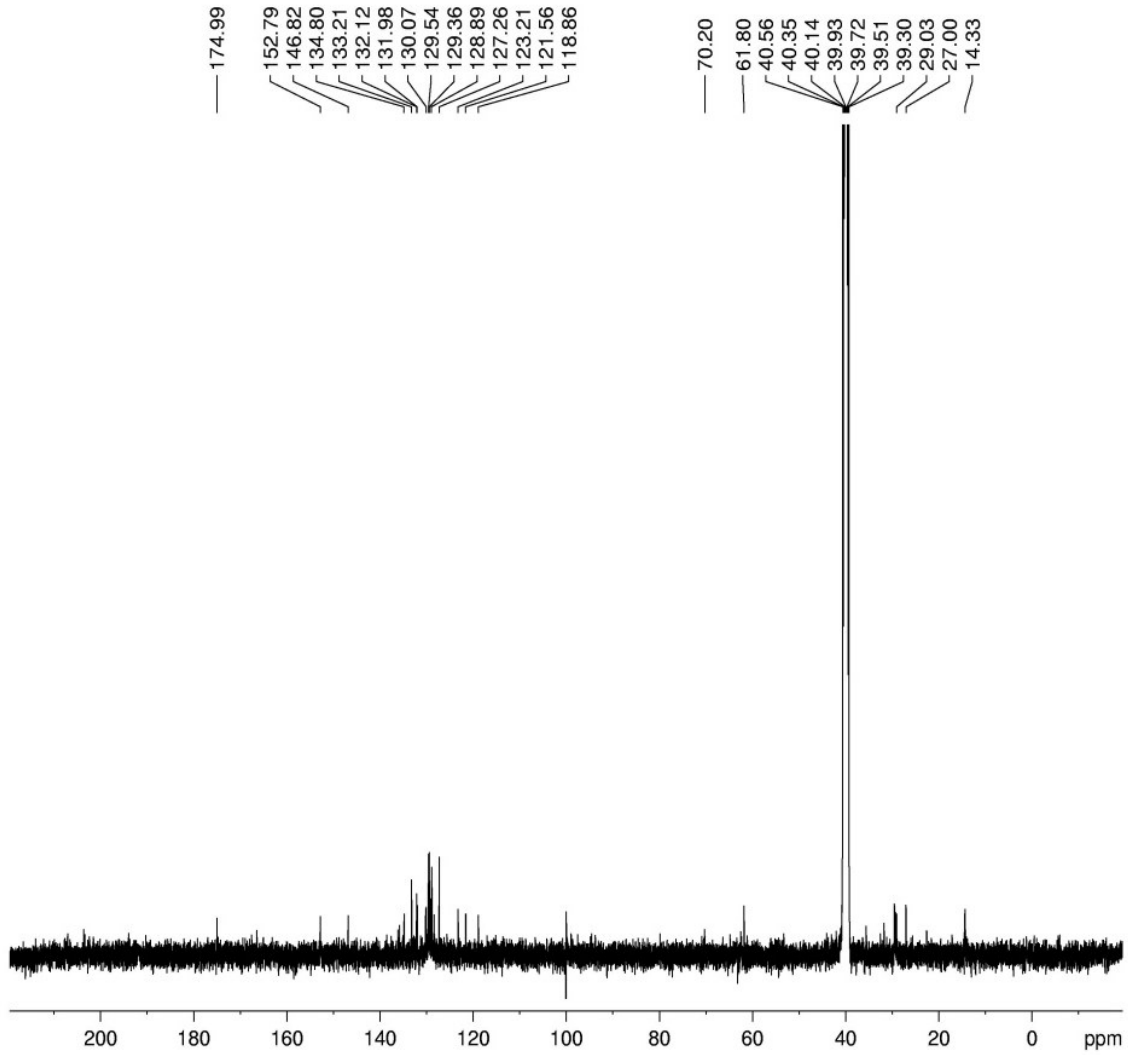


Şekil 3.1. 3-(2,5-dimetoksifenil)-5-(4-metoksifenil)-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazol (**3a**) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.



Şekil 3.2. 3-(2,5-dimetoksifenil)-5-(4-metoksifenil)-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazol (**3a**) Bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.

Şekil 3.2’de görülen **3a** bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumuna göre metoksi gruplarındaki 9 protonun 3.86-3.55ppm aralığında pik verdiği, pirazol halkasındaki -CH ve -CH₂ ‘ye ait piklerin 3.55 ve 5.54ppm’de, aromatik halkalardaki protonların 7.27-7.69ppm (4H, -CH₂) ve 6.47ppm’de (2H, -CH₂), azota bağlı aromatik halkadaki protonların 6.47-7.18ppm (6H, Ar-H) aralığında pik verdiği görülmüş olup; spektrumdaki entegrasyonlar karşılaştırıldığında, proton sayılarının uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.3. 3-(2,5-dimetoksifenil)-5-(4-metoksifenil)-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol (**3a**) Bileşiğine ait $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu.

Bileşik **3a**’ya ait $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (Şekil 3.3) incelendiğinde ise metoksi gruplarına ait karbon atomlarını 39.30-40.56 ppm aralığında (3C, -OCH₃), pirazol halkasındaki karbonların

170.66ppm (1C, -C=N) ve 118.86-123.21 ppm'de (3C,-C-N; -C-C), aromatik halkalara ait karbon atomlarını ise 127.26-129.36 ppm (6C, Ar-C), 130.07-134.80ppm (6C, Ar-C), 146.83,134.80ppm (2C, C=C), 152.79 ppm (1C), 166.57 ppm (1C), 174.99ppm'de (1C) gözlemlenmiştir.

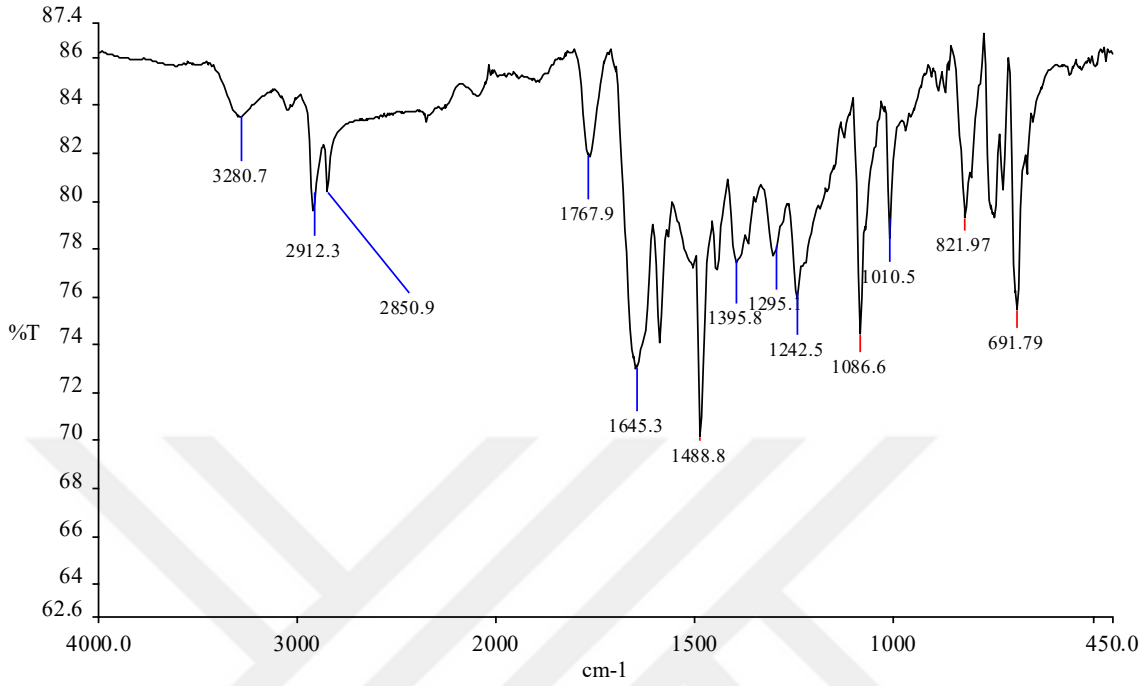
QTOF analiz sonuçlarına göre bileşiğin kapalı formülü ve molekül ağırlığı saptanmıştır. *QTOF: [M+H]⁺, bulunan 388,16304 C₂₄H₂₄N₂O₃ hesaplanan 388,16304.* Bileşiğin yüzde verim hesabı yapılmış, erime noktası tayin edilmiştir. Bileşiğin kimyasal formülü:C₂₄H₂₄N₂O₃; M.A.:388.47 g/mol.; verim 0.462 g (77%) ve e.n.:105.2 °C olarak bulunmuştur (**Tablo 3.1**).

Spektrumların analizlerinin değerlendirilmesi ile bileşik **3a**'nın IUPAC adlandırma sistemine göre adlandırılarak '3-(2,5-dimetoksifenil)-5-(4-metoksifenil)-2-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirazol' olarak belirlenmiştir.

3.1.2. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid (3b)

Stokiyometrik oranlar Bölüm 2.3.1.3'de sunulmuştur. Buna göre (3) bileşiği ve semikarbazit etanolik sodyum hidroksit çözeltisinde çözülerek geri soğutucu sistemde ısıtılıp, yeni ürünün varlığı ve saflığı TLC ile takip ve kontrol edilip ve bu sürenin sonunda ortama buz atılarak oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı süzülerek alınmış ve safsızlıkların giderilmesi için etil alkolle kristallendirilmiştir.

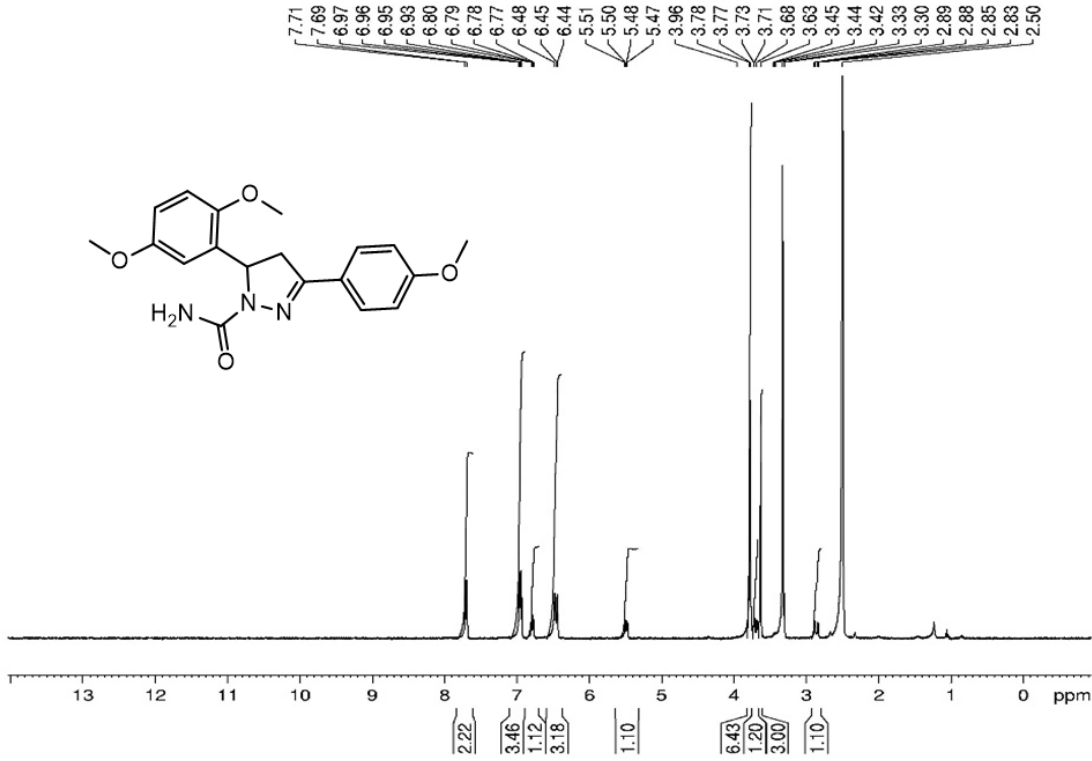
Bileşiğin karakterizasyonu için FTIR (**Şekil 3.4**), ¹H-NMR (**Şekil 3.5**), ¹³C-NMR (**Şekil 3.6**) analizleri yaptırılmış olup; spektral analizlere ait grafikler incelendiğinde gözlenen piklerin kaynaklarda belirtilen spektrumlarla benzer olduğu görülmüştür [43, 44, 52, 55, 64].



Şekil 3.4. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid (**3b**) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.

Bileşik 3b'ye ait FTIR (ATR) spektrumu incelendiğinde karbonil grubuna bağlı -NH₂'nin 3280.7 cm⁻¹'de (-NH), aromatik halkalara ait piklerin 2912.3 cm⁻¹'de (Ar-CH), alifatik -CH gerilimlerinin ise 2850.9 cm⁻¹'de (alifatik -CH), karbonil grubuna ait titreşimlerin 1767.9 cm⁻¹'de (C=O) ve pirazol halkasındaki -C-N- gerilimlerinin de 1645.3 cm⁻¹'de (C=N) ve 1488.8 cm⁻¹'de (C-N) verdiği görülmüştür (**Şekil 3.4**).

Şekil 3.5'de görülen **3b** bileşiğinin ¹H-NMR (δ) spektrumu incelendiğinde pirazol halkasındaki protonların 5.50 ppm (1H, -CH) ve 2.89-3.63 ppm'de (2H, -CH₂); metoksi gruplarındaki protonların 3.96-3.68 ppm aralığında (9H, -OCH₃) ve aromatik halkadaki protonların ise 6.48-7.71 ppm (7H, Ar-H) aralığında pik verdiği görülmüştür. Spektrumdaki entegrasyonlar karşılaştırıldığında proton sayılarının uyumlu olduğu belirlenmiştir.

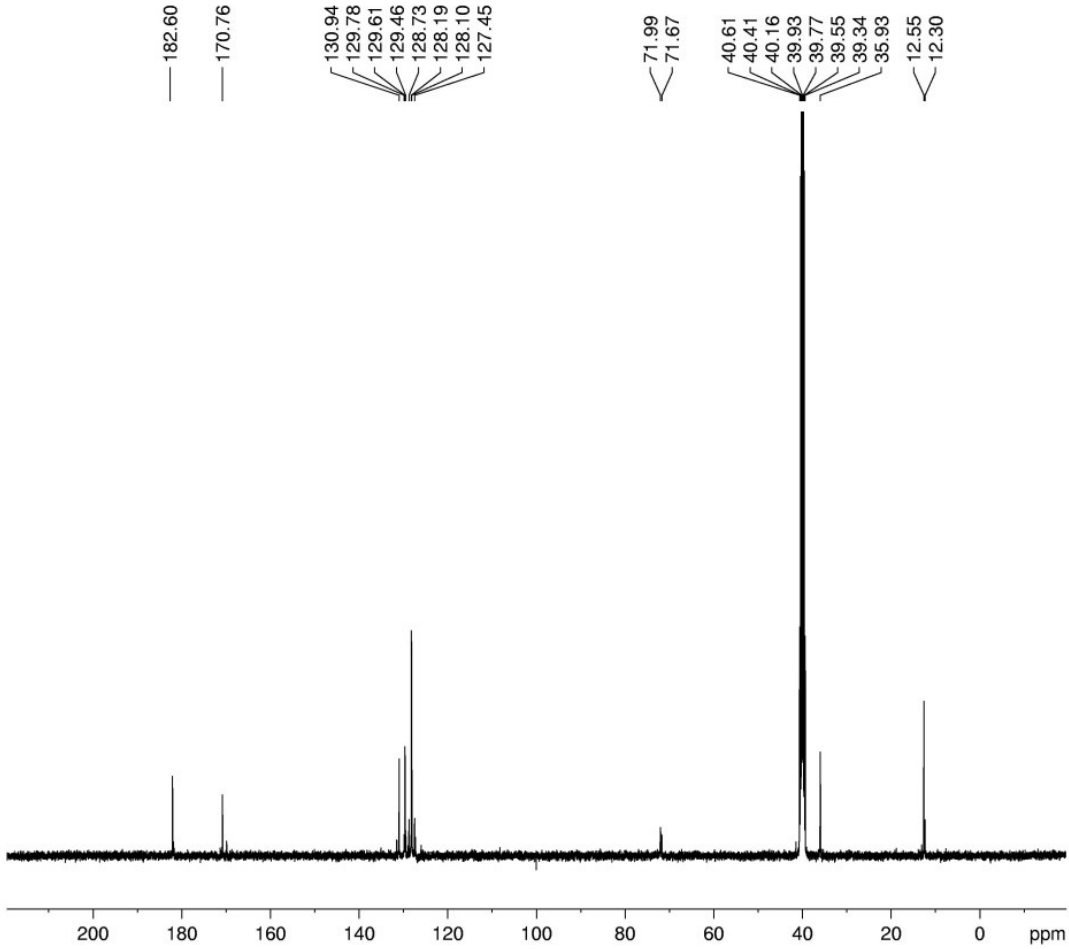


Şekil 3.5. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid (**3b**) Bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.

Bileşik 3b'nin Şekil 3.6'da verilen ¹³C-NMR (δ) spektrumuna göre metoksi gruplarındaki karbonların 40.16,39.93,39.77 ppm'de (3C,-OCH₃), pirazol halkasındaki karbonların 170.76, 169.85 ppm'de (2C,-C=N; -C-C), aromatik karbonların ise 127.26-131.52 ppm aralığında (12C, Ar-C) ve karbonil grubunun karbon atomunun da 182.60 ppm'de (1C, C=O).pik verdiği görülmüştür.

QTOF analiz sonuçlarına göre bileşiğin kapalı formülü ve molekül ağırlığı saptanmıştır QTOF: [M+H]⁺, *bulunan* 355,1532; C₁₉H₂₁N₃O₄; *hesaplanan* 355,15321. Bileşiğin yüzde verim hesabı yapılmış, erime noktası tayin edilmiştir. Bileşiğin kimyasal formülü: C₁₉H₂₁N₃O₄; M.A.:355.39 g/mol.; verim 0.332g (81%) ve e.n.:118.7 °C olarak bulunmuştur (**Tablo 3.1**).

Spektrumların analizlerinin değerlendirilmesi ile bileşik **3b** IUPAC adlandırma sistemine göre adlandırılarak '5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid' olarak belirlenmiştir.



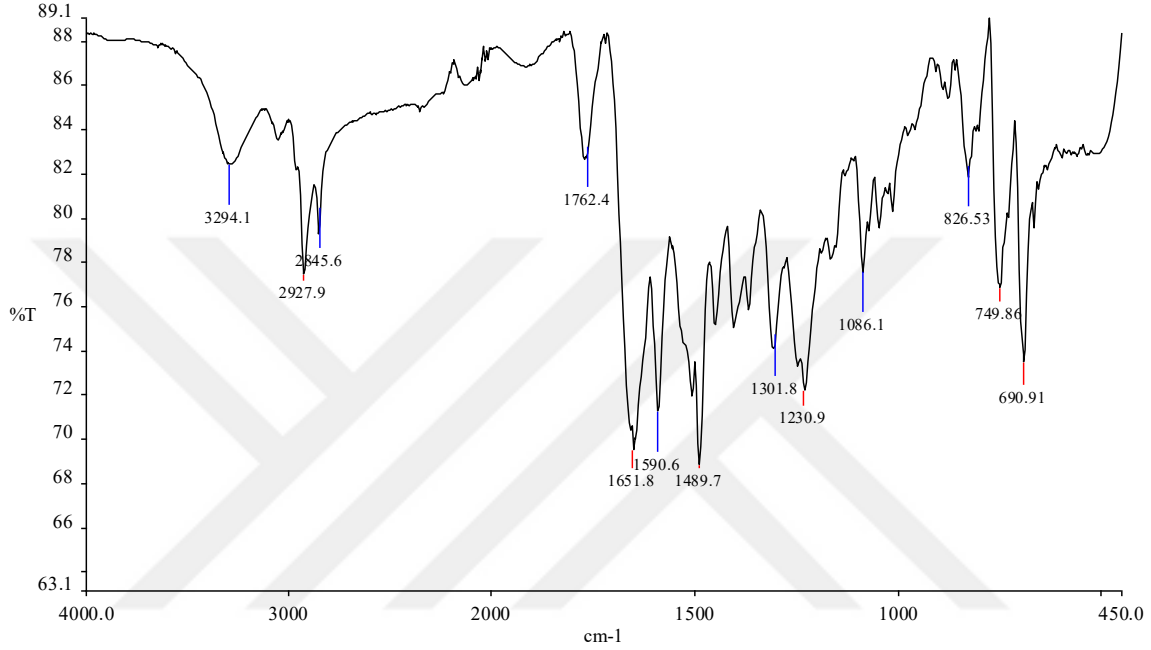
Şekil 3.6. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid (**3b**) Bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.

3.1.3. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karbotiyoamid (**3c**)

Stokiyometrik oranlar Bölüm 2.3.1.4'de sunulmuştur. Buna göre (**3**) bileşiği ve tiyo semikarbazit etanolik sodyum hidroksit çözeltisinde çözülerek geri soğutucu sistemde ısıtılıp, yeni ürünün varlığı ve saflığı TLC ile takip ve kontrol edilip, bu sürenin sonunda ortama buz atılarak oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı süzülerek alınmış ve safsızlıkların giderilmesi için etil alkolle kristallendirilmiştir.

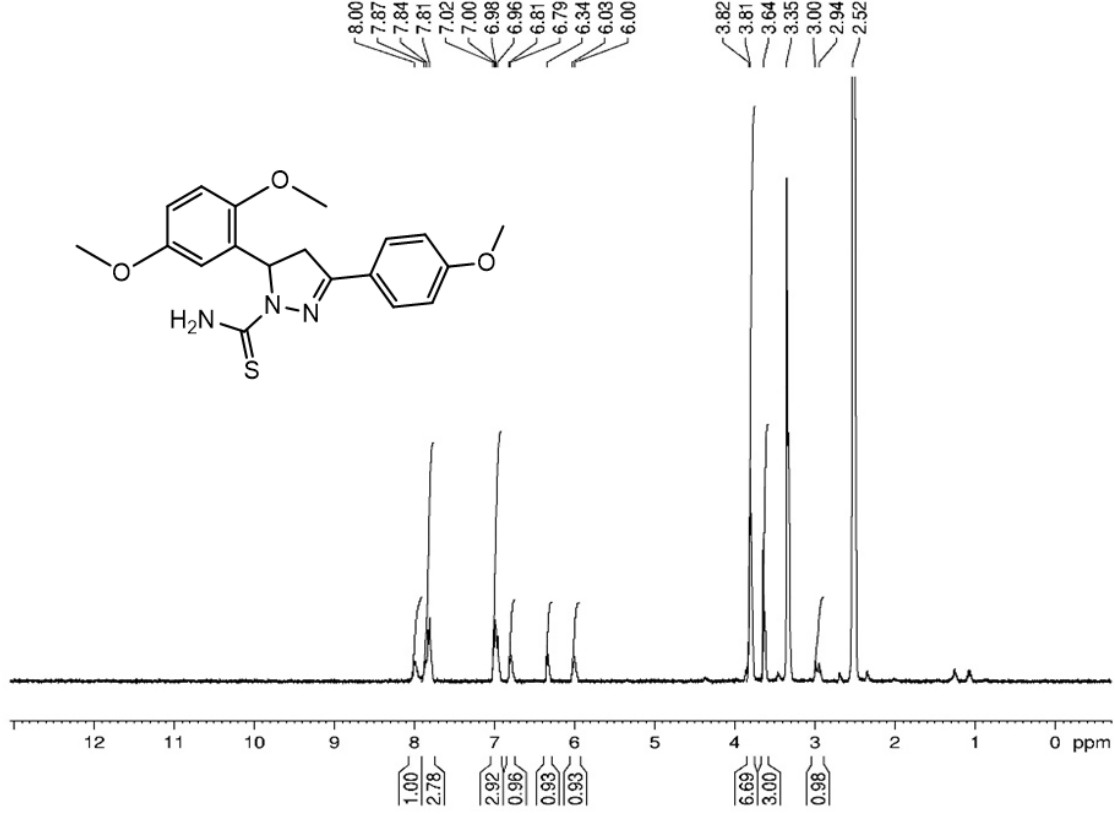
Bileşiğin karakterizasyonu için FTIR (Şekil 3.7), ¹H-NMR (Şekil 3.8), ¹³C-NMR (Şekil 3.9)

analizleri yaptırılmış olup; spektral analizlere ait grafikler incelendiğinde gözlenen piklerin kaynaklarda belirtilen spektrumlarla benzer olduğu görülmüştür [43, 44, 52, 55, 64].



Şekil 3.7. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karbotiyoamid (**3c**) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.

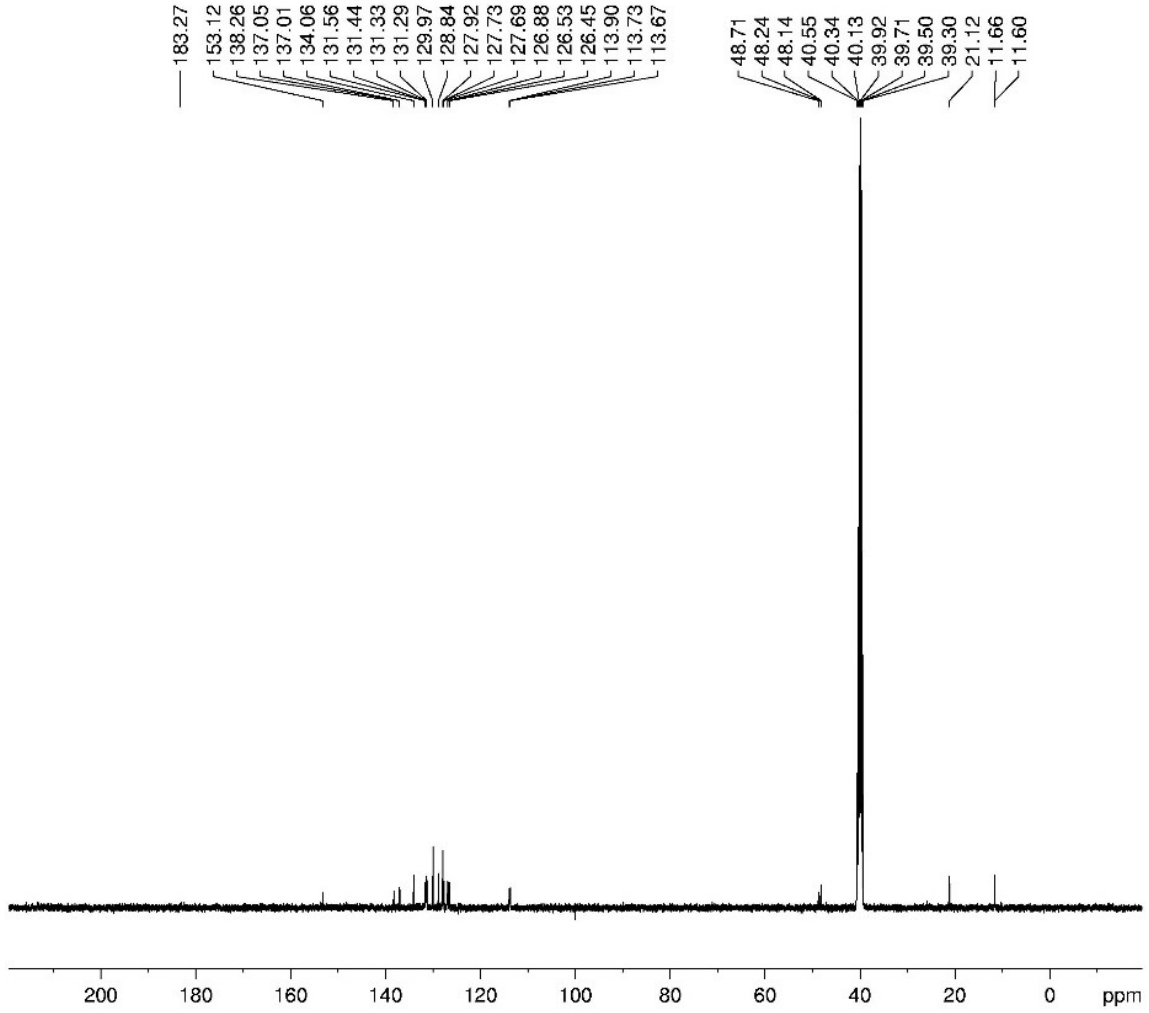
Bileşik **3c**'ye ait FTIR (ATR) spektrumu (Şekil 3.7) incelendiğinde karbotiyo grubuna bağlı -NH₂'nin 3294.1 cm⁻¹'de (-NH), aromatik halkalara ait piklerin 2927.9 cm⁻¹'de (Ar-CH), alifatik -CH gerilimlerinin ise 2845.6 cm⁻¹'de (alifatik -CH), karbotiyo grubuna ait titreşimlerin 1489.7 cm⁻¹'de (C=S) ve 1590.6 cm⁻¹'de (C-NH₂) ve pirazol halkasındaki -C-N- gerilimlerinin de 1651.8 cm⁻¹'de (C=N) verdiği görülmüştür.



Şekil 3.8. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karbotiyoamid (**3c**) Bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.

Şekil 3.8’de görülen 3c bileşiğinin ¹H-NMR (δ) spektrumu incelendiğinde pirazol halkasındaki protonların 2.94, 6.00-6.98 ppm’de (1H, –CH; 2H, –CH₂); metoksi gruplarındaki protonların 3.64-3.82 ppm aralığında (9H, –OCH₃) ve aromatik halkadaki protonların ise 8.00-7.00 ppm (7H, Ar–H) aralığında pik verdiği görülmüştür. Spektrumdaki entegrasyonlar karşılaştırıldığında proton sayılarının uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Bileşik 3c’nin Şekil 3.9’da verilen ¹³C-NMR (δ) spektrumuna göre metoksi gruplarındaki karbonların 39.92-40.34 ppm’de (3C, –OCH₃), pirazol halkasındaki karbonların 48.71 ppm (1C,–CH₂), 48.24 ppm (1C,–CH) ve 138.26 ppm (1C, C=N), aromatik karbonların ise 113.67-137.05 ppm aralığında (12C, Ar–C) ve karbotiyo grubunun karbon atomunun da 183.27 ppm’de (1C, C=S) pik verdiği görülmüştür.



Şekil 3.9. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karbotiyoamid (**3c**) Bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.

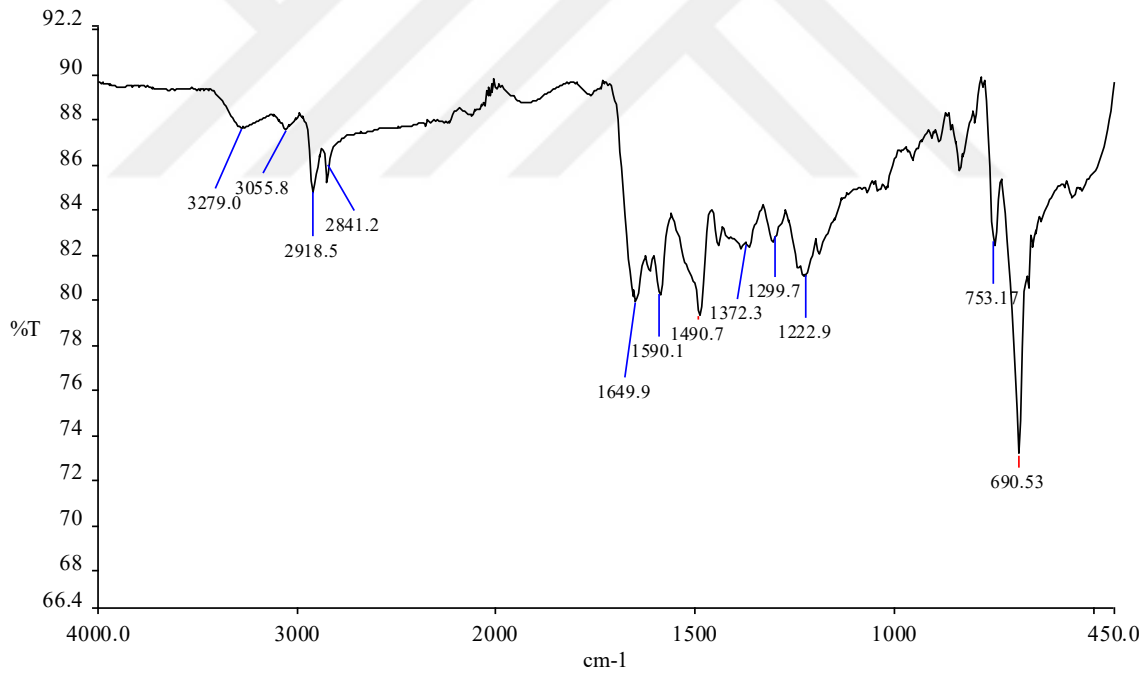
QTOF analiz sonuçlarına göre bileşiğin kapalı formülü ve molekül ağırlığı saptanmıştır; QTOF: [M+H]⁺, *bulunan* 371.1301; C₁₉H₂₁N₃O₃S; *hesaplanan* 371,1303. Bileşiğin yüzde verim hesabı yapılmış ve erime noktası tayin edilmiştir. Bileşiğin kimyasal formülü: C₁₉H₂₁N₃O₃S; M.A.:371.49 g/mol.; verim 0.4g (66.7%) ve e.n. 206.7 °C olarak bulunmuştur (**Tablo 3.1**).

Spektrumların analizlerinin değerlendirilmesi ile bileşik **3c**'nin IUPAC adlandırma sistemine göre adlandırılarak '5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karbotiyoamid' olarak belirlenmiştir.

3.1.4. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-N-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karboksi amid (3d)

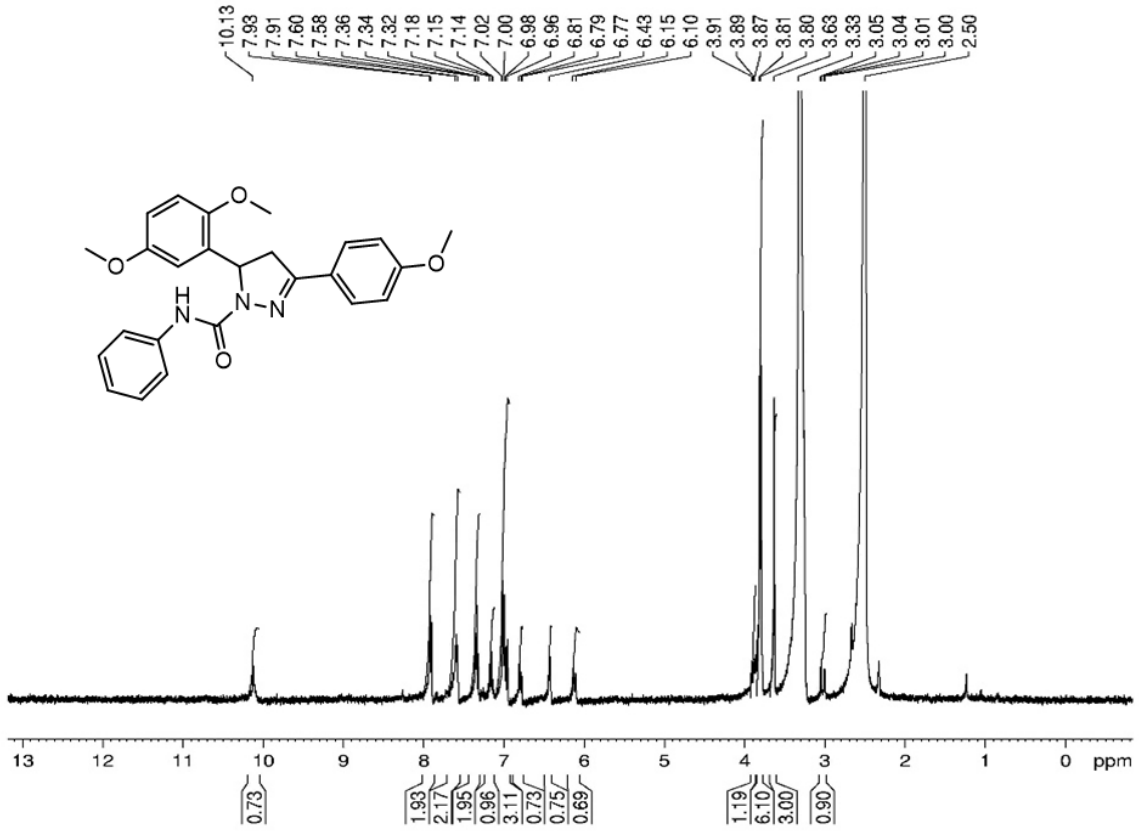
Stokiyometrik oranlar Bölüm 2.3.1.5’de sunulmuştur. Buna göre (3) bileşiği ve 4’fenil semikarbazit etanolik sodyum hidroksit çözeltisinde çözülerek geri soğutucu sistemde ısıtılıp, yeni ürünün varlığı ve saflığı TLC ile takip ve kontrol edilmiştir ve bu sürenin sonunda ortama buz atılarak oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı süzülerek alınmış ve safsızlıkların giderilmesi için etil alkolle kristallendirilmiştir.

Bileşiğin karakterizasyonu için FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR analizleri yaptırılmış olup; spektral analizlere ait grafikler incelenmiş olup, spektral analizlere ait grafikler incelendiğinde gözlenen piklerin kaynaklarda belirtilen spektrumlarla benzer olduğu görülmüştür [43, 44, 52, 55, 64].



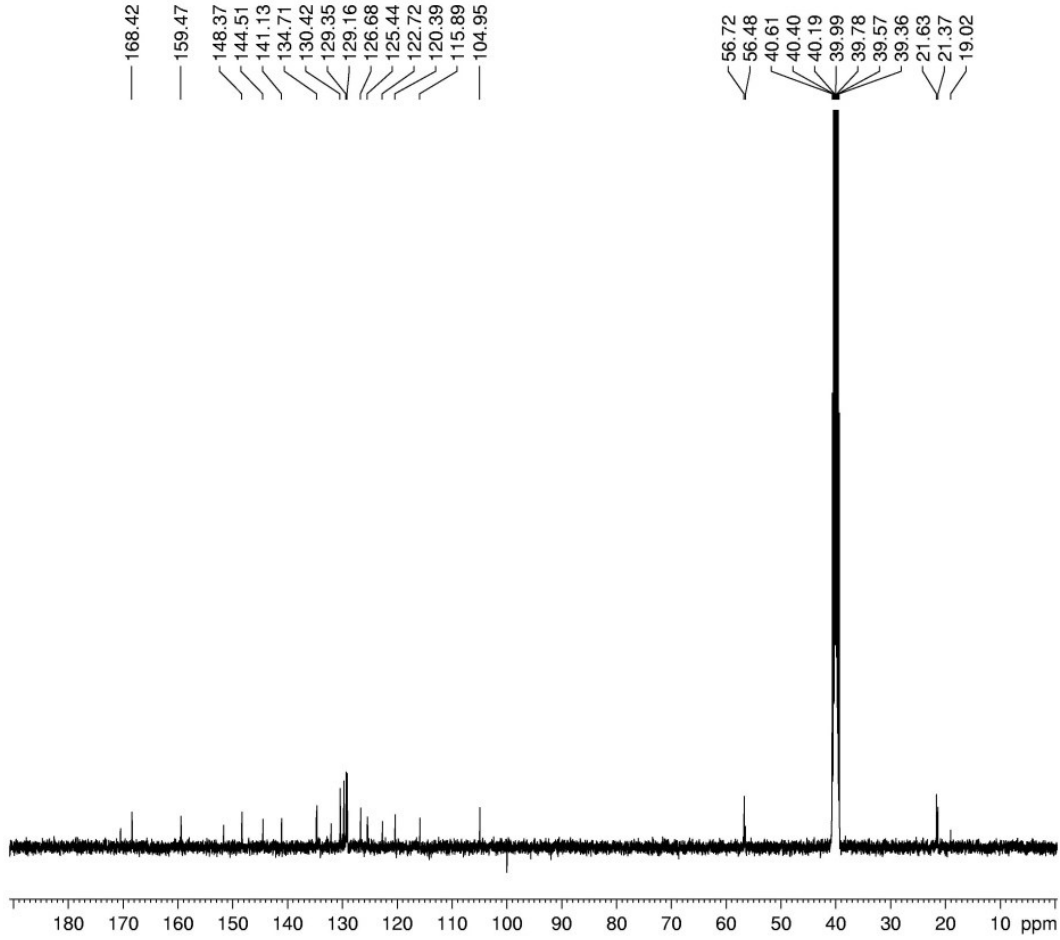
Şekil 3.10. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-N-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karboksi amid (3d) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.

Bileşik 3d’ye ait FTIR (ATR) spektrumu (Şekil 3.10) incelendiğinde karbonil grubuna bağlı -NH₂’nin 3279.0 cm⁻¹’de (-NH), aromatik halkalara ait piklerin 3055.8, 2918.5 cm⁻¹’de (Ar-CH), alifatik -CH gerilimlerinin ise 2841.2 cm⁻¹’de (alifatik -CH), karbonil grubuna ait titreşimlerin 1649.9 cm⁻¹’de (C=O) ve pirazol halkasındaki -C-N- gerilimlerinin de 1590.0 cm⁻¹’de (C=N) ve 1490.1 cm⁻¹’de (C-N) verdiği görülmüştür.



Şekil 3.11. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-N-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid (**3d**) Bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.

Şekil 3.11'de görülen **3d** bileşiğinin ¹H-NMR (δ) spektrumu incelendiğinde pirazol halkasındaki protonların 10.13 ppm (1H, -CH) ve 3.91,3.33 ppm'de (2H, -CH₂); metoksi gruplarındaki protonların 3.63-3.81 ppm aralığında (9H, -OCH₃) ve aromatik halkadaki protonların ise 6.10-7.93 ppm (12H, Ar-H) aralığında pik verdiği görülmüştür. Spektrumdaki entegrasyonlar karşılaştırıldığında proton sayılarının uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.12. 5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-N-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid (**3d**) Bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumu.

Bileşik **3d**'nin Şekil 3.12'de verilen ^{13}C -NMR (δ) spektrumuna göre metoksi gruplarındaki karbonların 19.02-21.63 ppm'de (3C, $-\text{OCH}_3$), pirazol halkasındaki karbonların 170.52 ppm (1C, C=N) ve 40.19 ve 56.72 ppm'de (2C, C-N; -C-C), aromatik karbonların ise 104.95-168.42 ppm aralığında (18C, Ar-C) ve karbonil grubunun karbon atomunun da 191.78 ppm'de (1C, C=O). pik verdiği görülmüştür.

QTOF analiz sonuçlarına göre bileşiğin kapalı formülü ve molekül ağırlığı saptanmıştır; QTOF: $[M+H]^+$, bulunan 431.18557; $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$; hesaplan 431.18451. Bileşiğin yüzde verim hesabı yapılmış, erime noktası tayin edilmiştir. Bileşiğin kimyasal formülü: $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$; M.A.:431.49 g/mol.; verim 0.324g (72%) ve e.n. 167.2 °C olarak bulunmuştur (**Tablo 3.1**).

Spektrumların analizlerinin değerlendirilmesi ile bileşik **3d**'nin IUPAC adlandırma sistemine göre adlandırılarak '5-(2,5-dimetoksifenil)-3-(4-metoksifenil)-N-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid' olarak belirlenmiştir.

3.1.5. (*E*)-3-(3-(3,5-dimetoksifenil)akril)-4-hidroksi-2*H*-kumarin-2-on (7)

Stokiyometrik oranlar Bölüm 2.3.1.6'de sunulmuştur. Buna göre 4'-hidroksi kumarin (4) bileşiği asetik asitte geri soğutucu sisteme takılarak ısıtıldıktan sonra POCl₃ eklenerek oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı madde (5) süzülerek alınmış ve soğuk etil alkol ile yıkanmıştır. Bileşik (5) ve 3,5'-dimetoksi benzaldehit (6) bileşiği sitokiyometrik oraklarda tartılarak alınıp etil alkolde çözüldükten sonra piperidin eklenerek karışmaya bırakılmış, yeni ürünün varlığı ve saflığı TLC ile takip ve kontrol edilmiş. Bu sürenin sonunda çözücü evaporatörden atılarak balona dietil eter eklenip çöken katı ürün süzülerek toplanmıştır.

Bileşiğin karakterizasyonu için FTIR (Şekil 3.13), ¹H-NMR (Şekil 3.14), ¹³C-NMR (Şekil 3.15) analizleri yaptırılmış olup; spektral analizlere ait grafikler incelendiğinde gözlenen piklerin kaynaklarda belirtilen spektrumlarla benzer olduğu görülmüştür [7, 8, 65, 66].

Bileşik 7'ye ait FTIR (ATR) spektrumu (Şekil 3.13) incelendiğinde kumarin halkasındaki hidroksi grubunun 3086.0 cm⁻¹'de (-OH), aromatik halkalara ait -CH'ların 2881.6 cm⁻¹'de (Ar-CH), alifatik -CH gerilimlerinin ise 1488.2 ve 1417.1 cm⁻¹'de (alifatik -CH), karbonil gruplarına ait titreşimlerin 1624.9-1488.2 cm⁻¹'de (C=O) verdiği görülmüştür.

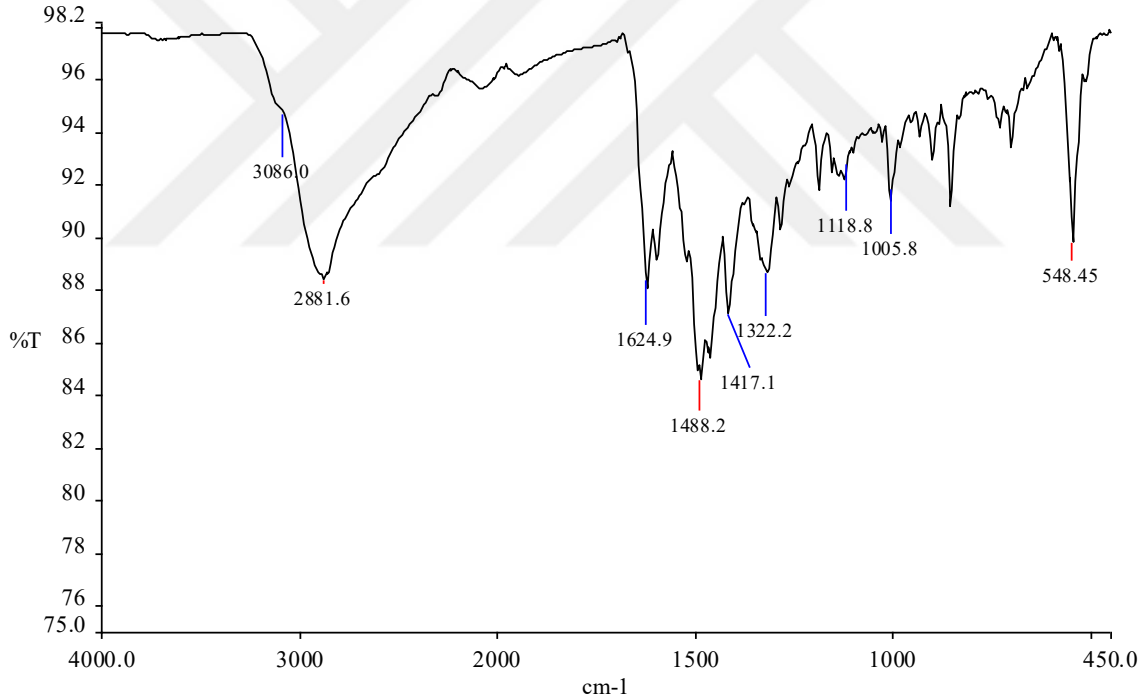
Şekil 3.14'de görülen 7 bileşiğinin ¹H-NMR (δ) spektrumu incelendiğinde α-β doymamış karbonil grubundaki protonların 6.49, 6.73 ppm'de (2H, -CH-CH-); metoksi gruplarındaki protonların 3.77 ppm'de (6H, -OCH₃) ve aromatik halkadaki protonların ise 7.10-8.50 ppm (7H, Ar-H) aralığında pik verdiği görülmüştür. Spektrumdaki entegrasyonlar karşılaştırıldığında proton sayılarının uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Bileşik 7'nin Şekil 3.15'de verilen ¹³C-NMR (δ) spektrumuna göre metoksi gruplarındaki karbonların 39.88,40.09 ppm'de (2C, -OCH₃), α,β doymamış karbonil grubundaki karbonların 143.25,123.81 ppm (2C,-CH), aromatik karbonların ise 124.10-135.83 ppm aralığında (14C, Ar-C) ve karbonil gruplarının karbon atomlarının da 158.97, 190.02 ppm'de

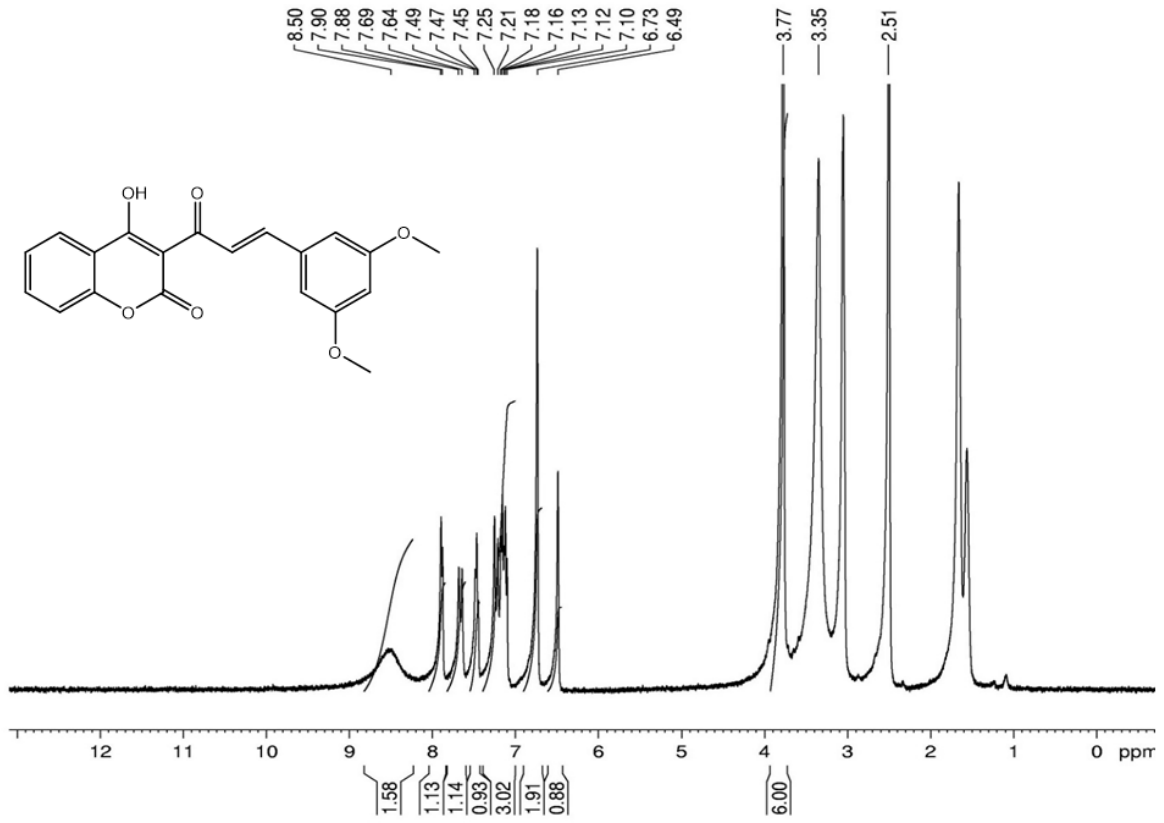
(2C, C=O) pik verdiği görülmüştür.

QTOF analiz sonuçlarına göre bileşiğin kapalı formülü ve molekül ağırlığı saptanmıştır; QTOF: $[M+H]^+$, bulunan 352,09477; $C_{20}H_{16}O_6$, hesaplanan 352,09469. Bileşiğin yüzde verim hesabı yapılmış, erime noktası tayin edilmiştir. Bileşiğin kimyasal formülü: $C_{20}H_{16}O_6$; M.A.:352.34 g/mol.; verim 0.435g (87%) ve e.n. 195.0 °C olarak bulunmuştur (**Tablo 3.1**).

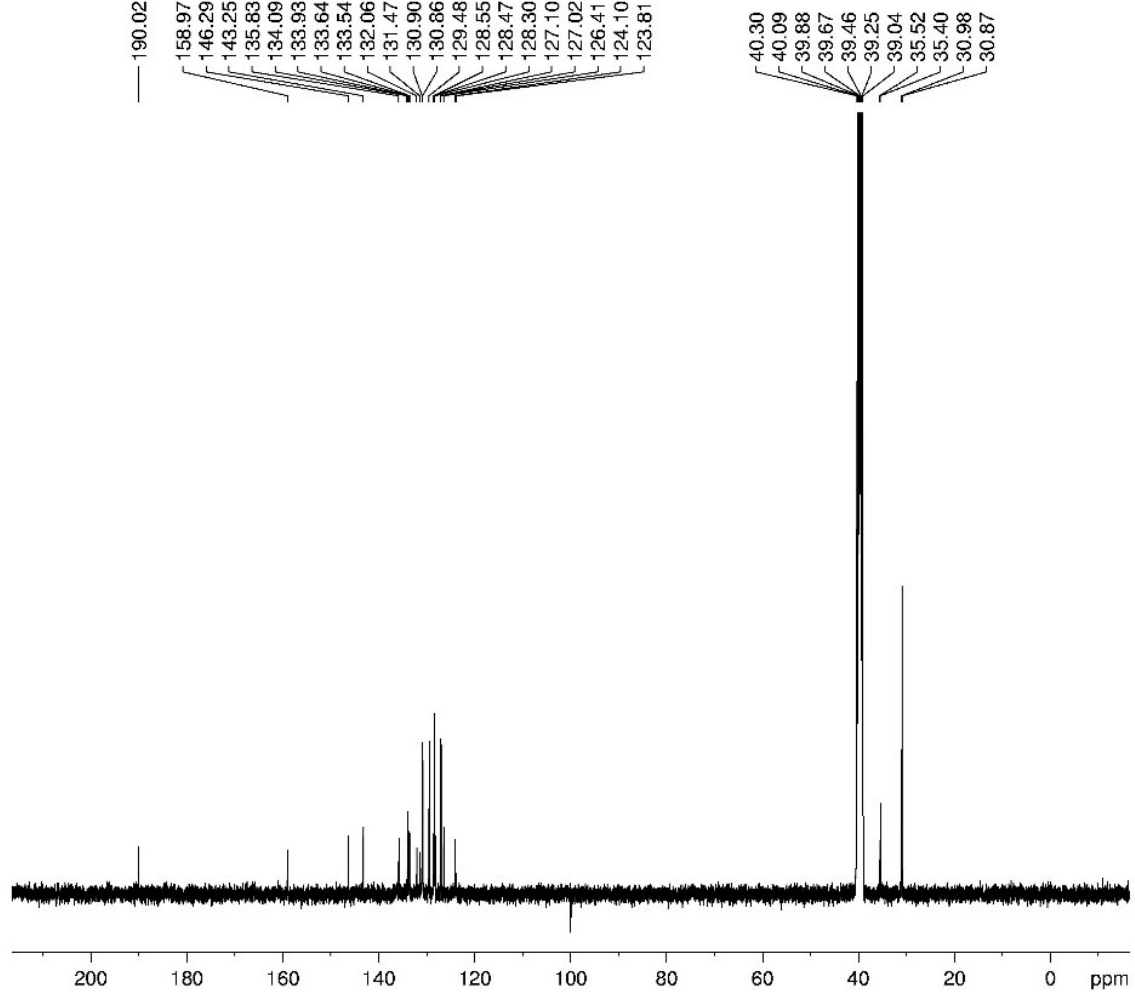
Spektrumların analizlerinin değerlendirilmesi ile bileşik 7'nin IUPAC adlandırma sistemine göre adlandırılarak '(E)-3-(3-(3,5-dimetoksifenil)akril)-4-hidroksi-2H-kumarin-2-on' olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.13. (E)-3-(3-(3,5-dimetoksifenil)akril)-4-hidroksi-2H-kumarin-2-on (7) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.



Şekil 3.14. (E)-3-(3-(3,5-dimetoksifenil)akril)-4-hidroksi-2H-kumarin-2-on (7) Bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



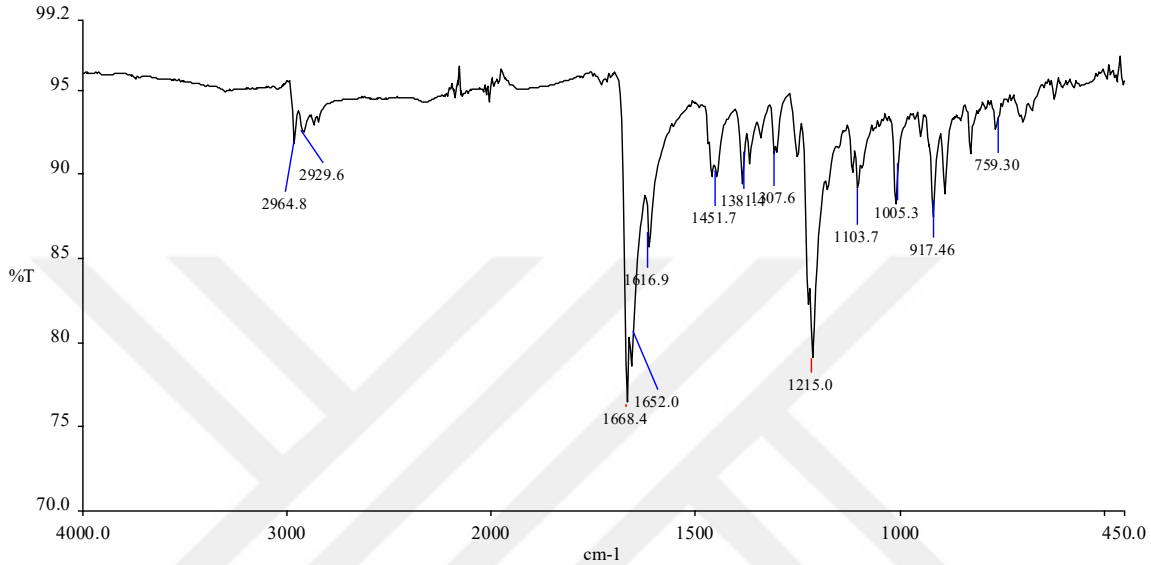
Şekil 3.15. (*E*)-3-(3-(3,5-dimetoksifenil)akril)-4-hidroksi-2*H*-kumarin-2-on (7) Bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.

3.1.6. 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-3-yl)-4-hidroksi-2*H*-kumarin-2-on (7a)

Stokiyometrik oranlar Bölüm 2.3.1.7’de sunulmuştur. Buna göre (7) bileşiği ve fenilhidrazin etil alkolde çözülerek geri soğutucu sistemde ısıtılıp, yeni ürünün varlığı ve saflığı TLC ile takip ve kontrol edilmiştir ve bu sürenin sonunda ortama buz atılarak oda sıcaklığında karışmaya bırakılmış, çöken katı süzülerek alınmış ve safsızlıkların giderilmesi için etil alkolle kristallendirilmiştir.

Bileşiğin karakterizasyonu için FTIR (Şekil 3.16), ¹H-NMR (Şekil 3.17), ¹³C-NMR (Şekil

3.18) analizleri yaptırılmış olup; spektral analizlere ait grafikler incelenmiş olup, spektral analizlere ait grafikler incelendiğinde gözlenen piklerin kaynaklarda belirtilen spektrumlarla benzer olduğu görülmüştür [7, 8, 65, 66].



Şekil 3.16. 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-yl)-4-hidroksi-2H-kumarin-2-on (**7a**) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.

Bileşik **7a**'ye ait FTIR (ATR) spektrumu (Şekil 3.16) incelendiğinde kumarin halkasındaki hidroksi grubunun 2964.8 cm^{-1} 'de (-OH), aromatik halkalardaki titreşimlerin 2929.6 cm^{-1} 'de (Ar-CH), pirazol halkasının $1662.0-1616.9 \text{ cm}^{-1}$ 'de (C-N ve C=N) ve karbonil grubunun 1668.4 cm^{-1} (C=O) ve alifatik gerilimlerin de $1451.7-1215.0 \text{ cm}^{-1}$ (alifatik -CH) pik verdiği görülmüştür.

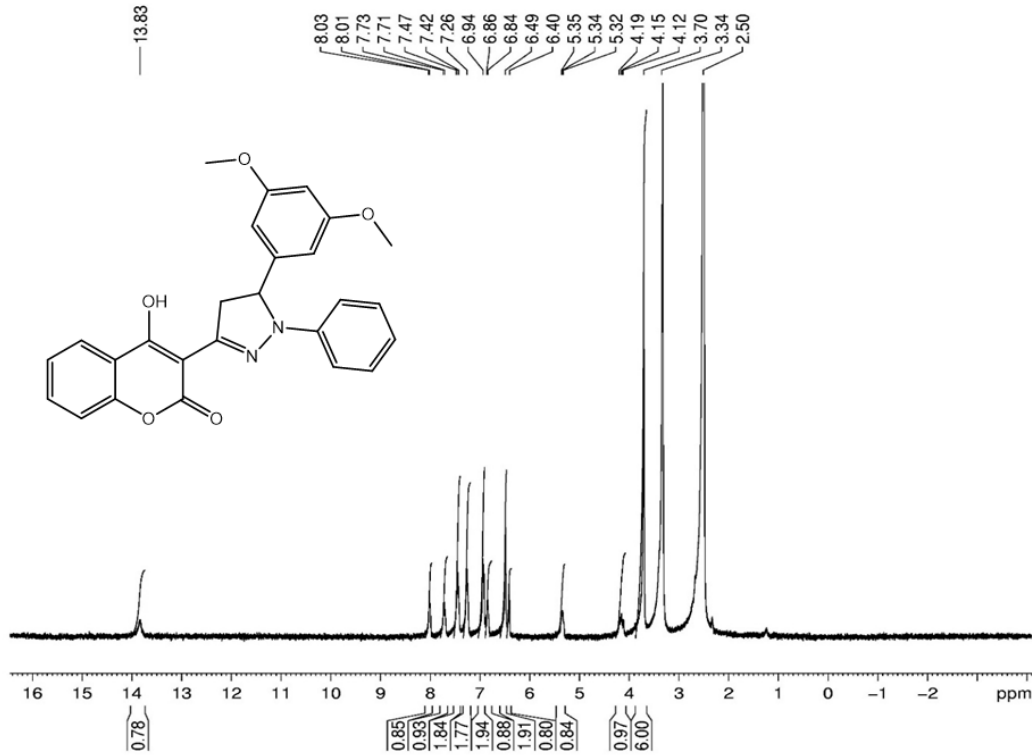
Şekil 3.17'de görülen **7a** bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ (δ) spektrumu incelendiğinde pirazol halkasındaki protonların 4.19, 5.35, 5.40 ppm'de (3H, -CH); metoksi gruplarındaki protonların 4.15-2.50 ppm (6H, -OCH₃) ve aromatik halkadaki protonların ise 6.49-8.03 ppm (12H, Ar-H) aralığında pik verdiği görülmüştür. Spektrumdaki entegrasyonlar karşılaştırıldığında proton sayılarının uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Bileşik **7a**'nin (Şekil 3.18)'de verilen $^{13}\text{C-NMR}$ (δ) spektrumuna göre metoksi gruplarındaki karbonların 21.52 ppm'de (2C, -OCH₃), pirazol halkasındaki karbonların 174.46 ppm (1C, C=N) ve 42.68 ve 59.15 ppm'de (2C, -C-N; -C-C), aromatik karbonların ise 123.88-145.72 ppm aralığında (2°C, Ar-C) ve karbonil grubunun karbon atomunun da 176.64 ppm'de (1C,

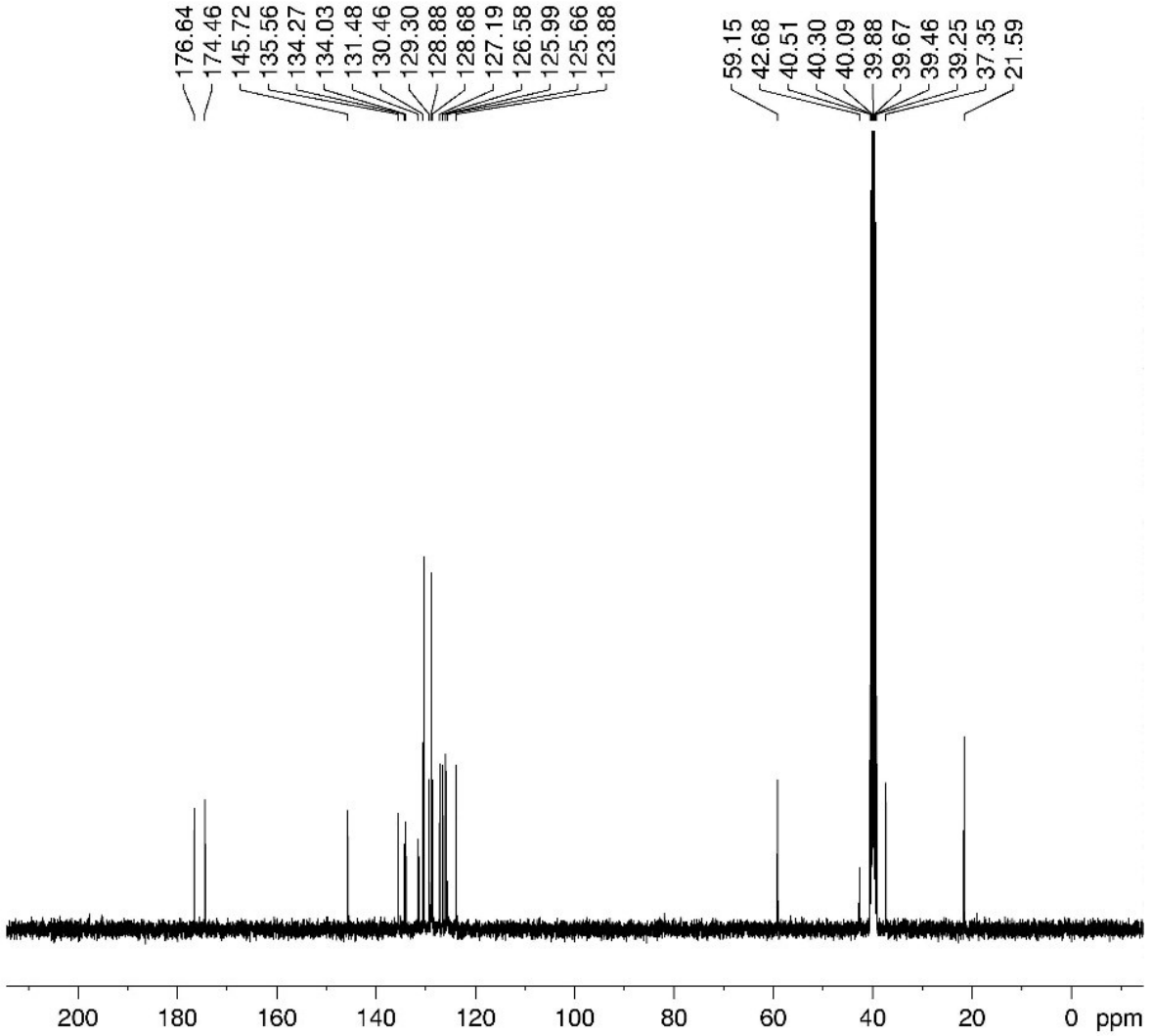
C=O) pik verdiği görülmüştür.

QTOF analiz sonuçlarına göre bileşiğin kapalı formülü ve molekül ağırlığı saptanmıştır; QTOF: [M+H]⁺, bulunan 442.15272; C₂₆H₂₂N₂O₅; hesaplanan 442,152887. Bileşiğin yüzde verim hesabı yapılmış, erime noktası tayin edilmiştir. Bileşiğin kimyasal formülü:C₂₆H₂₂N₂O₅; M.A.:442.47 g/mol.; verim 0.220g (78.57%) ve e.n. 211.2 °C olarak bulunmuştur (**Tablo 3.1**).

Spektrumların analizlerinin değerlendirilmesi ile bileşik **7a**'nın IUPAC adlandırma sistemine göre adlandırılarak '3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-yl)-4-hidroksi-2H-kumarin-2-on' olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.17. 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-yl)-4-hidroksi-2H-kumarin-2-on (**7a**) Bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.



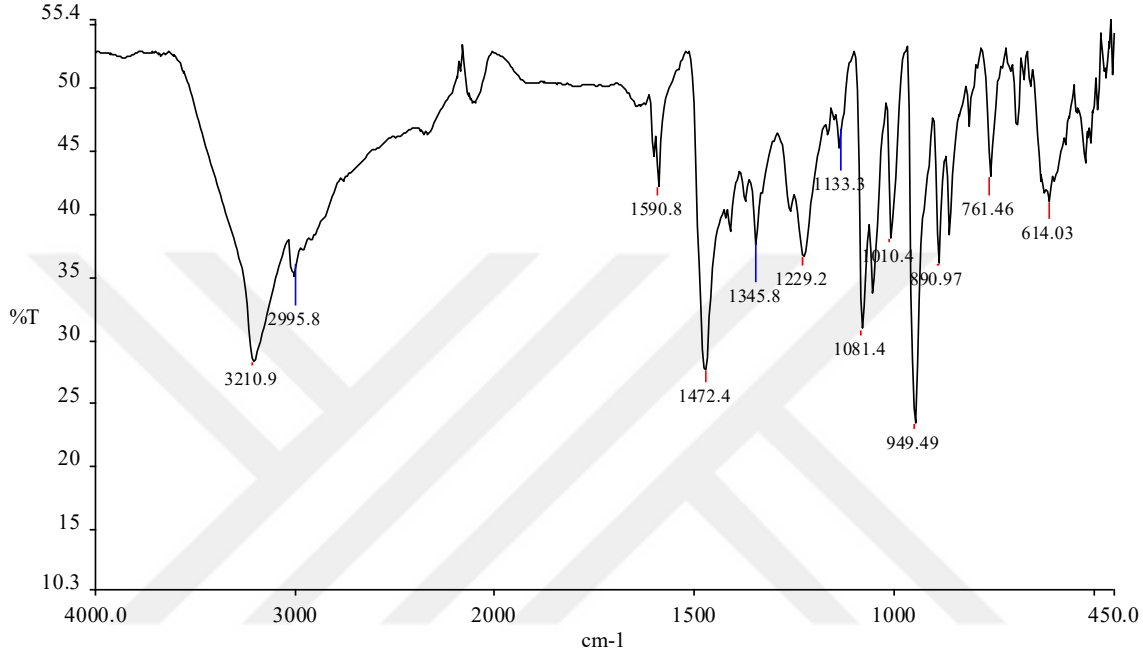
Şekil 3.18. 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-3-yl)-4-hidroksi-2*H*-kumarin-2-on (**7a**) Bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.

3.1.7. 5-(3,5-dimetoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-kumarin-3-yl)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karbotiyo amid (**7b**)

Stokiyometrik oranlar Bölüm 2.3.1.8’de sunulmuştur. Buna göre (**7**) bileşiği ve tiyo semikarbazit etil alkol ve asetik asit karışımında çözülerek geri soğutucu sistemde ısıtılıp, yeni ürünün varlığı ve saflığı TLC ile takip ve kontrol edilmiş ve bu sürenin sonunda ortama buz atılarak oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı süzülerek alınıp safsızlıkların giderilmesi için metil alkolle kristallendirilmiştir.

Bileşiğin karakterizasyonu için FTIR (Şekil 3.19), ¹H-NMR (Şekil 3.20), ¹³C-NMR (Şekil

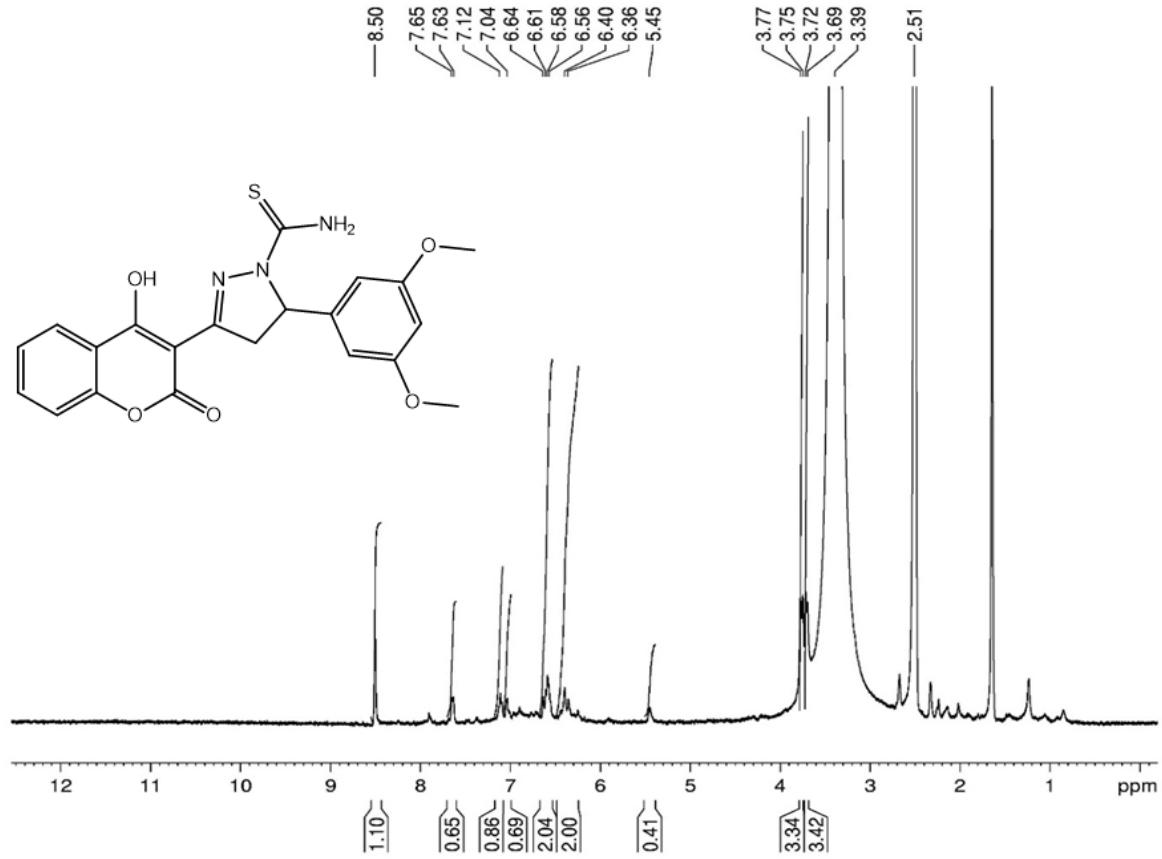
3.21) analizleri yaptırılmış olup; spektral analizlere ait grafikler incelenmiş olup; spektral analizlere ait grafikler incelendiğinde gözlenen piklerin kaynaklarda belirtilen spektrumlarla benzer olduğu görülmüştür [7, 8, 65, 66].



Şekil 3.19. 5-(3,5-dimetoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-kumarin-3-yl)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karbotiyo amid (**7b**) Bileşiğine ait FITR spektrumu.

Bileşik **7b**'ye ait FTIR (ATR) spektrumu (Şekil 3.19) incelendiğinde kumarin halkasındaki hidroksi grubunun 3210.9 cm⁻¹ 'de (-OH), aromatik halkalardaki titreşimlerin 2995.8 cm⁻¹ 'de (Ar-CH), pirazol halkasının 1590.8 cm⁻¹ 'de (C=N) ve karbotiyo grubunun 1472.4 cm⁻¹ (C=S) pik verdiği görülmüştür.

Şekil 3.20'de görülen **7b** bileşiğinin ¹H-NMR (δ) spektrumu incelendiğinde pirazol halkasındaki protonların 5.45 (1H, -CH) ve 3.39, 3.69 (2H, -CH); metoksi gruplarındaki protonların 2.51-3.7 ppm (6H, -OCH₃) ve aromatik halkadaki protonların ise 6.36-7.12 ppm (7H, Ar-H) aralığında pik verdiği görülmüştür. Spektrumdaki entegrasyonlar karşılaştırıldığında proton sayılarının uyumlu olduğu belirlenmiştir.

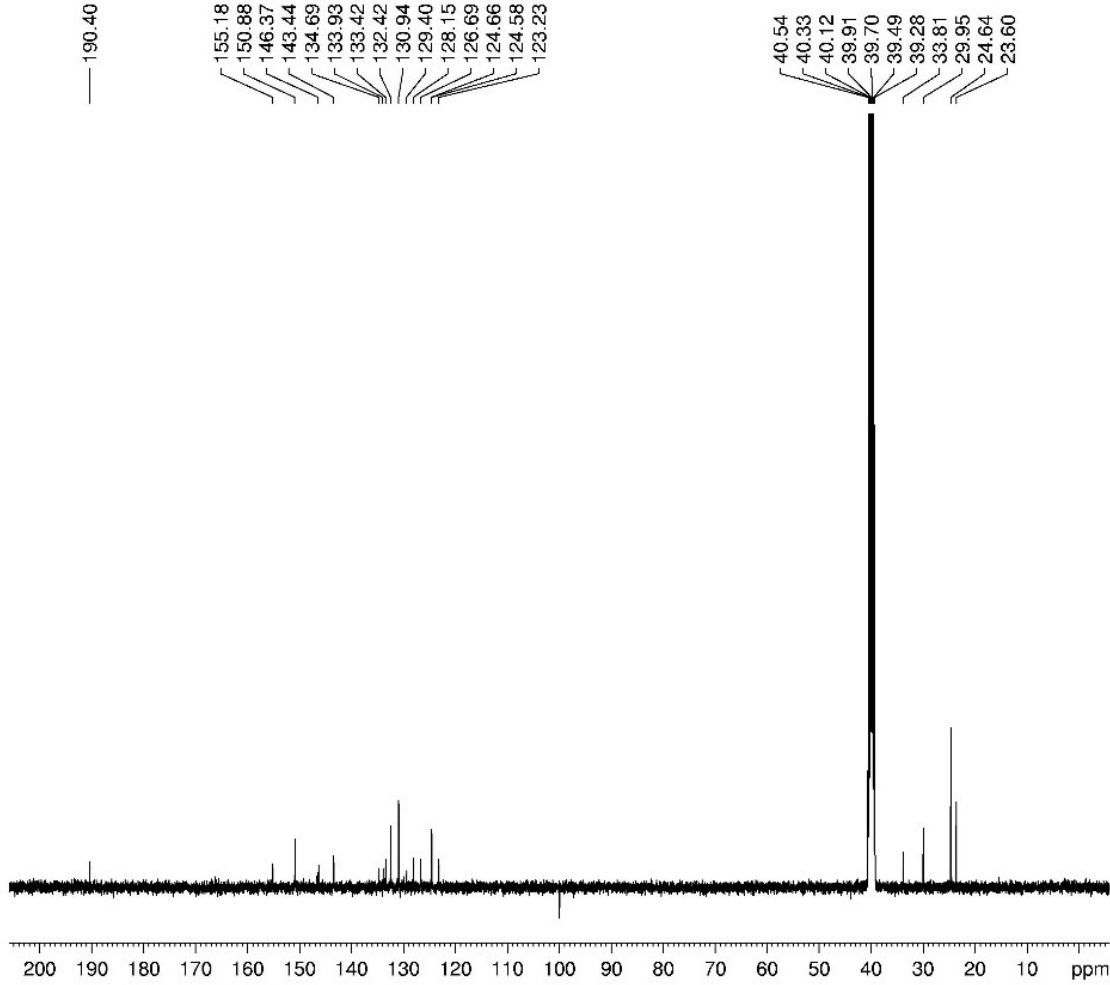


Şekil 3.20. 5-(3,5-dimetoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-kumarin-3-yl)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karbotiyo amid (**7b**) Bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.

Bileşik **7b**'nin **Şekil 3.21**'de verilen ¹³C-NMR (δ) spektrumuna göre metoksi gruplarındaki karbonların 39.91,39.70 ppm'de (2C, -OCH₃), pirazol halkasındaki karbonların 150.88 ppm (1C, C=N) ve 40.33ve 40.54 ppm'de (2C,-C-N; -C-C), aromatik karbonların ise 146.37-123.23 ppm aralığında (14C, Ar-C) ve karbotiyo grubunun karbon atomunun 155.18 ppm'de (1C,C=S), kumarin halkasındaki karbonil grubundaki karbon atomunun da 190.40 ppm'de (1C,C=O) pik verdiği görülmüştür.

QTOF analiz sonuçlarına göre bileşiğin kapalı formülü ve molekül ağırlığı saptanmıştır; QTOF: [M+H]⁺, *bulunan* 425.10579; C₂₁H₁₉N₃O₅S; *hesaplanan* 425.10454. Bileşiğin yüzde verim hesabı yapılmış, erime noktası tayin edilmiştir. Bileşiğin kimyasal formülü: C₂₁H₁₉N₃O₅S; M.A.:425.26g/mol.; verim 0.2g (80%) ve e.n. 162.3°C olarak bulunmuştur (**Tablo 3.1**).

Spektrumların analizlerinin değerlendirilmesi ile bileşik **7b**'nin IUPAC adlandırma sistemine göre adlandırılarak '5-(3,5-dimetoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-kumarin-3-yl)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karbotiyo amid' olarak belirlenmiştir.



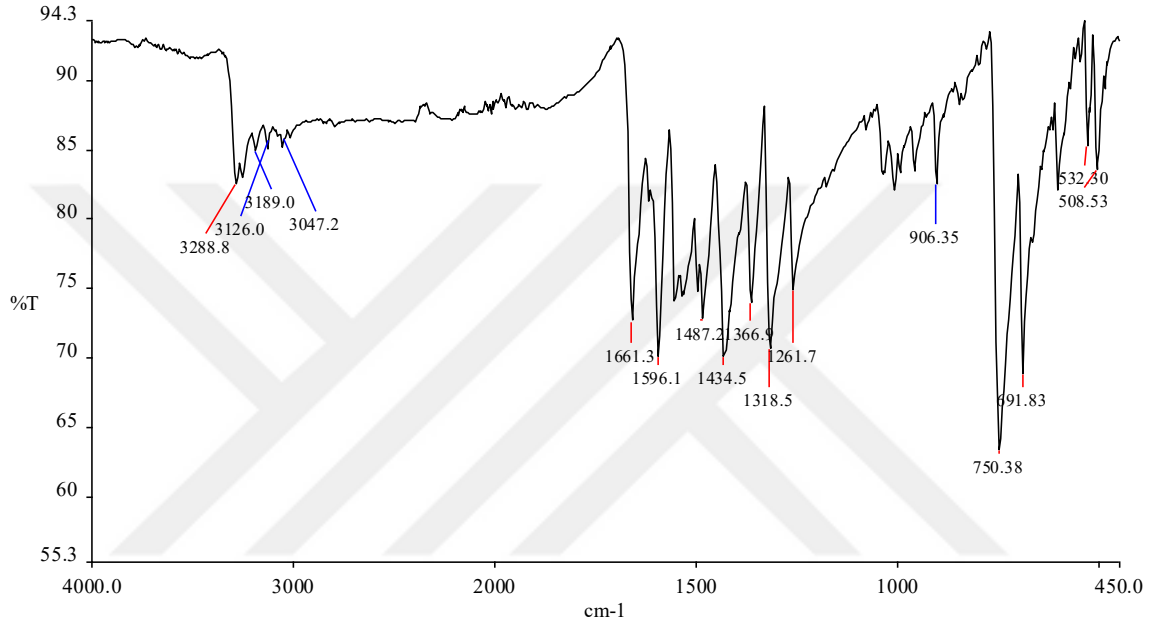
Şekil 3.21. 5-(3,5-dimetoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-kumarin-3-yl)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karbotiyo amid (**7b**) Bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.

3.1.8. 5-(3,5-dimethoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-kumarin-3-yl)-N-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid (**7c**)

Stokiyometrik oranlar Bölüm 2.3.1.9 'de sunulmuştur. Buna göre (**7**) bileşiği ve 4'-fenil semikarbazit etanolik sodyum (çözeltisinde çözülerek geri soğutucu sistemde ısıtılıp, yeni ürünün varlığı ve saflığı TLC ile takip ve kontrol edilmiş ve bu sürenin sonunda ortama buz atılarak oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Çöken katı süzülerek alınıp ve safsızlıkların

giderilmesi için etil alkolle kristallendirilmiştir.

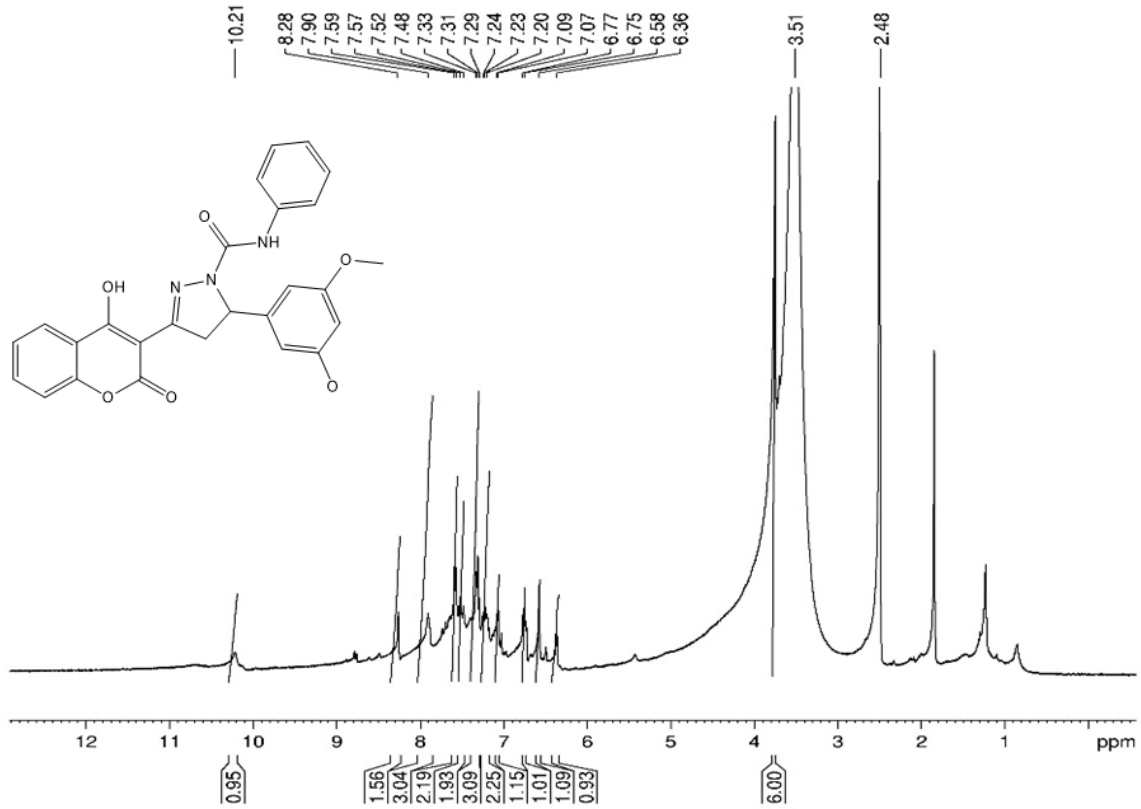
Bileşiğin karakterizasyonu için FTIR (Şekil 3.22), ¹H-NMR (Şekil 3.23), ¹³C-NMR (Şekil 3.24) analizleri yaptırılmış olup; spektral analizlere ait grafikler incelendiğinde gözlenen piklerin kaynaklarda belirtilen spektrumlarla benzer olduğu görülmüştür [7, 8, 65, 66].



Şekil 3.22. 5-(3,5-dimethoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2H-kumarin-3-yl)-N-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karboksi amid (7c) Bileşiğine ait FTIR spektrumu.

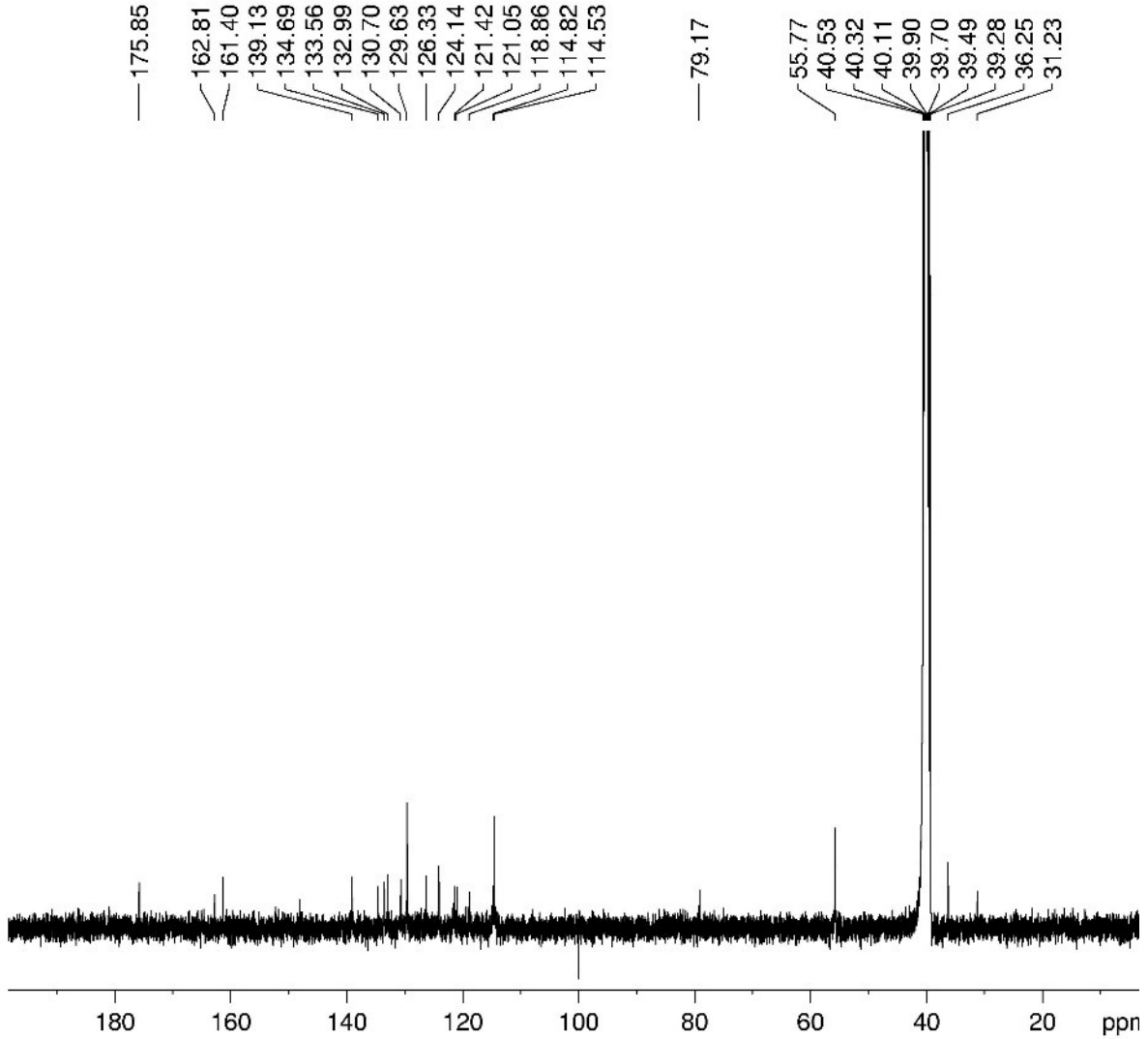
Bileşik 7b'ye ait FTIR (ATR) spektrumu (Şekil 3.22) incelendiğinde kumarin halkasındaki hidroksi grubunun 3288.8 cm^{-1} 'de (-OH), aromatik halkalardaki titreşimlerin 3126.0 , 3189.0 cm^{-1} 'de (Ar-CH), alifatik gerilimlerin 3047.2 cm^{-1} 'de (alifatik -CH), pirazol halkasının 1596.1 cm^{-1} 'de (C=N) ve kumarin halkasındaki karbonil grubunun 1661.3 cm^{-1} 'de (C=O) pik verdiği görülmüştür.

Şekil 3.23'de görülen 7c bileşiğinin ¹H-NMR (δ) spektrumu incelendiğinde pirazol halkasındaki protonların 6.36,6.58 (1H, -CH; 2H, -CH); metoksi gruplarındaki protonların 3.51 ppm (6H, -OCH₃) ve aromatik halkadaki protonların ise 6.75-8.28 ppm (12H, Ar-H) aralığında pik verdiği görülmüştür. Spektrumdaki entegrasyonlar karşılaştırıldığında proton sayılarının uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.23. 5-(3,5-dimethoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-kumarin-3-yl)-*N*-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid (**7c**) Bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu.

Bileşik **7c**'nin **Şekil 3.24**'de verilen ¹³C-NMR (δ) spektrumuna göre metoksi gruplarındaki karbonların 40.11,39.90 ppm'de (2C, -OCH₃), pirazol halkasındaki karbonların 175.85 ppm (1C, C=N) ve 55.77 ve 79.17 ppm'de (2C, -C-N; -C-C), aromatik karbonların ise 114.53-139.13 ppm aralığında (2°C, Ar-C) ve karbonil gruplarındaki karbon atomlarının da 162.81,161.40 ppm'de (2C, C=O) pik verdiği görülmüştür.

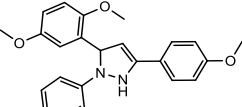
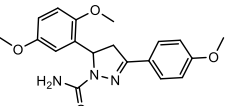
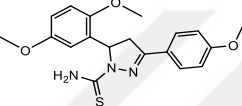
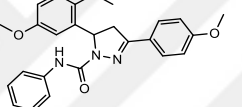
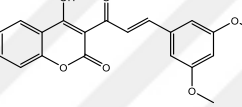
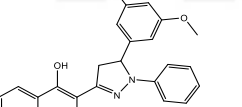
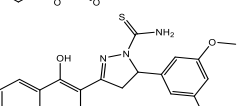
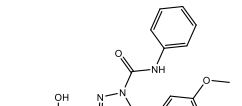


Şekil 3.24. 5-(3,5-dimethoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-kumarin-3-yl)-*N*-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid (**7c**) Bileşiğine ait ¹³C-NMR spektrumu.

QTOF analiz sonuçlarına göre bileşiğin kapalı formülü ve molekül ağırlığı saptanmıştır; QTOF: [M+H]⁺, bulunan 485.18316; C₂₇H₂₃N₃O₆; hesaplanan 485.10023. Bileşiğin yüzde verim hesabı yapılmış, erime noktası tayin edilmiştir. Bileşiğin kimyasal formülü: C₂₇H₂₃N₃O₆, M.A.:485.5 g/mol.; verim 0.19g (67%) ve e.n. 149.1°C olarak bulunmuştur (Tablo 3.1).

Spektrumların analizlerinin değerlendirilmesi ile bileşik **7c**'nin IUPAC adlandırma sistemine göre adlandırılarak '5-(3,5-dimethoksifenil)-3-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-kumarin-3-yl)-*N*-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-karboksi amid' olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Sentezlenen bileşiklerin kapalı formülleri, kodları, molekül ağırlıkları, % verimleri ve erime noktaları.

Kapalı Formül	Bileşikler	M.A.*	%Verim	E.N*.
3a C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₃		388.47	77	105.2
3b C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₄		355.39	81	118.7
3c C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₃ S		371.49	66.7	206.7
3d C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₄		431.49	72	167.2
7 C ₂₀ H ₁₆ O ₆		352.34	87	195.0
7a C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₅		442.47	78.57	211.2
7b C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₅ S		425.26	80	162.3
7c C ₂₇ H ₂₃ N ₃ O ₆		485.5	67	149.1

*M.A.:Molekül ağırlığı (g/mol); E.N.:Erime noktası (°C).

3.2. İnhibisyon Çalışmaları

Pirazol/kumarin iskeletini içeren bileşiklerin inhibisyon etkisi, DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz'ın bilinen inhibitörleri olan sitagliptin, akarboz ve kuersetin ile karşılaştırıldığında özellikle bu enzimlere karşı değişen oranlarda inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Enzimlerin bilinen inhibitörlerine ait IC₅₀ değerlerinin hesaplanması için

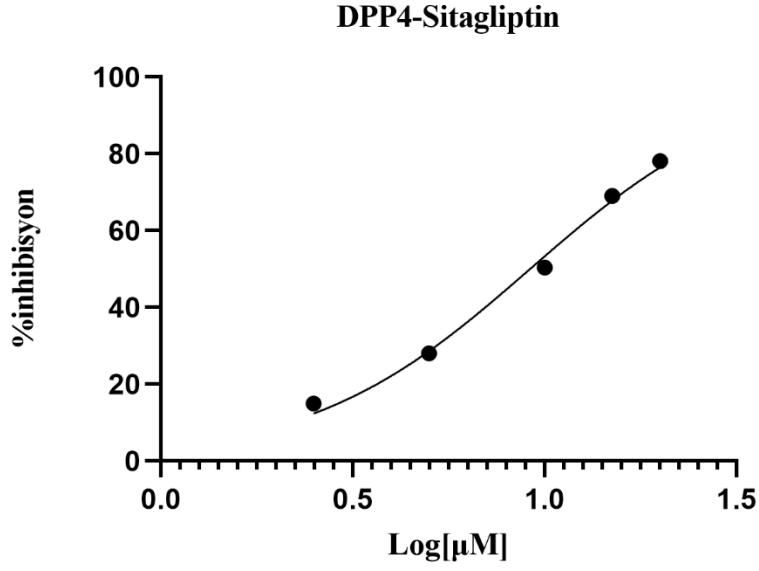
logCye karşı %inhibisyon grafiği çizilmiş elde edilen eğrinin lineer olmayan regresyon analizi yapılmıştır (Şekil 3.25, Şekil 3.26, Şekil 3.27).

Pirazol halkaları içeren (3a), (3b), (3c) ve (3d) bileşiklerinin ve etkin inhibitör özelliğe sahip olduğu bilinen kumarin ve kalkon yapısını içeren bileşik (7) ve kumarin/pirazol halkasını içeren (7a), (7b), (7c) ve (7d) bileşiklerin IC₅₀ değerleri ve standart sapmaları hesaplanmıştır; sonuçlar Tablo 3.2’de verilmiş olup; her bir enzim için ilgili inhibisyon çalışmaları başlığı altında ayrıntılı olarak incelenmiştir.

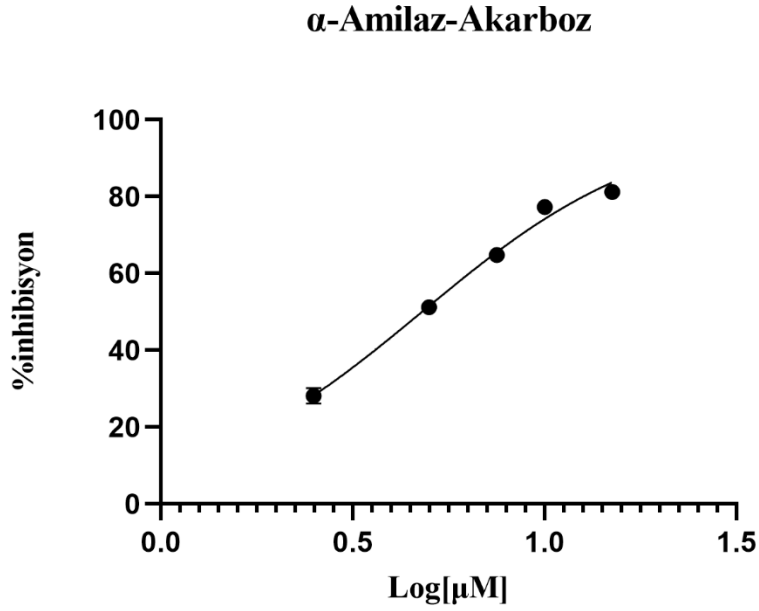
Tablo 3.2. Yeni sentezlenen bileşiklerin ve bilinen inhibitörlerin DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri üzerindeki inhibitör aktivitelerinin *in vitro* deneylerle hesaplanan sonuçları.

Bileşikler	DPP4 IC ₅₀ (μ M) \pm SD*	α -Amilaz IC ₅₀ (μ M) \pm SD*	α -Glukosidaz IC ₅₀ (μ M) \pm SD*
3a	53.03 \pm 1.49	13.49 \pm 1.07	77.49 \pm 1.55
3b	20.08 \pm 1.29	31.81 \pm 1.39	95.61 \pm 1.33
3c	88.72 \pm 1.42	24.72 \pm 1.63	124.8 \pm 0.70
3d	78.91 \pm 1.46	17.61 \pm 1.22	93.82 \pm 0.33
7	45.55 \pm 0.51	77.02 \pm 1.57	101.7 \pm 0.28
7a	22.51 \pm 0.45	16.69 \pm 1.47	91.51 \pm 1.76
7b	89.41 \pm 2.34	70.58 \pm 0.93	89.96 \pm 1.21
7c	73.02 \pm 1.18	22.09 \pm 2.85	82.91 \pm 0.31
Sitagliptin	8.86 \pm 0.43	-	-
Akarboz	-	4.79 \pm 0.16	-
Kuersetin	-	-	26.24 \pm 0.22

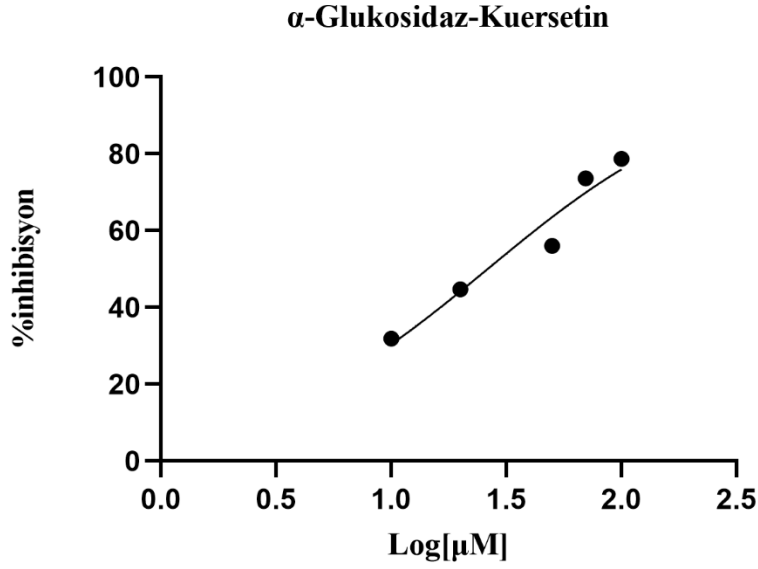
*IC₅₀ değerler üçlü sonuçların ortalaması ve bunların \pm S.D.'si (standart sapmalar) ile verilmiştir.



Şekil 3.25. DPP4 enziminin bilinen inhibitörlerinden Sitagliptin ile %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafiği.



Şekil 3.26. α -Amilaz enziminin bilinen inhibitörlerinden Akarboz ile %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafiği.

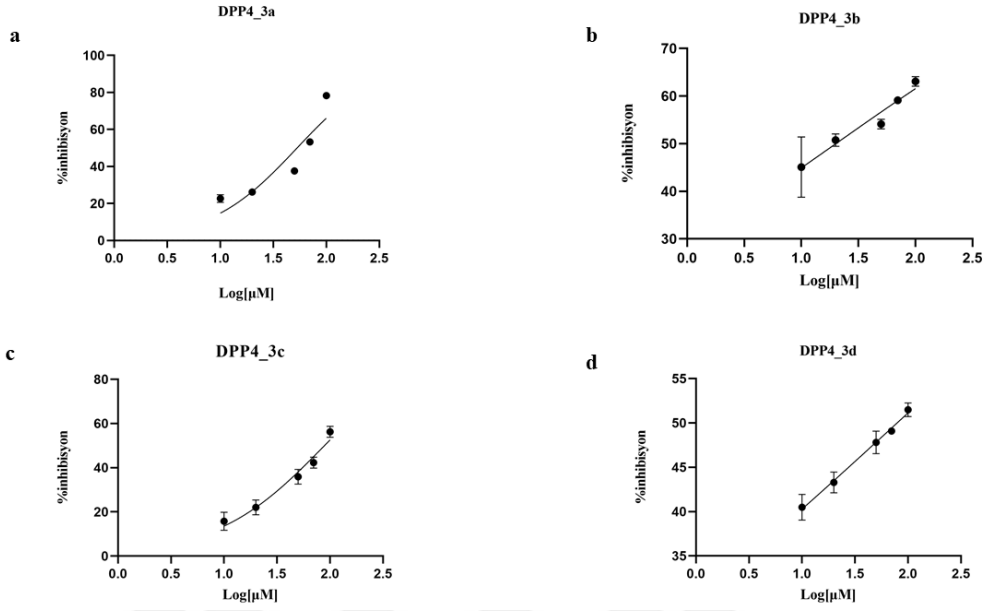


Şekil 3.27. α -Glukosidaz enziminin bilinen inhibitörlerinden Kuersetin ile %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafiği.

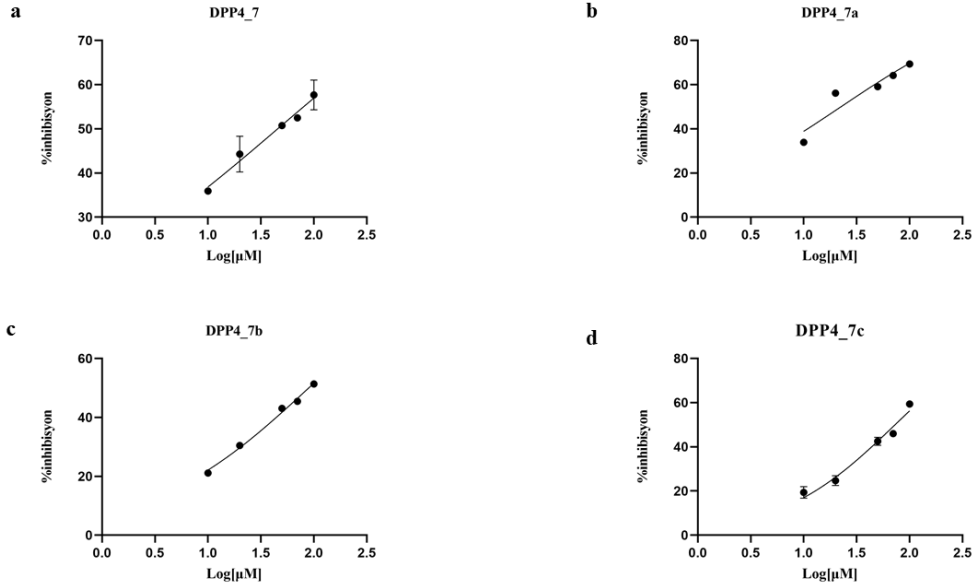
3.2.1. DPP4 İnhibisyon sonuçları

İnhibisyon deneylerinde hesaplanan inhibisyon değerleri ile çizilen %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafiklerinden gelen IC_{50} sonuçları (Şekil 3.28 ve Şekil 3.29) değerlendirilmiş ve Şekil 3.25'de verilen, enzimin bilinen inhibitörü olan sitagliptinin (IC_{50} :8.86 μ M) sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Tablo 3.2). Bileşikler arasında (3b) (IC_{50} :20.08 μ M) ve (7a)'nın (IC_{50} :22.51 μ M), DPP4 enzimi üzerinde belirgin bir inhibe edici aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte bileşik (7b)'nin IC_{50} :89.41 μ M değeri ile en düşük DPP4 inhibitör aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Bileşik (3b)'nin aksine, benzen halkasının amid bağının yerini alması sebebi ile bileşik (3a)'nın IC_{50} değerinde önemli bir azalma olduğu; diğer yandan, bileşik (3b)'deki oksijen atomunun (3c)'deki gibi bir kükürt atomu ile değiştirildiğinde, inhibitör aktivitesinde hafif bir artışa neden olduğu görülmüştür. Amid bağı ve benzen halkası, bileşik (3d)'deki gibi birlikte olduğunda, inhibitör aktivitesi önemli ölçüde azalmıştır (IC_{50} :78,91 μ M). Hem kumarin halkası hem de α,β -doymamış bağına sahip bir kalkan içeren bileşik (7)'nin, kumarin ve pirazol halkası içeren bileşiklere kıyasla daha yüksek bir inhibitör aktivitesine sahip olması beklenirken, kumarin ve pirazol halkalarına sahip bileşik (7a) daha iyi bir inhibitör aktivitesi

göstermiştir (7:IC₅₀:45.55µM ve 7a:IC₅₀:22.51µM). Bileşik (7a)'daki pirazol grubuna bağlı benzen halkası (7b)'de olduğu gibi tiyoamid bağı ile değiştirildiğinde bileşiğin inhibitör aktivitesi azalmıştır (Tablo 3.2). Kumarin, pirazol halkaları ve amid bağının birleşimi olan (7b) ve (7c) bileşikleri önemli bir inhibisyon sağlamamıştır. Çıkarımlarımıza göre, farmakofor olduğu düşünülen bu fonksiyonel grupların ayrı uçlarda bulunduğu daha iyi bir inhibitör aktivitesi verdiği görülmüştür. Özellikle amid bağının DPP4 enzim inhibisyonunda oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, tiyo grubunun inhibisyonda etkisiz olduğu sonucuna varılmıştır. Heterosiklik halka, amid bağı ve kumarin halkası ile birlikte metoksi grupları olan benzen halkası içeren bizim sentezlediğimiz yapılara benzer çalışmalar incelenmiştir. Buna göre Soni ve ark. (2018) [19] DPP4 enzim inhibisyonu için yaptıkları çalışmada 25 µM ve 100 µM konsantrasyonlara seyreltilmiş kumarin halkası ve amid bağı içeren 14 bileşiğin enzim üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Amino grubunun kumarin halkasındaki pozisyonunda yapılan değişiklikler sonuçları etkilemektedir. 3 pozisyonuna bağlı amino grubu içeren bileşikler için %10-35 aralığında inhibisyon elde edilmiş olup benzer şekilde 7 pozisyonuna bağlı amino grubu içeren bileşikler için %10-55 aralığında inhibisyon değerleri verilmiştir. Kumarin kısmındaki amino pozisyonunun 3. pozisyondan 7. pozisyona değişmesi ile inhibisyonda artış kaydedilmiştir. Bununla birlikte yapılara ester gruplarının dahil edilmesi inhibisyon aktivitesinde düşüşe neden olmaktadır. Benzen ve pirazol halkası ile birlikte karbotiyo grubu içeren bileşiklerin DPP4 enzim inhibisyonu için Sever ve ark. (2020) [77] yaptıkları çalışmada bu bileşiklerin inhibitor aktivitelerinin yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca benzen halkasına bağlı olan metoksi gruplarının da inhibisyona etkisinin yüksek olduğu kaydedilmiştir. Bifenil-süstitüe bileşiklerin ise yüzde inhibisyon değerinin düşük olduğu belirtilmiştir.



Şekil 3.28. DPP4 enzimi ile *a*: Bileşik 3a; *b*: Bileşik 3b; *c*: Bileşik 3c ve *d*: Bileşik 3d'nin %inhibisyona karşı log[C]'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.

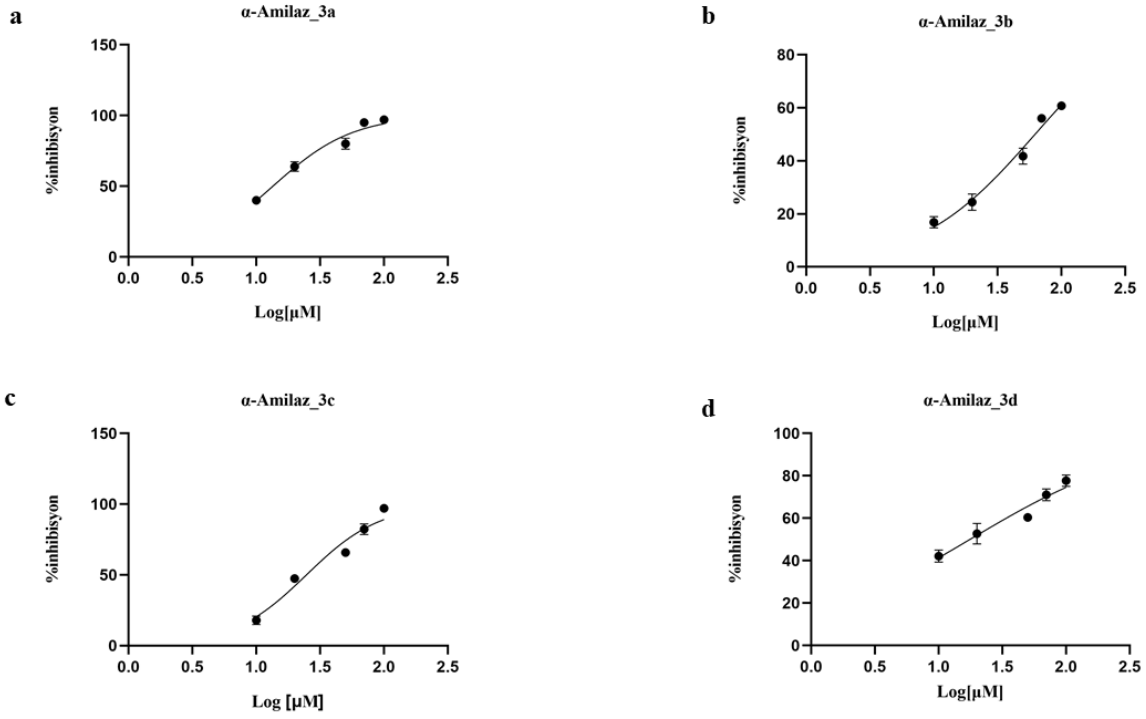


Şekil 3.29. DPP4 enzimi ile *a*: Bileşik 7; *b*: Bileşik 7a; *c*: Bileşik 7b ve *d*: Bileşik 7c'nin %inhibisyona karşı log[C]'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.

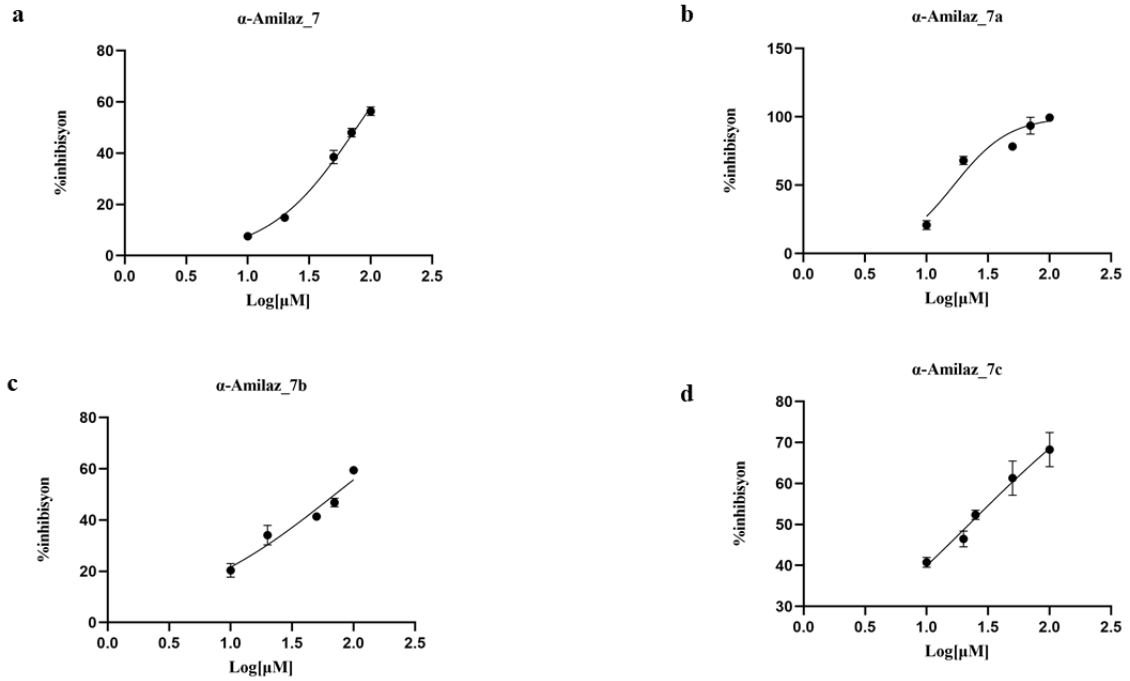
3.2.2. α-Amilaz enzimi inhibisyon sonuçları

İn vitro deneylerde hesaplanan inhibisyon değerleri ile çizilen %inhibisyona karşı log[C]'nin doğrusal olmayan regresyon grafiklerinden (Şekil 3.30 ve Şekil 3.31) elde edilen IC₅₀ sonuçları (Tablo 3.2), ve Şekil 3.26'de verilen grafiğe göre hesaplanan enzimin bilinen

inhibitörü akarbozun ($IC_{50}:4,792\mu M$) inhibisyon sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde bileşikler arasında **(3a)**'nın en yüksek ($IC_{50}:13.49\mu M$) ve **(7)**'nin en düşük inhibitör aktiviteye ($IC_{50}:77.02\mu M$) sahip olduğu görülmüştür. Bileşiklerden **(3a)**, **(3d)**, **(7a)** ve **(7c)** dikkate değer şekilde yüksek inhibitör aktivitesi göstermiştir. Bu durumun bileşik **(3a)** ve **(7a)**'daki pirazol halkasına bağlı bir benzen halkasından ve **(3d)** ve **(7c)**'deki pirazol grubuna bağlı bir amid bağı ve benzen halkasından ileri geldiği düşünülmektedir. Kumarin halkası ve α,β -doymamış karbonil grubu içeren bileşik **(7)**'nin inhibisyon sonuçlarına göre bu bileşiklerin yüksek inhibitör aktivitesi göstermediği sonucuna varılabilir. Pirazol-Schiff bazı yapılarının potansiyel α -amilaz inhibitör etkilerini araştıran Aroua ve ark. (2025) [78] bu iskeleti içeren analogları, enzimin bilinen inhibitörlerinden akarboz ile karşılaştırmışlar ve kayda değer sonuçlar elde etmişlerdir. Ayrıca pirazol ve benzen halkalarına bağlı metil ve hidroksi gruplarının orto ve para pozisyonlarda olmalarının inhibisyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Akarbozun IC_{50} değerini yaklaşık $16 \mu M$ olarak kaydederek; pirazol-schiff bazı analoglarının IC_{50} değerlerini $18-40 \mu M$ aralığında bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda sentezlediğimiz bileşikler arasında benzen halkalarına bağlı metoksi gruplarının ve pirazol halkasının inhibisyon üzerindeki etkinliği ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 3.30. α -Amilaz enzimi ile *a*: Bileşik 3a; *b*: Bileşik 3b; *c*: Bileşik 3c ve *d*: Bileşik 3d'nin %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.

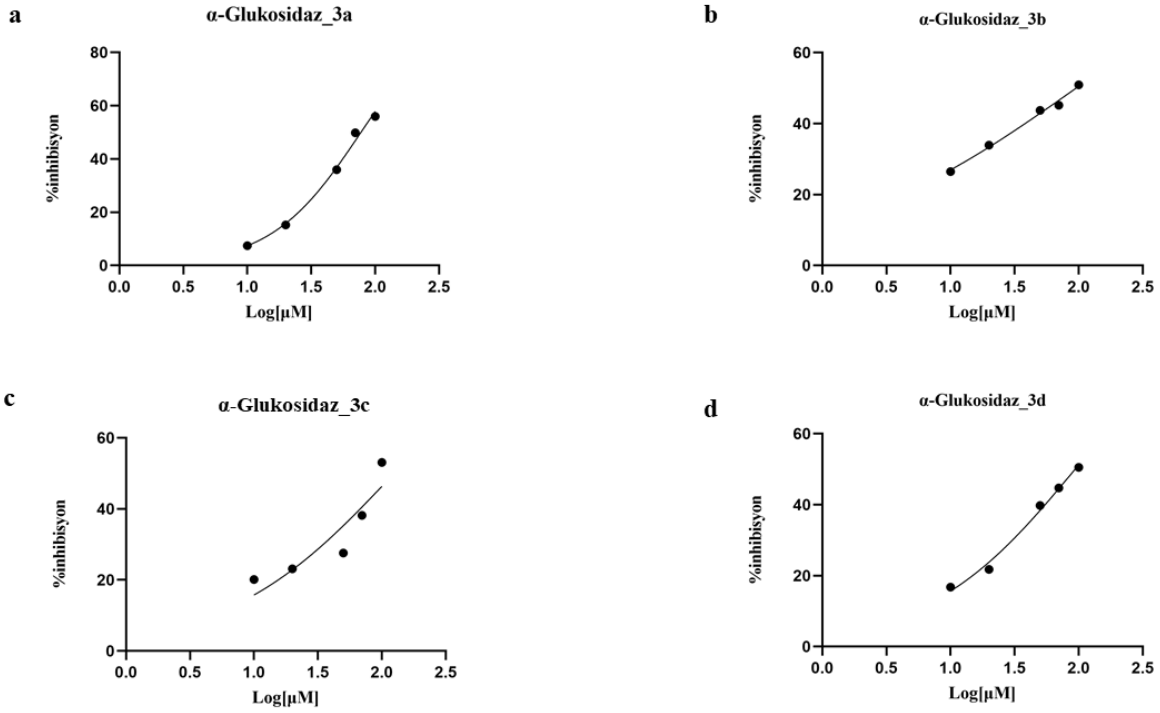


Şekil 3.31. α -Amilaz enzimi ile *a*: Bileşik 7; *b*: Bileşik 7a; *c*: Bileşik 7b ve *d*: Bileşik 7c'nin %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.

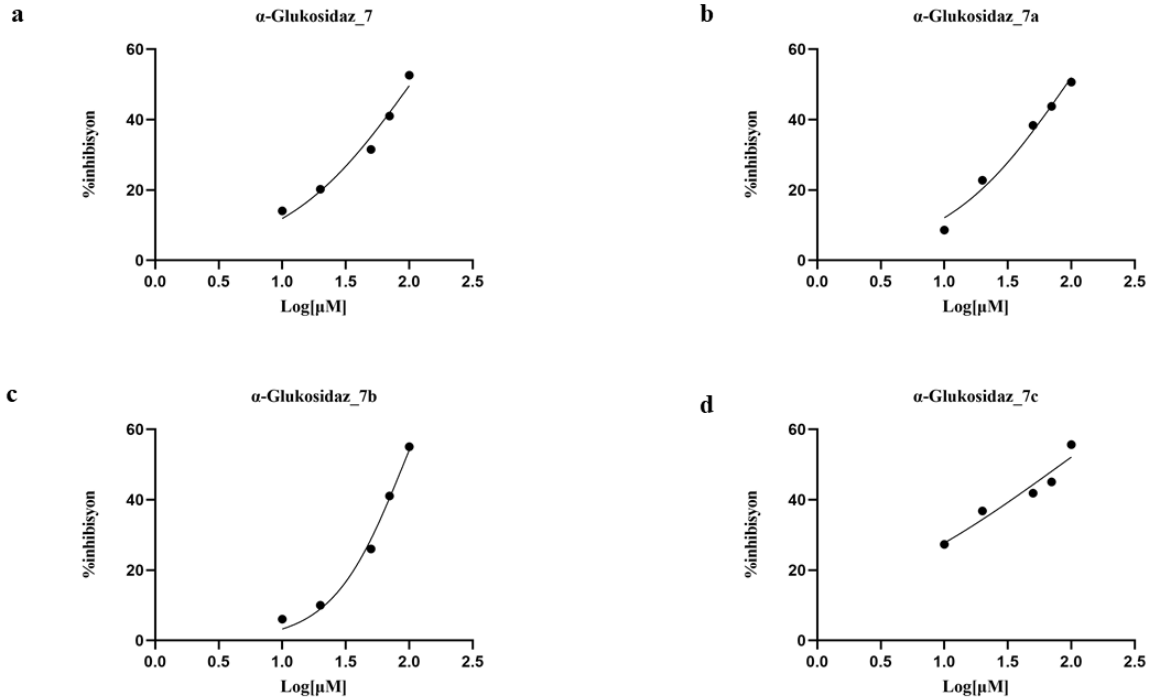
3.2.3. α -Glukosidaz enzimi inhibisyon çalışmaları

İn *vitro* deneylerde hesaplanan inhibisyon değerleri ile çizilen %inhibisyona karşı $\log[C]$ 'nin doğrusal olmayan regresyon grafiklerinden (Şekil 3.32 ve Şekil 3.33) gelen IC_{50} sonuçları Tablo 3.2'de verilmiştir. Şekil 3.27'de verilen grafiğe göre hesaplanan enzimin bilinen inhibitörü kuersetinin (IC_{50} : 26.24 μ M), inhibisyon sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde bileşiklerin tümünün kayda değer bir inhibitör aktivitesine sahip olmadığı görülmüştür. Bununla beraber Tablo 3.2'de görüldüğü gibi, bileşik (3a) en yüksek inhibitör aktivitesine sahipken (IC_{50} : 77.49 μ M), bileşik (3c)'nin en düşük inhibitör aktivitesine sahip olduğu kaydedilmiştir (IC_{50} : 124.8 μ M). Bileşiklerden (3a) ve (3b)'nin inhibitör aktiviteleri karşılaştırıldığında, bileşik (3b)'deki azalmanın (IC_{50} : 95.61 μ M), (3b)'deki benzen halkasının yerine bir amid bağının gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde (3b)'deki karbonil grubunun yerine (3c)'de görüldüğü gibi (IC_{50} : 124.8 μ M) bir tyoamid grubunun gelmesi ile bileşik (3c)'nin (3b)'den daha düşük inhibitör aktivite göstermiş olduğu düşünülmüştür. Bileşik (3d)'de, amid bağı ve benzen halkası birlikte bulunmasına rağmen beklendiğinin aksine; IC_{50} değerinde dikkate değer bir azalma gözlenmemiştir (3d IC_{50} : 93.82 μ M). Kumarin halkası ve kalkon içeren bileşik (7), 101.7 μ M'lik bir IC_{50} değerine sahiptir. Kumarin ve pirazol halkalarının birlikte bulunduğu bileşik (7a)'nın IC_{50} değerinde bir azalma olduğu (IC_{50} : 91.51 μ M) gözlemlenmiştir. Ancak, pirazol halkasına bağlı benzen halkasının bileşik (7b)'de tyoamid bağı ile değiştirilmesinin olumsuz bir etkiye sebep olduğu düşünülmektedir. Bileşik (7c)'deki gibi, kumarin, pirazol halkası ve amid bağı kombinasyonu da beklenen inhibisyonu sağlamamıştır.

Pirazol halkasına doğrudan bağlı karbotiyo grubu ve bu uçtan türevlendirilmiş yapılarının α -glukosidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin araştırılan Saeed ve ark. (2024) [79] bu yapıları içeren bileşiklerin inhibitör aktivitelerinin yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Bu çalışmadaki bileşikler bizim yapılarımıza benzer olmalarına rağmen bizim moleküllerimiz α -glukosidaz enzimi üzerinde etkili inhibisyon sağlayamamıştır. Bunun sebebi bizim yapılarımızda pirazol halkasının etrafında benzen halkalarının bulunması olarak açıklanabilir.



Şekil 3.32. α -Glukosidaz enzimi ile *a*: Bileşik 3a; *b*: Bileşik 3b; *c*: Bileşik 3c ve *d*: Bileşik 3d'nin %inhibisyona karşı log[C]'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.

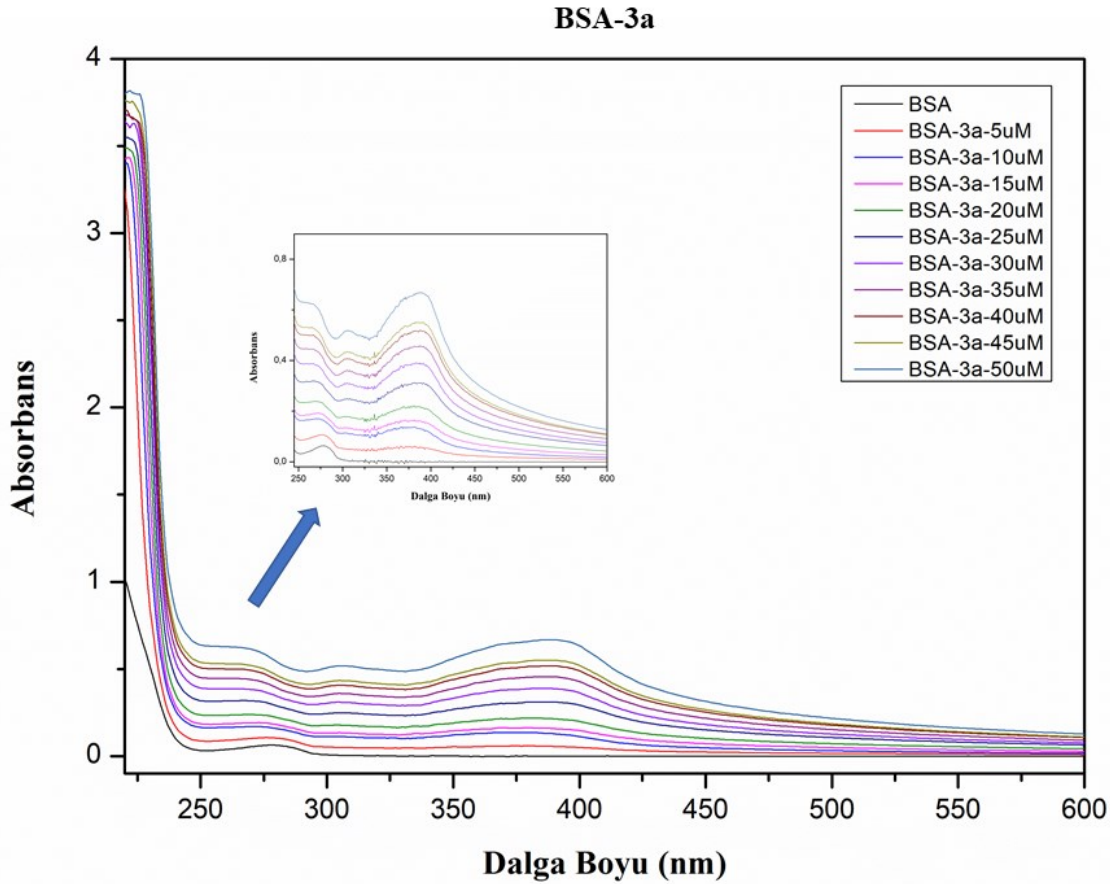


Şekil 3.33. α -Glukosidaz enzimi ile *a*: Bileşik 7; *b*: Bileşik 7a; *c*: Bileşik 7b ve *d*: Bileşik 7c'nin %inhibisyona karşı log[C]'nin doğrusal olmayan regresyon grafikleri.

3.3. BSA bağlanma Çalışmaları

Bileşiklerimizin inhibisyon çalışmalarına bağlı olarak enzimler arasında en yüksek inhibisyon aktivitesi α -Amilaz enziminin inhibisyonunda etkili sonuçlar veren bileşik **3a**, **3d**, **7** ve **7a**'nın BSA ile etkileşimleri incelenmiştir.

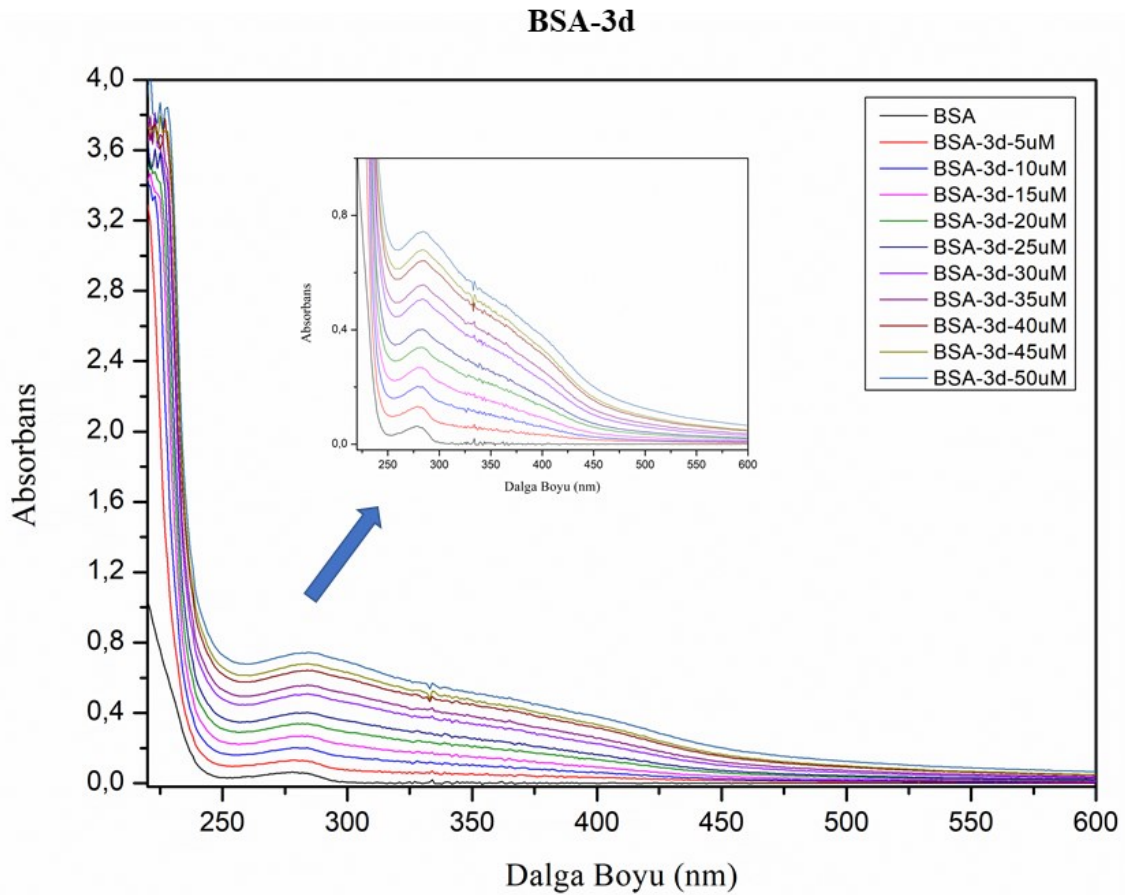
Spektroskopik analizlerin değerlendirilmesi sonucunda; bileşiklerin proteine bağlanmasıyla BSA'nın absorpsiyon şiddetindeki değişiklikler izlenmiş olup; bileşiklerin artan konsantrasyonuyla BSA'nın 280 nm dalga boyundaki absorpsiyonunun da arttığı saptanmıştır. Sistemlere ait grafikler ayrıntılı olarak incelenmiştir.



Şekil 3.34. BSA-(**3a**) sistemine ait UV-VİS absorpsiyon grafiği.

Bileşik (**3a**)'nın ilavesiyle BSA'nın absorpsiyon spektrumunda önemli bir değişiklik olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum BSA ile ligandın arasındaki etkileşimi ve bağlanmanın söz konusu olduğunu göstermektedir. **Şekil 3.34**'de farklı ligand konsantrasyonları (0-100 μ M) ile

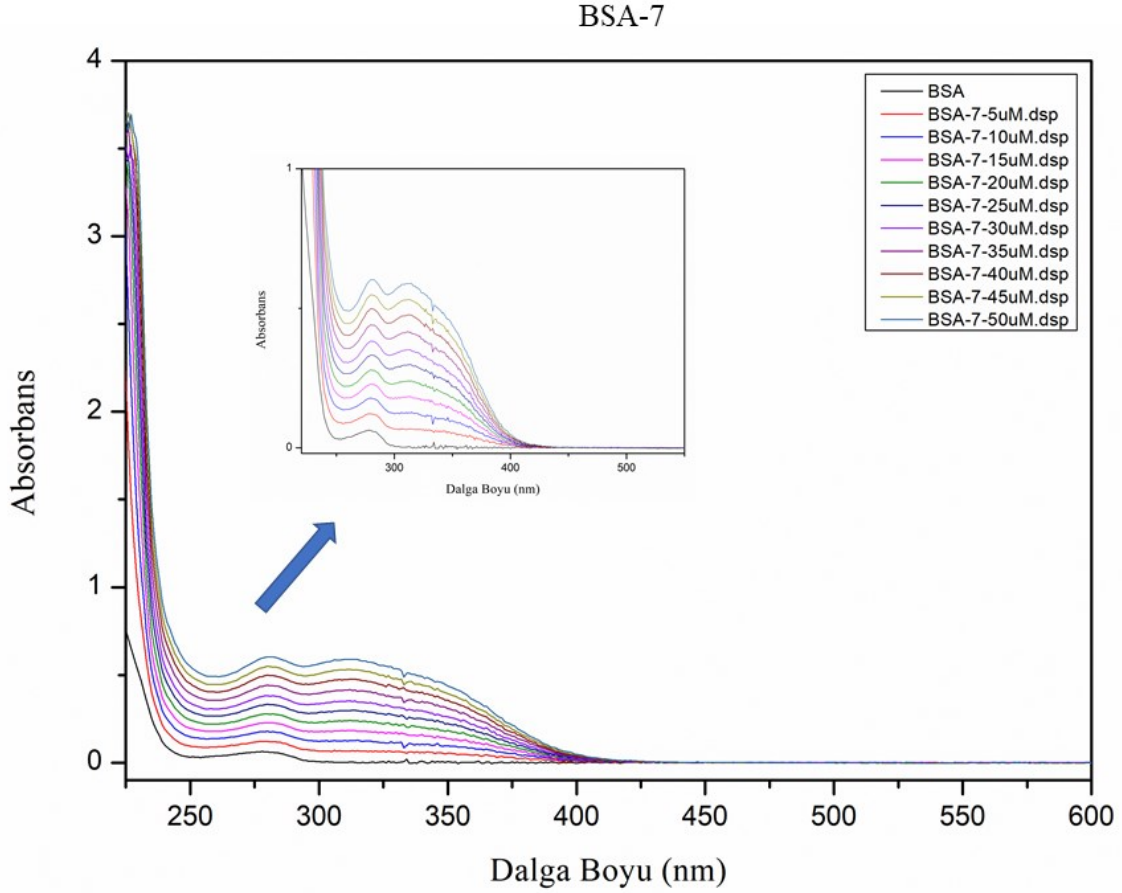
BSA'nın absorpsiyon grafiği verilmiştir. Ligandın artan konsantrasyonlarına karşı değişiklikler incelenmiştir. Artan ligand konsantrasyonu ile BSA'nın 280 nm'deki dalga boyunda absorpsiyonun arttığı saptanmıştır. Maksimum dalga boylarında mavi b"lgeye kayma g"zlemlenmiş olup; o b"lgede tirozin amino asit kalıntılarını yoğunluğunu ve bağlanmada etkili olduğunu g"stermektedir. Bu kayma, protein zincirinde konformasyonel değişimlerin olduğunu g"stermektedir.



şekil 3.35. BSA-(3d) sistemine ait UV-VİS absorpsiyon grafiği.

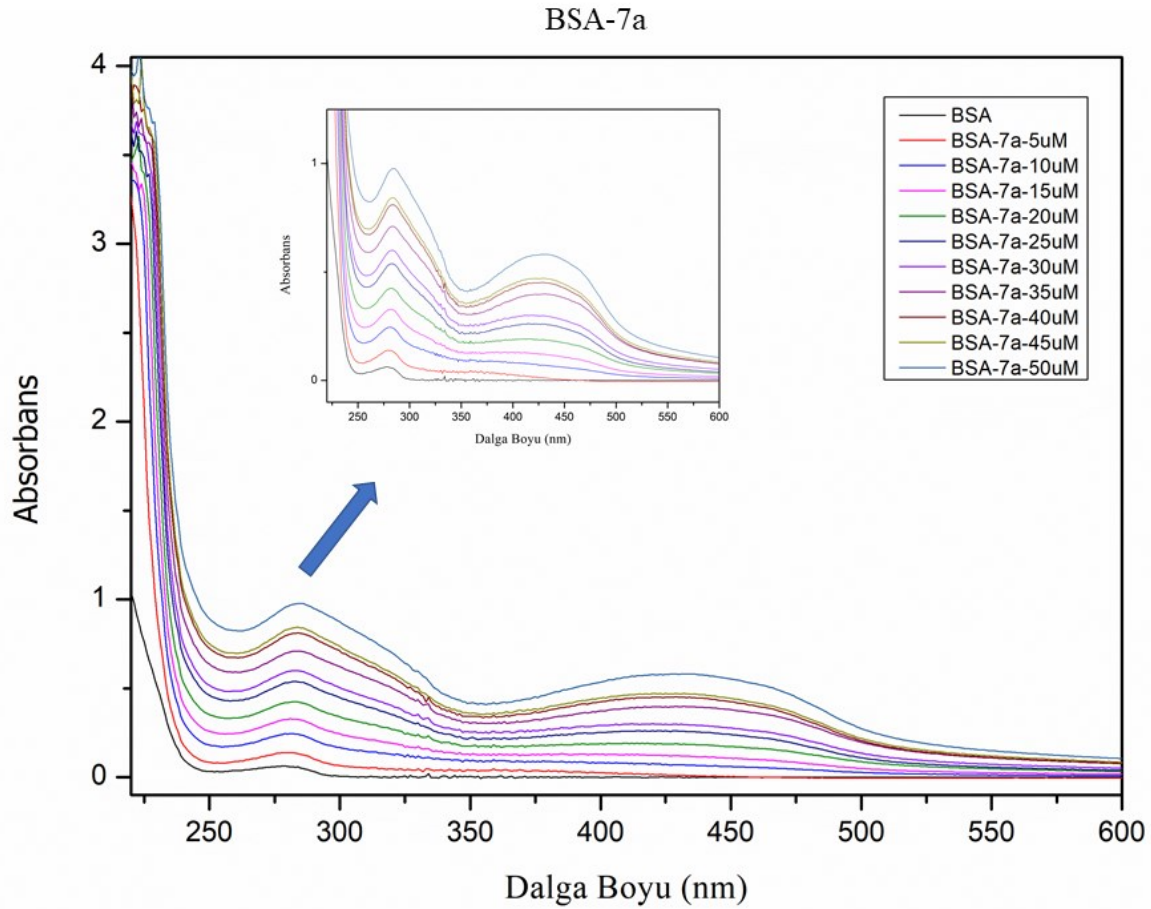
Bileşik (3d)'nin ilavesiyle BSA'nın absorpsiyon spektrumunda "nemli bir değişiklik olduğu g"zlenmiştir. Bu durum BSA ile ligandın arasındaki etkileşimini ve bağlanma s"z konusu olduğunu g"stermektedir. şekil 3.35'de farklı ligand konsantrasyonları (0-100μM) ile BSA'nın absorpsiyon grafiği verilmiştir. Ligandın artan konsantrasyonlarına karşı değişiklikler incelenmiştir. Artan ligand konsantrasyonu ile BSA'nın 280 nm'deki dalga boyunda absorpsiyonun arttığı saptanmıştır. Maksimum dalga boylarında g"zlemlenen kayma

ile o bölgede protein zincirindeki konformasyonel değişimlerin olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.36. BSA-(7) sistemine ait UV-VİS absorpsiyon grafiği.

Bileşik (7)'nin ilavesiyle BSA'nın absorpsiyon spektrumunda önemli bir değişiklik olduğu gözlenmiştir. Bu durum BSA ile ligandın arasındaki etkileşimini ve bağlanma söz konusu olduğunu göstermektedir. Şekil 3.36'de farklı ligand konsantrasyonları (0-100 μ M) ile BSA'nın absorpsiyon grafiği verilmiştir. Ligandın artan konsantrasyonlarına karşı değişiklikler incelenmiştir. Artan ligand konsantrasyonuyla BSA'nın 280 nm'deki dalga boyunda absorpsiyonun arttığı saptanmıştır. Maksimum dalga boylarında kayma gözlemlenmiştir. Bu kayma, protein zincirindeki konformasyonel değişimlerin olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.37. BSA-(7a) sistemine ait UV-VİS absorpsiyon grafiği.

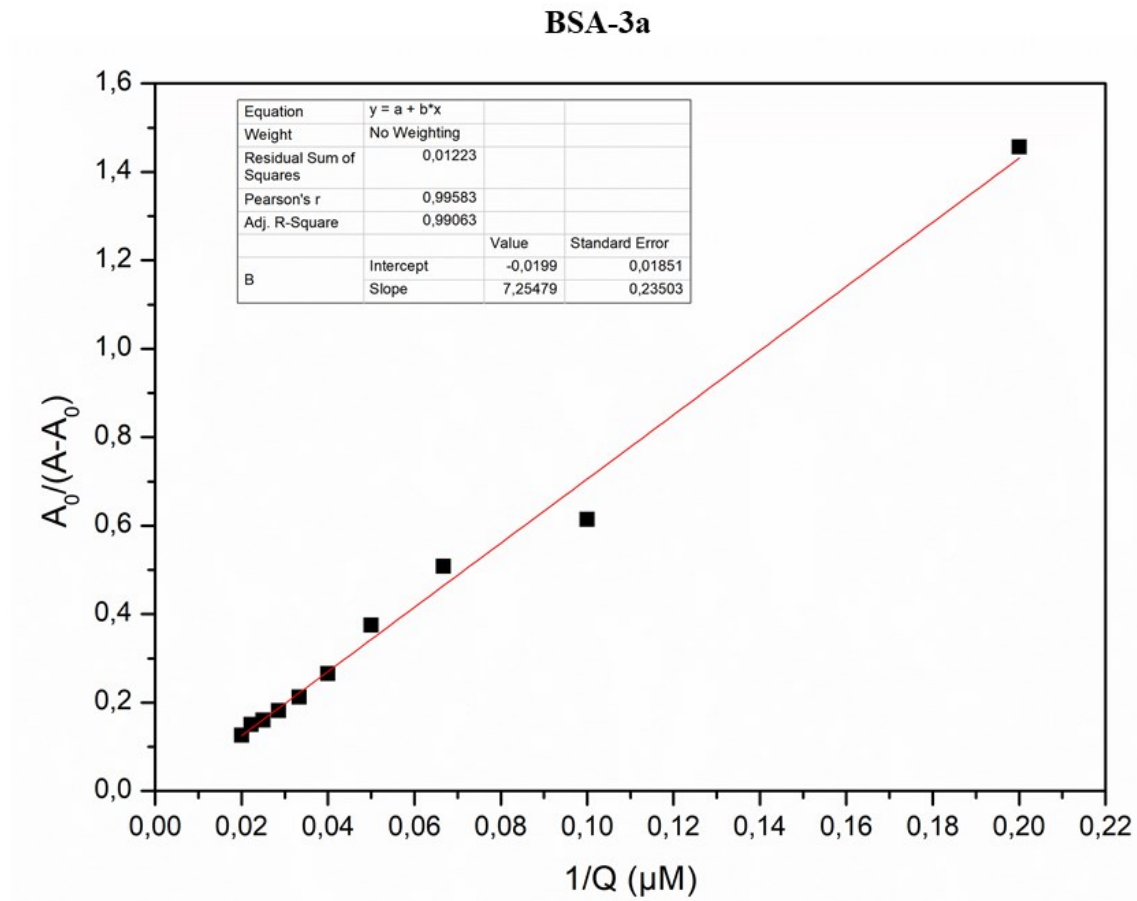
Bileşik (7a)'nın ilavesiyle BSA'nın absorpsiyon spektrumunda önemli bir değişiklik olduğu gözlenmiştir. Bu durum BSA ile ligandın arasındaki etkileşimini ve bağlanma söz konusu olduğunu göstermektedir. Şekil 3.37'de farklı ligand konsantrasyonları (0-100 μ M) ile BSA'nın absorpsiyon grafiği verilmiştir. Ligandın artan konsantrasyonlarına karşı değişiklikler incelenmiştir. Artan ligand konsantrasyonuyla BSA'nın 280 nm'deki dalga boyunda absorpsiyonun arttığı saptanmıştır. Maksimum dalga boyunda gözlemlenen kayma ile o bölgede protein zincirindeki konformasyonel değişimlerin olduğunu göstermektedir.

Ayrıca sistemlere ait Benesi-Hildebrand grafikleri çizilerek (Şekil 3.38, Şekil 3.39, Şekil 3.40 ve Şekil 3.41) ΔG değerleri Gibbs-Helmholtz Denklemine (Bölüm 2.3.3) hesaplanmış olup ΔG değeri ve K_a değerleri Tablo 3.3'de verilmiştir. Benesi-Hildebrand grafiklerinde BSA'nın serbest formundaki absorbansı A_0 , BSA'nın bileşikle absorbansı A ile gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Bileşik (3a), (3d), (7) ve (7a)'ya ait termodinamik parametreler.

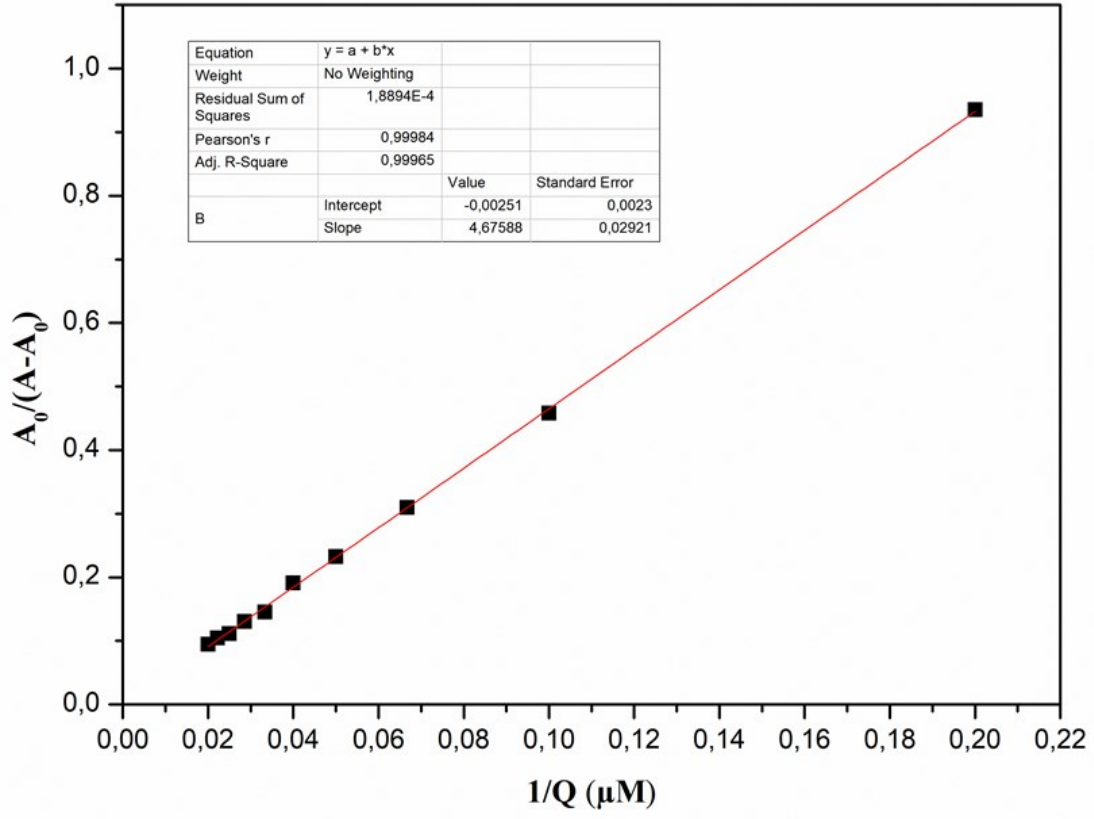
Bileşikler	ΔG (kcal/mol)*	$K_a \times 10^6$ *
3a	-9,35390922	7,2547
3d	-9,09382844	4,67588
7	-9,16838861	5,30334
7a	-9,03582642	4,23957

* ΔG :Gibbs enerjisi; K_a :Bağlanma sabiti.



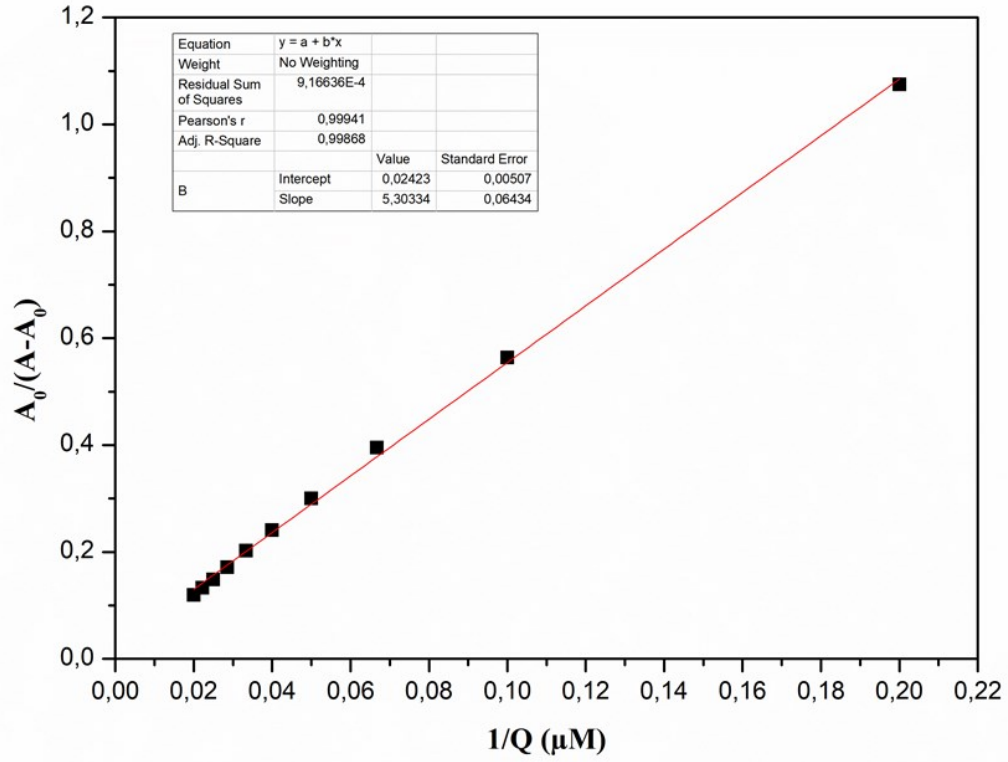
Şekil 3.38. BSA-(3a) sistemine ait Benesi-Hildebrand grafiği.

BSA-3d



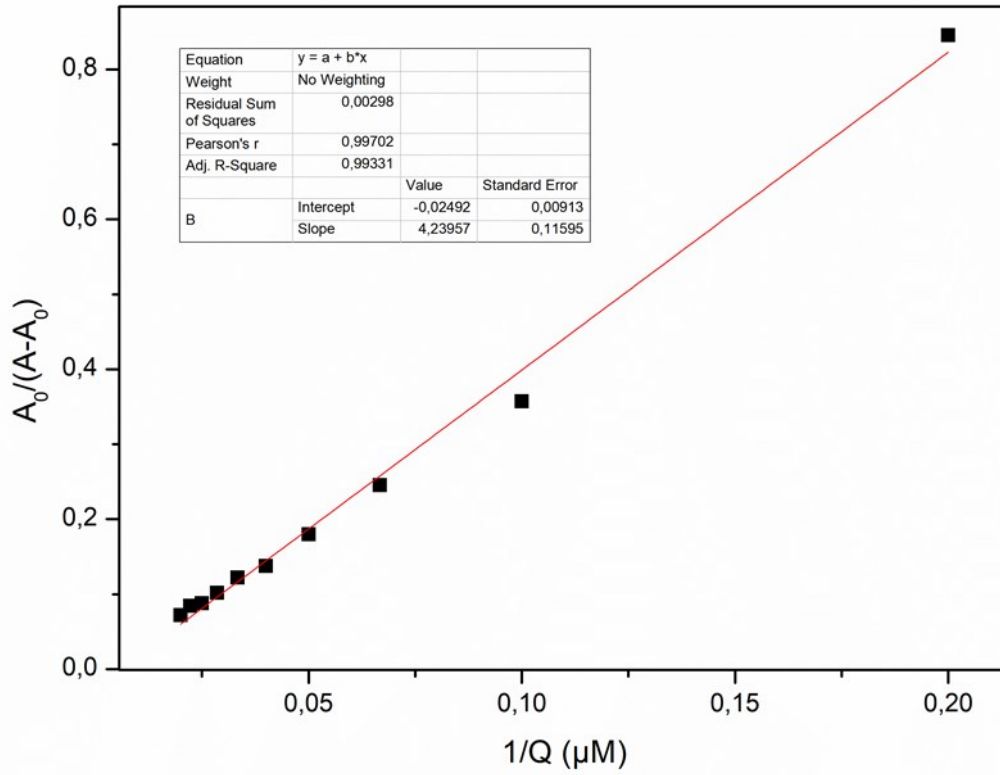
Şekil 3.39. BSA-(3d) sistemine ait Benesi-Hildebrand grafiği.

BSA-7



Şekil 3.40. BSA-(7) sistemine ait Benesi-Hildebrand grafiği.

BSA-7a



Şekil 3.41. BSA-(7a) sistemine ait Benesi-Hildebrand grafiği.

3.4. Hesapsal Çalışmalar

3.4.1. Bileşiklerin ADME özellikleri

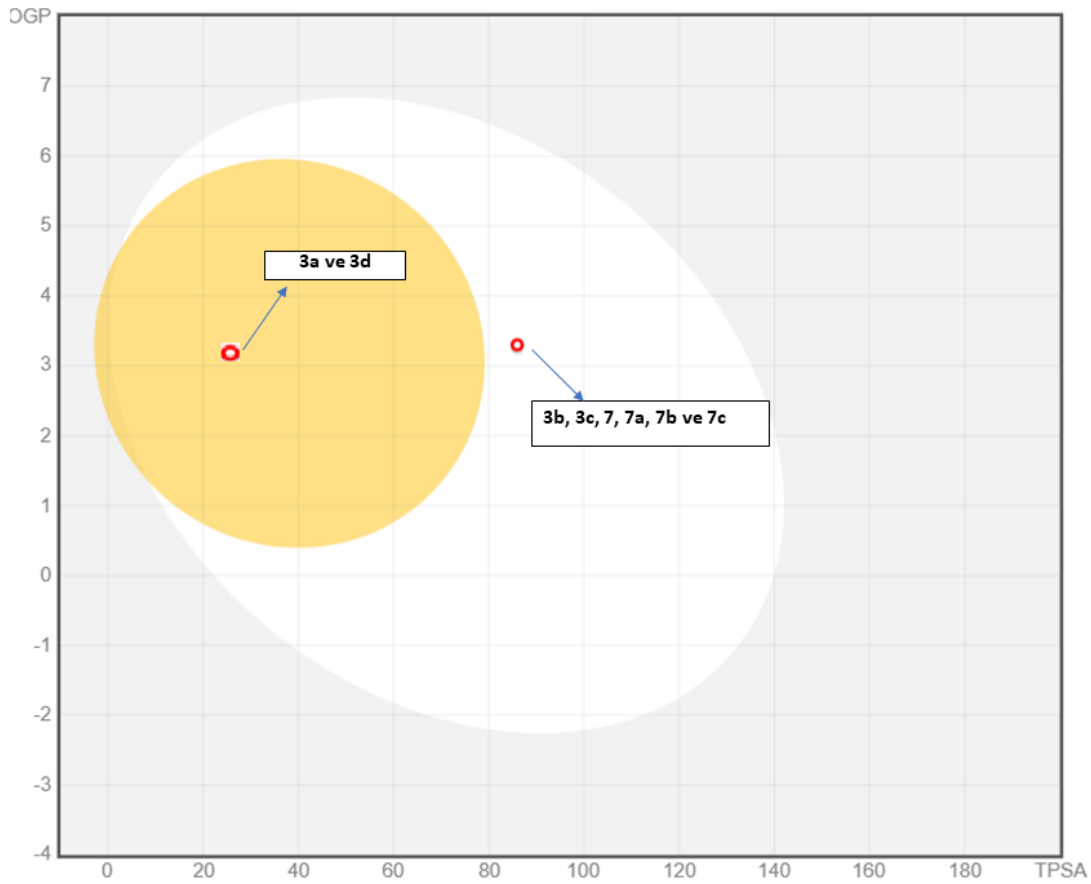
Bileşiklerin ADME özellikleri

- ✓ Molekül ağırlığı (M.A., g/mol) $150 < MA < 500$,
- ✓ Doygunluk (Fraction Csp3) $0.25 < \text{Fraksiyon Csp3} < 1$,
- ✓ Döndürülebilir bağlar $0 < \text{Flex} < 9$,
- ✓ Hidrojen bağı alıcısı ve vericisi,
- ✓ Topolojik polar yüzey alanı (TPSA(Å²)) $20 < \text{TPSA} < 130$,
- ✓ Lipofiliklik ölçüsü (Log P) $-0.7 < XLOGP < +0.5$

değerlendirildiğinde tüm özelliklerin değer aralıklarında olduğu ve Lipinski kuralına uyduğu

görülmüştür (Tablo 3.4). Ayrıca GIA/BBB geçirgenlikleri analiz edilerek **Şekil 3.42**'de verilen BOILED-Egg grafiğine göre değerlendirilmiştir. Buna göre bileşiklerin 7 tanesinin GIA sistemdeki çözünürlüğünün yüksek olduğu iki tanesinin ise BBB geçirgenliği olduğu bulunmuştur. DPP4'ün etkin inhibitörlerinden olmasına rağmen sitagliptinin BBB'yi geçtiği, bunun aksine α -amilaz ve α -glukosidazın inhibitörleri olan akarboz ve kuersetinin BBB'yi geçmediği bilinmektedir.

BBB'yi geçebilen bu iki bileşiğin (**3a** ve **3d**) yapıları incelendiğinde (**3c**) ve (**3b**)'den farklı olarak fazladan bir benzen halkasına sahip olduğu görülmektedir. Apolar özellikteki benzen halkasının bileşiğin TPSA değerini düşürdüğü düşünülmektedir. Ayrıca diğer bileşikler ile kıyaslandığında (**7**, **7a**, **7b** ve **7c**) kumarin halkasının TPSA değerini yükseltmiş olduğu görülmüştür.



Şekil 3.42. Bileşiklere ait BOILED-Egg grafiği.

Tablo 3.4. Bileşiklerin ADME özellikleri.

Bileşik	MA*	Fr.Csp*	RB*	HBA*	HBD*	TPSA*	LogP*	GIA*	BBB*	L.V.*
3a	388,46	0,17	6	3	1	42,96	5,61	Yüksek	+	0
3b	355,39	0,26	6	5	1	86,38	2,04	Yüksek	-	0
3c	371,45	0,26	6	4	1	101,40	2,64	Yüksek	-	0
3d	431,48	0,20	8	5	1	72,39	4,00	Yüksek	+	0
7	352,34	0,10	5	6	1	85,97	3,74	Yüksek	-	0
7a	442,46	0,15	5	6	1	84,50	4,53	Yüksek	-	0
7b	425,46	0,19	5	6	2	142,61	2,23	Düşük	-	0
7c	485,49	0,15	7	7	2	113,60	3,59	Yüksek	-	0
Sitagliptin	407,31	0,44	6	10	1	77,04	0,70	Yüksek	+	0
Akarboz	645,60	0,88	13	19	14	329,01	-8,82	Düşük	-	3
Kuersetin	302,24	0,00	1	7	5	131,36	1,54	Yüksek	-	0

*M.A.:Molekül ağırlığı (g/mol), Fr.Csp.:Doymunluk (Fraction Csp3), R.B.: Döndürülebilir bağlar (flex), HBA:Hidrojen bağı alıcısı, HBD:Hidrojen bağı vericisi, TPSA:Topolojik Polar Yüzey Alanı (Å²) LogP:Lipofiliklik ölçüsü, GIA:Gastrointestinal emilim, BBB:Kan-beyin bariyeri geçirgenliği, L.V.:Lipinski kuralı.

3.4.2. Moleküler yerleştirme Çalışmaları

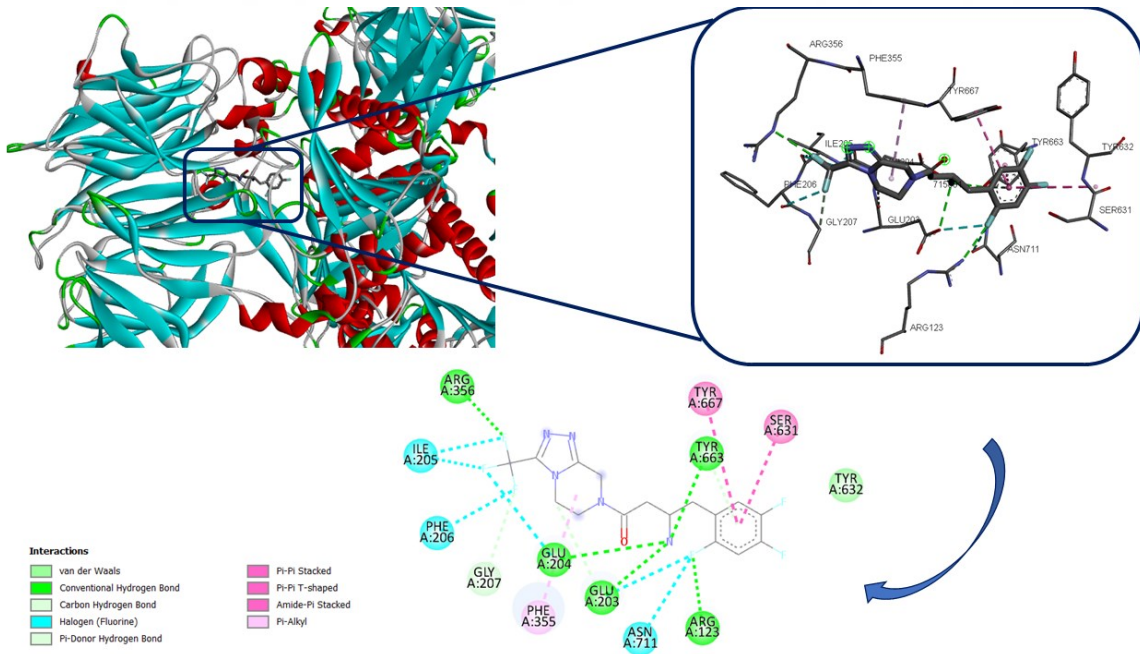
Sentezlenen bileşiklerin DPP4 ve α -amilaz enzimleri ile inhibisyon çalışmaları incelendiğinde en iyi sonuçların elde edildiği ve enzimin bilinen inhibitörlerine göre uygun inhibitör aktivite gösteren bileşikler seçilerek ilgili enzimler ile etkileşimleri moleküler yerleştirme yöntemi ile incelenmiştir. Bilinen inhibitörüne göre değerlendirildiğinde sentezlediğimiz maddelerin α -glukosidazın inhibisyonunda etkili sonuçlar vermemesinden dolayı moleküler yerleştirme çalışmaları yapılmamıştır.

Söz konusu bileşiklerin DPP4 ve α -amilaz enzimlerinin aktif bölgelerindeki etkileştiği amino asit kalıntılarının hangileri olduğu ve bu amino asit kalıntılara bağlanma afiniteleri bulunmuştur. Hesapsal çalışmalarda enzimlerin bilinen inhibitörleri model olarak seçilmiştir. Bunlar DPP4 için sitagliptin ve α -amilaz enzimi için ise akarbozdur. Sonuçlar iki kez tekrarlanmıştır. Hesaplamalar sonucunda bileşiklerin enzim içindeki yönelimlerini gösteren farklı konformasyonlar ve bu konformasyonlara ait bağlanma enerjileri elde edilmiştir. Enzimler ve sentezlenen bileşiklerin moleküler yerleştirme işlemlerinden önce Autodock Vina programının validasyonu için enzimlerin kendi ligandları ile doklanmış olup uygun

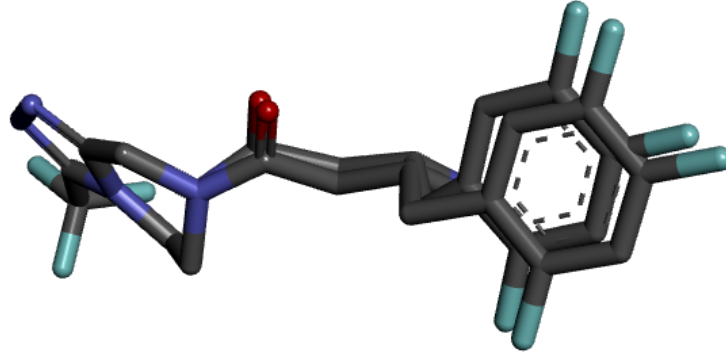
konformasyonu incelenmiştir (Root Mean Square Deviation, RMSD) RMSD hesabı için Discovery Studio 4.1. programı kullanılmıştır.

DPP4 enziminin moleküler yerleştirme çalışmaları için X, Y, Z koordinatların belirlenmiş olup Bölüm 2.3.5'de verilmiştir. Buna göre DPP4 enzimi ve kristal yapısındaki sitagliptinin etkileşimleri sırasıyla -Arg123, Glu203, Glu204, Ile205, Phe206, Gly207, Phe355, Arg356, Ser631, Tyr632, Tyr663, Tyr667, Asn711- olup; aktif bölgeye bağlanma enerjisi -7.40 kcal/mol olarak bulunmuştur (Şekil 3.43 ve Şekil 3.44). Validasyon işleminde belirlenmiş olan koordinatlar bileşiklerin doklanmasında da kullanılmıştır.

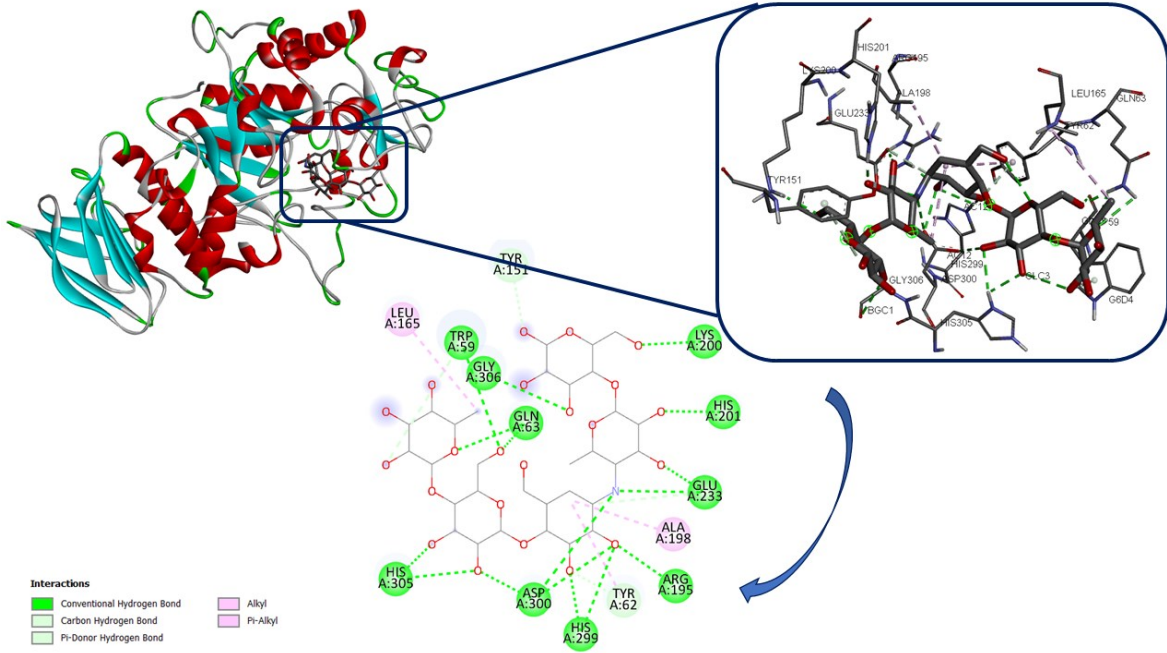
α -Amilaz enziminin moleküler yerleştirme çalışmaları için X,Y,Z koordinatların belirlenmiş olup Bölüm 2.3.5'de verilmiştir. Enzimi ve kristal yapısındaki akarbozun etkileşimleri sırasıyla -Trp59, Gln63, TYr62, Tyr151, Leu165, Arg195, Ala198, Lys200, His201, Glu233, His299, Asp300, His305, Gly306- olup; enzimin aktif bölgesine bağlanma enerjisi -14.55 kcal/mol olarak bulunmuştur. Her iki enzim için validasyon işleminde belirlenmiş olan koordinatlar bileşiklerin doklanmasında da kullanılmıştır.



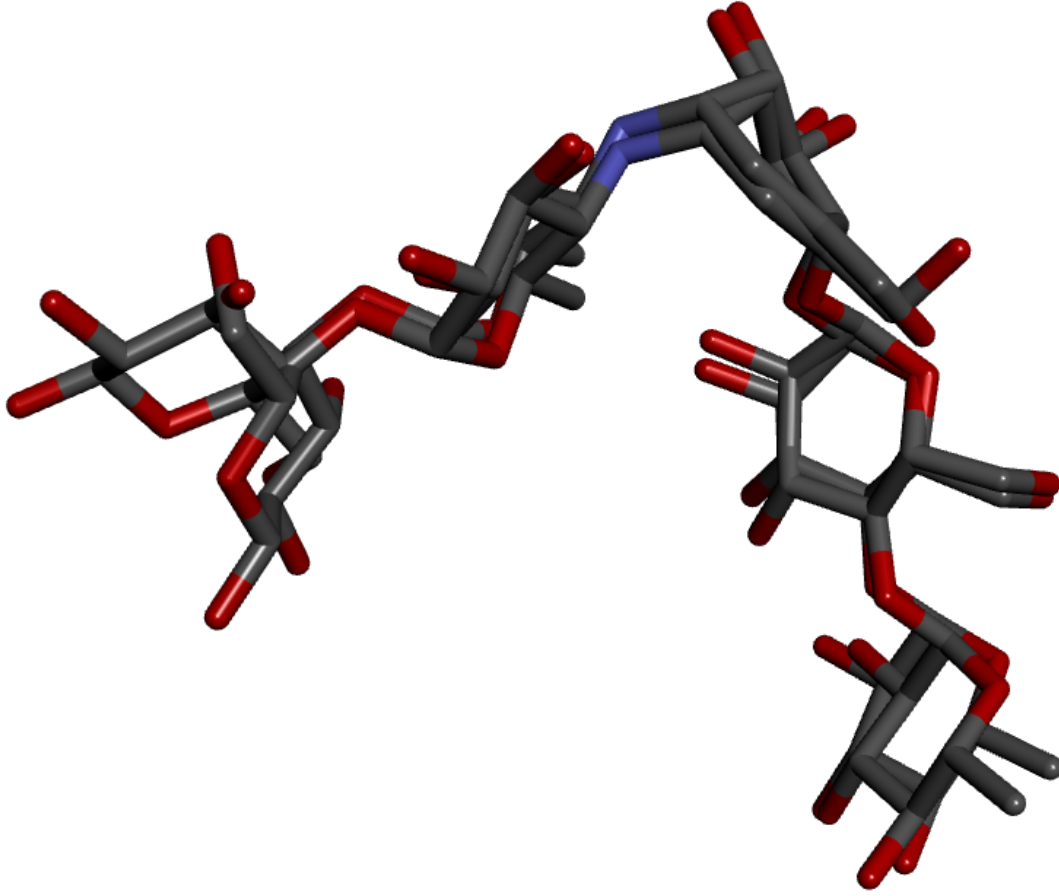
Şekil 3.43. DPP4 enziminin kristal yapısındaki ligandının moleküler yerleştirme sonucu etkileşimleri.



Şekil 3.44. DPP4 enziminin kristal yapısındaki ligandının pozu ile doklanmış pozun karşılaştırması.



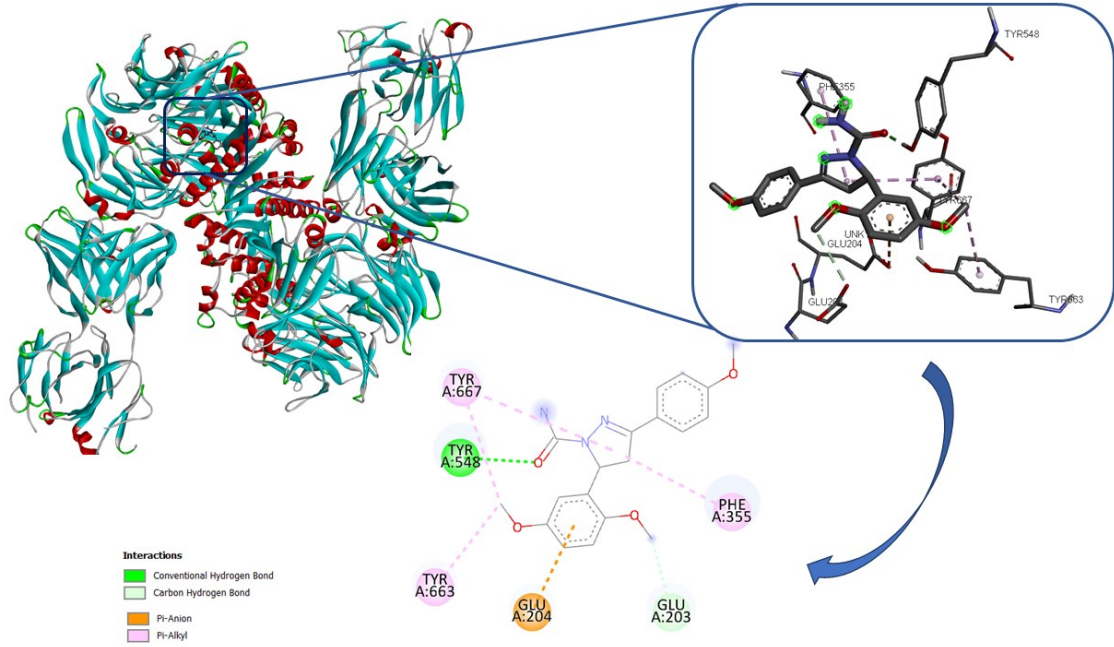
Şekil 3.45. α -amilaz enziminin kristal yapısındaki ligandının moleküler yerleştirme sonucu etkileşimleri.



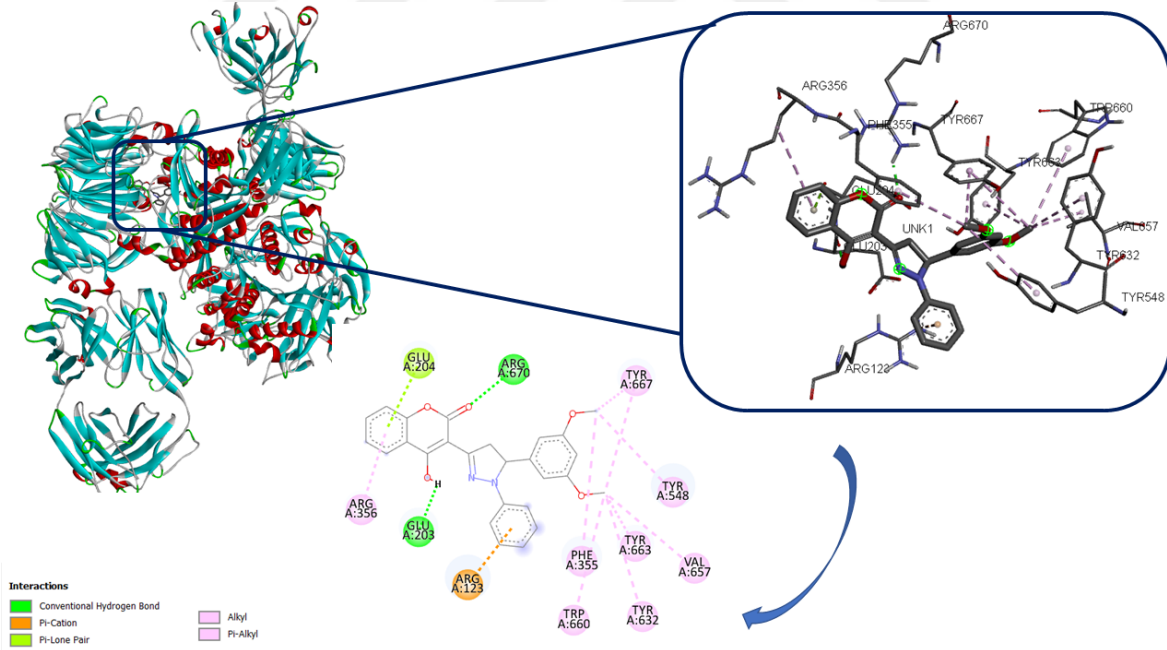
Şekil 3.46. α -amilaz enzimlerinin kristal yapısındaki ligandının pozunu ile doklanmış pozunu karşılaştırması.

3.4.2.1. DPP4 enzimi ile (3b) ve (7a) bileşiklerine ait etkileşim sonuçları

Bileşik (3b)'nin DPP4 enziminin aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu Şekil 3.47'de görülmektedir. Bağlanma enerjisi -6.17 kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları - Glu203, Glu204, Phe355, Tyr548, Tyr663, Tyr667- olarak bulunmuştur.



Şekil 3.47. DPP4-(3b) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.



Şekil 3.48. DPP4-(7a) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.

Bileşik (7a)'nın DPP4 enziminin aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu Şekil 3.48'da görülmektedir. Bağlanma enerjisi -8.48 kcal/mol; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları -Arg123, Glu203, Glu204, Phe355, Arg356, Tyr548, Tyr632, Trp660, Val657, Tyr663, Tyr667, Arg670- olarak bulunmuştur.

Tablo 3.5. DPP4 enzimi ve bileşiklerin bağlanma enerjileri, bağlanma bölgesinde yer alan amino asit kalıntıları ve inhibisyon sabiti değerleri.

Bileşikler	Bağlanma enerjileri (ΔG) (kcal/mol)	İnhibisyon sabiti (Ki) (nM)	Bağlanma bölgesindeki amino asit kalıntıları
3b	-6.17	2.99	Glu203, Glu204, Phe355, Tyr548, Tyr663, Tyr667
7a	-8.48	6.07	Arg123, Glu203, Glu204, Phe355, Arg356, Tyr548, Tyr632, Trp660, Val657, Tyr663, Tyr667, Arg670
Sitagliptin	-7.40	3.76	Arg123, Glu203, Glu204, Ile205, Phe206, Gly207, Phe355, Arg356, Ser631, Tyr632, Tyr663, Tyr667, Asn711

Enzimlerin ligandlara bağlanma enerjilerinden (ΔG), Ki değerleri;

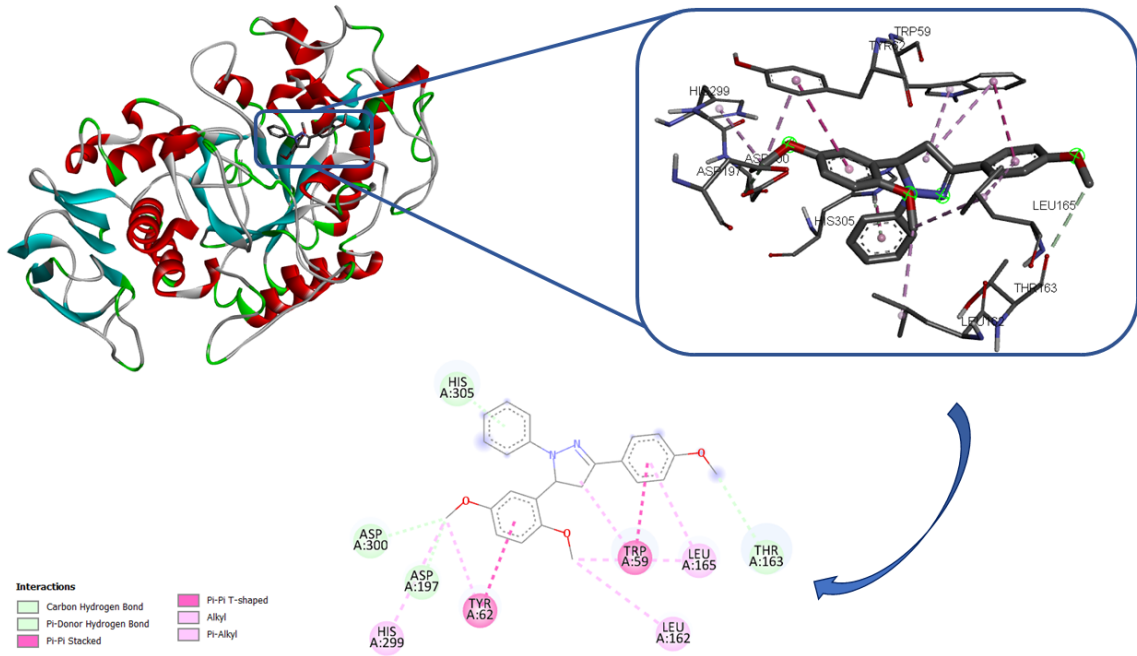
$$\Delta G = RT \ln Ki \quad (3.1)$$

denklemini kullanılarak hesaplanmıştır. Burada $R=1,988$ kcal/mol.K ve $T=298K$ cinsinden sıcaklığı vermektedir.

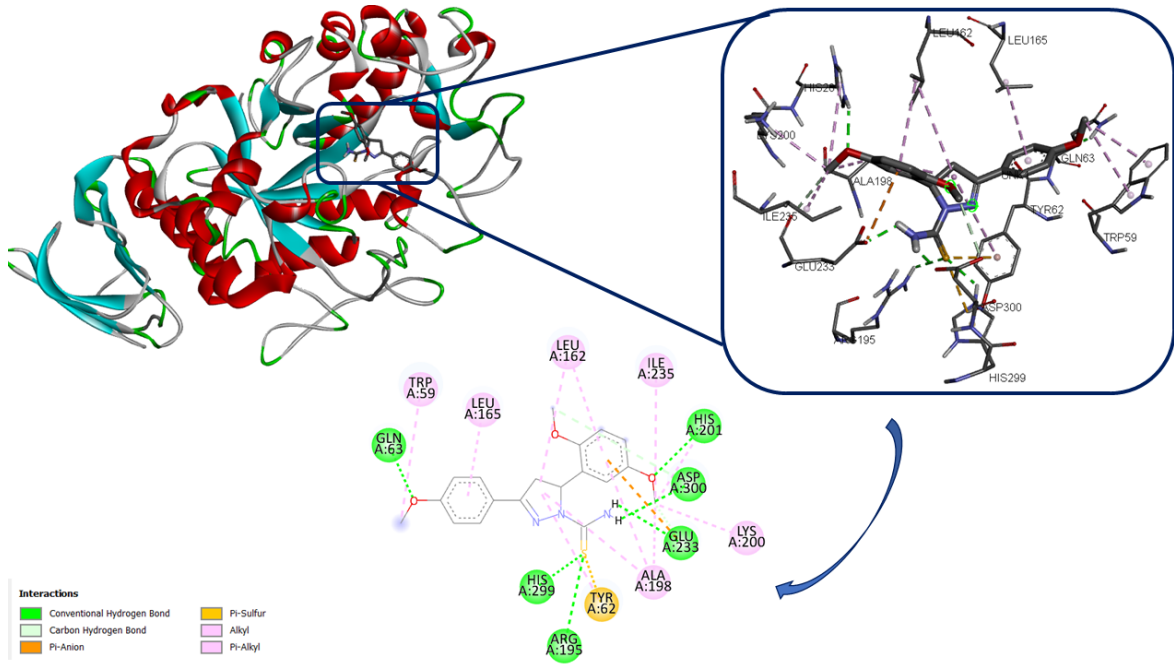
Buna göre bileşik (**3b**) ve (**7a**)'nın bağlanma enerjileri ile bu değerden hesaplanan inhibisyon sabiti (Ki) değerlendirildiğinde (**Tablo 3.5**) bu bileşiklerin DPP4 enzimi üzerinde etkili inhibitör aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bileşiklerin bağlanma enerjileri ve aktif bölgedeki konformasyonlarının, enzimin kristal yapısında yer alan referans ligand sitagliptin ile karşılaştırıldığında yüksek uyum gösterdiği belirlenmiştir. Bu bileşiklerin deneysel çalışmalardaki inhibisyon bulgularına (IC_{50} 3b: 20.08 μM ; 7a: 22.51 μM) göre etkili inhibitörler olduğu görülmüştür.

3.4.2.2. α -Amilaz enzimi ile (3a),(3c),(3d),(7a),(7b) ve (7c) bileşiklerine ait etkileşim sonuçları

Bileşik (3a)'nın α -amilaz enziminin aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu Şekil 3.49'de görülmektedir. Bağlanma enerjisi -7.23 kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları -Asp197, Asp300, His299, Tyr62, His305, Leu162, Trp59, Lue165 ve Thr163- olarak bulunmuştur.



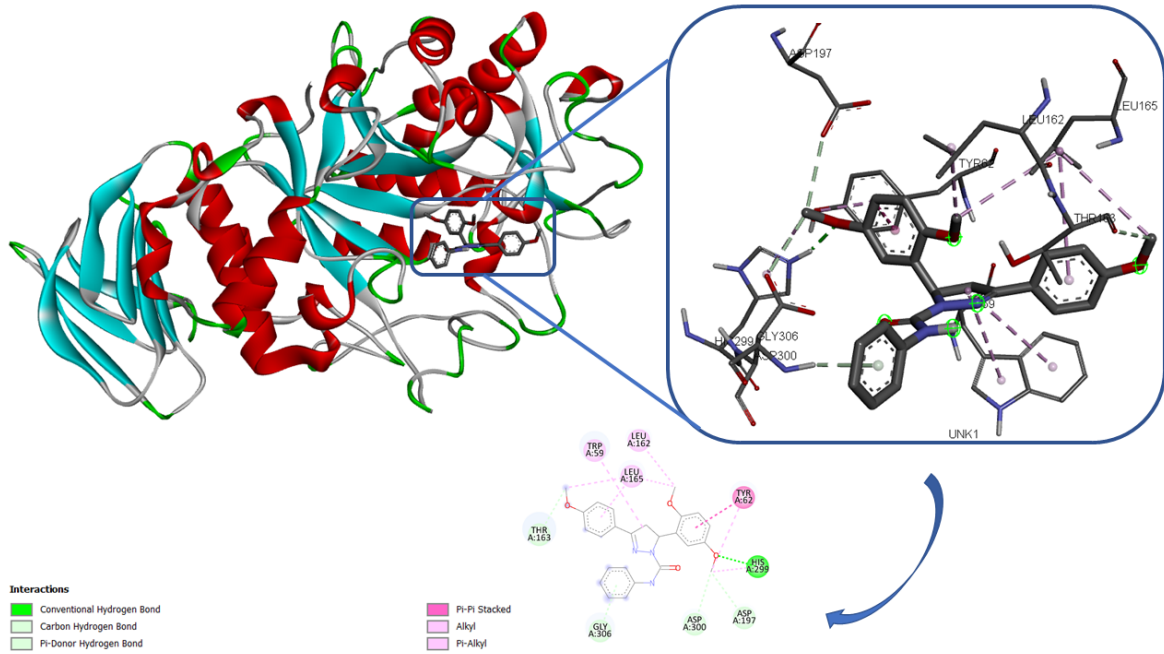
Şekil 3.49. α -Amilaz-(3a) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.



Şekil 3.50. α -Amilaz-(3c) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.

Bileşik (3c)'nin α -amilaz enziminin aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu **Şekil 3.50**'de görülmektedir. Bağlanma enerjisi -7.56 kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları – Trp59, Tyr62, Gln63, Leu162, Leu165, Arg195, Ala198, Lys200, His201, Glu233, His299, Asp300, Ile235- olarak bulunmuştur.

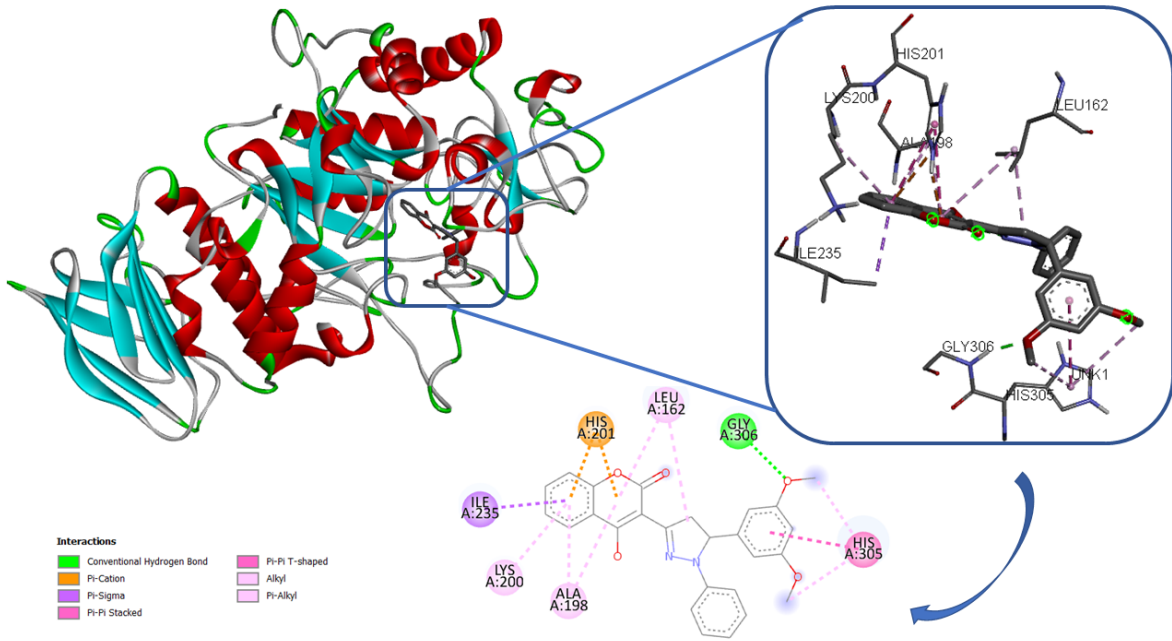
Bileşik (3d)'nin α -amilaz enziminin aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu **Şekil 3.51**'de görülmektedir. Bağlanma enerjisi -7.90kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları -Trp59, Try62, Leu162, Leu165, Asp197, Thr163, His299, Asp300 ve Gly306- olarak bulunmuştur.



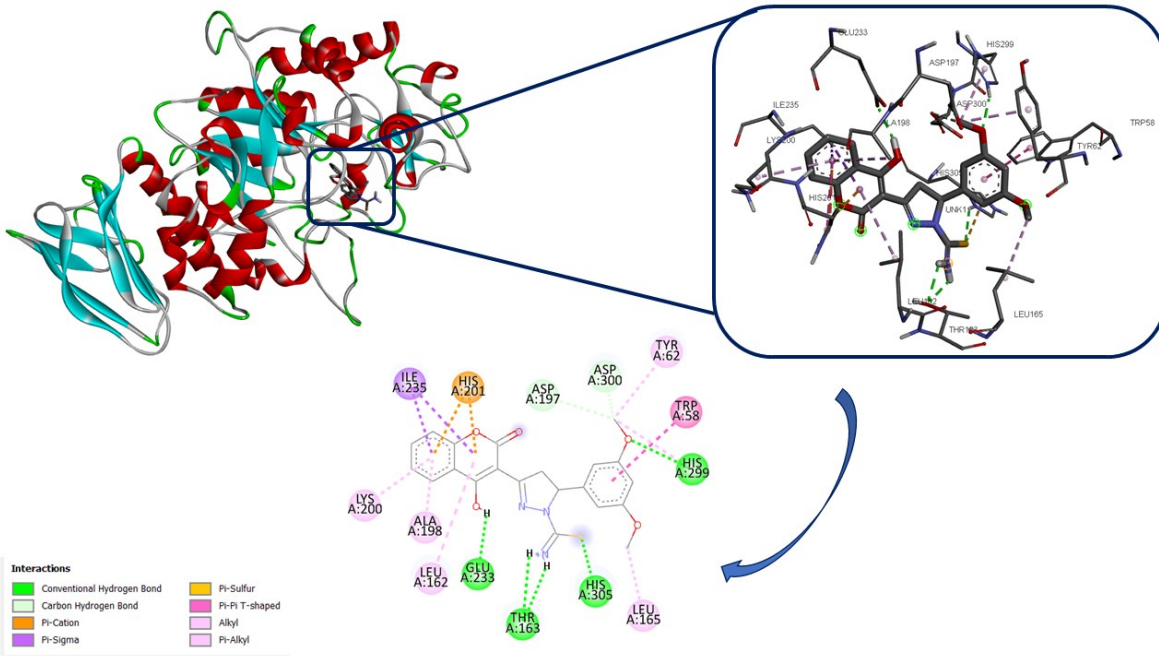
Şekil 3.51. α -Amilaz-(**3d**) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.

Bileşik (**7a**)'nın α -amilaz enziminin aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu **Şekil 3.52**'de görülmektedir. Bağlanma enerjisi -7,68 kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları -Leu162, Ala198, Lys200, Ile235, His201, Gly306 ve His305- olarak bulunmuştur.

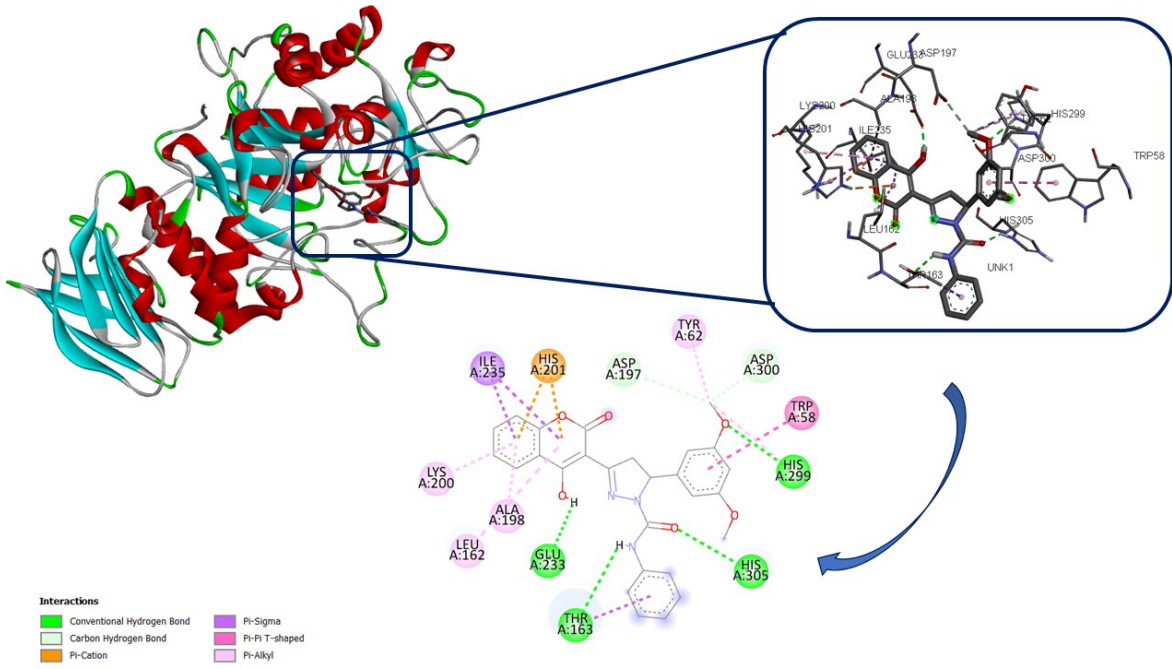
Bileşik (**7b**)'nın α -amilaz enziminin aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu **Şekil 3.53**'de görülmektedir. Bağlanma enerjisi -8.59 kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları -Trp58, Tyr62, Leu162, Thr163, Leu165, Asp197, Ala198, Lys200, His201, Glu233, Ile235, His299, Asp300- olarak bulunmuştur.



Şekil 3.52. α -Amilaz-(7a) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.



Şekil 3.53. α -Amilaz-(7b) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.



Şekil 3.54. α -Amilaz-(7c) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.

Bileşik (7c)'nin α -amilaz enziminin aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu **Şekil 3.54**'de görülmektedir. Bağlanma enerjisi -8.88 kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları -Trp58, Tyr62, Leu162, Thr163, Ala198, Asp197, Lys200, His201, Glu233, Ile235, His299, Asp300, His305- olarak bulunmuştur.

Teorik çalışmalar incelendiğinde bileşiklerin enzime bağlanma enerjilerinin -7.23 ve -8.88 kkal/mol aralığında olduğu; inhibisyon değerlerinin de 1.21 ve 5.01 nM aralığında olduğu belirlenmiştir (**Tablo 3.6**). Buna göre bileşik (7) en yüksek (-8.07 kkal/mol, $K_i=1.21$ nM) ve (3a) en düşük bağlanma enerjisine (-7.23 kkal/mol, $K_i=5.01$ nM) sahiptir. En yüksek bağlanma afinitesine sahip yapılardan biri olan bileşik (7)'nin (-8.07 kkal/mol, $K_i=1.21$ nM) deneysel IC_{50} değerinin nispeten daha düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte (3a), (3d), (7a) ve (7c)'nin dikkate değer şekilde yüksek inhibitör aktivitesinin bileşik (3a) ve (7a)'daki pirazol halkasına bağlı bir benzen halkasından ve (3d) ve (7c)'deki pirazol grubuna bağlı bir amid bağı ve benzen halkasından ileri geldiği düşünülmektedir.

Tablo 3.6. α -Amilaz enzimi ve bileşiklerin bağlanma enerjileri, bağlanma bölgesinde yer alan amino asit kalıntıları ve inhibisyon sabiti değerleri.

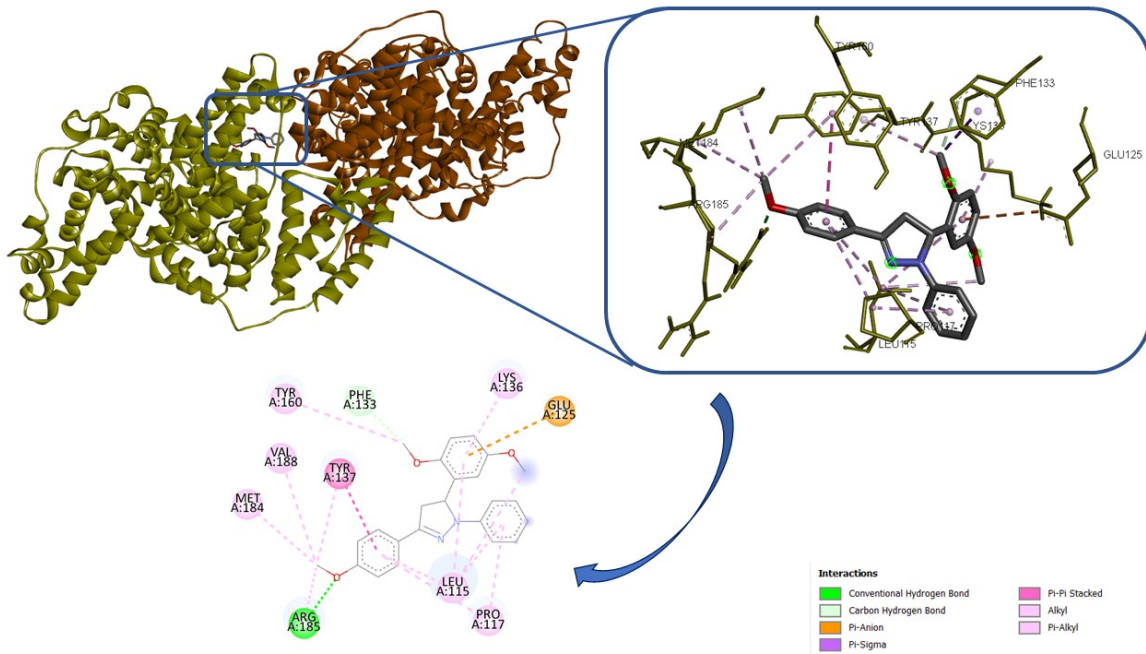
Bileşikler	Bağlanma enerjileri (ΔG) (kkal/mol)	İnhibisyon sabiti (Ki) (nM)	Bağlanma bölgesindeki amino asit kalıntıları
3a	-7.23	5.01	Asp197, Asp300, His299, Tyr62, His305, Leu162, Trp59, Leu165, Thr163
3d	-7.90	1.62	Trp59, Try62, Leu162, Leu165, Asp197, Thr163, His299, Asp300, Gly306
7	-8.07	1.21	Try62, His101, Try151, Leu165, His201, Lys200, Ile235, Ala198, Asp197, His299, Asp300
7a	-7.68	2.34	Leu162, Ala198, Lys200, Ile235, His201, Gly306, His305
7c	-8.88	3.09	Trp58, Tyr62, Leu162, Thr163, Ala198, Asp197, Lys200, His201, Glu233, Ile235, His299, Asp300, His305
Akarboz	-14.55	2,15	Trp59, Gln63, Tyr62, Tyr151, Leu165, Arg195, Ala198, Lys200, His201, Glu233, His299, Asp300, His305, Gly306

Deneysel çalışmalar ve teorik veriler kıyaslandığında söz konusu bileşiklerin deneysel çalışmalardaki bulgularına göre enzim üzerinde yüksek inhibitör aktiviteye sahip olduğu bulunmuş ve teorik çalışmaların bu inhibisyon değerlerini desteklediği belirlenmiştir.

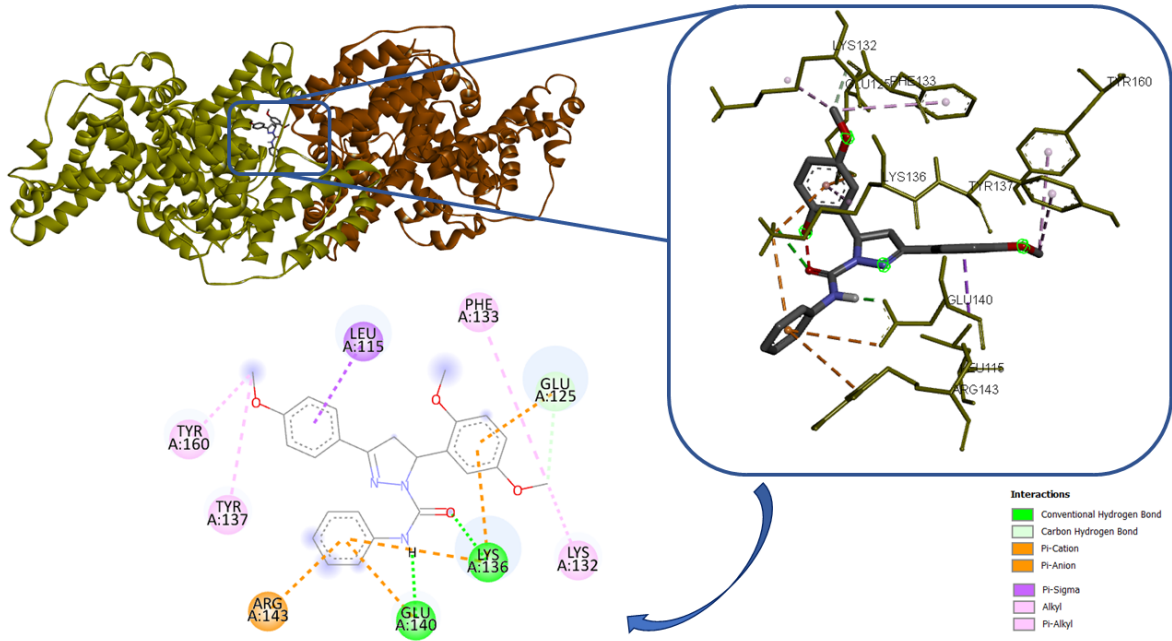
3.4.2.3. BSA proteini ile (3a), (3d), (7) ve (7a) bileşiklerine ait etkileşim sonuçları

Ligandın hedef proteine bağlanma ilgisini temsil eden bağlanma serbest enerji skoru moleküler yerleştirme ile bulundu. Ayrıca protein-ligand bağlanma çalışmalarında önem taşıyan tirozin ve triptofan amino asit kalıntılarının özellikle moleküler yerleştirme çalışmalarında etkileşimde olup olmadığı ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Bileşik (3a)'nın BSA'nın aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu **Şekil 3.55'da** görülmektedir. Bağlanma enerjisi -8,77 kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları -Pro117, Leu115, Glu125, Phe133, Lys136, Tyr137, Tyr160, Val188, Met184 ve Arg185-olarak bulunmuştur. Bu etkileşimdeki amino asit kalıntıları ayrı ayrı değerlendirildiğinde pi-sigma/alkil veya pi-pi etkileşimlerinin yoğunlukta olduğu görülmüştür. Bunların içinde özellikle tirozin amino asidinin pi-pi etkileşiminde olması dikkat çekmiştir.

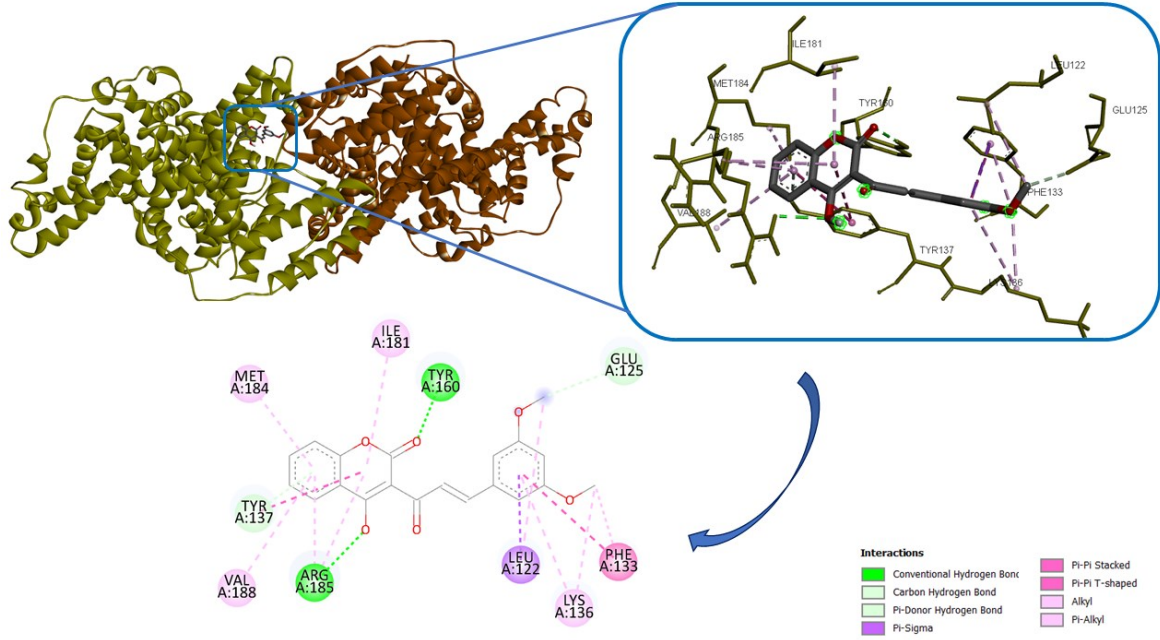


Şekil 3.55. BSA-(3a) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.



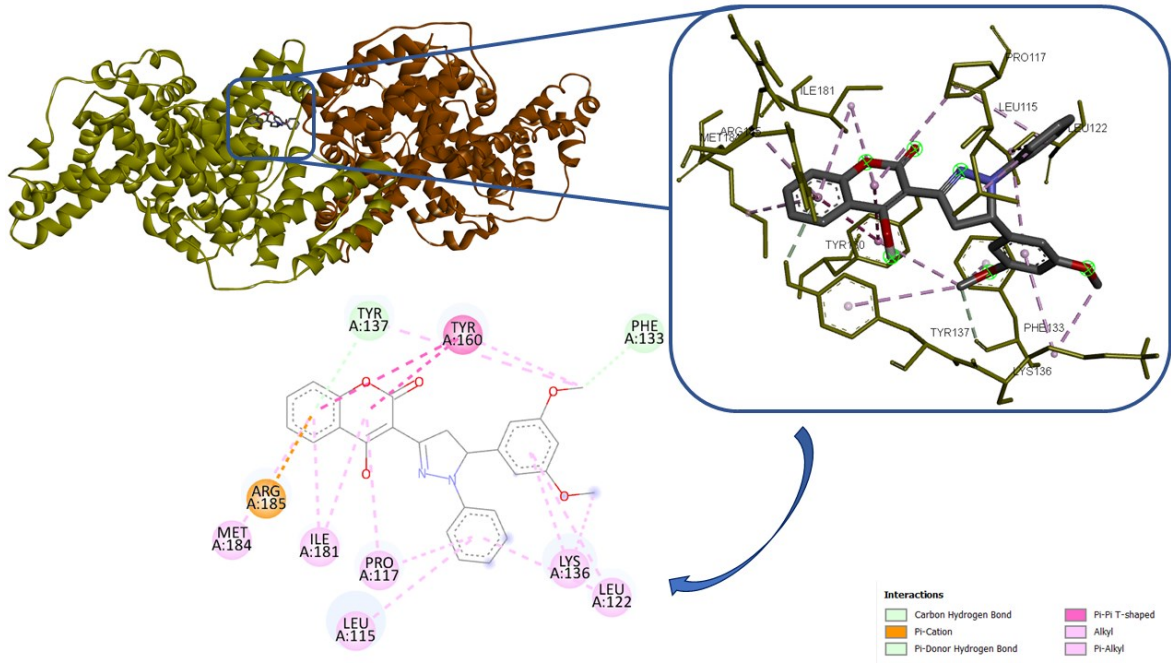
Şekil 3.56. BSA-(3d) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.

Bileşik (3d)'nin BSA'nın aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu **Şekil 3.56'da** görülmektedir. Bağlanma enerjisi -7,91 kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları -Leu115, Glu125, Lys132, Lys136, Tyr137, Tyr160, Phe133, Glu140 ve Arg143- olarak bulunmuştur.



Şekil 3.57. BSA-(7) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.

Bileşik (7)'nin BSA'nın aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu **Şekil 3.57'** da görülmektedir. Bağlanma enerjisi -9,50 kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları –Leu122, Glu125, Phe133, Lys136, Tyr137, Tyr160, Ile181, Met184, Arg185 ve Val188- olarak bulunmuştur. Sisteme ait bağlar incelendiğinde ise makromolekül ve bileşik (7) arasında Glu125, Tyr160, Arg185 ve Tyr137 ile hidrojen bağı, Leu122, Lys136, Ile181, Met184 ve Val188 amino asitleri ile pi-sigma etkileşimleri söz konusuyken Phe133 amino asidinin fenil halkası ve bileşiğin benzen halkası arasında pi-pi etkileşimi olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca kumarin halkasının da pi-pi etkileşimlerde olduğu dikkat çekmektedir. Bunların içinde Tyr137 ile pi-donor etkileşiminde olması ve Tyr160 ile hidrojen bağı yapması halkanın etkinliğini göstermektedir.



Şekil 3.58. BSA-(7a) sistemine ait moleküler yerleştirme sonucu etkileşimler.

Bileşik (7a)'nin BSA'nın aktif bölgesindeki en uygun bağlanma konformasyonu **Şekil 3.58'da** görülmektedir. Bağlanma enerjisi -11.07 kcal/mol olarak bulunmuş olup; bağlanma bölgesinde etkileşime giren amino asit kalıntıları -Leu115, Pro117, Leu122, Lys136, Phe133, Tyr137, Tyr160, Ile181, Met184 ve Arg185- olarak bulunmuştur. Bu etkileşimdeki amino asit kalıntıları ayrı ayrı değerlendirildiğinde sistemde hidrojen bağının bulunmaması dikkat çekmiştir. Bununla beraber pi-pi ve pi-alkil etkileşimlerinin yoğun olduğu özellikle bu etkileşimlerin Tyr137 ve Tyr160 ile kumarin halkası arasında olduğu görülmüştür.



4. SONUÇLAR

Diyabet, dünya çapında en yaygın hastalık olup, hızla artan yayılma oranı ve mevcut ilaçların hastalığı kontrol altına alma konusundaki yetersizliği sağlık sistemi için önemli bir zorluk oluşturmaktadır. Çalıştığımız DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri, bu hastalığın tedavisi için çok önemli terapötik hedeflerdir.

Bu enzimlerin bilinen inhibitörleri ve literatürdeki potansiyel inhibitör molekülleri oldukça büyüktür ve temel sentez yöntemleri oldukça karmaşıktır. Bu nedenle, yenilikçi, pratik ve kolay yöntemlerle sentezlenen sentetik bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, pirazol içeren kumarinlerin sentezi ve türevlendirilmesi için yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Sentez çalışmalarında daha kısa sürede daha ekonomik ve kolay sentezlenebilen bileşikler avantaj sağlamaktadır. Bileşiklerimizin sadece iki basamakta sentezlenmeleri ve nispeten küçük moleküller olmaları literatürdeki moleküllere göre bileşiklerimize üstünlük kazandırmaktadır. Proje kapsamında kumarin/pirazol, pirazol ve amid bağı içeren grupların tek bir yapıda bir araya getirilmiş ve nükleofilik katılma yoluyla yedi yeni N-heterosiklik türev serisinin ve ayrıca kumarin/kalkon yapısı içeren sekizinci bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlediğimiz bu bileşikler daha önce sentezlenmemiş özgün yapılar olup literatüre kazandırılmıştır.

Azot atomuna sahip beş üyeli heterosiklik türev olan pirazol çekirdeği içeren bileşiklerimiz DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz için iyi inhibitör aktivitesi göstermiştir. Öte yandan, kumarin halkasının bu enzimler üzerinde etkili olduğu ve aktivitelerini engellediği kanıtlanmıştır. Tiyosemikarbazid/semikarbazid türevleri ve fenil hidrazin kimyada önemli heterosiklik yapıları elde etmek için uygun reaktiflerdir. Bu substitüentler heterosiklik yapılara hidrolaz enzimlerinin hedefi olan amid bağını sağlamaktadır. Ek olarak, elektron verici gruplardan metil veya metoksi gruplarının varlığı inhibisyon etkisi için oldukça önemlidir.

Tüm bileşiklerin DPP4, α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Bileşikler arasında (**3b**) (IC_{50} :20.08 μ M) ve (**7a**)'nın (IC_{50} :22.51 μ M), DPP4 enzimi üzerinde belirgin bir inhibe edici aktiviteye sahip olduğu; bununla birlikte IC_{50} :89.41 μ M değeri ile bileşik (**7b**)'nin en düşük inhibisyon aktivitesi gösterdiği

bulunmuştur. Ortak iskelete sahip (7a) ve (7b)'nin aralarındaki bu büyük inhibitör aktivite farkının (7b)'deki tiyoamid grubundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca kumarin, pirazol halkaları ve amid bağının birleşimi olarak tasarlanan bileşik (7b) ve (7c)'nin de önemli bir inhibisyon sağlamamıştır. Bileşikler arasında (3a), (3d), (7) ve (7a)'nın (sırasıyla IC₅₀:13.49µM, 17.61 µM, 77,02 µM ve 16,69 µM) α-amilaz inhibisyonunda en dikkat çekici inhibitör aktiviteye sahip olduğu olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, α-amilaz ile bileşiklerden (3a), (3c), (3d), (7a), (7b) ve (7c) 'nın moleküler yerleştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu sonuçlara göre bileşiklerdeki benzen halkasının aktif bölgedeki pozisyonları incelendiğinde bilinen bir α-amilaz inhibitörü olan akarbozun konformasyonuna benzediği ve buna ek olarak, elektron verici grupların etkileşimde etkileşimde olduğu bulunmuştur. Elde edilen bulgular *in vitro* ve *in silico* sonuçların birbirini desteklediği yönündedir. Çıkarımlarımıza göre, farmakofor olduğu düşünülen bu fonksiyonel grupların ayrı uçlarda bulunduğu daha iyi bir inhibitör aktivitesi verdiği görülmüştür. Bileşiklerin α-glukosidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelendiğinde ise enzimin bilinen inhibitörü ile kıyaslandığında bileşiklerin tümünün kayda değer bir inhibitör aktivitesine sahip olmadığı düşünülebilir.

Tüm enzimlerin inhibisyon değerleri incelendiğinde bileşiklerin α-amilaz için potansiyel inhibitör olduğu sonucuna varılmış ve en iyi inhibisyon değeri veren dört bileşik (3a, 3d, 7 ve 7a) ile *in vitro* ve *in silico* BSA bağlanma çalışmaları yapılmıştır. Negatif ΔG değerlerine göre BSA ile 3a, 3d, 7 ve 7a sistemleri arasındaki etkileşimlerin kompleks oluşumunu desteklediği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte moleküler yerleştirme çalışmaları sonucunda elde edilen protein-ligand ilgisinin skoru ile *in vitro* bağlanma sonuçlarında elde edilen ΔG değerlerinin aynı skalada olduğu bulunmuştur. *In vitro* çalışmalarla elde edilen sonuçlara göre çizilen UV-Vis grafiklerinde maksimum dalga boyunda kaymalar gözlemlenmiştir. Ayrıca hesapsal çalışmalar incelendiğinde tirozin amino asit kalıntılarının ligandlar ile etkileşimde olması deneysel çalışmalardaki kaymaları buna bağlı olarak konformasyonel değişimleri göstermektedir. Buna göre *in vitro* ve *in silico* BSA bağlanma çalışmalarından elde edilen sonuçların birbirleri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Sentezlenen bileşikler α-amilaz enzimi üzerinde etkili olup; diyabet tedavisinde potansiyel taşımaktadır. Çalışmalarımızın ileride *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerektiği

görüŖündeyiz. Bu alıŖma, dünya genelinde antidiyabetik ilaç geliŖtirme üzerine alıŖan araŖtırmacılara yardımcı olacak, gelecekte daha güçlü ve daha güvenli inhibitörlerin bulunmasına katkı sağlayacaktır.





KAYNAKLAR

1. Okechukwu, P., et al., *In-vitro anti-diabetic activity and in-silico studies of binding energies of palmatine with alpha-amylase, alpha-glucosidase and DPP-IV enzymes*. Pharmacia, 2020. **67**.
2. Chen, T.-H., et al., *Garcinia linii extracts exert the mediation of anti-diabetic molecular targets on anti-hyperglycemia*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021. **134**: p. 111151.
3. Reaven, G.M., *Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes, 1988. **37**(12): p. 1595-1607.
4. Hamamcıoglu, A.C., *Diyabette oksidatif stres ve antioksidanların rolü*. Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi, 2017. **1**(1): p. 7-13.
5. Mohamed, L., et al., *Chronic Complications of Diabetes Mellitus: A Mini Review*. Current Diabetes Reviews, 2017. **13**(1): p. 3-10.
6. Saltiel, A.R. and J.M. Olefsky, *Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes*. Diabetes, 1996. **45**(12): p. 1661-1669.
7. Pérez-Cruz, F., et al., *Synthesis and electrochemical and biological studies of novel coumarin–chalcone hybrid compounds*. Journal of medicinal chemistry, 2013. **56**(15): p. 6136-6145.
8. Kalirajan, R., et al., *Synthesis and biological evaluation of some heterocyclic derivatives of chalcones*. International J. of Chem Tech Research, 2009. **1**(1): p. 27-34.
9. Dhumaskar, K.L., et al., *Graphite catalyzed solvent free synthesis of dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones and their antidiabetic activity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2014. **24**(13): p. 2897-2899.
10. Dilworth, L., A. Facey, and F. Omoruyi, *Diabetes Mellitus and Its Metabolic Complications: The Role of Adipose Tissues*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(14): p. 7644.
11. Landon, B.E., et al., *Trends in diabetes treatment and monitoring among Medicare beneficiaries*. Journal of general internal medicine, 2018. **33**: p. 471-480.
12. Ashcroft, F.M., *Mechanisms of the glycaemic effects of sulfonylureas*. Hormone and Metabolic Research, 1996. **28**(09): p. 456-463.
13. Kandra, L. and G. Gyémánt, *Examination of the active sites of human salivary α -amylase (HSA)*. Carbohydrate Research, 2000. **329**(3): p. 579-585.
14. Richter, B., et al., *Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors for type 2 diabetes mellitus*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2008(2).
15. Baetta, R. and A. Corsini, *Pharmacology of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: similarities and differences*. Drugs, 2011. **71**: p. 1441-1467.
16. Ahrén, B., *DPP-4 inhibitors*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. **21**(4): p. 517-533.
17. Zhou, Q., et al., *Inhibitory mechanism of α -glucosidase by liquiritigenin and its combined effect with acarbose: Multi-spectroscopic analyses and molecular docking simulation*. Food Bioscience, 2025. **63**: p. 105659.

18. Yousuf, H., et al., *Dihydropyridines as potential α -amylase and α -glucosidase inhibitors: Synthesis, in vitro and in silico studies*. Bioorganic Chemistry, 2020. **96**: p. 103581.
19. Soni, R. and S.S. Soman, *Design and synthesis of aminocoumarin derivatives as DPP-IV inhibitors and anticancer agents*. Bioorganic Chemistry, 2018. **79**: p. 277-284.
20. Matheussen, V., et al., *Method comparison of dipeptidyl peptidase IV activity assays and their application in biological samples containing reversible inhibitors*. Clinica Chimica Acta, 2012. **413**(3): p. 456-462.
21. Deacon, C.F., *Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2011. **13**(1): p. 7-18.
22. Drucker, D.J., *Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: preclinical biology and mechanisms of action*. Diabetes care, 2007. **30**(6): p. 1335-1343.
23. Pathak, R. and M.B. Bridgeman, *Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors in the management of diabetes*. Pharmacy and Therapeutics, 2010. **35**(9): p. 509.
24. Amanatidou, D., et al., *Thiazolidine-4-One Derivatives with Variable Modes of Inhibitory Action Against DPP4, a Drug Target with Multiple Activities and Established Role in Diabetes Mellitus Type II*. Pharmaceuticals, 2025. **18**(1): p. 52.
25. Vaithiyalingam, M., et al., *Isolation of 6-gingerol and semi-synthesis of 1,4-benzodiazepines derivatives: An in-situ pharmacokinetics properties, molecular docking and molecular dynamics simulation assessments*. Saudi Journal of Biological Sciences, 2024. **31**(8): p. 104048.
26. Bhat, A.A., N. Tandon, and I. Singh, *Pyrrolidine derivatives as α -amylase and α -glucosidase inhibitors: Design, synthesis, structure-activity relationship (SAR), docking studies and HSA binding*. Heliyon, 2024. **10**(20).
27. Bhat, A.A., N. Tandon, and I. Singh, *Pyrrolidine derivatives as α -amylase and α -glucosidase inhibitors: Design, synthesis, structure-activity relationship (SAR), docking studies and HSA binding*. Heliyon, 2024. **10**(20).
28. Brayer, G.D., et al., *Subsite Mapping of the Human Pancreatic α -Amylase Active Site through Structural, Kinetic, and Mutagenesis Techniques*. Biochemistry, 2000. **39**(16): p. 4778-4791.
29. Rydberg, E.H., et al., *Mechanistic Analyses of Catalysis in Human Pancreatic α -Amylase: Detailed Kinetic and Structural Studies of Mutants of Three Conserved Carboxylic Acids*. Biochemistry, 2002. **41**(13): p. 4492-4502.
30. Karrouchi, K., et al., *Synthesis, crystal structure, DFT, α -glucosidase and α -amylase inhibition and molecular docking studies of (E)-N'-(4-chlorobenzylidene)-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carbohydrazide*. Journal of Molecular Structure, 2021. **1245**: p. 131067.
31. NAHOUM, V., et al., *Crystal structures of human pancreatic α -amylase in complex with carbohydrate and proteinaceous inhibitors*. Biochemical Journal, 2000. **346**(1): p. 201-208.
32. Park, H., et al., *Discovery and biological evaluation of novel α -glucosidase inhibitors with in vivo antidiabetic effect*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008. **18**(13): p. 3711-3715.

33. Chaudhry, F., et al., *Hetarylcoumarins: Synthesis and biological evaluation as potent α -glucosidase inhibitors*. *Bioorganic Chemistry*, 2017. **73**: p. 1-9.
34. Singh, A.K., et al., *Evaluation of antidiabetic activity of dietary phenolic compound chlorogenic acid in streptozotocin induced diabetic rats: Molecular docking, molecular dynamics, in silico toxicity, in vitro and in vivo studies*. *Computers in Biology and Medicine*, 2021. **134**: p. 104462.
35. Abbas, M. and N. Arshad, *Synthesis, highly potent α -glucosidase inhibition, antioxidant and molecular docking of various novel dihydropyrimidine derivatives to treat diabetes mellitus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2025. **115**: p. 130016.
36. Reddy, D.S., et al., *Synthesis and evaluation of novel coumarin-oxime ethers as potential anti-tubercular agents: Their DNA cleavage ability and BSA interaction study*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018. **150**: p. 864-875.
37. Bayraktutan, T. and Y. Onganer, *Biophysical influence of coumarin 35 on bovine serum albumin: Spectroscopic study*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017. **171**: p. 90-96.
38. Wang, B.-L., et al., *Exploring the binding interaction between bovine serum albumin and perindopril as well as influence of metal ions using multi-spectroscopic, molecular docking and DFT calculation*. *Chemical Physics*, 2020. **530**: p. 110641.
39. Sharma, K., et al., *Interaction of coumarin triazole analogs to serum albumins: Spectroscopic analysis and molecular docking studies*. *Journal of Molecular Recognition*, 2020. **33**(6): p. e2834.
40. Mutafoğlu, B.S., F. Meletli, and Ö. Damiş, *Investigation of the interaction of monoamine oxidase (MAO) inhibitor biscoumarins with hemoglobin and albumin using multi-spectroscopic techniques and molecular docking*. *Analytical Letters*, 2025. **58**(12): p. 2032-2055.
41. Wang, C., et al., *Investigation on the interaction of glipizide with bovine hemoglobin by spectroscopy and molecular docking*. *Spectroscopy Letters*, 2017. **50**(9): p. 476-481.
42. Yu, J., et al., *Binding interaction of sodium benzoate food additive with bovine serum albumin: multi-spectroscopy and molecular docking studies*. *BMC chemistry*, 2019. **13**(1): p. 95.
43. Tanak, H., et al., *Crystal and Molecular Structure of 3, 5-Diphenyl-4, 5-dihydro-2-phenylcarboxamide-1H-pyrazole*. *Crystallography Reports*, 2017. **62**: p. 1078-1082.
44. Kanmazalp, S.D., et al., *Crystal Structure and Hirshfeld Surface Analysis of 3,5-Bis(4-Methoxyphenyl)-4,5-Dihydro-1H-Pyrazole-1-Carbothioamide*. *Journal of Structural Chemistry*, 2020. **61**(1): p. 126-132.
45. El Ashry, E.S.H., et al., *New 4-(arylidene)amino-1,2,4-triazole-5-thiol derivatives and their acyclo thioglycosides as α -glucosidase and α -amylase inhibitors: Design, synthesis, and molecular modelling studies*. *Journal of Molecular Structure*, 2022. **1259**: p. 132733.
46. Pogaku, V., et al., *Design, synthesis, molecular modelling, ADME prediction and anti-hyperglycemic evaluation of new pyrazole-triazolopyrimidine hybrids as potent α -glucosidase inhibitors*. *Bioorganic Chemistry*, 2019. **93**: p. 103307.

47. Bai, X.-G., et al., *Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Alkoxyated Chalcones*. *Molecules*, 2014. **19**(11): p. 17256-17278.
48. Wang, X., et al., *Mechanistic study and synergistic effect on inhibition of α -amylase by structurally similar flavonoids*. *Journal of Molecular Liquids*, 2022. **360**: p. 119485.
49. Mellado, M., et al., *Hansch's analysis application to chalcone synthesis by Claisen-Schmidt reaction based in DFT methodology*. *Chemical Papers*, 2018. **72**(3): p. 703-709.
50. Özkınalı, S., et al., *Synthesis of new azo schiff bases of pyrazole derivatives and their spectroscopic and theoretical investigations*. *Journal of Molecular Structure*, 2018. **1174**: p. 74-83.
51. Sharma, S., et al., *Pyrazoline scaffold: hit identification to lead synthesis and biological evaluation as antidiabetic agents*. *Future Medicinal Chemistry*, 2023. **15**(1): p. 9-24.
52. Ari, H., et al., *Synthesis, spectral and theoretical (DFT) investigations of 4,6-diphenyl-6-hydroxy-1-[(1Z)-1-phenyl ethylidene] amino}tetrahydropyrimidine-2(1H)-one*. *Journal of Molecular Structure*, 2022. **1250**: p. 131820.
53. Abdelbaki, H., et al., *Synthesis of bioactive 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole-linked Thiosemicarbazone derivatives using Cu₂O microbeads catalysis for enhanced antibacterial and antioxidant activities*. *Journal of Molecular Structure*, 2025. **1324**: p. 140784.
54. Trivedi, A.R., et al., *Synthesis and biological evaluation of some new pyrimidines via a novel chalcone series*. *Arkivoc*, 2008. **11**: p. 131-141.
55. Köysal, Y., et al., *Crystal structure and computational studies of (3Z)-4-benzoyl-3-[(2, 4-dinitrophenyl) hydrazinylidene]-5-phenylfuran-2 (3H)-one*. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 2016. **72**(12): p. 1852-1855.
56. Daina, A., O. Michielin, and V. Zoete, *SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 42717.
57. Riaz, R., et al., *Virtual screening, ADME prediction, drug-likeness, and molecular docking analysis of Fagonia indica chemical constituents against antidiabetic targets*. *Molecular Diversity*, 2024: p. 1-22.
58. Daina, A. and V. Zoete, *A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules*. *ChemMedChem*, 2016. **11**(11): p. 1117-1121.
59. Tiwari, S.S., et al., *In vitro and in vivo investigation of metabolic fate of riociguat by HPLC-Q-TOF/MS/MS and in silico evaluation of the metabolites by ADMET predictor™*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019. **164**: p. 326-336.
60. Ojha, P.K. and K. Roy, *Exploring structural requirements for a class of nucleoside inhibitors (PfdUTPase) as antimalarials: first report on QSAR, pharmacophore mapping and multiple docking studies*. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2013. **16**(9): p. 739-757.

61. Morris, G.M., et al., *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. Journal of computational chemistry, 2009. **30**(16): p. 2785-2791.
62. Kumar, S.P. and P.C. Jha, *Multi-pharmacophore modeling of caspase-3 inhibitors using crystal, dock and flexible conformation schemes*. Combinatorial chemistry & high throughput screening, 2018. **21**(1): p. 26-40.
63. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. Journal of computational chemistry, 2010. **31**(2): p. 455-461.
64. Wu, D., et al., *Synthesis, Structure–Activity Relationship, and Pharmacophore Modeling Studies of Pyrazole-3-Carbohydrazone Derivatives as Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitors*. Chemical biology & drug design, 2012. **79**(6): p. 897-906.
65. Abdelhafez, O.M., et al., *Synthesis, anticoagulant and PIVKA-II induced by new 4-hydroxycoumarin derivatives*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010. **18**(10): p. 3371-3378.
66. Al-Ayed, A.S., *Synthesis, spectroscopy and electrochemistry of new 3-(5-aryl-4, 5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)-4-hydroxy-2H-chromene-2-one 4, 5 as a novel class of potential antibacterial and antioxidant derivatives*. International Journal of Organic Chemistry, 2011. **1**(03): p. 87.
67. Nidhar, M., et al., *Design, synthesis and in-silico & in vitro enzymatic inhibition assays of pyrazole-chalcone derivatives as dual inhibitors of α -amylase & DPP-4 enzyme*. Chemical Papers, 2022. **76**(3): p. 1707-1720.
68. Lim, W.X.J., et al., *The Inhibitory Effects of New Zealand Pine Bark (Enzogenol®) on α -Amylase, α -Glucosidase, and Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) Enzymes*. Nutrients, 2022. **14**(8): p. 1596.
69. Liu, J.-J., et al., *Synthesis, biological evaluation of novel 4,5-dihydro-2H-pyrazole 2-hydroxyphenyl derivatives as BRAF inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012. **20**(20): p. 6089-6096.
70. Nidhar, M., et al., *Click inspired novel pyrazole-triazole-persulfonimide & pyrazole-triazole-aryl derivatives; Design, synthesis, DPP-4 inhibitor with potential anti-diabetic agents*. Bioorganic Chemistry, 2022. **120**: p. 105586.
71. Ramírez Fuentes, L., C. Richard, and L. Chen, *Sequential alcalase and flavourzyme treatment for preparation of α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitory peptides from oat protein*. Journal of Functional Foods, 2021. **87**: p. 104829.
72. Tao, Y., et al., *Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR*. Biomedical chromatography, 2013. **27**(2): p. 148-155.
73. Kundu, P. and N. Chattopadhyay, *Unraveling the binding interaction of a bioactive pyrazole-based probe with serum proteins: Relative concentration dependent 1:1 and 2:1 probe-protein stoichiometries*. Biophysical Chemistry, 2018. **240**: p. 70-81.
74. Liu, J., et al., *Characterizing the binding interaction of astilbin with bovine serum albumin: a spectroscopic study in combination with molecular docking technology*. RSC advances, 2018. **8**(13): p. 7280-7286.

75. Maurus, R., et al., *Alternative catalytic anions differentially modulate human α -amylase activity and specificity*. *Biochemistry*, 2008. **47**(11): p. 3332-3344.
76. Qureshi, M.A., et al., *Molecular interactions of esculin with bovine serum albumin and recognition of binding sites with spectroscopy and molecular docking*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2023. **41**(7): p. 2630-2644.
77. Sever, B., et al., *Pyrazole Incorporated New Thiosemicarbazones: Design, Synthesis and Investigation of DPP-4 Inhibitory Effects*. *Molecules*, 2020. **25**(21): p. 5003.
78. Aroua, L.M., et al., *Synthesis, bioactivity, and molecular docking of pyrazole bearing Schiff-bases as prospective dual α -amylase and α -glucosidase inhibitors with antioxidant activity*. *Journal of Molecular Structure*, 2025. **1320**: p. 139291.
79. Saeed, A., et al., *Novel pyrazoline linked acyl thiourea pharmacophores as antimicrobial, urease, amylase and α -glucosidase inhibitors: design, synthesis, SAR and molecular docking studies*. *RSC advances*, 2024. **14**(2): p. 1018-1033.

NAZENİN AKIN

Lisan:

- ✓ Kayseri Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2007-2011)
- ✓ T. C. Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Böl. (İng., %75 Burs) (2014-2018)

Yüksek Lisans: Kayseri Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Kimya Böl., Organik Kimya Anabilim Dalı (2011-2013)

“Çeşitli Semi ve Tiyosemi Karbazidlerinin 4-benzoil-1-(2,4-dinitrofenil)-5-fenil-1H-pirazol-3-karboksilli asit klorürü ve Çeşitli Kalkon Türevleri ile Reaksiyonları ve Bazı Pirazol-3-karboksilli asit klorürlerinin Çeşitli Aromatik Bileşikler ile Reaksiyonları”

Doktora: Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Kimya Böl., Biyokimya Anabilim Dalı (2018-2025)

“DPP4, α -Amilaz ve α -Glukosidaz Enzimlerinin İnhibisyonunu Hedefleyen Yeni Heterosiklik Bileşiklerin Sentezi, İn Vitro ve İn Siliko Çalışmaları”

Staj Deneyimleri:

Boğaziçi Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Hesapsal Kimya laboratuvarı

Marmara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya laboratuvarı

Yayınlar:

- ✓ **Akın, N.**, Demir, S., Çadır, M., İlhan, İ. Ö., & Ogan, A. (2025). Novel heterocyclic organic compounds as DPP-4, α -amylase, and α -glucosidase inhibitors: Design, synthesis, and docking studies. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications, 152354.

- ✓ Arı, H., Özpozan, T., Büyükmumcu, Z., **Akın, N.**, & İlhan, İ. Ö. (2022). Synthesis, spectral and theoretical (DFT) investigations of 4, 6-diphenyl-6-hydroxy-1-tetrahydropyrimidine-2 (1H)-one. *Journal of Molecular Structure*, 1250, 131820.
- ✓ Kanmazalp, S. D., Dege, N., İlhan, I. O., & **Akın, N.** (2020). Crystal Structure and Hirshfeld Surface Analysis of 3, 5-Bis (4-methoxyphenyl)-4, 5-Dihydro-1 H-Pyrazole-1-Carbothioamide. *Journal of Structural Chemistry*, 61(1), 126-132.
- ✓ Tanak, H., İlhan, İ. Ö., Dege, N., **Akın, N.**, & Sarıpınar, E. (2017). Crystal and Molecular Structure of 3, 5-Diphenyl-4, 5-dihydro-2-phenylcarboxamide-1H-pyrazole. *Crystallography Reports*, 62(7), 1078-1082.
- ✓ Köysal, Y., Bülbül, H., İlhan, İ. Ö., **Akın, N.**, & Dege, N. (2016). Crystal structure and computational studies of (3Z)-4-benzoyl-3-[(2, 4-dinitrophenyl)hydrazinylidene]-5-phenylfuran-2 (3H)-one. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 72(12), 1852-1855.
- ✓

Bildiriler:

- ✓ 9th International Conference MSNG 22-24.09.2022 Ankara, 172

Meletli F, Akın N, Yapar S, Ogan A. (2022) “Investigation of Binding Interactions Between Novel Pyrazole Derivatives and Bovine Hemoglobin by Spectroscopic and Molecular Docking Studies” International Conference MSNG 2022.

- ✓ 34. Kimya Kongresi 1-6.09.2022 Yalova, PS-088 311-312

Meletli F, Kazancıçok Z, **Akın N**, Danış Ö, Ogan A. “Kumarin Türevlerinin Fizyolojik pH’da Sığır Serum Albümine Bağlanmasının Spektral ve Moleküler Yerleştirme ile İncelenmesi” 34. Kimya Kongresi 2022

- ✓ 44th World Chemistry Congress 11-16.08.2013 İstanbul, P-0144 1262, P-0145 1265

Akın N, İlhan İÖ, Önal Z, Tınmaz F, Çadır M. (2013) “Synthesis and Reaction of 4-Benzoyl-

1-(2,4-dinitrophenyl)-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid chlorides with Various Semi- and Thiosemicarbazides Derivatives” IUPAC 2013.

Akın N, İlhan İÖ, Çadır M, Tınmaz F. (2013) “Design, Synthesis and Characterisation 1,3,5-trisubstituted pyrazolines of Some Novel Chalcone with Semicarbazide Derivatives” IUPAC 2013.

✓ 7th Eurasian Meeting On Heterocyclic Chemistry 17-21.06. 2012 İstanbul

Özpozan T, Arı H, Büyükmumcu Z, **Akın N**, İlhan İÖ. “N,3,5-triphenyl-4,5-dihydro- 1H-pyrazole-1-carbox amide: Vibrational Spectroscopic Investigation and Quantum Chemical Calculations” EurasianBioChem 2012.

Arı H, Özpozan T, Büyükmumcu Z, **Akın N**, İlhan İÖ. “Vibrational Spectroscopic Investigation and DFT Studies on 4,6-diphenyl-6-hydroxy-1-[52]tetrahydropyrimidin-2(1H)-one” EurasianBioChem 2012.

