



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI 7-HİDROKSİ KUMARİN BİLEŞİKLERİNİN PIHTILAŞMA FAKTÖRÜ Xa
ve ANTİDİYABETİK ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Furkan MELETLİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Özlem SAÇAN

Kimya Anabilim Dalı

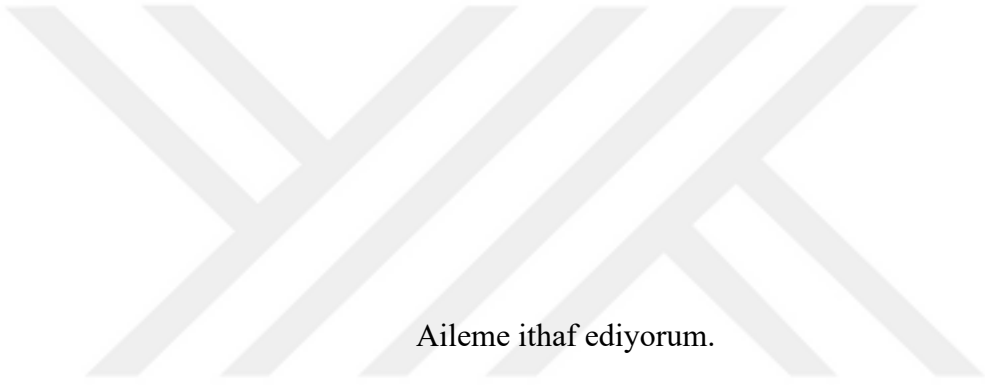
Biyokimya Programı

Haziran, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Furkan MELETLİ tarafından, **Prof. Dr. Özlem SAÇAN** danışmanlığında hazırlanan "**BAZI 7-HİDROKSİ KUMARİN BİLEŞİKLERİNİN PIHTILAŞMA FAKTÖRÜ Xa ve ANTİDİYABETİK ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **21/06/2023** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi		
	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Özlem SAÇAN	☒
	İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa	Kabul ☐
	Kimya Anabilim Dalı	Ret
ÜYE	Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ	☒
	İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa	Kabul ☐
	Kimya Anabilim Dalı	Ret
ÜYE	Prof. Dr. Ayşe OGAN	☒
	Marmara Üniversitesi	Kabul ☐
	Kimya Anabilim Dalı	Ret



Aileme ithaf ediyorum.

BÜTÇE DESTEKLERİ

BAZI 7-HİDROKSİ KUMARİN BİLEŞİKLERİNİN PIHTILAŞMA FAKTÖRÜ Xa ve ANTİDİYABETİK ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.



TEŞEKKÜR

Bu tezin yürütülmesi esnasında sahip olduğu bilgi, deneyim ve tecrübeleriyle beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam **Sayın Prof. Dr. Özlem SAÇAN’a**,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini ve fikirlerini her zaman benimle paylaşan, araştırmam süresince yakın ilgi ve önerileriyle beni yönlendiren **Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ**, **Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN**, **Sayın Prof. Dr. Özkan DANIŞ’a** ve **Sayın Prof. Dr. Serap DEMİR’e**,

Tez süresi boyunca bana her zaman yardımcı olan mesai arkadaşım **Sayın Arş. Gör. Mücahit ÖZDEMİR’e**,

Yüksek lisans eğitimim süresince 2210-A Genel Yurtiçi Yüksek Lisans Burs Programı ile maddi olarak beni destekleyen **Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-TÜBİTAK’a**,

Çocukluğumdan beri aldığım bütün kararlarda ve karşılaştığım zorluklarda her zaman benim yanımda olan ve destekleyen **çok kıymetli annem, babam ve abime**,

ve

Umutsuzluğa kapıldığım her anımda, varlığıyla beni güçlendiren ve yoluma devam etmeme sebep olan **çok sevgili Zeynep Sude YILMAZ’a**,

Sonsuz minnet, sevgi ve saygılarımla teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2023

Furkan MELETLİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	3
2.1. KUMARİNLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	3
2.1.1. Kumarinlerin Farmakokinetik Özellikleri.....	4
2.1.2. Kumarinlerin Biyolojik Aktiviteleri.....	4
2.1.3. Kumarinlerin Anti-diyabetik Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkileri	5
2.1.4. Kumarinlerin Üreaz İnhibitör Aktiviteleri	6
2.1.5. Kumarin ve Türevlerinin Antikoagülan Etkileri	6
2.1.6. Kumarinlerin Sentezi	8
2.1.6.1. Knoevenagel reaksiyonu.....	8
2.1.6.2. Pechmann Reaksiyonu.....	8
2.1.6.3. Perkin reaksiyonu.....	9
2.2. ENZİMLER	9
2.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması	10
2.2.1.1. Oksidoredüktazlar	12
2.2.1.2. Transferazlar	12
2.2.1.3. Hidrolazlar	12
2.2.1.4. Liyazlar.....	12
2.2.1.5. İzomerazlar.....	13
2.2.1.6. Ligazlar.....	13
2.2.1.7. Translokazlar.....	13
2.2.2. Enzimlerin Yapısı ve Genel Özellikleri	14
2.2.2.1. Enzim Aktif Bölgesi.....	15
2.2.2.2. Katalitik Etkinlik.....	17
2.2.2.3. Kofaktörler ve Koenzimler.....	17
2.2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler.....	18
2.2.3.1. Sıcaklık	18
2.2.3.2. pH	18

2.2.3.3. Enzim Konsantrasyonu.....	18
2.2.3.4. Substrat Konsantrasyonu.....	19
2.2.3.5. Diğer Faktörler	19
2.2.4. Enzim Kinetiği	19
2.2.4.1. Michaelis-Menten Denklemi.....	20
2.2.4.2. Lineweaver-Burk Grafiği.....	21
2.2.5. Enzim İnhibisyonu	21
2.2.5.1. Geri Dönüşümlü İnhibisyon	22
2.2.5.2. Geri Dönüşümsüz İnhibisyon	23
2.2.6. Enzim İnhibisyonunun Klinik Çalışmalardaki Önemi	24
2.3. α -AMİLAZ ve α -GLUKOZİDAZ ENZİMLERİNİN YAPISI ve FONKSİYONU	25
2.3.1. α -Amilaz ve α -Glukozidaz Enzimlerinin Karbohidrat Metabolizmasındaki Yerleri	26
2.3.2. Klinik Açısından α -Amilaz ve α -Glukozidaz Enzimlerinin Önemi	27
2.4. ÜREAZ ENZİMİNİN YAPISI ve FONKSİYONU	31
2.4.1. Üreaz Enziminin Çevresel Etkileri ve Klinik Çalışmalardaki Yeri	32
2.4.2. Üreaz İnhibitörleri	33
2.5. HEMOSTAZ.....	34
2.5.1. Primer ve Sekonder Hemostaz	35
2.5.2. Hemostazın Fazları.....	39
2.5.2.1. Vasküler Faz (Vazokonstriksiyon)	39
2.5.2.2. Trombosit Fazı (Adhezyon, Aktivasyon: Sekresyon ve Agregasyon).....	39
2.5.2.3. Koagülasyon Fazı (İntrinsik, Ekstrinsik ve Ortak yol)	39
2.5.2.4. Pıhtının Çözülmesi (Eritelizasyon ve Fibrinoliz)	41
2.6. HESAPSAL ÇALIŞMALARIN İLAÇ KEŞFİNDEKİ ÖNEMİ	41
3. YÖNTEM	43
3.1. DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR.....	43
3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	43
3.3. DENEYSEL TASARIM.....	44
3.4. BİLEŞİKLERİN ADME ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER YERLEŞTİRME ÇALIŞMALARININ YAPILMASI.....	45
3.4.1. Kumarin-Ftalonitril Türevlerinin Doking İşlemine Hazırlanması	45
3.4.2. Enzim Dosyalarının Hazırlanması	45
3.4.3. Doking Çalışması	46

3.5. KUMARİN-FTALONİTRİL TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU	46
3.5.1. 4-[7-Oksi-3-fenilkumarin]ftalonitril Sentezi (K1)	46
3.5.2. 4-[7-Oksi-3-(p-tolil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K2)	48
3.5.3. 4-[7-Oksi-3-(4-metoksifenil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K3).....	49
3.5.4. 4-[7-Oksi-3-(4-nitrofenil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K4).....	51
3.5.5. 4-[7-Oksi-3-(bifenil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K5)	52
3.5.6. 4-[7-Oksi-3-(4-dimetilaminofenil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K6).....	54
3.5.7. 4-[7-Oksi-3-(4-florofenil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K7)	55
3.5.8. 4-[7-Oksi-3-(4-bromofenil)-kumarin]ftalonitril Sentezi (K8)	56
3.6. BİYOKİMYASAL ANALİZ.....	58
3.6.1. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Çalışmaları	58
3.6.2. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin α -Amilaz İnhibisyon Aktivitesi	58
3.6.3. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin α -Glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi	60
3.6.4. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Üreaz İnhibisyon Aktivitesi.....	61
3.6.5. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Tromboplastik Aktiviteleri	62
3.6.6. İstatiksel Analiz.....	63
4. BULGULAR	64
4.1. KUMARİN-FTALONİTRİL TÜREVLERİNİN HESAPSAL ÇALIŞMALARI	64
4.2. KUMARİN-FTALONİTRİL TÜREVLERİNİN ENZİM İNHİBİSYONU VE TROMBOPLASTİK AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİLERİ	66
4.2.1. α -Amilaz Enzimi Aktivitesine Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Etkisi.....	66
4.2.2. α -Glukozidaz Enzimi Aktivitesine Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Etkisi.....	68
4.2.3. Üreaz Enzimi Aktivitesine Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Etkisi	70
4.2.4. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Tromboplastik Aktivite Üzerine Etkileri.....	72
4.2.5. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin <i>In Vitro</i> ve <i>In Silico</i> Çalışmaları	73
5. TARTIŞMA.....	79
5.1. KUMARİN-FTALONİTRİL TÜREVLERİNİN SPEKTRAL BULGULARININ İNCELENMESİ.....	79
5.2. KUMARİN-FTALONİTRİL TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTE BULGULARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Kumarin genel formülü.	3
Şekil 2.2: Kumarinlerin sınıflandırılmasına örnek bileşikler; a) basit kumarinler, b) furanokumarinler, c) pironokumarinler ve d) piron-substitue kumarinler.....	4
Şekil 2.3: Kumarin türevlerinin terapötik uygulamaları.....	5
Şekil 2.4: Varfarin ve asenokumarol yapısı.....	7
Şekil 2.5: K vitamininin pıhtılaşmadaki rolü.	8
Şekil 2.6: Knoevenagel reaksiyonunun genel sentez şeması.....	8
Şekil 2.7: Pechmann reaksiyonunun genel sentez şeması.	8
Şekil 2.8: Perkin reaksiyonunun genel sentez şeması.	9
Şekil 2.9: Enzim yapısının genel görüntüsü (PDB: 1DGF, insan eritrosit katalaz enzimi).....	10
Şekil 2.10: Enzimlerin sınıflandırılması.....	11
Şekil 2.11: Oksidoredüktaz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.	12
Şekil 2.12: Transferaz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.	12
Şekil 2.13: Hidrolaz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.	12
Şekil 2.14: Liyaz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.	12
Şekil 2.15: İzomeraz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.....	13
Şekil 2.16: Ligaz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.	13
Şekil 2.17: Bir reaksiyonun enzimatik ve enzimatik olmayan enerji diyagramı.....	14
Şekil 2.18: Enzimatik reaksiyonun genel şeması.	15
Şekil 2.19: a) Anahtar-kilit modeli ve b) Uyarılmış uyum modeli.....	17
Şekil 2.20: Enzim katalizli bir reaksiyona a) sıcaklık, b) pH, c) enzim konsantrasyonu ve d) substrat konsantrasyonu etkisi.	19
Şekil 2.21: a) Michaelis-Menten grafiği ve b) Lineweaver-Burk grafiği.....	21

Şekil 2.22: Yarışmalı inhibisyon tipinin genel reaksiyonu ve Michaelis-Menten grafiği.....	22
Şekil 2.23: Yarışmasız inhibisyon tipinin genel reaksiyonu ve Michaelis-Menten grafiği.....	23
Şekil 2.24: Yarı-yarışmalı inhibisyon tipinin genel reaksiyonu ve Michaelis-Menten grafiği.....	23
Şekil 2.25: İnhibitörün enzimde substrat girişini engellemesi.	24
Şekil 2.26: a) İnsan α -amilaz yapısı (PDB: 1SMD) b) Arpa β -amilazı yapısı (PDB: 2XFR) c) <i>Penicillium oxalicum</i> γ -amilaz yapısı (6FHV).	25
Şekil 2.27: <i>Sulfolobus solfataricus</i> α -glukozidaz yapısı (PDB: 2G3N).	26
Şekil 2.28: Akarboz bileşiği.	30
Şekil 2.29: Vogliboz bileşiği.	30
Şekil 2.30: Miglitol bileşiği.	31
Şekil 2.31: a) PDB ID: 4H9M (<i>Canavalia ensiformis</i> üreazı) b) PDB ID: 2KAU (<i>Klebsiella aerogenes</i> üreazı).	31
Şekil 2.32: Üreaz enziminin hidrolitik mekanizması.	32
Şekil 2.33: a) PDB ID: 1E9Y (<i>Helicobacter pylori</i> üreazı) b) PDB ID: 2KAU c) PDB ID: 4H9M.	32
Şekil 2.34: Çeşitli üreaz inhibitörleri.	34
Şekil 2.35: Primer hemostaz.	37
Şekil 2.36: Sekonder hemostaz.	38
Şekil 2.37: İntrinsik yolun pıhtılaşma mekanizması.	40
Şekil 2.38: Ekstrinsik yolun pıhtılaşma mekanizması.	40
Şekil 2.39: Fibrin oluşumunun son basamakları (Ortak yol).	41
Şekil 2.40: Moleküler yerleştirme sürecinin şematik hali.	42
Şekil 3.1: K1 bileşiğinin sentez reaksiyonu.	47
Şekil 3.2: K1 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.	47
Şekil 3.3: K2 bileşiğinin sentez reaksiyonu.	48
Şekil 3.4: K2 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.	49
Şekil 3.5: K3 bileşiğinin sentez reaksiyonu.	50
Şekil 3.6: K3 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.	50

Şekil 3.7: K4 bileşiğinin sentez reaksiyonu.	51
Şekil 3.8: K4 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.	52
Şekil 3.9: K5 bileşiğinin sentez reaksiyonu.	53
Şekil 3.10: K5 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.	53
Şekil 3.11: K6 bileşiğinin sentez reaksiyonu.	54
Şekil 3.12: K6 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.	55
Şekil 3.13: K7 bileşiğinin sentez reaksiyonu.	56
Şekil 3.14: K7 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.	56
Şekil 3.15: K8 bileşiğinin sentez reaksiyonu.	57
Şekil 3.16: K8 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.	58
Şekil 3.17: DNSA indirgenme reaksiyonu.	59
Şekil 3.18: p-NPG hidroliz reaksiyonu.	60
Şekil 3.19: İndofenol oluşum mekanizması.	61
Şekil 4.1: K1-K7 ve akarboz bileşiklerinin konsantrasyon – α -amilaz % inhibisyon grafikleri.	67
Şekil 4.2: K1-K8 ve kuarsetin bileşiklerinin konsantrasyon – α -glukozidaz % inhibisyon grafikleri.	69
Şekil 4.3: K1, K2, K5, K7 ve tiyoüre bileşiklerinin konsantrasyon – üreaz % inhibisyon grafikleri.	71
Şekil 4.4: Akarboz bileşiğinin α -amilaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.	73
Şekil 4.5: Kuarsetin bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.	74
Şekil 4.6: K1 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.	74
Şekil 4.7: K2 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.	75
Şekil 4.8: K4 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.	75
Şekil 4.9: K8 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.	76
Şekil 4.10: Tiyoüre bileşiğinin üreaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.	77
Şekil 4.11: K1 bileşiğinin üreaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.	77
Şekil 4.12: K7 bileşiğinin üreaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.	78

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Bazı enzim inhibitörlerinin klinikte kullanım alanları.	24
Tablo 2.2: Tip II diyabet tedavisinde kullanılan oral ilaçlar.	29
Tablo 2.3 : Koagülasyon faktörleri ve görevleri.....	36
Tablo 4.1: K1-K8, akarboz, kuarsetin ve tiyoüre bileşiklerinin ADME özellikleri.	64
Tablo 4.2: Kumarin-ftalonitril türevlerinin α -amilaz enzimine bağlanma enerjileri ve ligand verimliliği (LV) değerleri.	65
Tablo 4.3: Kumarin-ftalonitril türevlerinin α -glukozidaz enzimine bağlanma enerjileri ve ligand verimliliği (LV) değerleri.	65
Tablo 4.4: Kumarin-ftalonitril türevlerinin üreaz enzimine bağlanma enerjileri ve ligand verimliliği (LV) değerleri.	66
Tablo 4.5: K1-K8 ve akarboz bileşiklerinin α -amilaz için IC ₅₀ değerleri.	68
Tablo 4.6: K1-K8 ve kuarsetin bileşiklerinin α -glukozidaz için IC ₅₀ değerleri.	70
Tablo 4.7: K1-K8 ve tiyoüre bileşiklerinin üreaz için IC ₅₀ değerleri.....	72
Tablo 4.8: Kumarin-ftalonitril türevlerinin tromboplastik aktivite (TF) değerleri.....	72
Tablo 4.9: Akarboz bileşiğinin α -amilaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşim türleri.....	73
Tablo 4.10: K1, K2, K4, K8 ve kuarsetin bileşiklerinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları ile etkileşim türleri.	76
Tablo 4.11: K1, K7 ve tiyoüre bileşiklerinin üreaz enziminin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları ile etkileşim türleri.	78

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
Å	: Angström
α	: Alfa
β	: Beta
cm	: Santimetre
°C	: Santigrat derece
Da	: Dalton
fL	: Femto litre
γ	: Gama
g	: Gram
ΔG	: Gibbs serbest enerjisi
IC ₅₀	: Enzim aktivitesini %50 inhibe eden inhibitör konsantrasyonu
K	: Kelvin
kcal	: Kilokalori
K _m	: Michaelis-Menten Sabiti
L	: Litre
μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
μL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
M	: Molar
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen gücü
π :	: Pi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
U	: Enzim ünitesi
V ₀	: İlk hız
V _{maks}	: Maksimum hız
%	: Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
Abs	: Absorbans şiddeti
ADME	: Emilim, Dağılım, Metabolizma ve Atılım
ADP	: Adenozin difosfat
AF	: Atriyal fibrolizasyon
AIDS	: Edinsel bağışıklık yetmezliği sendromu
Arg	: Arjinin
Asp	: Aspartik asit
ATP	: Adenozin trifosfat
CYP2A6	: Monooksijenaz enzim
DMF	: Dimetilformamid
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNSA	: 3,5-Dinitrosalisilik asit
DPP-4	: Dipeptidil peptidaz-4
E	: Enzim
EC	: Enzim Komisyon numarası
FXa	: Faktör Xa
GI	: Gastrointestinal
Gln	: Glutamin
Glp-1	: Glukagon benzeri peptid-1
Glu	: Glutamik asit
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
His	: Histidin
HMWK	: Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
IR	: Infrared spektroskopisi
Lys	: Lizin
K	: Kontrol
KVH	: Kardiyovasküler hastalıklar
LV	: Ligand verimliliği
N	: Numune
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
Oks	: Oksidasyon

P	: Ürün
PDB	: Protein Data Bank
Phe	: Fenilalanin
Pro	: Prolin
p-NPG	: p-Nitrofenil-D-glukopiranozit
Red	: Redüksiyon
S	: Substrat
Ser	: Serin
TF	: Doku faktörü, tromboplastik aktivite
THF	: Tetrahidrofuran
Thr	: Treonin
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
tPA	: Doku plazminojen aktivatörü
Tyr	: Tirozin
Val	: Valin
VKOR	: Vitamin K epoksit redüktaz
vWF	: von Willebrand Faktörü

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI 7-HİDROKSİ KUMARİN BİLEŞİKLERİNİN PIHTILAŞMA FAKTÖRÜ Xa ve ANTİDİYABETİK ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Furkan MELETLİ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman : Prof. Dr. Özlem SAÇAN

Kumarinler; antioksidan, antibakteriyel, antifungal, anti-viral, antibiyotik, antitümör, antikoagülan, anti-diyabetik ve antikanser gibi biyolojik aktiviteleri olan moleküllerdir. Kumarinlerin α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz enzimlerini inhibe ettiği bilinmektedir. α -Amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibitörleri, insülin hormonunun işlev bozukluğunun sonucunda anormal yüksek kan şekeri ile karakterize edilen diyabet hastalığının tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ayrıca kumarin türevlerinin üreaz inhibitör aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Üreaz enzimi, bakteriler için uygun yaşam koşulları sağlayarak tüberküloza, mide ve peptik ülserlere, akut ve kronik enfeksiyonlara sebep olur.

İlaç çalışmalarında hesaplamalı kimya ve modelleme olmaksızın hedeflenen sonuçlara ulaşmak imkânsızdır. Moleküler yerleştirme, hesapsal kimya uygulamasıdır ve hedef biyomolekülünün geometrisine ve yapısına dayanarak ligandın proteine bağlanma afinitesini tahmin edebilen ve ilaç tasarımında kilit rolü olan bir araştırma alanıdır.

Çeşitli ve yüksek biyolojik etki potansiyeli olan, 5 tanesi özgün 8 adet 7-hidroksikumarin türevleri (kumarin-ftalonitril türevleri) sentezlenmiştir. Bileşiklerin yapıları FT-IR ve $^1\text{H-NMR}$ yöntemleriyle doğrulanmıştır.

Yapılan *in silico* çalışmalar ile bileşiklerin enzimlere bağlanma enerjileri, ligand verimliliği değerleri ve amino asit kalıntıları ile etkileşim türleri belirlenmiştir. Ayrıca sentezlenen

kumarin-ftalonitril türevlerinin ilk kez α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz inhibitör aktiviteleri ile birlikte antikoagülan etkileri *in vitro* yöntemler kullanılarak araştırılmıştır.

Gerçekleştirilen *in vitro* denemeler neticesinde elde edilen biyolojik aktivite sonuçlarına göre; K1, K2, K4 ve K8 bileşiklerinin IC_{50} = 612.85-1056.31 μ M değerleriyle, referans bileşik olan kuarsetinden (IC_{50} = 1076.80 μ M) daha yüksek α -glukozidaz inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu yapılar içerisinde K8 molekülü, serinin en aktif bileşiği olarak tespit edilmiştir. K7 bileşiği IC_{50} = 1163.89 μ M değeriyle, referans bileşik olan tiyoüreden (IC_{50} = 2287.95 μ M) daha yüksek üreaz inhibitör aktivite göstermiştir. Ayrıca kumarin bileşiklerinin tromboplastik aktivite üzerine olan etkileri incelendiğinde; K2, K3, K6 ve K7 bileşiklerinin pıhtılaşma süresini uzattıkları bulunmuştur.

Tez çalışmamızdan elde edilen sonuçlar neticesinde, kumarin-ftalonitril türevlerinin α -glukozidaz ve üreaz inhibitör aktiviteleri ile birlikte antikoagülan etkileri açısından umut verici bileşikler olarak değerlendirilmiştir. |

Haziran 2023 , |122| sayfa.

Anahtar kelimeler: |kumarin, anti-diyabet, antikoagülan, anti-bakteriyel, *in silico* |

ABSTRACT

[M.Sc. THESIS]

[EFFECTS of SOME 7-HYDROXY COUMARIN COMPOUNDS on COAGULATION
FACTOR Xa and ACTIVITIES of ANTIDIABETIC ENZYMES]

[Furkan MELETLİ]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Biochemistry Programme

[Supervisor: Prof. Dr. Özlem SAÇAN]

Coumarins are molecules that possess various biological activities such as antioxidant, antibacterial, antifungal, antiviral, antibiotic, antitumor, anticoagulant, anti-diabetic, and anticancer properties. It is known that they inhibit the enzymes α -amylase, α -glucosidase, and urease. Inhibitors of α -amylase and α -glucosidase enzymes have been used in the treatment of diabetes for many years. Diabetes is a disease characterized by abnormally high blood sugar levels due to malfunctioning of the hormone insulin. Furthermore, coumarin derivatives are known as urease inhibitors. Urease enzyme creates favorable conditions for bacteria, and can cause tuberculosis, gastric and peptic ulcers, acute and chronic infections.

In drug research, it is impossible to achieve the desired results without computational chemistry and modeling. Molecular docking is a computational chemistry application and a research area that plays a key role in drug design by predicting the binding affinity of a ligand to a target biomolecule based on its geometry and structure.

Due to the diverse and high biological activities of coumarin compounds, 8 derivatives of 7-hydroxycoumarin (coumarin-phthalonitrile derivatives), 5 of which are novel were designed and synthesized, for potential α -amylase, α -glucosidase, and urease inhibition potential, as well as anti-thrombotic effects. The structures of the compounds were confirmed by FT-IR and ^1H -NMR methods.

In silico studies were evaluated to determine the binding energies of the compounds to the enzymes, their ligand efficiency values, and the types of interactions with amino acid residues.

Additionally, the synthesized coumarin-phthalonitrile derivatives were investigated for their α -amylase, α -glucosidase, and urease inhibitor activities, as well as their anticoagulant effects, using *in vitro* methods for the first time.

According to the results obtained from the *in vitro* experiments, compounds K1, K2, K4, and K8 exhibited higher α -glucosidase inhibitory activity with IC_{50} values of 612.85-1056.31 μ M compared to the reference compound quercetin (IC_{50} = 1076.80 μ M). Among these structures, compound K8 was identified as the most active compound in the series. Compound K7 showed higher urease inhibitory activity with an IC_{50} value of 1163.89 μ M compared to the reference compound thiourea (IC_{50} = 2287.95 μ M). Additionally, when the effects of coumarin compounds on thromboplastic activity were examined, it was found that compounds K2, K3, K6, and K7 prolonged clotting time.

The results obtained from our thesis study indicate that coumarin-phthalonitrile derivatives are promising compounds in terms of α -glucosidase and urease inhibitory activities, as well as anticoagulant effects. |

January 2023, |122| pages.

Keywords: | coumarin, antidiabetic, anticoagulant, anti-bacterial, *in vitro* |

1. GİRİŞ

Kumarinlerin farklı hedefler için yüksek ilgiye ve spesifikliğı sahip bileşikler olma potansiyelleri vardır. Bu durumun nedeni, sahip oldukları iki düzlemsel halkanın (bir tanesi lakton halkası olmak üzere) aracılık ettiğı, protein-ligand etkileşiminde hidrojen bağı yapma olanaklarının bulunması ve kolayca türevlendirilmeleridir (Ibrar ve diğ., 2018). Kumarinler; antioksidan, anti-inflamatuar, antibakteriyel, antifungal, anti-viral, analjezik, anti-mutajenik, antibiyotik, antitümör, antikoagulan, anti-diyabetik, anti-nörodejeneratif ve antikanser gibi çok geniş biyolojik yelpazeye sahip olan moleküllerdir (Alomari ve diğ., 2019; Shkoor ve diğ., 2020; Moya-Alvarado ve diğ., 2021). Yapılan çalışmalarda kumarinlerin bu etkilerini enzimleri inhibe ederek gösterdiği anlaşılmıştır. Ayrıca istenmeyen pıhtılaşmayı önlemek için kumarinler, K vitamini antagonistleri olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır.

Yapılan araştırmalarda kumarinlerin amilaz, glukozidaz ve üreaz enzimlerini inhibe ettiğı gösterilmiştir. α -Amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibitörleri, 21. yüzyılın en büyük sağlık sorunlarından biri olan diyabet tedavisinde sıklıkla tercih edilmektedir. Diyabetik kişi, yemek sonrası kan şekeri seviyesinin yükselmesini engellemek/geciktirmek için α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibitör ilaçlarını kullanmaktadır (Zhao ve diğ., 2019). Üreaz enzimi, bakteriler için uygun yaşam koşulları sağlayarak tüberküloz hastalığına, mide ve peptik ülserlerin gelişmesine, akut ve kronik enfeksiyonlara sebep olur (Clemens ve diğ., 1995; Kusters ve diğ., 2006; Zhou ve diğ., 2019). Üreaz inhibitörleri, midede ülserasyona sebep olan *Helicobacter Pylori* 'ye karşı kullanılan önemli potansiyel tedavi ajanlarıdır.

İlaç çalışmalarında hesaplamalı kimya ve modelleme olmaksızın yalnızca laboratuvar deneyleri ile hedeflenen sonuçlara ulaşmak imkânsız gibidir. Hesapsal kimya, yeni ilaç keşifleri için gereken maliyeti ve zamanı azaltmak için son derece yararlıdır. Bir hesapsal kimya uygulaması olan moleküler yerleştirme (doklama), hedef biyomolekülünün geometrisine ve yapısına dayanarak ligandın proteine bağlanma afinitesini tahmin edebilen ve ilaç tasarımında kilit rolü olan bir araştırma alanıdır (Novichikhina ve diğ., 2020). Yalnızca belirli bir hedef enzime seçici olarak bağlanan, yan etkileri olmayan, etkinliğı çok yüksek yeni ilaçların keşfedilmesi, moleküler modelleme ve bilgisayar-destekli tasarım yöntemleri sayesinde mümkün hale gelmiştir (Garazd ve diğ., 2005; Kasperkiewicz ve diğ., 2020).

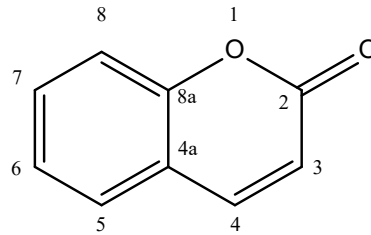
Kumarin bileşiklerinin çok çeşitli ve yüksek biyolojik aktivite göstermelerinden dolayı bu tez çalışmasında yapılan *in silico* değerlendirmelerin ışığında α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz inhibisyonu ile anti-trombotik etki potansiyeli olan 7-hidroksikumarin türevleri (kumarin-ftalonitril) tasarlanmıştır. Bu doğrultuda 5 tanesi özgün olmak üzere 8 adet kumarin-ftalonitril türevleri sentezlenmiş ve ilk kez anti-diyabetik, antikoagülan ve anti-bakteriyel etkileri *in silico* ve *in vitro* yöntemler kullanılarak araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasının sonuçları, kumarin-ftalonitril türevlerinin α -amilaz, α -glukozidaz, üreaz enzimleri ve antikoagülan etkileri hakkında bilgileri zenginleştirerek literatüre katkı sağlayacaktır. Elde ettiğimiz verilerin ışığında, dünyada önemli sorun haline gelen diyabet, bakteriyel enfeksiyon ve istenmeyen pıhtılaşma tedavileri için etkili ilaçların tasarlanmaları ve geliştirilmelerine katkıda bulunması beklenmektedir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

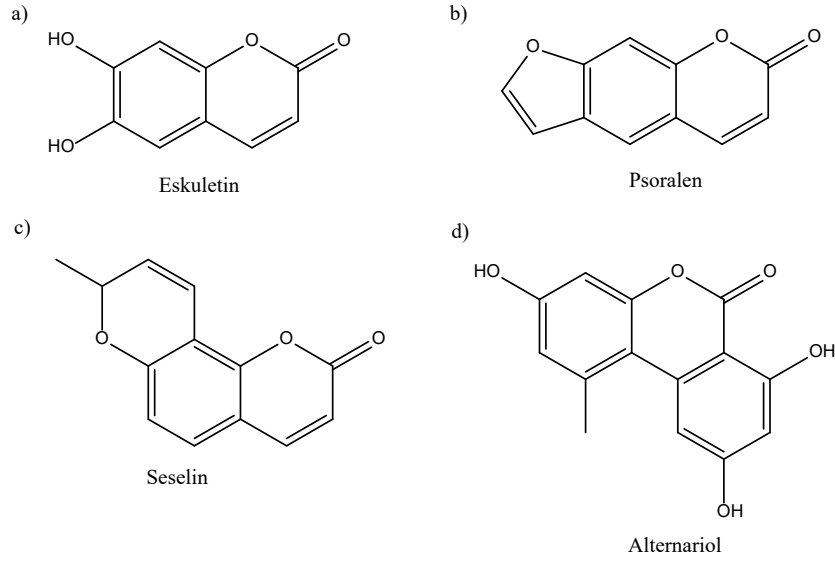
2.1. KUMARİNLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Kumarinlerin 1822 yılında ilk kez izolasyonu ve 1868 yılında laboratuvar ortamında ilk kez sentezlenmesi yapılmıştır. Bu bileşiklerin tonka fasulyesi, tatlı yonca, odun kökü, sinameki yağı ve lavanta dahil olmak üzere birçok bitki ve esansiyel yağda doğal olarak bulundukları keşfedilmiştir. 1300'den fazla kumarin türevidir, bitkilerin, bakterilerin ve mantarların sekonder metabolitleri olarak tanımlandılar. Kumarinler ayrıca 2H-1-benzopiran-2-on, 2H-kromen-2-on, 1,2-benzopiron, cis-o-kumarinik asit lakton, kumarinik anhidrit, o-hidroksinnamik asit-8-lakton ve 2-okso-1-benzopiran olarak da adlandırılırlar. Kumarin halkası 146.15 g/mol molekül ağırlığına sahip, hoş ve karakteristik kokuları olan, renksiz, parlak ve küçük plakalar halinde fiziksel özellikleri vardır. Ayrıca 68-70 °C erime noktasına ve 303 °C kaynama noktasına sahiplerdir. Genellikle kumarinler, etanol, kloroform ve yağlarda kolaylıkla çözünürlerken, sudaki çözünürlükleri yok denecek kadar düşüktür. Kumarin halkası, benzopiron adı verilen bir bileşik sınıfının üyesidir ve bu yapı bir benzen ile bir α -piron halkasının kaynaşması sonucu oluşurlar (Şekil 2.1) (Egan ve diğ., 1990; Iransahi ve diğ., 2009).



Şekil 2.1: Kumarin genel formülü.

Kumarin bileşikleri; basit kumarinler, piranokumarinler, furanokumarinler ve piron-substitue kumarinler olmak üzere 4 ana başlıkta sınıflandırılır (Şekil 2.2) (Murray, 1982).



Şekil 2.2: Kumarinlerin sınıflandırılmasına örnek bileşikler; a) basit kumarinler, b) furanokumarinler, c) pironokumarinler ve d) piron-substitue kumarinler.

2.1.1. Kumarinlerin Farmakokinetik Özellikleri

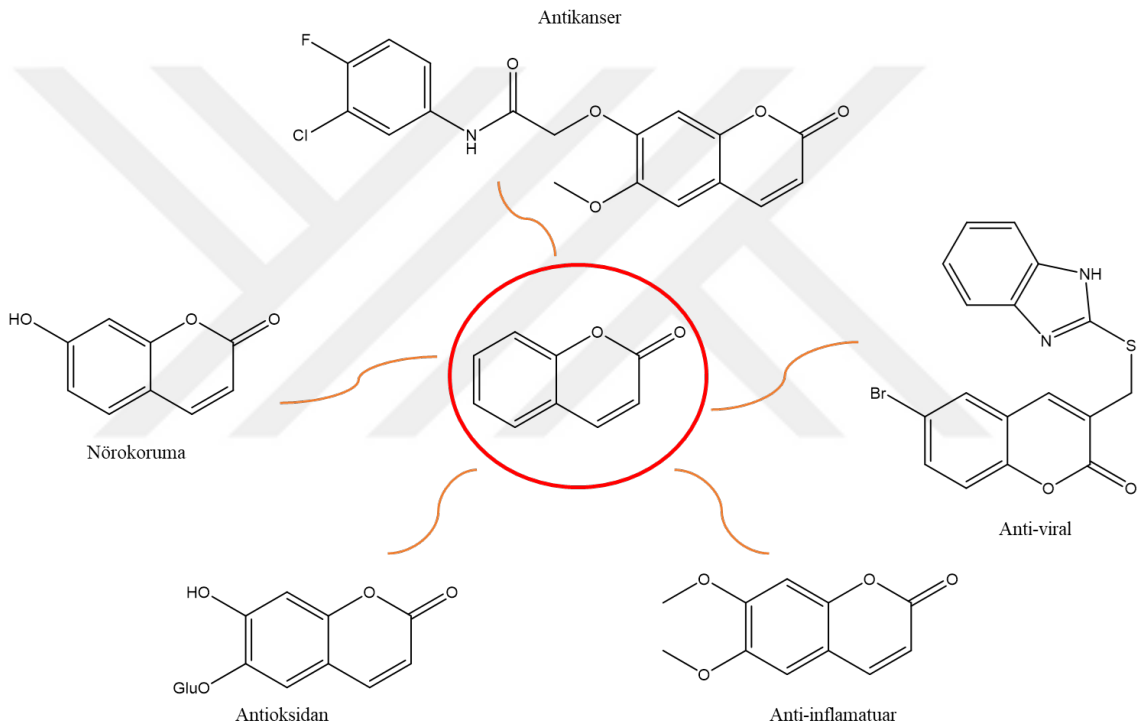
Kumarinler oral olarak alındıktan sonra gastrointestinal (GI) kanalda hızla emilir ve tüm vücuda yayılır. Kumarin ve 7-hidroksikumarin türevlerinin sudaki çözünürlükleri düşük olsa da vücutta yüksek dağılım oranlarına sahiplerdir. Bu durum, kumarinlerin polar olmayan kısımlarının pasif difüzyon yoluyla lipid çift katmanlarını kolayca geçebildiklerini gösterir. Farmakokinetik çalışmalarda, oral olarak uygulanan kumarinin gastrointestinal sistemden tamamen emildiği ve karaciğerde yoğun bir şekilde metabolize edildiği tespit edilmiştir. 7-hidroksikumarinin öncüsü olan kumarin iskeletinin biyoyararlanımı düşüktür ve yarı ömrü kısadır. Yapılan çalışmalarda, kumarinin %35 ve 7-hidroksikumarinin %47 oranında plazma proteinlerine bağlandığı belirlenmiştir. Kumarin, ilk olarak karaciğer mikrozomlarında sitokrom P-450’de bulunan mono-oksijenaz enzim (CYP2A6) sistemi tarafından metabolize edilir ve 7-hidroksikumarine dönüştürülür. 7-Hidroksikumarin bileşikleri faz II konjugasyonu ile glukuronit konjugata dönüştürülerek vücuttan idrar yoluyla atılırlar (Küpeli Akkol ve diğ., 2020).

2.1.2. Kumarinlerin Biyolojik Aktiviteleri

Kumarinlerin farklı hedefler için yüksek ilgiye ve spesifikliğe sahip bileşikler olma potansiyelleri vardır. Bu durumun nedeni, bir tanesi lakton halkası olmak üzere iki düzlemsel halkanın aracılık ettiği, protein-ligand etkileşiminde hidrojen bağı yapma olanaklarının bulunması ve kolayca türevlendirilmeleridir (Ibrar ve diğ., 2018). Benzen halkasının piron halkası ile kaynaşması sonucunda iyi bir π - π konjuge sistemi oluşur. Bu yapı, kumarinlere

elektronca zengin bir iskelet ve yük transfer özelliği kazandırır (Matos ve diğ., 2015). Kumarinlerin sahip oldukları konjuge çift halka sistemleri onları farklı araştırma alanları için ilginç moleküller haline getirir. Kumarinler endüstri, kozmetik, gıda ve ilaç sektörlerinde sıklıkla tercih edilen bileşikler arasındadır (Carneiro ve diğ., 2021).

Kumarinler; antioksidan, anti-inflamatuar, antibakteriyel, antifungal, anti-viral, analjezik, anti-mutajenik, antibiyotik, antitümör, antikoagulan, anti-diyabetik, anti-nörodejeneratif ve antikanser gibi çok geniş biyolojik yelpazeye sahip olan moleküllerdir (Şekil 2.3) (Alomari ve diğ., 2019; Shkoor ve diğ., 2020; Moya-Alvarado ve diğ., 2021).



Şekil 2.3: Kumarin türevlerinin terapötik uygulamaları.

2.1.3. Kumarinlerin Anti-diyabetik Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkileri

2015 yılında Taha ve arkadaşları 4-amino-benziliden-bis-(4hidroksikumarin) ile izotiyosiyanatların kondenzasyonu ile biskumarin-tiyöüre yapılarını sentezlemişlerdir. Sentezlemiş oldukları bu yapıların α -glukozidaz enzimi üzerine yüksek inhibisyon aktivitesi ($IC_{50} = 13.5-104.6 \mu M$) gösterdiklerini belirlemişlerdir (Zawawi ve diğ., 2015).

Wang ve çalışma arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada yeni kumarin tiyazol grupları sentezlemişlerdir. Bu yapıların, α -glukozidaz inhibisyon çalışmaları sonucunda IC_{50} değerlerini $6.24-81.69 \mu M$ aralığında bulmuşlardır (Wang ve diğ., 2016). Başka bir kumarin-

tiyazol çalışmasında ise daha iyi inhibisyon aktivitesi gösteren ($IC_{50} = 0.12-16.20 \mu M$) yapılar keşfedilmiştir (Salar ve diğ., 2016).

Menteşe ve arkadaşları yeni kinazolin-kumarin hibritlerini sentezlemişler ve α -glukozidaz inhibitör etkilerini ($IC_{50} = 6.11-7.34 \mu M$) incelemişlerdir (Menteşe ve diğ., 2016).

Shetty ve arkadaşları uzun zincire sahip çeşitli kumarin bileşiklerinin α -amilaz enzimi üzerine inhibisyon etkilerini araştırmışlardır. Bu bileşiklerin IC_{50} değerlerini 48.80-192.30 $\mu g/mL$ olarak belirlemişlerdir (Shetty ve diğ., 2018).

Sun ve ekibi 2018 yılında yüksek molekül ağırlığına sahip çeşitli kumarin bileşiklerinin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerine karşı inhibitör etkilerini incelemişlerdir. Yapıların α -glukozidaza karşı 1.47-22.73 μM ve α -amilaza karşı 6.89->50 μM IC_{50} değerlerine sahip olduklarını göstermişlerdir (Sun ve diğ., 2018).

2.1.4. Kumarinlerin Üreaz İnhibitör Aktiviteleri

Shafiq ve arkadaşlarının sentezlemiş oldukları kumarin-tiyosemikarbazon yapılarının üreaz aktivitelerinin incelenmesi sonucunda IC_{50} değerlerinin 2.23-16.9 μM arasında olduklarını belirlemişlerdir (Hameed ve diğ., 2016).

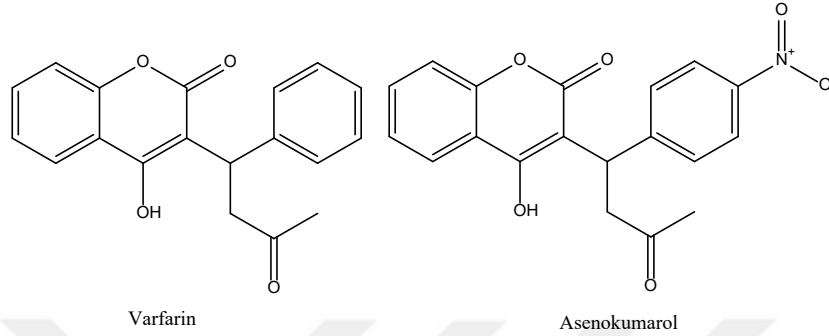
Alomaria ve arkadaşları hibrit bis-kumarin yapıları sentezlemişler ve bu yapıların üreaz inhibisyon aktivitelerini IC_{50} 0.12-38.04 μM olarak belirtmişlerdir (Alomari ve diğ., 2019).

Khan ve arkadaşlarının 2020 yılında çeşitli kumarin-tiyazol yapılarının üreaz enzimi üzerine etkilerini inceleyerek IC_{50} değerlerini 4.35-426.13 μM arasında değişkenlik gösterdiklerini tespit etmişlerdir (Khan ve diğ., 2020).

2.1.5. Kumarin ve Türevlerinin Antikoagülan Etkileri

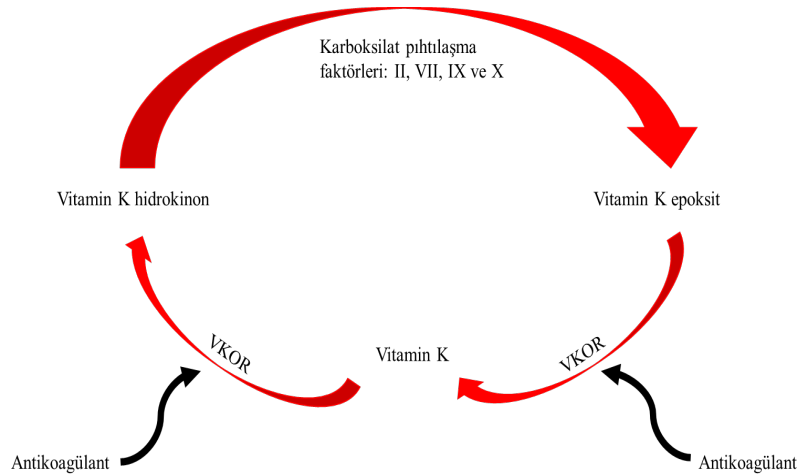
Bilindiği gibi kumarinler, antikoagülan ve anti-trombotik özellikler dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilen geniş bileşik grubudur. Birçok kumarin türevi, özellikle 4-hidroksikumarin, K vitamininin rejenerasyonunu engelleyerek/yavaşlatarak önemli bir pıhtılaşma önleyici etki göstermektedir. Varfarin, fenprokumon ve asenokumarol bu gruba örnek olarak gösterilebilir (Şekil 2.4). Varfarin, kumadin ticari adı altında satılan halen dünyada en etkili görülen kan sulandırıcıdır (Gebauer, 2007; Jain ve Joshi, 2012; Chen ve diğ., 2020). Ayrıca 3-karboksamit kumarinler, trombin ve FXa inhibitörleri olarak bildirilmiş ve 6-substitue analoglarının çok güçlü trombin inhibisyonu sergiledikleri bulunmuştur. Bir dizi

benzokumarin amid ve pirimidinokumarin güçlü anti-trombotik ve anti-trombosit ajanlar olduğu gösterilmiştir. Amidin içeren birçok kumarin bileşiğinin önemli bir serin proteaz olan FXa ve trombin inhibitörü olduğu, dolayısıyla antikoagülan aktiviteye sahip oldukları ortaya konmuştur (Phutdhawong ve diğ., 2021).



Şekil 2.4: Varfarin ve asenokumarol yapısı.

K vitamini antagonisti olan kumarinler, bir serin proteaz olan Faktör II (trombin), VII, IX ve X üzerine etkilidir. Bu faktörlerin biyolojik aktivite gösterebilmeleri için γ -karboksilasyonu gereklidir. Faktörlerin içerdikleri glutamik asit kalıntıları karboksillenerek γ -karboksi glutamata dönüşür ve faktörlerin pıhtılaşma sürecinde aktif rol oynamalarını sağlar. Karboksi glutamat kalıntıları koagülasyon faktörlerinin trombosit yüzeyindeki fosfolipitlere bağlanmasını sağlar. K vitamini, bu karboksilasyon tepkimesini katalize eden ve γ -glutamil karboksilaz adı verilen enzimin kofaktörü olarak görev alan bir yapıdır. Karboksilasyon sürecinde faktörlere bağlı bulunan glutamik asit kalıntıları, karboksi glutamat kalıntılarına dönüşürken, indirgenmiş olan K vitamini (hidrokinon) yükseltgenerek epoksite dönüşür. Döngünün devamlılığı için Vitamin K epoksitinin tekrardan hidrokinon oluşturması gerekir ve bu noktada K vitamin epoksit redüktaz (VKOR) görev alır. Kumarinler, bu dönüşüm döngüsünün inhibisyonunu sağlar. Böylece pıhtılaşma sürecinde birden fazla adımı bloke ederek antikoagülan etkilerini gösterirler (Şekil 2.5) (Au ve Rettie, 2008; Ar, 2012; Jain ve Joshi, 2012; Venugopala ve diğ., 2013).



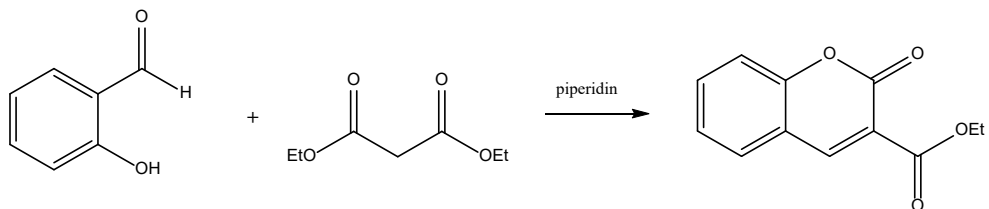
Şekil 2.5: K vitamininin pıhtılaşmadaki rolü.

2.1.6. Kumarinlerin Sentezi

Kumarin bileşikleri; Pechmann, Knoevenagel, Reformatsky, Wittig ve Perkin reaksiyonlarıyla sentezlenirler. Genel olarak tercih edilen yöntemler Perkin, Pechmann ve Knoevenagel kondenzasyon reaksiyonlarıdır.

2.1.6.1. Knoevenagel reaksiyonu

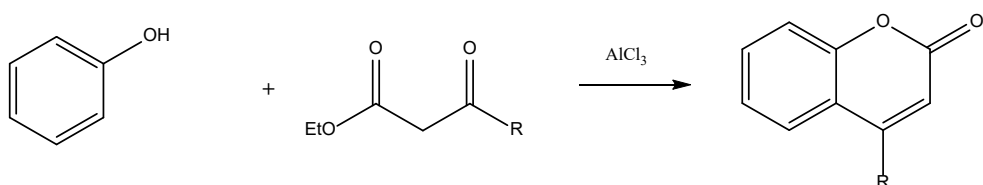
Knoevenagel reaksiyonu, bir aldehit veya ketonun, aktif hidrojeni olan bir bileşik (genellikle bir aldehit veya keton) ile kondenzasyon reaksiyonu sonucu kumarin bileşiğinin sentezlendiği organik kimyasal bir reaksiyondur (Şekil 2.6) (Knoevenagel ve Fries, 1898).



Şekil 2.6: Knoevenagel reaksiyonunun genel sentez şeması.

2.1.6.2. Pechmann Reaksiyonu

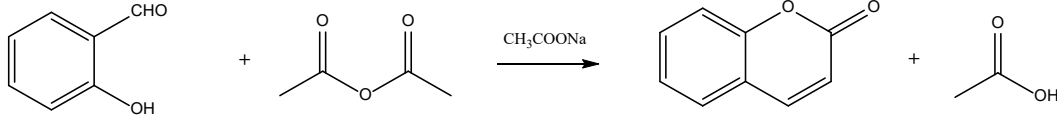
Pechmann reaksiyonu, fenolik bileşiklerin β -keto esterler ile asidik ortamda kondenzasyonu sonucu kumarinlerin sentezlendiği bir yöntemdir (Şekil 2.7) (Pechmann, 1884).



Şekil 2.7: Pechmann reaksiyonunun genel sentez şeması.

2.1.6.3. Perkin reaksiyonu

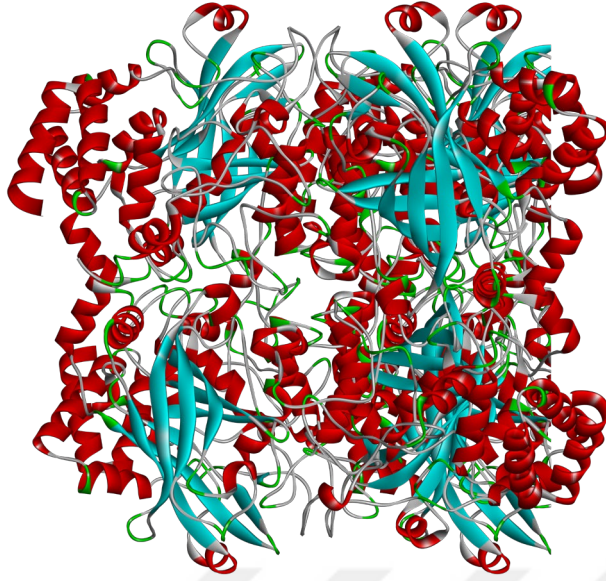
Perkin reaksiyonu, asidik koşullar altında asetik anhidritin aromatik bir aldehit ile yüksek sıcaklıkta sodyum asetat varlığında kondenzasyonu sonucu kumarinlerin sentezlendiği bir başka yöntemdir (Şekil 2.8) (Perkin, 1868).



Şekil 2.8: Perkin reaksiyonunun genel sentez şeması.

2.2. ENZİMLER

Enzimler, uzun amino asit zincirlerinden oluşan polipeptit yapıda üç boyutlu küresel proteinlerdir (Şekil 2.9) (Mojsov, 2011). Enzimler, biyolojik reaksiyonlar için gerekli olan yapılardır. Etkileşimde bulundukları moleküllere substrat, reaksiyon sonucunda oluşan moleküllere ürün adı verilir. (Cook ve Cleland, 2007). Enzimler, substratların ürünlere dönüşümlerini hızlandırarak biyokimyasal reaksiyonları katalize ederler ve bu kataliz süreci enzimin aktif bölgesinde gömülü bulunan bir cepte gerçekleşir. Enzim katalizi olmadan reaksiyonlar, yaşam ve doğa için faydalı olamayacak kadar yavaş olur. Ancak doğadaki tüm reaksiyonlar kataliz süreci gerektirmemektedir (Keller ve diğ., 2015). Enzimler, birbirlerinden bağımsız olarak hareket etmezler. Birden fazla enzim metabolik yolaklarda ve ağlarda bir dizi seri reaksiyonu regüle ederler. Enzimler, moleküler fonksiyonlarını hücrenin belirli bölümlerinde gerçekleştirirler. Örneğin hekzokinaz enzimi, sitozolde gerçekleşen glikoliz yolunda D-glukoza α-D-glukoz-6-fosfata dönüştürür. Ayrıca farklı organizmalardaki enzim fraksiyonları; organel, hücre tipi ve doku seviyelerinde birbirlerinden farklılıklar göstererek enzimlerin doğadaki çeşitliliğine katkıda bulunurlar (Lewis ve diğ., 2010; Freilich ve diğ., 2005; Stincone ve diğ., 2015).



Şekil 2.9: Enzim yapısının genel görüntüsü (PDB: 1DGF, insan eritrosit katalaz enzimi).

1833'te nişastanın diyastaz enzimi ile katalizlenmesi sonucu şekerlere dönüştürülmesinin keşfedilmesiyle enzim kavramı ilk kez literatüre geçmiştir (Payen ve Persoz, 1833). Ribonükleaz ve lizozim enzimlerinin yapıları ve katalitik mekanizmalarını açıklama girişimleri, enzimolojinin gelişmekte olan bir bilimsel disiplin olduğunu ortaya çıkarmıştır (Cuesta ve diğ., 2015).

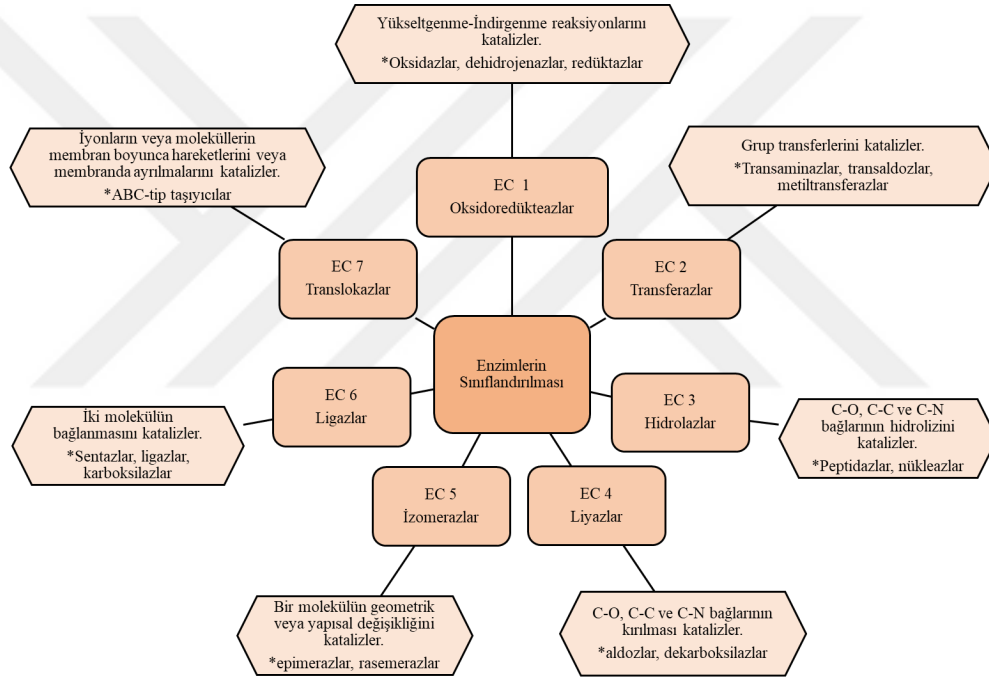
Enzimler büyük bir protein grubunu temsil eden metabolizma, gen ekspresyonu, hücre bölünmesi ve bağışıklık sistemi gibi önemli yaşamsal süreçlerde rol oynayan yapılardır. Mevcut genlerin %30-40'ı enzimler tarafından kodlanır (Almonacid ve Babbitt, 2011). Kimyasal reaksiyonları büyük ölçüde hızlandırarak hücreler içinde koordineli bir şekilde metabolik yollarda görev alırlar (Schomburg ve diğ., 2017). Enzimler çok spesifik moleküller olmak üzere aktiviteleri ve fonksiyonları sekanslarına, üç boyutlu yapılarına, stabilitelere ve diğer moleküllerle etkileşimlerine bağlıdır (de Souza Vandenberghe ve diğ., 2020).

2.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Enzimlerin sınıflandırılması ve adlandırılması karmaşık bir konudur. Birbirinden farklı birçok enzim yapısının aynı ada sahip olduğu veya bir enzimin birden fazla adının olduğu bilinmektedir. Genellikle bir enzimin isimlendirilmesi etki edeceği substrat isminin yanına “-az” eki getirilerek yapılır (Uçak ve Afreen, 2022). Ancak daha doğru bir yöntem; enzimlerin katalizledikleri kimyasal reaksiyonlara göre adlandırılması ve sınıflandırılmalarıdır. Bunun

nedeni her bir enzimin katalizlediği reaksiyonun özgül olmasıdır. Diğer bir deyişle etki ettikleri substratlar enzimlerin adlandırılmasında rol oynarlar (Choudhury, 2020).

Enzimlerin sınıflandırılması Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'ne göre EC numaraları (Enzim Komisyonu numarası) ile yapılmıştır. Enzimlerin adlandırılması; tek bir enzim proteinine karşılık gelen veya aynı katalitik etkiyi gösteren bir grup enzimin kataliz ettikleri reaksiyonlara göre sınıflandırılırlar (McDonald ve diğ., 2009; McDonald ve Tipton, 2014). Oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı farklı sınıfa ayrılmışlardır. Ağustos 2018'de EC, translokaz enzimlerini gruplandıran yedinci bir enzim kategorisi dahil etmiştir (Şekil 2.10) (Tipton, 2018).



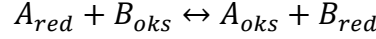
Şekil 2.10: Enzimlerin sınıflandırılması.

EC numarası (Schomburg ve diğ., 2017) dört rakamdan oluşur:

- İlk sayı: 7 ana enzim sınıfını,
- İkinci sayı: Etki ettiği kimyasal yapıyı veya fonksiyonel grubu (substrat),
- Üçüncü sayı: Alt-alt grubu (alıcı grubu, bağ veya reaksiyon türünü),
- Dördüncü sayı: Belli bir sınıfta olan enzimin sıra numarasını gösterir.

2.2.1.1. Oksidoredüktazlar

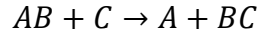
Oksidoredüktazlar, yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalize eden enzim sınıfını temsil ederler. Bu enzimlerde genellikle flavin, hem ve metal iyonları gibi kofaktörlerin varlığı söz konusudur (Şekil 2.11) (Vidal ve diğ., 2018).



Şekil 2.11: Oksidoredüktaz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.

2.2.1.2. Transferazlar

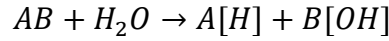
Transferazlar, verici bir molekülden alıcı bir moleküle metil, açıl, amino veya fosfat gibi fonksiyonel grupların transferini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 2.12) (Chronopoulou ve Labrou, 2009).



Şekil 2.12: Transferaz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.

2.2.1.3. Hidrolazlar

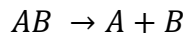
Hidrolazlar, ester bağları, eter bağları, peptit bağları gibi çeşitli bağları hidrolize eden ve EC numarası 3 ile gösterilen enzimlerdir (Şekil 2.13) (Alcántara ve diğ., 2011).



Şekil 2.13: Hidrolaz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.

2.2.1.4. Liyazlar

Liyazlar, hidrolitik olmayan reaksiyonlar ile kimyasal grupların eklenmesini veya çıkarılmasını katalize ederler. Bu enzimler C-C, C-O, C-N, C-S gibi bağları kırarak bir çift bağ, var olan bir çift bağa grup(lar) eklenmesi veya yeni bir halkanın oluşmasına neden olurlar (ters reaksiyon; sentaz) (Şekil 2.14) (Guengerich, 2018; Paul ve diğ., 2019).

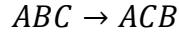


(ters reaksiyon; sentaz)

Şekil 2.14: Liyaz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.

2.2.1.5. İzomerazlar

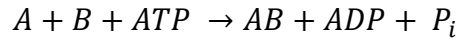
İzomeraz enzimleri molekül içi yeniden düzenlemeleri veya izomerizasyon reaksiyonlarını katalize ederler. Bir kiral merkezin rasemizasyonunu (rasemerazlar) veya epimerizasyonunu (epimerazlar) katalize edenler olmak üzere çeşitleri vardır (Şekil 2.15) (Paul ve diğ., 2019).



Şekil 2.15: İzomeraz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.

2.2.1.6. Ligazlar

Ligaz enzimleri, merkezi metabolizmada biyolojik olarak gerekli reaksiyonlarda yer alır. İki molekülün veya bu moleküllerin belirli kısımlarının bağlanmalarını katalize ederler (Kashyap ve diğ., 2001). C-O, C-S, C-N, C-C, fosfat-ester ve N-metal bağlarının oluşumunda görev alırlar. Bu reaksiyonlar enerji gerektirir ve bu enerji adenosin trifosfat (ATP) ve adenosin difosfat (ADP) gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden sağlanır (Şekil 2.16) (Holliday ve diğ., 2014).



Şekil 2.16: Ligaz sınıfına ait enzimlerin genel reaksiyonu.

2.2.1.7. Translokazlar

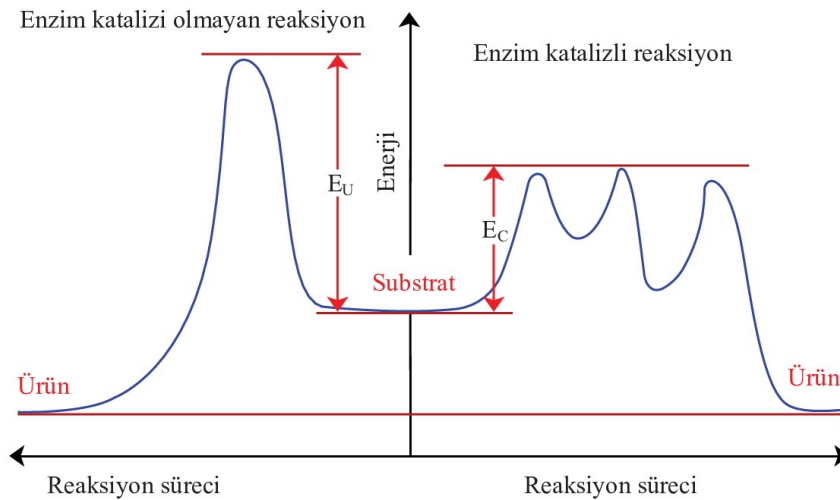
Translokazlar, iyonların veya moleküllerin hücre boyunca yer değiştirmelerini (translokasyon) veya bunların membranlar içinde ayrılmasını katalize eden ve sıklıkla ATP'nin hidrolizini içeren yeni bir enzim sınıfıdır (EC 7). Bu enzimlerin bazıları daha önce hidrolazlar sınıfında (EC 3.6.3) ATPaz'lar olarak bulunurlardı, ancak hidroliz işlemleri birincil görevleri değildi. Asıl işlevleri, iyonların veya moleküllerin zarlar boyunca hareketini veya bunların zarlar içinde ayrılmasını katalize etmeleridir. Taşınan iyon veya molekülün türüne göre translokaz enzimler farklılıklar gösterir. Hidronların (EC 7.1), inorganik katyonların ve bunların şelatlarının (EC 7.2), inorganik anyonların (EC 7.3), amino asitlerin ve peptitlerin (EC 7.4), karbohidrat ve türevlerinin (EC 7.5) ve diğer bileşiklerin translokasyonlarını (EC 7.6) katalize eden enzimler olmak üzere altı alt sınıfa ayrılırlar (Tipton, 2018; de Souza Vandenberghe ve diğ., 2020).

2.2.2. Enzimlerin Yapısı ve Genel Özellikleri

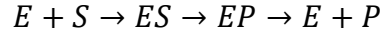
Enzimler, yapılarına göre iki genel gruba ayrılırlar. Birincisi, sadece amino asit kalıntıları içeren basit enzimlerdir. İkincisi, amino asit kalıntıları ile birlikte protein olmayan bir yapı içeren kompleks enzimlerdir. (Roskoski, 2007).

Enzimlerin aktivitesi onların yapısal özelliklerine bağlıdır. Enzimler birden fazla alan (multidomain) içerebilirler ve bu alanların kendine has karakteristik işlevsellikleri vardır (Bashton ve Chothia, 2007). Enzimlerin aktif bölgeleri, substrat molekülleri için uygun ve kataliz işlemi sırasında allosteriye izin vermeleri için esnek yapıya sahiplerdir (Koshland Jr., 1959; Tsou, 1993). Enzimin aktif bölgesinden uzakta bulunan amino asit kalıntıları enzimin konformasyonel değişikliklerini uyararak allosterik olarak hareket kazandırır (Makhlynets ve diğ., 2015). Bu allosterik düzenlenme efektörlerin enzime bağlanarak substratın enzimin aktif bölgesine bağlanmasında ve enzimin reaksiyonu katalizlemesinde önemli katkısı vardır (Baier ve Tokuiriki, 2014; Cuesta ve diğ., 2015). Allosterik moleküller enzim katalizli reaksiyonun hızını artırabilir (pozitif efektörler) veya azaltabilir (negatif efektörler). Bir enzim birden fazla allosterik bölgeye sahip olabilir ve hem pozitif hem de negatif düzenleyici bölgeler içerebilir (Roskoski, 2007).

Enzimler etkilerini, bir reaksiyonun gerçekleşmesi için gereken enerjiyi (serbest aktivasyon enerjisi) azaltarak gösterirler (Şekil 2.17) (Roskoski, 2007). Enzim, öncelikle substrat ile etkileşir ve enzim substrat kompleksini oluşturur. Bu kompleksten, substrat ürüne dönüşür ve ayrılması gerçekleşir. Enzim herhangi bir değişikliğe uğramadan reaksiyonu tamamlamış olur (Şekil 2.18).



Şekil 2.17: Bir reaksiyonun enzimatik ve enzimatik olmayan enerji diyagramı.



Şekil 2.18: Enzimatik reaksiyonun genel şeması.

Bir enzim için molar aktivite (turnover sayısı) enzim substrat ile doygun duruma geldiğinde birim zamanda bir enzim molekülü başına ürüne dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısıdır (Cook ve Cleland, 2007; Roskoski, 2007). Katal, optimum şartlarda 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır (Dybkær, 2001). Enzimin katalitik aktivitesi enzim ünitesi ile tanımlanır ve enzim ünitesi, 1 dakikada 1 mikromol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır (Bisswanger, 2014).

Enzimler hassas yapılardır. Yüksek sıcaklık, iyonlaştırıcı radyasyon, ışık, asitler, alkaliler, biyolojik faktörlerle kolayca denatüre olurlar ve inaktif (etkisiz) hale gelirler (Choudhury, 2020).

Enzimler birbirinden farklı birçok özelliğe sahiplerdir. Bunlardan bazıları aşağıdaki gibidir;

- Reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonları hızlandırırlar,
- Reaksiyon sonunda enzimler yok olmazlar ve herhangi bir değişime uğramazlar,
- Etkileri çok spesifiktir, bu nedenle kimyasal kesinliği dikkate değer bir şekilde korurlar,
- Biyolojik olarak parçalanabildiklerinden dolayı çevre dostudurlar,
- İstenmeyen yan ürünler oluşturmazlar (Choudhury 2020).

Enzimler aşağıdaki özellikler ile birbirinden farklılık gösterirler;

- Mevcut amino asitlerdeki farklılıklar,
- Yapılarındaki amino asit dizilimlerindeki farklılıklar,
- Metal iyonlarının varlığı veya yokluğu (Choudhury, 2020).

2.2.2.1. Enzim Aktif Bölgesi

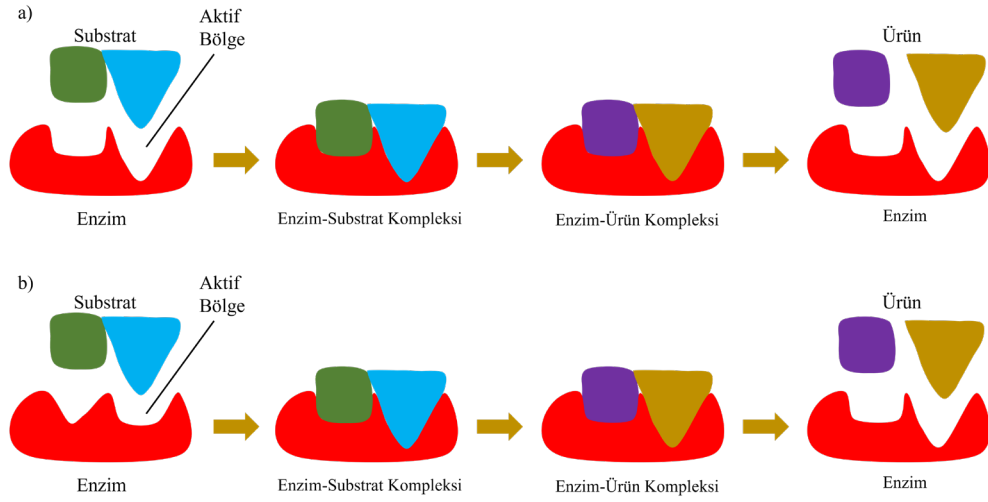
Enzimler genellikle substratlarından çok daha büyük yapılardır. Yapılarının sadece çok küçük bir kısmı doğrudan katalizle ilgilidir. Bu kısma katalitik bölge denir. Bu katalitik bölge, amino asit kalıntılarının substratları yönlendirdiği bir veya daha fazla bağlanma alanının yanında bulunur. Katalitik bölge ve bağlanma bölgesi enzimin aktif bölgesini oluşturur. Aktif bölge, substratları bağlamaktan ve ürünlere dönüşümünü katalize etmekten sorumludur. Enzim

yapısının geri kalan bölümleri aktif bölgenin oryantasyonu ve dinamiği üzerinde etkilidir (Kato ve Nagano, 2011; Suzuki, 2015).

Substratın enzime bağlanması, kataliz işleminin başlaması için bir ön koşuldur. Bu bağlanmada enzim ve substrat yapılarının yarı geçiş halinden enzim ve substrat kompleks haline geçişi için substrat bağlanma enerjisi kullanılır (Thyme ve diğ., 2009). Enzim, substrat ve/veya ürünler ile kimyasal bağların kurulmasını ve/veya kırılmasını katalize ederek geçiş durumuna geçilmesini sağlar (Purich, 2001). Substrat enzime bağlandığında enzimin aktif bölgesi yeniden şekillenir (Miller, 2007).

Substratın enzime bağlanması için iki model ileri sürülmüştür :

- Anahtar-kilit modeli (Fischer Modeli): Enzimler son derece spesifik katalizörler olduğundan hem enzim hem de substrat birbirinin tamamlayıcısı olan geometrik şekillere sahiptir. Örnek olarak; substratın tıpkı bir anahtarın kilide oturması gibi enzimin aktif bölgesine tam olarak uyması gerekir. Enzimlerin substrat ile reaksiyonunun özgüllüğü, enzimin yapısı tarafından belirlenir. Enzimin birincil yapısı amino asit dizisi tarafından, ikincil yapısı protein zincirinin spesifik yapısı tarafından ve üçüncül yapısı zincir bölümlerinin düzenlenmesi ile belirlenir (Şekil 2.19a) (Fischer, 1894).
- Uyarılmış uyum modeli (Koshland Modeli): Substrat moleküllerinin enzim aktif bölgesine bağlanarak, enzim molekülünün şeklini değiştiren bir uyarının indüklenmesine yol açar. Bu şekil değişikliği, enzimin substrat molekülüne daha iyi uyum sağlamasına neden olur ve böylece reaksiyonun katalizlenmesi gerçekleşir. Bu uyarın, "uygunluk uyarını" veya "indüklenmiş uygunluk" olarak adlandırılır. Bu modele göre, bir enzimin substrat molekülü ile etkileşimi, enzim molekülünün aktive olmasına ve böylece reaksiyon hızının artmasına neden olur. Enzim esnek olmasından kaynaklı tersiyer yapısında konformasyonel bir değişim meydana gelerek aktif bölgenin substrat moleküllerini bağlaması için uygun bir konformasyona ve konuma gelir (Şekil 2.19b) (Koshland Jr., 1995).



Şekil 2.19: a) Anahtar-kilit modeli ve b) Uyarılmış uyum modeli.

2.2.2.2. Katalitik Etkinlik

Enzimlerin aynı kökenli substratlarına karşı dikkate değer bir özgülükleri vardır. Bazı enzimler, düşük katalitik verimlilikle de olsa, aynı kökenli olmayan yani farklı substratları katalize edebilir veya alternatif kimyasal reaksiyonları gerçekleştirebilir. Bu durum enzimlerin esnekliğine ve adaptasyon yeteneğine sahip olduklarını gösterir. Bu özellik, enzimlerin biyokimyasal çeşitliliğini artıran bir özelliktir (Hult ve Berglund, 2007; Copley, 2020).

Enzim-substrat kompleksinin oluşumu çok az enerji gerektirdiğinden enzimler, reaksiyonların hızını birkaç bin kat artıran çok etkili katalizörlerdir. Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızı, katalizlenmeyen bir reaksiyona kıyasla 10^3 - 10^7 kat daha hızlı gerçekleşir (Roskoski, 2007; Choudhury, 2020).

2.2.2.3. Kofaktörler ve Koenzimler

Bazı enzimler katalitik aktivite gösterebilmeleri için kofaktörler olarak bilinen spesifik, küçük, protein olmayan moleküllere ihtiyaç duyarlar (De Bolster, 1997). Kofaktörler, inorganik (metal iyonları veya demir-kükürt yapıları) veya organik bileşikler (flavin veya hem) olabilirler. Organik bileşikler (veya metallo organik bileşikler) koenzim olarak adlandırılırlar. Bu koenzim veya metal iyonu enzime çok sıkı bağlar ile bağlanmışsa veya kovalent etkileşimler varsa bunlara prostetik grup (bir proteinin parçasını oluşturan veya protein olmayan bir grup) denir (Chapman-Smith ve Cronan, 1999).

Bu kofaktörlerin ve ko-enzimlerin aktivite üzerinde birden fazla etkileri vardır. Örneğin; metal iyonları aktif bölge içindeki nükleofilik türlerin dengelenmesine yardımcı olurlar ve kimyasal grupları bir enzimden diğer bir enzime taşırlar (Suzuki, 2015; Voet ve diğ., 2016).

Ayrıca, substratları bağlayarak onları yönlendirir ve elektrostatik olarak stabilize ederler (Roskoski, 2007).

2.2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimlerin katalitik aktivitesi sıcaklık, zaman, pH, enzim ve substrat konsantrasyonları gibi faktörlerin yanı sıra iyonik kuvvet, tuz, çözücü, metal iyonları ve inhibitör varlıklarına da bağlıdır (Zhang ve diğ., 2018).

2.2.3.1. Sıcaklık

Sıcaklık, sadece enzim katalizli reaksiyonlar için değil herhangi bir kimyasal reaksiyonun hızını her 10 °C'de iki-üç kat artıran bir etkidir. Enzim aktivitesi sıcaklıkla birlikte artar ve belirli bir noktada maksimum seviyeye ulaşır. Bu sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Optimum sıcaklık her enzim için farklı olmakla birlikte belirli bir sıcaklığın üstünde (>60 °C) enzimler denatürasyona uğrarlar. Buna karşılık optimum değer altındaki her sıcaklık, reaksiyon hızının tam kapasitede olmamasına sebep olmasından dolayı enzim aktivitesi daha düşük gerçekleşir (Şekil 2.20a) (Bisswanger, 2014).

2.2.3.2. pH

Enzim aktivitesi ve enzimin reaksiyonunu katalizleme derecesi pH ile de ilişkilidir. Enzimler aynı zamanda bir protein yapıya sahip olmalarından kaynaklı yan zincirlerinde iyonlaşabilen gruplara (-COOH, NH₂, -SH, imidazol gibi) sahiplerdir. Bu grupların ayrışması pH'a bağlı olarak gerçekleşir ve bu durum enzimin konformasyonunu, substrat bağlama derecesini ve aktif bölgesini etkiler. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a optimum pH denir ve bu değer altında/üstünde reaksiyon hızı yavaştır (Şekil 2.20b). pH'da gerçekleşen hafif değişiklikler, enzimin sahip olduğu amino ve karboksil gruplarının iyonik karakterini değiştirerek katalitik özelliklerini etkiler. pH'daki aşırı değişiklikler ise (2'den fazla pH birimi) enzimin aktivitesini sıfıra indirgeyerek enzimin inaktivasyonuna ve denatürasyonuna sebep olur (Bisswanger, 2014).

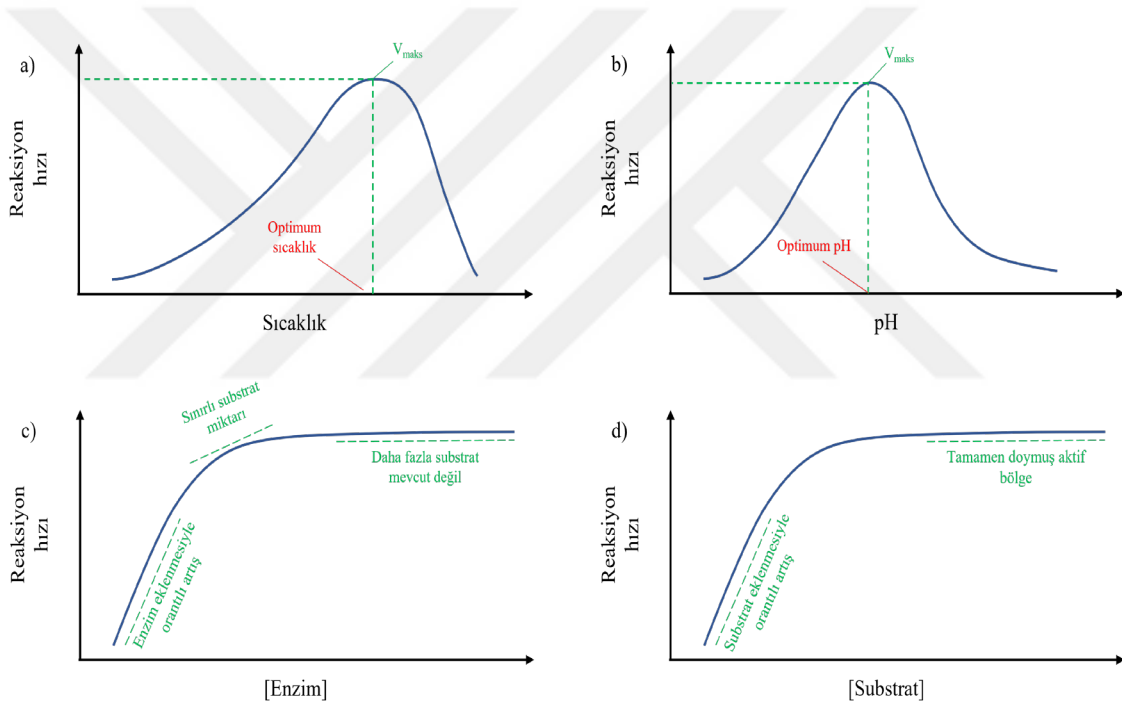
2.2.3.3. Enzim Konsantrasyonu

Ortamda yeterli substrat mevcutsa enzim katalizli bir reaksiyonun hızı, bulunan enzim miktarı ile doğru orantılıdır. Substrat moleküllerinin enzim moleküllerine bağlanmasıyla reaksiyon hızı artar. Ancak bir noktadan sonra reaksiyon hızı, ortamda bulunan substrat moleküllerinin hepsinin enzime bağlanmasından dolayı sabit kalır. Ortama daha fazla enzimin eklenmesi reaksiyon hızını etkilemez. Çünkü ortamda bağlanma için yeterli miktarda substrat

molekölü yoktur. Bu durum reaksiyon hızının sabit ilerlemesine sebep olur (Şekil 2.20c) (Bisswanger, 2014; Kuddus, 2019).

2.2.3.4. Substrat Konsantrasyonu

Enzim katalizli bir reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Substrat konsantrasyonundaki artış, reaksiyon hızını belirli bir seviyeye kadar artırır. Optimum pH, sıcaklık ve enzim konsantrasyonunda daha fazla substrat molekölü enzimle etkileşime girerek daha fazla ürün açığa çıkarır. Ancak enzimler ortamda bulunan bütün substrat moleküllerini bağladığında daha fazla substrat eklenmesi reaksiyon hızı üzerinde bir etkisi olmaz. Bu noktadan sonra reaksiyon hızı sabit bir şekilde devam eder (Şekil 2.20d) (Scanlon ve diğ., 2018; Kuddus, 2019).



Şekil 2.20: Enzim katalizli bir reaksiyona a) sıcaklık, b) pH, c) enzim konsantrasyonu ve d) substrat konsantrasyonu etkisi.

2.2.3.5. Diğer Faktörler

Enzim katalizli reaksiyonların hızları pek çok faktöre bağlıdır. Bu faktörler; reaksiyonda oluşan ürünler, ortamda bulunan iyonlar ve konsantrasyonları, ışık, hormonlar, allosterik etki, kofaktör veya inhibitör varlığı, fiziksel ve biyokimyasal faktörlerdir (Robinson, 2015).

2.2.4. Enzim Kinetiği

Enzimin kinetiği, yalnızca enzimin katalitik mekanizması hakkında bilgi vermez, aynı zamanda enzimin saflık derecesi ve etkinliği hakkında da önemli bilgiler gösterir (Eisenthal ve

Danson, 2002; Cook ve Cleland, 2007). Enzim molekülünün, substrat molekülünü ürüne dönüştürmesi bir dizi enzim-substrat kompleksi oluşumu sonucunda gerçekleşir. Enzimatik reaksiyonun hızını ve diğer parametrelerini belirlemek enzim mekanizmasını anlamak ve aydınlatmak için önemlidir (Kraut ve diğ., 2003).

Bir enzimatik reaksiyonda substratların ve ürünlerin konsantrasyonuyla ilgili ilk denklem Henri (Henri, 1903; Henri, 2006) tarafından Brown'un (Brown, 1902) çalışmalarının ardından türetilmiştir. Henri enzim kinetiğinin tanımını; reaksiyonun başlangıç hızının, enzimin konsantrasyonuyla doğru orantılı olduğunu ve reaksiyon hızının artan substrat konsantrasyonuyla belli bir seviyeye kadar arttığını non-lineer yöntemle göstermiştir (Henri, 1903; Henri, 2006). Henri'nin çalışmasından sonra, Michaelis ve Menten deneysel çalışmayı modifiye edilmiş bir hız denklemi kullanarak doğrulamışlardır (Johnson ve Goody, 2011).

2.2.4.1. Michaelis-Menten Denklemi

Michaelis-Menten denklemi, reaksiyonun hızının (v) substrat ($[S]$) ve ürün ($[P]$) konsantrasyonlarıyla ilişkilendirir (Şekil 2.21a) ve bu denkleme göre reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuyla doğrudan ilgilidir.

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{maks}[S]}{K_m + [S]}$$

v_0 : İlk hız

v_{maks} : Maksimum hız

K_m : Michaelis-Menten sabiti

$[S]$: Substrat konsantrasyonu

$[P]$: Ürün konsantrasyonu

K_m değeri, sayısal olarak maksimum reaksiyon hızının (v_{maks}) yarısına eşit hız veren substrat konsantrasyonudur ($K_m = \frac{1}{2} v_{maks}$ 'daki $[S]$) (Butterworth ve diğ., 2022). K_m değeri ayrıca enzimin substratına karşı olan afinitesinin bir ölçüsüdür. Substratı için düşük afiniteye sahip bir enzim, yüksek bir K_m değerine ve yüksek afiniteye sahip bir enzim, düşük bir K_m değerine sahip olur (Engelking, 2015).

2.2.4.2. Lineweaver-Burk Grafiği

v_{maks} ve K_m değerleri non-lineer regresyon ile substrat doygunluk eğrilerinden bulunabilir. Ancak verilerin değerlendirilmesi lineer grafik kullanılarak yapılmak istendiğinde Michaelis-Menten grafiği yerine Lineweaver-Burk (Lineweaver ve Burk, 1934) tercih edilir. Bu grafik, Michaelis-Menten denkleminin tersi alınarak elde edilir (Şekil 2.21b). Ayrıca enzim inhibitörlerinin etki mekanizmalarının aydınlatılmasında ve tiplerinin belirlenmesinde Lineweaver-Burk grafiği kullanılır (Engelking, 2015; Butterworth ve diğ., 2022).

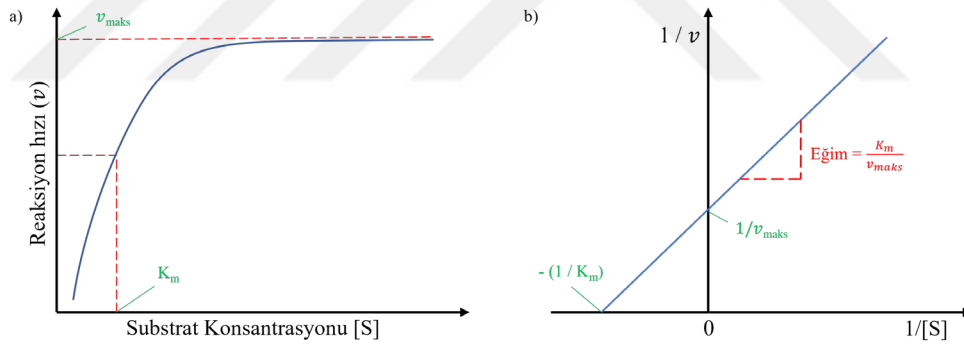
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{maks}}$$

v_0 : İlk hız

v_{maks} : Maksimum hız

K_m : Michaelis-Menten sabiti

[S]: Substrat konsantrasyonu



Şekil 2.21: a) Michaelis-Menten grafiği ve b) Lineweaver-Burk grafiği.

2.2.5. Enzim İnhibisyonu

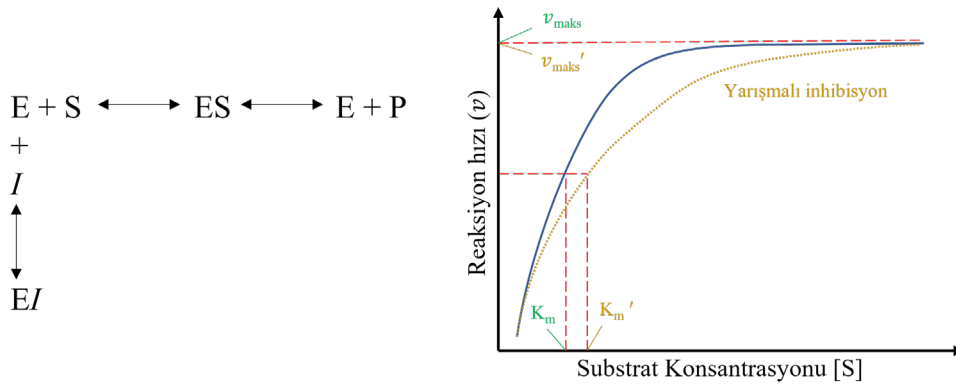
Bir enzimin aktivitesi üzerine çalışmalar deneysel veya doğal yollar ile inhibisyonu gerçekleştirilerek düzenlenir. Enzimin aktivitesi, sıcaklık ve pH gibi fizikokimyasal koşullar tarafından inhibe edilebilir. Enzim inhibitörü terimi ise bir enzimatik reaksiyonun aktifliğini azaltmak veya durdurmak için enzimin aktif bölgesine veya substratına bağlanan bir kimyasal molekülü ifade eder. Enzim inhibisyonu ile etkisini gösteren terapötik ilaçların birçoğu enzime spesifiktir. Yani sadece o enzimin inhibisyonunu gerçekleştirir ve aktivitesini engeller (Bhagavan, 2002; Walsh ve diğ., 2011).

Enzim inhibitörleri, bağlanmalarına ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılır. Bu sınıflandırma; inhibitör molekülün ortamdan çıkarılmasıyla enzimin aktivitesinin tekrar eski haline geldiği geri dönüşümlü inhibisyon (reversible, tersinir) ve enzimin denatürasyonu ile (veya kovalent bağlar ile bağlanmasıyla) kalıcı bir şekilde aktivitesini kaybettiği geri dönüşümsüz inhibisyon (irreversible, tersinmez) olarak iki başlık altında yapılır (Bhagavan, 2002).

2.2.5.1. Geri Dönüşümlü İnhibisyon

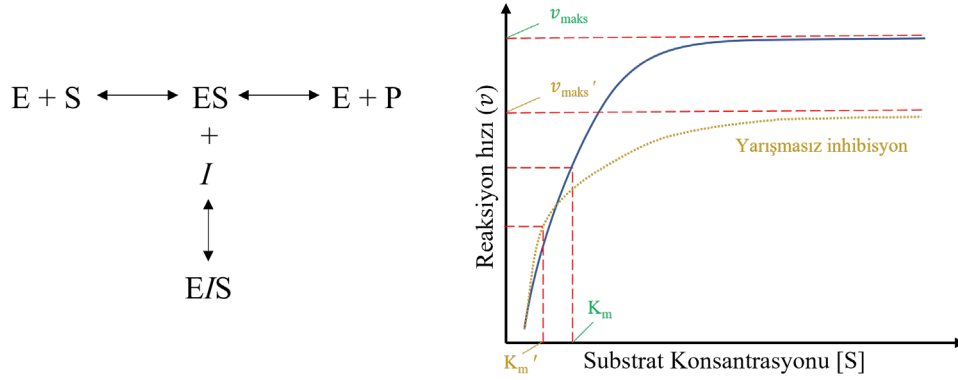
Enzimin aktif bölgesine bir inhibitörün kovalent olmayan bağlarla (non-kovalent) bağlanmasıdır. Ortamda substrat miktarının artmasıyla birlikte inhibisyon durumu tersine çevrilebilir (Litwack, 2022). Geri dönüşümlü inhibisyon türünün yarışmalı (kompetitif), yarışmasız (unkompetitif), yarı-yarışmalı (non-kompetitif), ve karışık (mixed) inhibisyon olmak üzere 4 farklı tipi vardır (Segel, 1993; Cornish-Bowden, 2014).

Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon: İnhibitör, enzime substratın varlığından bağımsız olarak bağlanır. Bu inhibitör molekülü enzimin substratına oldukça benzer yapıdadır ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını engeller. Diğer bir deyişle; inhibitör ve substrat enzimin aktif bölgesi için bir yarışma halindedir. Yüksek substrat konsantrasyonlarında inhibisyon durumu ortadan kalkar. K_m değeri artarken v_{maks} değeri etkilenmez (Şekil 2.22) (Kedderis, 2018).



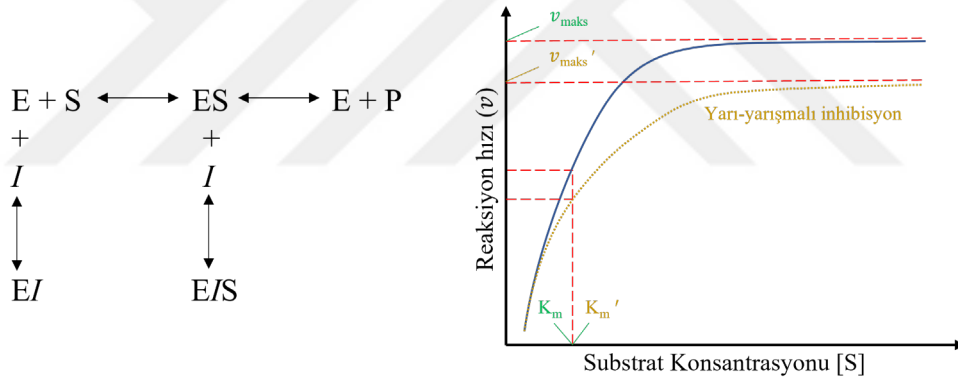
Şekil 2.22: Yarışmalı inhibisyon tipinin genel reaksiyonu ve Michaelis-Menten grafiği.

Yarışmasız (Unkompetitif) İnhibisyon: İnhibitör molekülü burada yalnızca enzim-substrat kompleksine bağlanır. Bu nedenle bu inhibisyon tipinde substrat konsantrasyonunun artırılması inhibisyonda herhangi bir değişikliğe neden olmaz. Hem v_{maks} hem de K_m değeri azalır (Şekil 2.23) (Mazzei ve diğ., 2016).



Şekil 2.23: Yarışmasız inhibisyon tipinin genel reaksiyonu ve Michaelis-Menten grafiği.

Yarı-Yarışmalı (Nonkompetitif) İnhibisyon: İnhibitör molekülü, enzim veya enzim-substrat kompleksine bağlanabilir. İnhibitörün hem enzim hem de enzim-substrat kompleksine olan ilgisi aynıdır. v_{maks} değeri azalırken, K_m değeri değişmez (Şekil 2.24) (Kenakin, 2017).



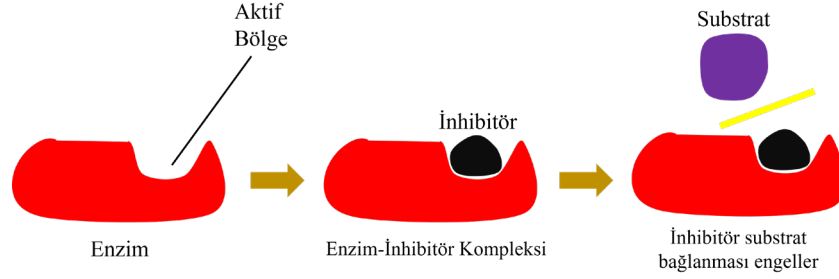
Şekil 2.24: Yarı-yarışmalı inhibisyon tipinin genel reaksiyonu ve Michaelis-Menten grafiği.

Karışık İnhibisyon: Bu inhibisyon tipinde, inhibitör molekülü hem enzime hem de enzim-substrat kompleksine bağlanabilir. İnhibitörün bu iki yapıya ilgisi farklıdır ve hangisine daha fazla bağlanma gerçekleştireceği afinitesi ile ilgilidir. İnhibitör serbest enzimin aktif bölgesine bağlanırsa yarışmalı inhibisyon, enzim-substrat kompleksine bağlanırsa yarışmasız inhibisyon tipi gösterir. v_{maks} değeri her iki tip içinde azalırken, K_m değeri inhibisyon tipine göre azalabilir veya artabilir (Kermasha ve Eskin, 2021).

2.2.5.2. Geri Dönüşümsüz İnhibisyon

Bu inhibisyon tipinde inhibitör, enzime kovalent bağlarla bağlanmaktadır ve bağlanma enzimin herhangi bir bölgesinde gerçekleşebilir. İnhibitör, enzimde konformasyonel

değişikliğe neden olarak kararlı bir kompleks oluşturmamasından dolayı enzimden ayrılması çok zordur ve substratın aktif bölgeye girişini engeller (Şekil 2.25) (Kenakin, 2012).



Şekil 2.25: İnhibitörün enzimde substrat girişini engellemesi.

2.2.6. Enzim İnhibisyonunun Klinik Çalışmalardaki Önemi

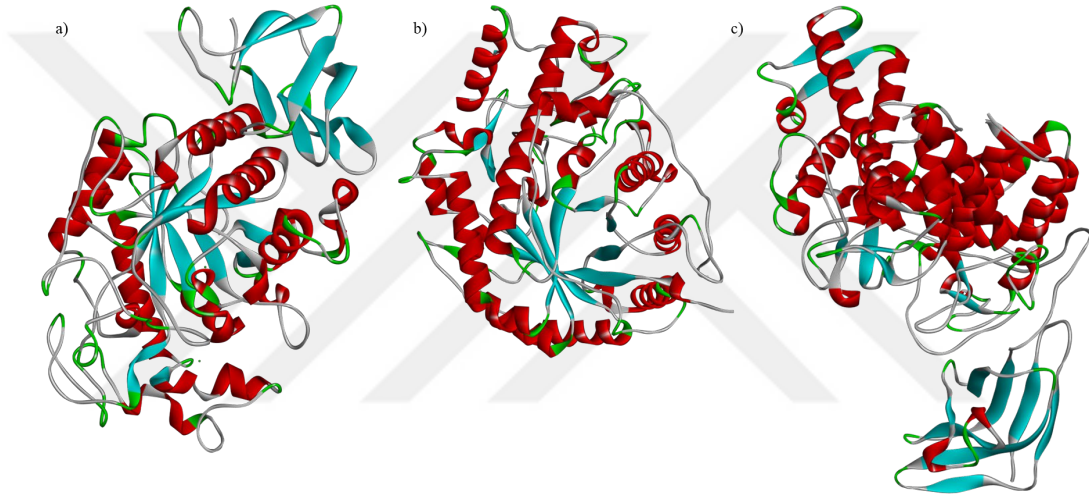
Enzim inhibitörlerinin ilaç keşfinde önemli bir yerinin olması nedeniyle farmakolojide temel araştırma alanı haline gelmiştir. 100'den fazla enzim inhibitörü halihazırda ilaç olarak kullanılmakta ve geliştirilmektedir. Bu tür ilaçlar spesifik etkilerini hücrelerdeki, bakterilerdeki, virüslerdeki ve insan vücudundaki enzimleri inhibe ederek gösterirler. Enzim inhibitörleri birçok hastalıkta kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak; astım ve kronik obstrüktif akciğer ve kardiyovasküler hastalıklar (KVH), erektil disfonksiyon, gastrointestinal bozukluklar, hepatit B/C ve herpes virüsü enfeksiyonları, insan immün yetmezlik virüsü (HIV)/edinsel bağışıklık yetmezliği sendromu (AIDS), romatoid artrit ve inflamatuvar hastalıklar verilebilir. Bunlar gibi çeşitli hastalıkların tedavilerinde veya semptomlarının hafifletilmelerinde enzim inhibitörler tercih edilmektedir (Tablo 2.1) (Ouertani ve diğ., 2019).

Tablo 2.1: Bazı enzim inhibitörlerinin klinikte kullanım alanları.

Enzim İnhibitör Tipi	İlaç	Enzim hedefi	Farmakolojik Kullanımı
Geri dönüşümsüz inhibitörler	Penisilin	Transpeptidaz	Bakteriyel enfeksiyon
	Asiklovir	Virüs DNA polimerazı	Herpes
	Allopurinol	Ksantin oksidaz	Gut
	Aspirin	Siklooksijenaz	Ateş/inflamasyon/ağrı
Yarışmalı geri dönüşümlü inhibitörler	Asetazolamid	Karbonik anhidraz	Glokom
	Glivec	Bcr-Abl kinaz	Kanser
	Viagra	Fosfodiesteraz	Erektil disfonksiyon
	Nevirapine	HIV ters transkriptaz	AIDS
Yarı-yarışmalı geri dönüşümlü inhibitörler	Etopozid	Topoizomeraz II	Kanser
	Trazodon	Adenozin deaminaz	Depresyon
	Tacrine	Asetilkolinesteraz	Alzheimer hastalığı
Yarışmasız geri dönüşümlü inhibitörler	Valproik asit	UDP-glukuronoziltransferaz	Ksenobiyotik metabolizması
	Kamptotesin	Topoizomeraz I	Kanser

2.3. α -AMİLAZ ve α -GLUKOZİDAZ ENZİMLERİNİN YAPISI ve FONKSİYONU

Amilaz enzimi, mikroorganizmalarda, bitkilerde, hayvanlarda, mantarlarda ve özellikle çimlenmekte olan tahıllarda yüksek miktarlarda bulunan bir metalloenzimdir. Amilaz enzimi, etki mekanizmasına göre alfa (α), beta (β) ve gama (γ) olarak sınıflandırılır (Şekil 2.26). α -Amilaz (EC 3.2.1.1), memelilerde hem tükürük bezlerinde hem de pankreas hücrelerinin salgı granüllerinde üretilir. Aynı zamanda bu enzim α -1,4-glukan-4-glukanohidrolaz olarak da adlandırılır. Enzimin aktivitesi kalsiyum iyonuna ve klorür iyonuna bağlıdır. Ayrıca pH 7’de en yüksek aktivitesini gösterir (Rick ve Stegbauer, 1974; Svensson, 1988; Van Der Maarel ve diğ., 2002; Reddy ve diğ., 2003).



Şekil 2.26: a) İnsan α -amilaz yapısı (PDB: 1SMD) b) Arpa β -amilazı yapısı (PDB: 2XFR) c) *Penicillium oxalicum* γ -amilaz yapısı (6FHV).

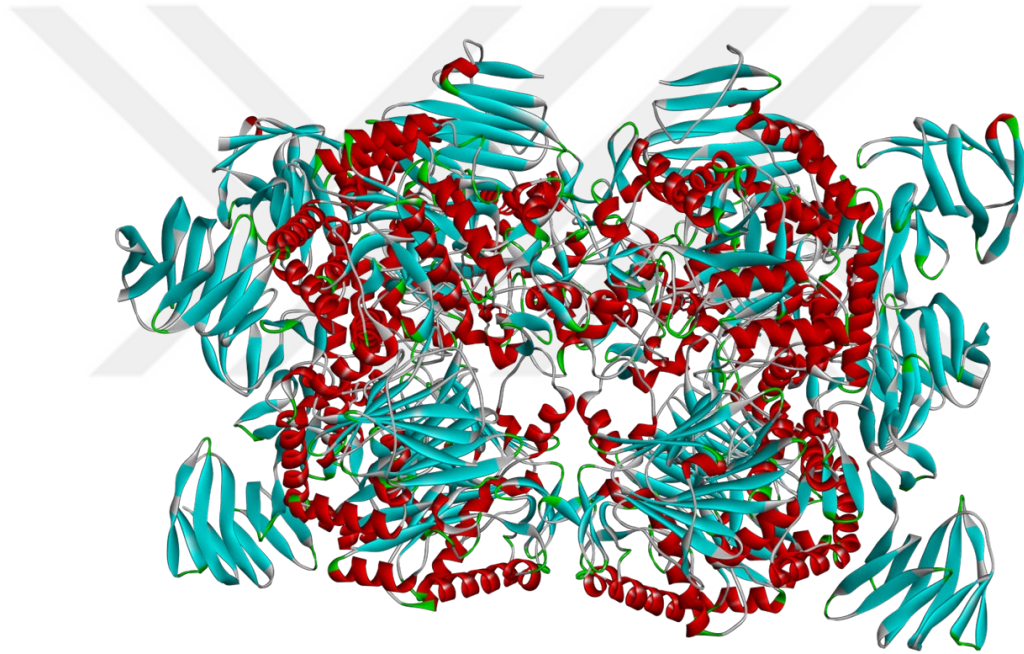
α -Amilaz enzimi, amilozun, amilopektinin, glikojenin ve diğer sakkaritlerin α -(1-4) glikozit bağlarını hidrolize eder (Rick ve Stegbauer, 1974). Bu karbohidratların α -amilaz tarafından hidrolizi sonucu; maltoz, maltotrioz, maltotetraoz ve maltodekstrinler gibi düşük molekül ağırlıklı yapılar açığa çıkar (Yoon ve Robyt, 2002; Moran ve diğ., 2011).

α -Amilazın yapısına bakıldığında üç alanı (subdomain) olduğu görülmektedir. İnsan pankreatik amilazı için;

- Birinci alan: Enzimin büyük bir bölümünü oluşturur ve bir tane klorür iyonu içerir. Bu alan, enzime sekiz sarmallı paralel bir yapı kazandırır,
- İkinci alan: Enzimin yapısındaki en küçük alandır ve birinci alanın karşısında bir kalsiyum bağlama bölgesi oluşturur,

- Üçüncül alan: Anti-paralel yapı olarak adlandırılır (Mahmood, 2016).

α -Glukozidaz (EC 3.2.1.20) (Şekil 2.27), disakkaritlerin α -(1-4) glikozit bağlarına etki ederek glukoz monomerlerine dönüştüren, ince bağırsakta yer alan bir enzimdir (Sorensen ve diğ., 1982). Hidrolitik reaksiyon ve aril (veya alkil) α -glikozitlerin, disakkaritlerin ve oligosakkaritlerin indirgeyici olmayan kısımlarında α -glukoz oluşumunu katalize ederler (Moremen ve diğ., 1994). α -Glukozidaz substrat özgüllüğüne göre üçe ayrılır; sakkaroz ve aril-glikozitler gibi heterojen substratları seçen Grup I enzimler, homojen substratları seçen Grup II ve Grup III enzimleridir. Ancak Grup II'deki enzimlerin, grup III'deki enzimlerden farkı; uzun zincirli substratlara karşı yüksek seçiciliğe sahip olmalarıdır (Auiewiriyankul ve diğ., 2018).



Şekil 2.27: *Sulfolobus solfataricus* α -glukozidaz yapısı (PDB: 2G3N).

α -Glukozidazın ince bağırsakta, maltaz-glukoamilaz ve sakkaraz-izomaltaz olmak üzere iki α -izoformu bulunur. Bu izoformların, birbirinden farklı aktiviteleri vardır. Ayrıca maltaz-glukoamilaz, sakkaraz-izomaltaza göre daha yüksek bir hidrolitik aktiviteye sahiptir (Martinez-Gonzalez ve diğ., 2017).

2.3.1. α -Amilaz ve α -Glukozidaz Enzimlerinin Karbohidrat Metabolizmasındaki Yerleri

Besinlerin sindirimi ilk olarak ağızda tükürük enzimleri tarafından başlar (Hurrel ve Finot, 1984). Karbohidratlar, diyetle en büyük kalori kaynağı olan yapılardır. Karbohidrat moleküllerinin vücutta emilimi için öncelikle α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri tarafından

monosakkarit birimlerine parçalanması gerekir (Yoon ve Robyt, 2002; Moran ve diğ., 2011). Ağızda sindirimi başlayan karbohidratların, α -amilazın asidik ortam koşulları nedeniyle inaktif olduğu midede sindirimi gerçekleşmez. İnce bağırsakta pH'nın nötralize olmasıyla birlikte pankreastan α -amilaz salgılanır ve karbohidratların sindirimine burada devam edilir. Ayrıca ince bağırsakta α -glukozidaz enzimi, bağırsakta emilimi gerçekleşmeyen oligosakkaritlerin ve disakkaritlerin monosakkarit birimlerine hidrolize edilmesine yardımcı olur (Obiro ve diğ., 2008; Nawaz ve diğ., 2022). Sindirim sonucu, maltoz, maltotrioz, maltooligosakkaritler ve α -dekstrin gibi şekerler açığa çıkar. Bu şekerler daha sonra α -glukozidaz tarafından glukoz birimlerine hidroliz edilir (Warren ve diğ., 2015).

Vücutta polimerik formda bulunan karbohidratların emilimi gerçekleşemez. Ancak monosakkarit birimleri hızlı bir şekilde emilerek yüksek bir glisemik indekse sahip olurlar. Glisemik indeks, bir besinin içerdiği karbohidratların kan şekerini nasıl etkilediğini ölçen bir belirteçtir. Glisemik indeks, yiyeceklerin sindirildikleri ve kana karıştıkları hızı gösterir. Bir besinin glisemik indeksi ne kadar yüksekse, kan şekerinin o besini tükettikten sonra daha hızlı yükseleceği anlamına gelir. Karbohidratları hidrolize eden enzimlerin inhibisyonu ile kan şekerinin daha istikrarlı bir şekilde seyretmesine katkıda bulunulabilir (Radulian ve diğ., 2009).

2.3.2. Klinik Açıdan α -Amilaz ve α -Glukozidaz Enzimlerinin Önemi

Kan glukoz seviyesinin düzenlenmesi, karbohidrat sindiriminde kilit rolleri olan α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibe edilmesiyle sağlanabilir (Ortiz-Andrade ve diğ., 2007; Karthic ve diğ., 2008; Sun ve Miao, 2020).

Örnek olarak; tip II diyabetin en önemli etkilerinden biri, kan şekeri seviyesindeki artıştır. α -Glukozidaz aktivitesinin inhibisyonu, yemek sonrası karbohidrat sindirimini yavaşlatarak kandaki glukoz seviyesini modüle eder (Bischoff, 1995; Dabhi ve diğ., 2013).

Diabetes mellitus (diyabet), insülin hormonunun işlev bozukluğunun sonucunda anormal yüksek kan şekeri seviyeleri (hiperglisemi) ile karakterize edilen kronik bir hastalıktır (Selvin ve diğ., 2004; Goldenberg ve Punthakee, 2013). Hiperglisemi, pankreasın yeterli insülin üretilmediği veya üretilen insülinin etkili şekilde kullanılmadığında ortaya çıkan bir durumdur (Ighodaro, 2018). Uygun tedavi uygulanmadığında yüksek kan şekeri seviyeleri; göz, böbrek, akciğer, kalp gibi organların fonksiyonlarını etkiler ve karbohidrat, lipid ve protein metabolizması bozukluklarını tetikler (Selvin ve diğ., 2004).

Diyabet, 21. yüzyılın en büyük sağlık sorunlarından biridir ve diyabetten etkilenen yetişkin sayısı son 20 yılda üç kat artmıştır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) 10. baskısında, 537 milyon yetişkinin bu hastalıkla mücadele ettiğini bildirmiştir. IDF, dünya genelinde 2030 yılına kadar 643 milyon, 2045 yılına kadar ise 783 milyon diyabet vakası olacağını tahmin etmektedir (Cisneros-Yupanqui ve diğ., 2023).

Yaklaşık 3000 yıl önce ilk diyabet vakası Mısır el yazmalarında bildirilmiştir ve bilinen en eski hastalıklardan biridir. 1755 yılında Dobson, diyabetik bir kişinin idrarında şekerin varlığını tespit etmiştir. Daha sonra Joseph von Mering ve Oskar Minkowski, köpekler üzerinde yapmış oldukları deneylerde, pankreası cerrahi olarak çıkarılan köpeklerin diyabet semptomları geliştirdiklerini saptamışlar ve böylece pankreasın diyabetteki rolünü keşfetmişlerdir. 1910 yılında Sir Edward Sharpey-Schafer, diyabet hastalığının insülin eksikliğinden kaynaklı ortaya çıktığını bulmuştur. 1936 yılında ise diyabetin tip I ve tip II gibi farklı türlerin olabileceği literatüre kazandırılmıştır (Kaur ve diğ., 2022).

Tip I diyabet, genetik yatkınlıkla ilişkili insüline bağımlı bir otoimmün hastalıktır. Bu hastalıkta bağışıklık sistemi, pankreasın insülin üreten β -hücrelerine karşı savunma geliştirerek bu hücreleri yok eder. Bu durumda, vücut insülin üretemez ve dışarıdan insülin takviyesi zorunlu hale gelir (Gharravi ve diğ., 2018; Tan ve diğ., 2019; Mahindrakar ve Rathod, 2021).

Tip I diyabette, β -hücrelerinin yıkım hızı kişiden kişiye değişkenlik gösterebilir. Bebekler ve çocuklarda hızlı olurken, yetişkinlerde yavaş gerçekleşir. Hastaların, enfeksiyon veya stres altında şiddetli hiperglisemi ve ketoasidoz geliştirmesi oldukça mümkündür. Bu tip diyabete sahip kişiler, ayrıca Graves hastalığı, Hashimoto tiroidi, Addison hastalığı, vitiligo, çölyak hastalığı, otoimmün hepatit, Myastenia Gravis ve pernisiyöz anemi gibi diğer otoimmün bozukluklara yatkın hale gelirler (Association, 2014). Tip I diyabet tedavisinde insülin enjeksiyonu uygulanır (Mohiuddin ve diğ., 2016).

Tip II diyabet, yaşam tarzıyla ilişkili insüline bağımlı olmayan bir diyabet türüdür. Tip II diyabete sahip kişilerin hücreleri, insüline direnç geliştirerek kan şekerinin yükselmesine sebep olur. Bu durum organlara hasar verir ve ömür boyu tedavi gerektiren bir süreçtir (Gharravi ve diğ., 2018; Tan ve diğ., 2019; Mahindrakar ve Rathod, 2021). Ayrıca hiperglisemi, reaktif oksijen türlerini artırarak oksidatif strese ve doku hasarına sebep olabilir (Vanessa Fiorentino ve diğ., 2013).

Tip II diyabet türü için risk faktörleri; fazla kilo veya obezite, genetik yatkınlık, 45 yaş üstü olmak, yüksek kan basıncı, kalp hastalığı ve etnik kökendir (Alberti ve Zimmet, 1998). Bu diyabet türü, diyabetik rahatsızlıkların %90'ını oluşturur. Glisemik kontrol, diyabet hastalarında çok önemlidir. Bundan dolayı yemek sonrası görülen hiperglisemi, tip II diyabet riskini artırmakla birlikte kardiyovasküler rahatsızlıklar, nefropati, nöropati, anjiyopati gibi rahatsızlıklara sebep olabilmektedir (Zheng ve diğ., 2018).

α -Amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu, yemek sonrası kan şekeri seviyesinin yükselmesini geciktirmek için kullanılan genel bir yöntemdir (Zhao ve diğ., 2019). Ayrıca tip II diyabet tedavisinde 6 tür oral anti-diyabetik ilaç vardır. Bunlar; biguanid (metformin), α -glukozidaz inhibitörü (akarboz), sulfonilüre (asetoheksamid), glinid inhibitörü (repaglinid), tiyazolidinedion (rosiglitazon) ve dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4)'dür (Tablo 2.2) (Bastaki, 2005; Marín-Peñalver ve diğ., 2016).

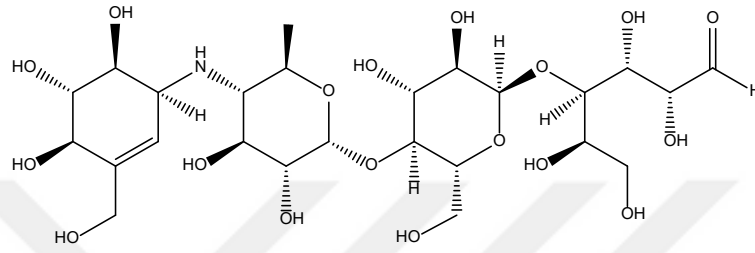
Tablo 2.2: Tip II diyabet tedavisinde kullanılan oral ilaçlar.

İlaç sınıfı	İlaç mekanizması
Biguanid	Karaciğerde glukoz üretilmesini azaltır
Tiyazolidinedion	İskelet kası hücreleri tarafından glukoz alımını artırır
Sulfonilüre	Pankreasın β -hücrelerinden insülin salınımı uyarır
Dipeptidil peptidaz (DPP-4) inhibitörü	DPP-4 enziminin GLP-1'i (glukagon benzeri peptid-1) parçalamamasını engeller (GLP-1 salınımını artırır), bu da insülin sekresyonunu artırır ve glukagon sekresyonunu azaltır.
α -Glukozidaz inhibitörü	Bağırsakta karbohidrat emilimini inhibe eder
Glinid	İskelet kası hücreleri tarafından glukoz alımını artırır

α -Glukozidaz inhibitörleri insülin müdahalesi gerektirmediğinden diyabetik hastalarda hiperinsülinemi olasılığını düşürür (Mukherjee ve diğ., 2020). Bu inhibitörler yemek sonrası hiperglisemiyi hedeflemesinden kaynaklı diyabetik hastaların tedavisinde birinci basamak ilaç olarak sıklıkla tercih edilmektedirler. Ayrıca α -glukozidaz inhibitörlerinin aşırı dozlarda uygulanması durumunda bile hipoglisemiye ve hayatı tehdit eden vakalara neden olmaması onların sıklıkla kullanılma nedenleridir (Chiasson ve diğ., 2002). Diyabet tedavisinde sıklıkla akarboz, vogliboz ve miglitol inhibitörleri tercih edilmektedir. Akarboz, miglitol ve vogliboz, hem α -amilaz hem de α -glukozidazı inhibe eden karbohidrat hidrolizini ve emilimini azaltan anti-diyabetik ilaçlardır (Cardullo ve diğ., 2020). Ancak bu ilaçların karın ağrısı, gaz, ishal, hipoglisemi, karaciğer hasarı, ilaç direncinin gelişmesi, kilo alma ve kalp rahatsızlığı gibi çeşitli

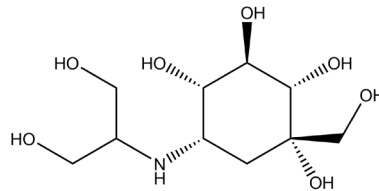
yan etkilere sahip olmalarından dolayı kullanımlarında belirli sınırlamalar vardır (Bhutkar ve Bhise, 2012; Palanisamy ve diğ., 2018; Etsassala ve diğ., 2019).

Akarboz, üzerinde en çok çalışılan α -glukozidaz inhibitörüdür ve şu anda tip II diyabetiklerde yemek sonrası hiperglisemiye önlemek için terapötik olarak kullanılmaktadır. Akarboz, izomaltaz dışındaki (α -(1,4) glikozidik bağları yerine α -(1,6) glikozidik bağlarına etki eden enzim) tüm bağırsak α -glukozidazlarını inhibe eder (Şekil 2.28) (Lebovitz, 1997).



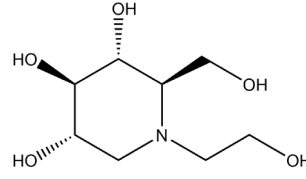
Şekil 2.28: Akarboz bileşiği.

Vogliboz, tip II diyabetik kişilerde yemek sonrası kan glukoz seviyesini düşürmek için 1994 yılında Japonya'da geliştirilen bir α -glukozidaz inhibitörüdür (Nepal ve diğ., 2020). Maltaz ve sakkaraz enzimleri üzerine kuvvetli inhibisyon etki gösteren vogliboz, amilazlar üzerine zayıf inhibisyon etki gösterir (akarbozdan 104 kat daha az) (Şekil 2.29) (Matsuo ve diğ., 1992).



Şekil 2.29: Vogliboz bileşiği.

Miglitol, karbohidratların bağırsaktan emilimini azaltmaya veya geciktirmeye neden olan bir α -glukozidaz inhibitörüdür. Bu etkisinden dolayı tip II diyabet tedavisinde sıklıkla kullanılır. İnce bağırsakta α -glukozidaz aktivitesini inhibe ederek, nişasta ve disakkaritlerin monosakkaritlere parçalanmasını bloke eder ve karbohidratların emiliminde gecikmeye ve kan glukozunda yemek sonrası artışın engellenmesine neden olur. Miglitol, ilk kez 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri tarafından kullanımı onaylanan ikinci α -glukozidaz inhibitörü (akarbozdan sonra) olmuştur (Şekil 2.30) (LiverTox, 2021).

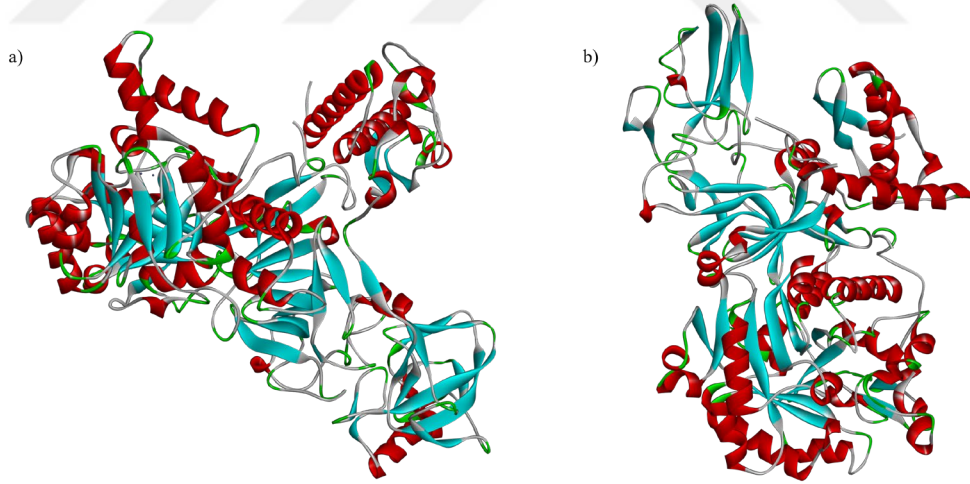


Şekil 2.30: Miglitol bileşiği.

Günümüzde hala diyabet için kesin bir tedavi yöntemi mevcut değildir. Ancak sağlıklı bir diyet, fiziksel egzersiz ve anti-diyabetik ajanların kullanımı ile kan şekeri düzeylerinin regüle edilmesi ve uzun süreli diyabet komplikasyonlarının kontrol altına alınması sağlanabilir (Krentz ve Bailey, 2005).

2.4. ÜREAZ ENZİMİNİN YAPISI ve FONKSİYONU

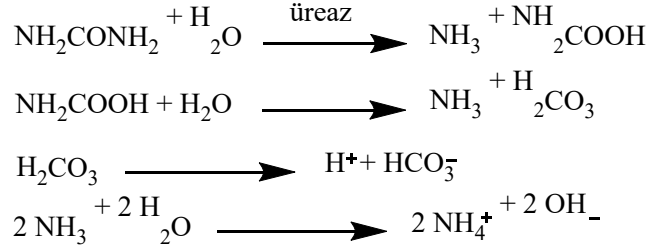
Üreaz enziminin (*Canavalia ensiformis*) (Şekil 2.31a) ilk kez izole edilmesi ve saf olarak kristalleştirilmesi 1926 yılında James Sumner tarafından yapıldı (Sumner, 1926) ve üreaz enziminin (*Klebsiella aerogenes*'den elde edilen) yapısı ilk kez 1995 yılında X-ışını kristal teknolojisi kullanılarak Andrew Karplus ve arkadaşları tarafından aydınlatıldı (Şekil 2.31b) (Jabri ve diğ., 1995).



Şekil 2.31: a) PDB ID: 4H9M (*Canavalia ensiformis* üreazı) b) PDB ID: 2KAU (*Klebsiella aerogenes* üreazı).

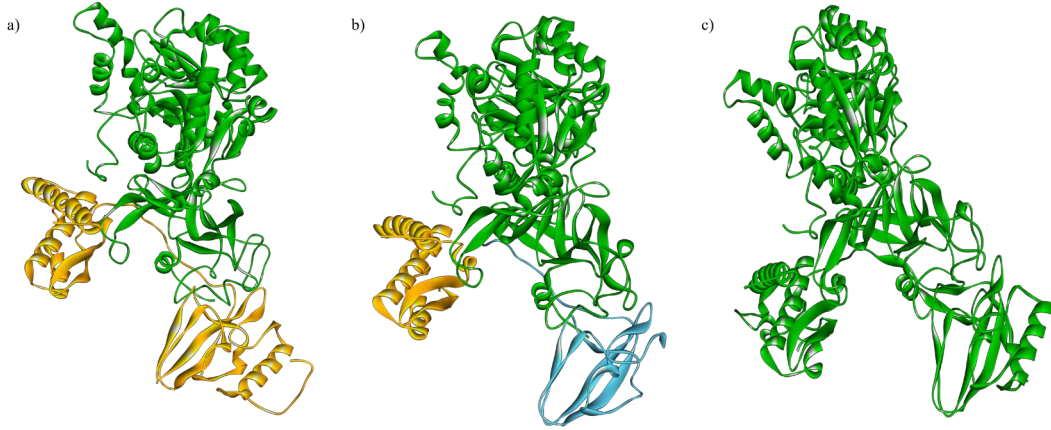
Üreaz (E.C. 3.5.1.5), bir hetero-polimerik enzim sınıfına ait olan bir metalloenzimdir (Aman ve diğ., 2020). Üreaz enzimi, bitkiler, bakteriler ve mantarlar tarafından üretilir. Üreazın birincil görevi üreyi hidrolize etmesidir. Bu reaksiyon sonucunda amonyak (NH_3) ve karbamat açığa çıkar (Karplus ve diğ., 1997). Oluşan karbamat hızlı bir şekilde kendiliğinden amonyak ve karbondioksit (CO_2) parçalanır. 1 mol ürenin hidrolizi sonucu, 2 mol amonyak ve 1 mol

karbondioksit oluşur. Üreazın, üreyi amonyağa ve karbondioksite hidrolizini katalize ettiği reaksiyon hızı, katalize olmayan reaksiyona göre $\sim 10^{14}$ kat fazla olduğu bilinmektedir (Abid ve diğ., 2021). Ürenin hidrolizi sonucunda pH artışı kaçınılmazdır (Şekil 2.32) (Burne ve Chen, 2000).



Şekil 2.32: Üreaz enziminin hidrolitik mekanizması.

Üreaz enziminin kaynağına göre (soya fasulyesi, Jack fasulyesi, diğer bazı bitkiler, bakteri ve mantar) alt ünitelerinin sayısı ve tipinde değişiklikler olabilir, ancak amino asit dizilişlerinde büyük benzerlikler vardır (Amtul ve diğ., 2002). Örnek olarak; *Helicobacter pylori* üreazı iki alt ünite (α , β) içerirken (Şekil 2.33a) diğer mikrobiyal üreazlar üç alt ünite (α , β ve γ) içerir (Şekil 2.33b) ve bitkisel kaynaklı/Jack fasulyesi gibi üreazlar ise tek bir polipeptit zincirden (α) oluşur (Şekil 2.33c) (Hu ve Mobley, 1990).



Şekil 2.33: a) PDB ID: 1E9Y (*Helicobacter pylori* üreazı) b) PDB ID: 2KAU c) PDB ID: 4H9M.

Üreazın aktif bölgesinde iki nikel (II) atomu (Ni^{+2}) bulunmaktadır (Modolo ve diğ., 2018). Üreazın yapılan mekanizma çalışmalarında aktif bölgesinde bulunan nikel atomlarının enzimin aktivitesinde kilit role sahip oldukları bulunmuştur (Mazzei ve diğ., 2019).

2.4.1. Üreaz Enziminin Çevresel Etkileri ve Klinik Çalışmalarda Yeri

Tarımda gübrelemede kullanılan ürenin, yüksek üreaz aktivitesine maruz kalması sonucunda, atmosfere anormal derecede amonyak salınmasına sebep olur. Bu durum önemli

çevresel/ekonomik kayıplara sebep olması ile birlikte bitkilerin gerekli besinlerden yoksun kalmasına, amonyak toksisitesine ve toprağın pH'ında ciddi artışlara neden olur (Mobley ve Hausinger, 1989). Bu nedenle üreaz inhibisyonu, üreolitik bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisinin yanı sıra, çevresel/ekonomik kayıplarla mücadelede ilk basamak olarak düşünülmektedir (Taha ve diğ., 2019).

Üreaz enzimlerinin mide kanseri, peptik ülserasyon, hepatik koma ve idrar taşları gibi hastalıklarda rol oynadıkları bilinmektedir (Prywer ve diğ., 2017). Bu nedenlerden dolayı üreazın klinik açıdan kritik bir rolünün olması onu biyolojide, çevre ve tarım çalışmalarında, kimyada ve tıpta önemli araştırma alanı haline getirmiştir. Etkili ve güvenli üreaz inhibitörlerinin çeşitli hastalıkların tedavilerinde kilit yerlerinin olması onları farmasötik araştırmalarda ön planda tutmaktadır (Islam ve diğ., 2019).

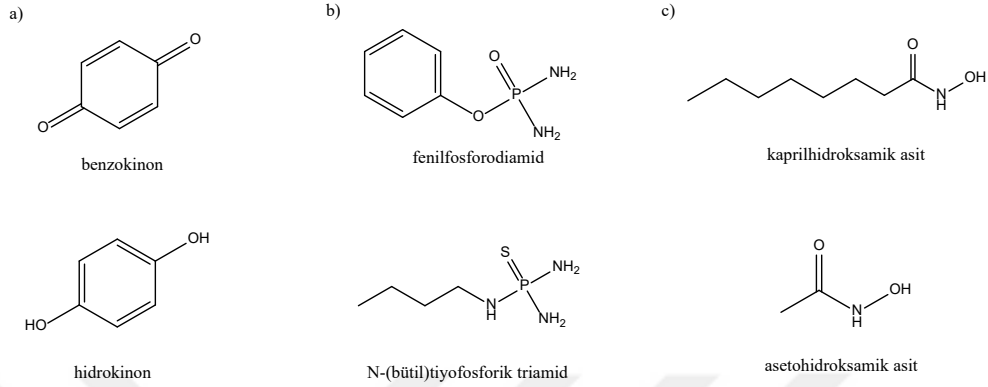
Üreaz enzimi, *Helicobacter pylori* bakterisinin midenin düşük pH'ına dayanmasına ve kolonizasyonlar oluşturmaya imkân sağlar. Bu durum daha sonra mide kanserlerinin gelişmesine öncülük edebilen mide ve peptik ülserlerin ortaya çıkmasına sebep olur (Kusters ve diğ., 2006). *Staphylococcus aureus* ise ölümle sonuçlanabilen akut ve kronik enfeksiyonlara sebep olabilen başka bir bakteri türüdür. Bu bakterinin yaşam koşullarında pH homeostazı ve ürece zengin ortam olması önemlidir (Zhou ve diğ., 2019). Tüberküloz hastalığının etiyolojik ajanı olan *Mycobacterium tuberculosis*, hücreleri enfekte eden başka bir bakteri türüdür. Bu bakterinin hayatta kalması, üreaz aktivitesine, üre hidrolizine ve azot varlığına bağlıdır (Clemens ve diğ., 1995). Ayrıca ürenin hidrolizi sonucu açığa çıkan amonyum hidroksit, histolojik hasara sebep olabilmektedir. Bu hasarın oluşmasının temel nedeni, amonyağın su ile reaksiyona girerek hidroksit iyonları oluşturmaktır (Mbachu ve diğ., 2023).

2.4.2. Üreaz İnhibitörleri

Üreaz inhibitörleri, yapılarına veya üreaz ile bağlanma biçimlerine göre üç gruba ayrılır;

- Üreazın sülfidril gruplarıyla reaksiyona girebilen organik veya inorganik bileşikler (alk(en)iltiyosülfinat, hidrokinon, p-benzokinon) (Şekil 2.34a),
- Kolayca hidrolize olmayan, üre yapısına benzeyen ve üreazın aktif bölgesine bağlanabilen yarışmalı inhibitörler (hidroksiüre, fosforamidler, fenilfosfordiamidat, N-(bütil)tiyofosforik triamid) (Şekil 2.34b),

- Üreazın aktif bölgesinde bulunan nikel atomlarından biriyle kompleks oluşturabilen metal şelatlayıcı bileşikler (kaprilhidroksamik asit, asetohidroksamik asit) (Şekil 2.34c) (Folina ve diğ., 2021).



Şekil 2.34: Çeşitli üreaz inhibitörleri.

2.5. HEMOSTAZ

Hemostaz, bilindiği gibi damar hasarı olduğunda o bölgede pıhtı oluşumu ile kanamanın önlenmesi ve durmasını sağlamasıyla birlikte, oluşan pıhtının çözülmesi ve damar içerisinde yeniden düzenli kan akımının devam ettirilmesini sağlar (Versteeg ve diğ., 2013). Hemostaz, pıhtı oluşumu ile kanama arasındaki dengedir. Denge bozulduğunda istenmeyen koagülasyon veya aşırı kanama ortaya çıkabilir (Atalan, 2013). İstenmeyen koagülasyon durumlarında KVH, felç, periferik arter hastalığı, abdominal aort anevrizması, pulmoner emboli, venöz tromboembolizm, atriyal fibrilasyon, atriyal çarpıntı ve kalp kapakçık hastalığı gibi çok çeşitli trombotik hastalıklar ortaya çıkabilir (Bridge ve diğ., 2014; Chylova ve diğ., 2021).

Hemostatik mekanizma, kan damarları, trombositler, pıhtılaşma faktörleri, pıhtılaşma inhibitörleri ve fibrinoliz gibi stimüle edici ya da inhibe edici yolların birbirleri ile ilişkisi olan bir bütündür. Bu süreçlere ek olarak ayrıca, hemostaz ile bedeninin diğer savunma mekanizmalarından olan immün sistem ve inflamatuvar sistemler arasında da ilişki vardır (Opneja ve diğ., 2019). Koagülasyon sistemindeki dengesizliğe neden olabilecek bir diğer faktör de virüslerdir. Dünya genelinde bir salgın olan COVID-19 enfeksiyonunun pıhtılaşma sisteminde bozukluklara sebep olup güçlü trombotik eğilim nedeniyle hem arteriyel hem de venöz trombozun yüksek bir insidans gösterdiği rapor edilmiştir (Asakura ve Ogawa, 2021; Parato ve diğ., 2021). COVID-19 enfeksiyonu sebebiyle ölen hastaların %70'inde intravasküler pıhtılaşmaya yol açabilen pıhtılaşma bozuklukları görülmüştür. Bu duruma endotel hücrelerinin

doğrudan viral invazyonu veya komplement sisteminin aktivasyonu, hücre disfonksiyonu ve mikro-trombojenez yol açan trombosit aktivasyonunun yol açabileceği düşünülmektedir. Aktive olan komplement sistemi, kan damarlarının endoteline zarar verir, bu da kanın subendotelial yapılarla temasına yol açar ve doğrudan kan pıhtılaşma mekanizmasını aktive eder (Hendaus ve Jomha, 2022).

KVH'lar yaşam süresi boyunca gerçekleşme ihtimali olan ve uzun bir süre asemptomatik olarak seyredebilen kronik hastalıklardır. Semptomların görülmesi genellikle hastalığın vücuda çok fazla yayılmış olması ile ortaya çıkar. KVH uzun yıllardır dünya genelinde erken ölümlere sebep olmaktadır. 2010 yılında dünya çapında atriyal fibrolizasyonlu (AF) insan sayısının 20,9 milyon erkek ve 12,6 milyon kadın olduğu tahmin edilmiştir. AF çoğu durumda felce neden olarak ölüme sebep olmaktadır (Kasperkiewicz ve diğ., 2020). 2006'dan 2016'ya kadar olan yıllarda KVH'dan dolayı ölen insan sayısı %15 artarak 17,6 milyona ulaşmıştır. 2030 yılına kadar her yıl 23,6 milyon kişinin KVH'dan dolayı öleceği tahmin edilmektedir. Şu an da Avrupa'daki ölümlerin yaklaşık %50'si KVH kaynaklıdır (Francula-Zanninovic ve Nola, 2018; Doust ve diğ., 2020). Ayrıca KVH yalnızca ölüme sebep olmaz aynı zamanda hastada fiziksel engelliğe neden olabilmektedir. KVH kaynaklı fiziksel engel oranları 1990 yılında 85 milyon iken 2020 yılları civarında 150 milyon kişiye ulaşacağı Van Camp tarafından ileri sürülmüştür (Van Camp, 2014).

2.5.1. Primer ve Sekonder Hemostaz

Damar hasarından hemen sonra hemostaz süreci başlar. Normal hemostaz; vasküler endotel yanıt, trombosit tıkaçının oluşması ve koagülasyon olmak üzere 3 aşamada gerçekleşir. Hemostazın dengeli olarak sürdürülebilmesi için tüm bu aşamaların uyumlu çalışması gereklidir. Modern hemostaz modeli iki aşamaya ayrılmıştır. Vasküler yanıt ve trombosit tıkaçının oluşması primer (birincil) hemostaz, koagülasyon sistemi ise sekonder (ikincil) hemostaz olarak tanımlanır. Vasküler yanıt ve trombosit tıkaçın oluşum mekanizmaları günlük yaşamda oluşabilen endotel hasarlarının onarımı için yeterli iken daha şiddetli hasarlarda koagülasyon sistemine gereksinim vardır (Atalan, 2013).

Damar hasarında ilk olarak vazokonstriksiyon gerçekleşir (damarın büzülmesi) ve daha sonrasında yara, bir trombosit kümesi ile tıkanır (tıkaç). Bu trombosit tıkaç kırılğan ve geçicidir (birinci aşama). Bu yüzden trombosit kümesinin fibrin liflerinden oluşturulan bir ağ ile sağlamlaştırılması gerekir. Böylece sağlam bir pıhtı (fibrin) oluşturulur (ikinci aşama). Pıhtı,

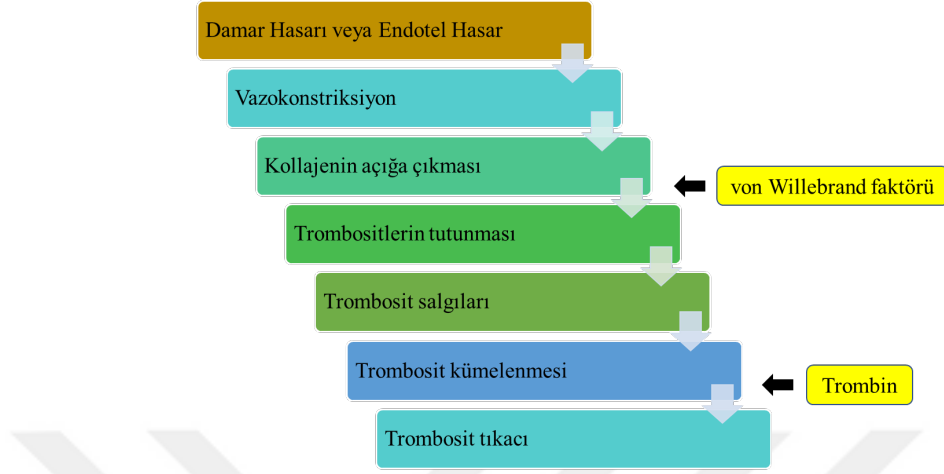
yara (damar) iyileşinceye kadar kalır ve iyileşme gerçekleştikten sonra fibrin çözülür (fibrinoliz) (Opneja ve diğ., 2019). Birinci aşama; trombosit-damar etkileşimini içeren primer hemostaz iken ikinci aşama; pıhtılaşma faktörlerini (Tablo 2.3), hasarlı hücreleri ve pıhtılaşma kademesinin hızla geliştiği trombosit yüzeylerini içeren sekonder hemostazdır (Gale, 2011).

Tablo 2.3 : Koagülasyon faktörleri ve görevleri.

Koagülasyon Faktörleri	Görevleri
Fibrinojen (Faktör I)	Fibrin (pıhtıyı oluşturur)
Protrombin (Faktör II)	Faktör I, VIII, IIa, VII, XIII, XI, V, protein C ve trombositlerin aktivasyonu yapar
Doku faktörü (Faktör III [TF])	Faktör VIIa'nın kofaktörü olarak görev alır
Kalsiyum (Faktör IV)	Koagülasyon sürecinde bulunan faktörlerin fosfolipitlere bağlanmasını gerçekleştirir
Proakselerin, labil faktör (Faktör V)	Faktör X'un kofaktörü ve protrombinaz kompleksinin oluşmasını sağlar
Prokonvertin, stabil faktör (Faktör VII)	Faktör IX ve X'un aktive edilmesini gerçekleştirir
Antihemofilik faktör-A (Faktör VIII)	Faktör IX'un kofaktörü ve tenaz kompleksinin oluşmasını sağlar
Antihemofilik faktör-B (Faktör IX)	Christmas faktörüdür. Faktör X'un aktive eder ve faktör VIII'le tenaz kompleksinin oluşumunda yer alır
Stuart-Prover faktörü (Faktör X)	Faktör II'yi aktive edilmesini sağlar ve faktör V ile protrombinaz kompleksinin oluşmasını gerçekleştirir
Plazma tromboplastini öncülü (Faktör XI)	Faktör IX'un aktive edilmesini sağlar
Hageman faktörü (Faktör XII)	Faktör XI, VII ve prekallikrein'i aktive edilmesini gerçekleştirir
Fibrini stabilize eden faktör (Faktör XIII)	Fibrin monomerlerinin fibrin polimerlerine dönüştürülmesinde görev alır
vWF (von Willebrand Faktörü)	Faktör VIII ve subendotelde bulunan kollajene bağlanır. Trombositlerin adhezyonunu gerçekleştirir
Fletcher faktörü (Prekallikrein)	Faktör XII ve prekallikrein'i aktive ederek yüksek moleküler ağırlıklı kininojenin bölünmesini gerçekleştirir
Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK)	Faktör XII, XI ve prekallikrein'in aktivasyonunda görev alır

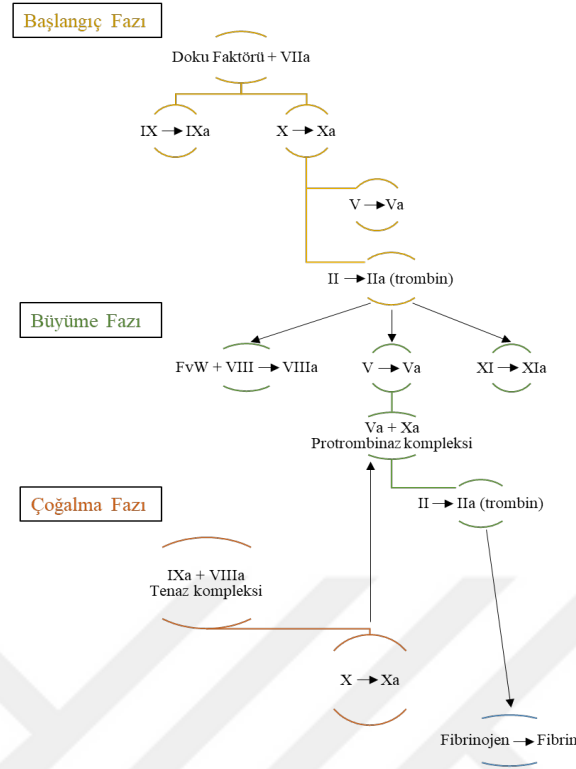
Primer hemostazın üç önemli adımı vardır. Bu adımlar; trombosit yapışması, granül salınması ve trombosit kümeleşmesidir. Kan damarının bütünlüğü bozulduğunda (endotel hasarı) vasküler hasar bölgesinde çok sayıda trombosit birikimi (hemostatik tıkaç veya trombosit tıkaçı) başlar (Şekil 2.35). Bu hemostatik tıkaç zayıf ve oldukça kararsız bir yapıdır. Bunun nedeni kan dolaşımı içinde bulunan tıkaçın, artan kan basıncı ile çözünmeye karşı oldukça dirençsiz oluşudur. Böylece ikincil hemostaz (kan pıhtılaşması olarak da bilinir) devreye girer. Basitçe söylemek gerekirse; hemostaz, trombositlerin tuğlalar olduğu ve fibrinin

harcı temsil ettiği duvara benzer. Tuğlalar olmadan duvar inşa edilemez, harç olmadan tuğla duvarı oldukça dengesizdir ve çökecektir (Lippi ve Favaloro, 2018).



Şekil 2.35: Primer hemostaz.

Sekonder hemostaz üç fazdan oluşur. Bu adımlar; başlangıç, büyüme ve çoğalma fazlarıdır. Koagülasyon sürecinin bu aşaması, endotel yaralanma bölgesinde trombosit tıkaçını güçlendirmek ve stabilize etmek için fibrin üretme kapasitesine sahip bir dizi katalitik reaksiyonu içerir (Şekil 2.36). Pıhtılaşma faktörlerinin çoğu, inaktif öncüler (yani "zimojenler") olarak sentezlenen ve protein aktivasyonunu veya bozulmasını önlemeyi, koagülasyon kademesinin modülasyonunu sağlamayı amaçlayan proteolitik enzim sınıfına aittirler. Zimojenlerin aktif enzimlere (pıhtılaşma faktörlerinin trombosit yüzeyine iyonize kalsiyumun aracılık ettiği bağlanma ile aktifleşmesi) dönüşümü bir dizi seri reaksiyonun birbirini takip etmesiyle gerçekleşir. Her zaman bir önceki enzim bir sonraki enzimi aktive eder. Enzimlerin bu şekilde birbirilerine aktive etmesine koagülasyon kaskadı denir (Lippi ve Favaloro, 2018; Atamer, 2006).



Şekil 2.36: Sekonder hemostaz.

Nihai olarak oluşan fibrin, işlevini yaptıktan sonra enzimatik reaksiyonlar ile parçalanır. Bu işleme fibrinoliz denir. Fibrinoliz daha fazla pıhtı oluşumunu önler ve hemostaz dengesini bozabilecek pıhtıların giderilmesini sağlar. İnaktif bir enzim olan plazminojen, fibrine karşı çok yüksek bir afiniteye sahiptir. Bundan dolayı fibrin oluşumunu takiben hemen onu bağlamaya başlar. Endotel hücreleri üzerinde oluşan fibrin, bu hücreler tarafından doku plazminojen aktivatörü (tPA)'nın salınımına neden olarak kendi kendine parçalanmasını tetikler. Bu adımdan sonra, tPA fibrine bağlanarak plazminojeni, plazmine dönüştürür. Plazmin, fibrinin adım adım parçalara ayrılmasını gerçekleştirir. tPA'nın etkisi, aktive olmuş trombositler ve endotelden salınan plazminojen aktivatör inhibitörleri tarafından ortadan kaldırılır (Gezer, 2012). Endotelyum üzerindeki bir diğer önemli protrombotik faktör, iltihaplı hücrelerin ve lökosit-trombosit konjugatlarının endotelyuma alınmasına izin veren büyük bir multimerik glikoprotein olan von Willebrand Faktörü (vWF)'dür. vWF'nin işlevi, trombositlerin adhezyonunu ve agregasyonunu desteklemesidir (Iba ve Levy, 2018).

Normal hemostazda genel olarak etkili olan yapılar; endotel hücreler, trombositler ve koagülasyon faktörleri şeklinde tanımlanabilir.

Trombositler, kemik iliğinde bulunan megakaryositlerin sitoplazmasından oluşurlar. Her saat yaklaşık sekiz milyar trombosit dolaşıma salınır ve 10 gün boyunca dolaşımda kalırlar. Yaklaşık 7-9 fL hacme sahiplerdir. Çekirdek, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtından yoksundurlar. Gövdeleri (γ -granüller), adenozin difosfat (ADP), serotonin ve Ca^{2+} gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşenlerin depolanma havuzudur. Aynı zamanda trombositlerde α -granüller olarak adlandırılan yapışkan proteinler, pıhtılaşma faktörleri, proteaz inhibitörleri, büyüme faktörleri, integral membran proteinleri, sitokinler ve kemokinler dahil olmak üzere çok çeşitli protein yapıları bulunur (de Groot ve diğ., 2012).

Trombosit plazma zarının, özgül glikoprotein reseptörleri ve fosfolipitler olmak üzere iki önemli bileşeni vardır. Glikoprotein reseptörleri, trombositlere agregasyon yapıcı etmenlerle, inhibitörlerle, pıhtılaşma faktörleriyle, diğer trombositlerle ve damar duvarı ile etkileşimlerinin gerçekleşmesine olanak verir. Fosfolipit yapıları prostaglandin sentezi, hücre içi kalsiyum hareketi ve prokoagülan aktivitenin trombositin dış yüzeyinde oluşması ve konaklaması açısından önem teşkil etmektedir (Atamer, 2006).

2.5.2. Hemostazın Fazları

Genel olarak hemostaz 4 fazda gerçekleşir. Bunlar; vasküler faz, trombosit fazı, koagülasyon fazı ve pıhtının eritilmesidir (LaPelusa ve Dave, 2022).

2.5.2.1. Vasküler Faz (Vazokonstriksiyon)

Damar büzülmesinin ve daralmasının gerçekleştiği fazdır (Yau ve diğ., 2015).

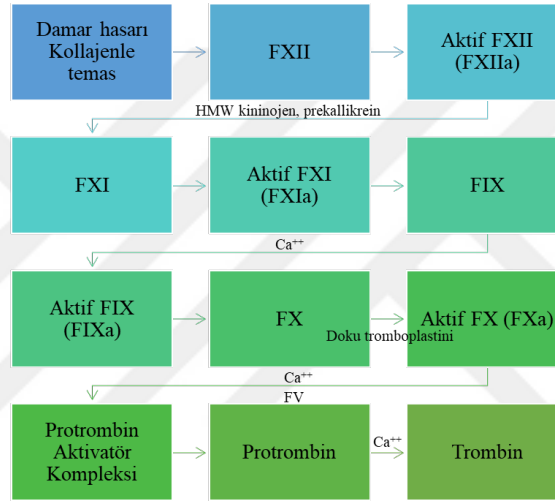
2.5.2.2. Trombosit Fazı (Adhezyon, Aktivasyon: Sekresyon ve Agregasyon)

Damarın hasar almasıyla, açığa çıkmış kollajen, trombositleri aktive eder. Trombositler yaraya (kollajene) yapışır ve salgıları aracılığıyla daha fazla sayıda trombosit çekerek trombosit tıkaçı oluşturur. Hasarlı endotel ve endotel altındaki bağ dokusundan, vWF salgılanır ve bu faktör hem trombositlere hem de yaradaki kollajene bağlanır (Yau ve diğ., 2015).

2.5.2.3. Koagülasyon Fazı (İntrinsik, Ekstrinsik ve Ortak yol)

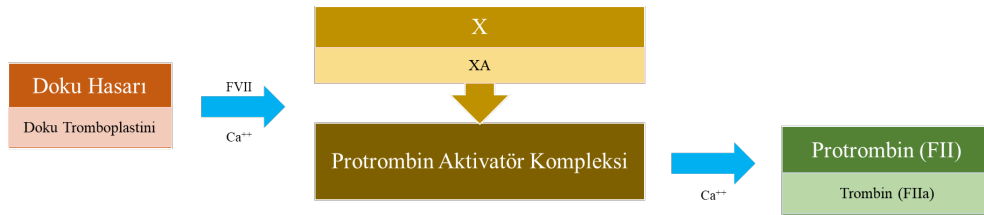
Hassas ve geçici olan trombosit tıkaçı, fibrin liflerinin ağ şeklinde birbiri ile bağlanmasıyla sağlamlaştırılır (pıhtı). Koagülasyon sürecini başlatan iki yol vardır. Bunlardan birincisi; yarada açığa çıkan kollajen (intrinsik yolu) ve ikincisi; yaradan salgılanan doku faktörü ([TF], ekstrinsik yolu)'dür. Bu iki yol daha sonradan birleşerek ortak yol olarak devam eder (Versteeg ve diğ., 2013).

İntrinsik yol, kanda dolaşan faktörler sonucunda koagülasyonun başlamasıdır. Damar yaralanınca, subendotel dokudaki (yaradaki) kollajene yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK) yapışır. HMWK'ya da prekallikrein bağlanır. Bu oluşan kompleks sayesinde prekallikrein aktive olur, kallikreine dönüşür. Bu da FXII'yi (Hageman Faktör) aktive eder (FXIIa). FXIIa, FXI'i aktive eder. FXIa, FIX'u aktive eder ve FVIIIa ile birleşir. Buna tenaz kompleksi denir (-ten: on, -az: enzim [FX'u kırpan enzim]). Tenaz kompleks (IXa + VIIIa), FX'u aktive eder (Xa'ya dönüştürür). Faktör X ve sonrası ortak yoldur. Pıhtı oluşumunda intrinsik yolun fonksiyonu daha az önemlidir. Bu yüzden bu yoldaki faktörlerin eksikliği ciddi kanama sorunlarına neden olmaz (Şekil 2.37) (Chaudhry ve diğ., 2022).



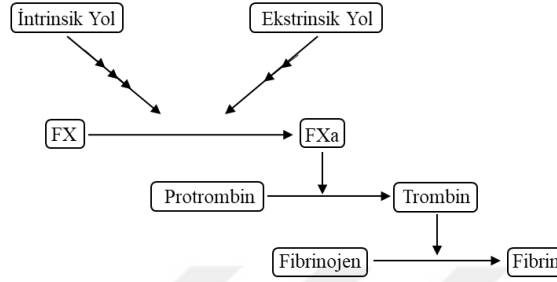
Şekil 2.37: İntrinsik yolun pıhtılaşma mekanizması.

Ekstrinsik yol, doku faktörünün (TF, FIII) koagülasyon sürecini başlatmasıdır. Damar yaralanınca, yaradaki fibroblast ve lökositlerin salgıladığı doku faktörüne (TF; FIII), faktör VIIa bağlanarak bir kompleks oluşturur (III + VIIa veya TF + VIIa). TF + VIIa kompleksi, FX'u aktive eder. Faktör X ve sonrası ortak yoldur. Pıhtı oluşumunda ekstrinsik yolun fonksiyonu daha önemlidir. Bu yüzden bu yoldaki faktörlerin eksikliği ciddi kanama sorunlarına sebep olur (Şekil 2.38) (Smith ve diğ., 2015).



Şekil 2.38: Ekstrinsik yolun pıhtılaşma mekanizması.

Ortak yol, intrinsik ve ekstrinsik yolla aktive olan FX'un FVa ile birleşmesiyle başlar. FXa + FVa kompleksine protrombinaz kompleksi denir. Bu kompleks, protrombini trombine dönüştüren yapıdır. Trombin, fibrinojeni fibrine dönüştürür. FXIII (fibrin stabilize edici faktör), fibrin liflerini (monomerlerini) birbirine bağlar (fibrin polimer) ve pıhtıyı sağlamlaştırır. Sağlam pıhtı yara iyileşinceye kadar kalır (Şekil 2.39) (Chaudhry ve diğ., 2022).



Şekil 2.39: Fibrin oluşumunun son basamakları (Ortak yol).

Koagülasyon kaskatında bulunan faktörlerini ve görevlerini tanımlarsak;

2.5.2.4. Pıhtının Çözülmesi (Epitelizasyon ve Fibrinoliz)

Pıhtının giderek küçülmesi ve sonunda tamamen giderildiği fazdır (Bridge ve diğ., 2014).

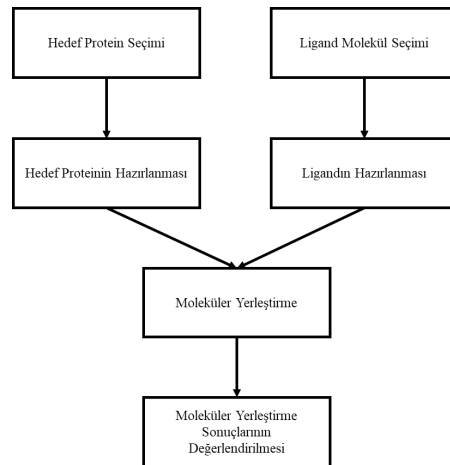
2.6. HESAPSAL ÇALIŞMALARIN İLAÇ KEŞFİNDEKİ ÖNEMİ

Makromoleküllerin metabolik yollarda kritik önemlere sahip olmaları, onları potansiyel terapötik hedefler haline getirmiştir. Bu sebepten dolayı bu yapıların, 3 boyutlu görüntülenmeleri, etkileşim türlerinin belirlenmesi ve kuvvetlerinin aydınlatılması yapı-temelli ilaç tasarımı ve keşfi için kritik role sahiptir (Sousa ve diğ., 2006).

İlaçların ve ilaç adayı moleküllerin sentezlenmesi, toksisitelerinin düşük olması, yüksek biyoverimliliğe ve uygun maliyete sahip olmaları gibi birçok zorlukları vardır. Her bir bileşiğin hedef yapıyla deneysel ve hayvansal çalışmalarının yapılması mümkün değildir. Bu sebepten dolayı deneysel ve hayvansal çalışmalardan önce moleküllerin *in silico* özellikleri belirlenir ve ilaç olarak uygunlukları kontrol edilir (Muhammed ve Aki-Yalcin, 2022). Hesapsal çalışmalar ilaç tasarımında ve geliştirilmesinde maliyeti, zamanı ve iş yükünü azaltır. Bilgisayar-destekli olan bu çalışmaların, moleküler yerleştirme uygulamaları ile yapı-aktivite araştırmalarını, bileşik optimizasyonunu, sanal tarama ile potansiyel ilaç adaylarının keşfedilmesini ve mutajenez çalışmalarını kolaylaştırmak gibi çok çeşitli kullanım alanları mevcuttur. Ticari

olarak kullanılan imatinib (kronik miyelojen lösemi tedavisinde), zanamir (influenza A ve B virüslerinin tedavi edilmesinde), nelfinavir (HIV ve AIDS tedavisinde) ve erdafitinib (kanser tedavisinde) gibi ilaçlar bilgisayar-destekli hesapsal çalışmalar ile geliştirilmişlerdir (Stanzione ve diğ., 2021).

Moleküler docking (moleküler yerleştirme, doklama, doking), iki veya daha fazla bileşenin (protein ve ligand yapıları), moleküller arası kompleks yapının nasıl olduğunu ve etkileşimlerini tahmin eden hesapsal bir çalışmadır (*in silico*) (Şekil 2.40). 1980'lerin başında ilaç keşfindeki kritik rolü fark edildikten sonra önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Özellikle hesapsal kimya çalışmaları ile yapılan moleküler yerleştirme, protein-ligand etkileşimlerinin incelenmesi ve tahminlerin yürütülmesinde sıkça tercih edilen bir yöntem olmuştur. Moleküler yerleştirme sonucunda ligandların, proteinlerin (veya enzimlerin) aktif bölgesinde veya herhangi bir alanında farklı konformasyonlar ve bağlanma enerjileri ile bulunabilecekleri gösterilir (Sousa ve diğ., 2006). Moleküler yerleştirme küçük moleküller (ligand) ile makromoleküller (protein) arasında atomik düzeyde bir modelleme aracı olarak kullanılır. Bu yaklaşım hedef proteinlerin bağlanma bölgelerinde ligandlar ile etkileşimlerinin ve davranışlarının değerlendirilmesinin yanı sıra temel biyokimyasal süreçlerin ve mekanizmaların aydınlatılmasında sıklıkla kullanılır. Doking yöntemi temel olarak iki adım içermektedir. Birinci adım; ligand molekülünün, protein bağlanma bölgesindeki konformasyonu, pozisyonu ve oryantasyonunun tahmini, ikinci adım; ligand molekülünün, proteinle bağlanma afinitesinin hesaplanmasıdır. Protein yapısının bağlanma bölgesinin lokasyonunu daha önceden belirlenmesi moleküler yerleştirme sonucunun daha verimli olmasını artırır (Meng ve diğ., 2011).



Şekil 2.40: Moleküler yerleştirme sürecinin şematik hali.

3. YÖNTEM

3.1. DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada; buzdolabı (Arçelik), çalkalayıcı su banyosu (Memmert WB 14 Çalkalayıcı), derin dondurucular (New-Brunswick Scientific -76 °C, Beko -20 °C), distile su cihazı (Brand MonoDest 3000), etüv (Memmert UNB 500), pH metre (Hanna pH/ORPvMeter HI 2211), sonikatör (Bandelin Sonorex), spektrofotometre (Shimadzu UV- Vis 1240, Shidmadzu Cop. 03462), mikrolaka okuyucu (BioTek ELx808 Absorbance Microplate Reader), terazi (Radwag XA 60/220/X Hassas terazi), terazi (Radwag XA AS 220/C/2 Hassas terazi), vakum etüvü (Binder ED23), ince tabaka kromatografisi (Merck, 105554) ve vorteks (Fisons Whirlimixer) gibi standart laboratuvar cihazları kullanıldı.

3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

α -Glukozidaz enzimi (Sigma, G5003), 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozit (Sigma N1377), üreaz (Jack Bean, Sigma 94280), üre (Riedel de Häen 15604), potasyum dihidrojen fosfat (Merck 105101), potasyum fosfat (Riedel de Häen 04243), sekonder dipotasyum hidrojen fosfat (Merck A116773847), sekonder sodyum fosfat (Merck 106586), sodyum dihidrojen fosfat (Fluka 71642), sodyum hidroksit (Merck 106482), sodyum klorür (Merck 106404), α -amilaz enzimi (Fluka 10080), 3,5-dinitrosalisik asit (Fluka 42260), kuarsetin (Fluka 83370), akarboz (Sigma A8980), dimetil sülfoksit (Merck 102952), 2,4-dihidroksibenzaldehit (Sigma 168637), 4-metoksifenilasetik asit (ABCR AB108942), 4-nitrofenilasetik asit (Sigma N20204), 4-bifenilasetik asit (Alfa Aesar A11749), 4-N,N-dimetilaminofenilasetik asit (Sigma 374032), 4-bromofenilasetik asit (ABCR AB109939), susuz sodyum asetat (TCI S0559), lityum hidroksit (Acros 379180025), tetrahidrofuran (Sigma 87368), metanol (Merck 106008), hidroklorik asit (Carlo Erba 403872), 4-nitroftalonitril (Sigma 330590), dimetilformamid (Merck 103053), potasyum karbonat (Sigma 209619), diklorometan (Merck 106050), petrol eteri (Merck 100909), silika jel (Merck 107734), p-tolilasetik asit (TCI T0882), p-florofenilasetik asit (TCI F0206), ince tabaka kromatografisi (Merck 105554), asetik anhidrit (Acros 149490010), kloroform (Merck 102445), aseton (Carlo Erba 301506), fenilasetik asit (Sigma 8.20993), sodyum nitroprussiyat (Riedel de Häen 31444), fenol (Merck 5559), tiyoüre (BDH-Chemicals),

nişasta (Merck 1253), potasyum sodyum tartarat tetrahidrat (Merck 108087) gibi kimyasal maddeler kullanıldı.

3.3. DENEYSEL TASARIM

Bu çalışmada ilk olarak 8 farklı kumarin türevleri Perkin reaksiyonuyla sentezlendi. Elde edilen kumarinler, 4-nitroftalonitril bileşiği kullanılarak nükleofilik aromatik süstitüsyon reaksiyonu ile 8 farklı kumarin-ftalonitril türevi sentezlendi. Kumarin-ftalonitril türevleri kolon kromatografisi ve kristalizasyon yöntemleri ile saflaştırılıp ¹H NMR ve Infrared spektroskopisi (FT-IR) analizleri ile yapı aydınlatma çalışmaları gerçekleştirildi. 4-[7-Oksi-3-fenilkumarin]ftalonitril (K1), 4-[7-oksi-3-(4-nitrofenil)kumarin]ftalonitril (K4), 4-[7-oksi-3-(4-dimetilaminofenil)kumarin]ftalonitril (K6), 4-[7-oksi-3-(4-florofenil)kumarin]ftalonitril (K7), 4-[7-oksi-3-(4-bromofenil)-kumarin]ftalonitril (K8) bileşikleri daha önce sentezlenmemiş olup bu tez kapsamında literatüre ilk kez kazandırılacaklardır. Ayrıca 8 farklı kumarin-ftalonitril türevi bileşiklerimizin α -glukozidaz, α -amilaz, üreaz enzimlerine karşı olan aktiviteleri ve tromboplastik sürece olan etkilerinin daha önce araştırılmamış ve ilk kez tez kapsamında incelenecek olması onları bu alanlarda özgün çalışmalar yapmaktadır.

Kumarin-ftalonitril türevlerinin α -glukozidaz, α -amilaz ve üreaz enzimleri üzerine etkileri hem *in silico* (moleküler yerleştirme, moleküler doking) hem de *in vitro* çalışmalarla belirlendi. Kumarin-ftalonitril türevlerinin tromboplastik aktiviteleri ise *in vitro* olarak çalışıldı.

Çalışmamızın *in silico* kısmında kumarin-ftalonitril türevlerimizin moleküler yerleştirme yöntemiyle α -glukozidaz, α -amilaz ve üreaz enzimlerine bağlanma enerjileri, ligand verimliliği değerleri ve amino asit etkileşimleri tespit edildi. Bu kumarin-ftalonitril türevlerinin farmasötik olarak da uygunluğu ve ilaç olarak kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla bileşiklerin Emilim, Dağılım, Metabolizma ve Atılım (ADME) özellikleri ve Lipinski'nin 5 kuralına uyumluluğu araştırıldı.

Çalışmamızın *in vitro* kısmında ise kumarin-ftalonitril türevlerimizin α -amilaz, α -glukozidaz, üreaz enzimleri için inhibitör potansiyelleri ile tromboplastik aktivite üzerine etkileri belirlendi. Bu ölçümlerde kumarin-ftalonitril türevlerinin farklı konsantrasyonlarında enzimlerin aktivitesini %50 inhibe eden inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) bulundu.

3.4. BİLEŞİKLERİN ADME ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER YERLEŞTİRME ÇALIŞMALARININ YAPILMASI

Kumarin-ftalonitril türevlerinin ADME özelliklerinin incelenmesinde SwissADME online programından yararlanıldı (Swiss Institute of Bioinformatics).

Bu çalışmada doking işlemleri için Scripps Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiş AutoDock, AutoDock Vina ve AutoDockTools programları (The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory, La Jolla, CA, USA) kullanıldı. Doking işlemleri; kumarin-ftalonitril bileşiklerinin (ligand) dosyalarının hazırlanması, enzim dosyalarının hazırlanması ve doking işleminin gerçekleştirilmesi olmak üzere adım adım yapıldı.

Doking işlemi sonucunda, bileşiklerin enzimlerin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları ile etkileşimleri, Discovery Studio 2021 Client (BIOVIA, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak belirlendi.

3.4.1. Kumarin-Ftalonitril Türevlerinin Doking İşlemine Hazırlanması

Ligand yapıları Avogadro programı kullanılarak en düşük enerjili geometrileri elde edildi (Hanwell ve diğ., 2012). Optimize edilen kumarin yapıları AutoDock yazılımında uygun dosya biçiminde okundu. Her bir bileşik için AutoDockTools yardımıyla ligandların kökleri (roots) tespit edildi ve dönebilen (rotatable) bağları tanımlandı (Morris ve diğ., 2009). Doking işlemine hazır hale getirilen kumarin-ftalonitril türevleri “.pdbqt” formatında kaydedildi.

3.4.2. Enzim Dosyalarının Hazırlanması

Protein Data Bank (PDB) ağ sunucusundan (<https://www.rcsb.org>) α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz enzimlerinin aydınlatılmış X-ışını kristal yapıları incelendi. α -Amilaz, α -glukozidaz ve üreaz enzimlerinin kristal yapıları sırasıyla; PDB ID: 4W93 (çözünürlük 1.35 Å) (Williams ve diğ., 2015), PDB ID: 3A4A (1.60 Å) (Yamamoto ve diğ., 2010) ve PDB ID: 3LA4 (çözünürlük 2.05 Å) (Balasubramanian ve Ponnuraj, 2010) olarak seçildi. Bu enzim yapıları “.pdb” formatında indirildi. Kristal yapıları, Discovery Studio 2021 Client programı kullanılarak açıldı ve bütün hetero atomlar (su molekülleri, inhibitör ve substrat gibi yapılar) silinerek boş enzim “.pdb” formatında kaydedildi. Bu dosya AutoDockTools programında açılarak polar hidrojen ile non-polar hidrojen atomları eklendi. Yapılara Kollman birleşik-atom modeli (Sengupta ve diğ., 2012) uygulanarak doking işlemine hazır hale getirildi ve “.pdbqt” formatında kaydedildi.

3.4.3. Doking Çalışması

Moleküler yerleştirme yapılacak α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz enzimlerinin aktif bölgelerinin -x, -y, -z boyutları ve koordinatları (gridbox) sırasıyla; 50 x 50 x 50 ve -8.367, 6.395, -17.841 (Williams ve diğ., 2015), 40 x 40 x 40 ve 12.583, -7.2896, 12.519 (Zhang ve diğ., 2021) ve 60 x 60 x 60 ve -43.931, -43.497, 77.423 (Talebi ve diğ., 2021; Çapan, 2022) olarak belirlendi. Konfigürasyon dosyası (doking çalışması için optimize edilen enzim ve ligand dosyaları) da hazırlandıktan sonra komut istemi verildi ve AutoDock Vina programı kullanılarak docking işlemi yapıldı (Trott ve Olson, 2010).

Moleküler yerleştirmenin sonuçlanmasının ardından kumarin-ftalonitril türevlerinin enzimlerin aktif bölgelerinde olası bulunabilecekleri konformasyonları ve bağlanma enerjilerini içeren “.txt” formatında bir log dosyası program tarafından oluşturuldu. Doking çalışmaları en az 3 kez tekrarlandı ve her bir kumarin türevi için enzimlere en kararlı bağlanan konformasyonlar seçilerek Discovery Studio 2021 Client programı ile amino asit etkileşimleri incelendi.

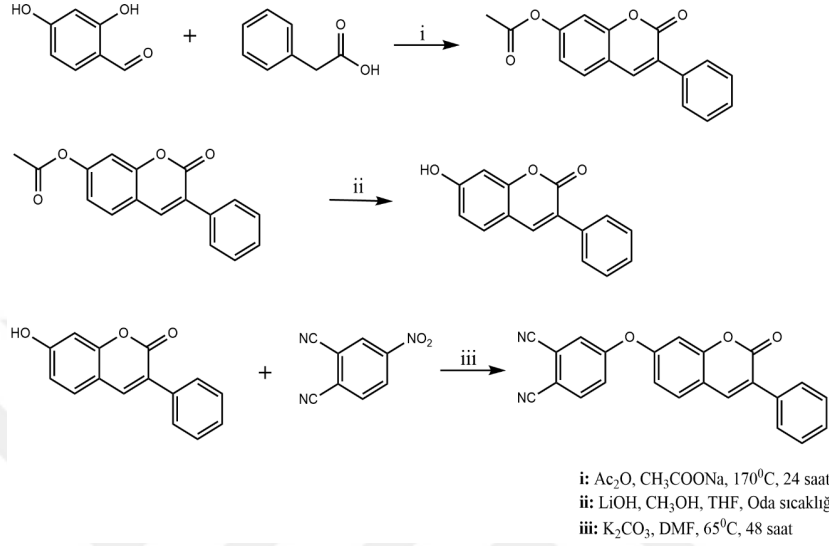
AutoDock Vina programının validasyonu, enzimlerin kristal yapılarında içerisinde gömülü olarak bulunan substratların enzimlerine dokinglerin yapılması ile elde edilen konformasyonlarının X-ray yapısından sapması (Root Mean Square Deviation, RMSD) incelenerek gerçekleştirildi. Doking işleminin ardından konformasyonların kristal yapı pozisyonları ile üst üste çakıştırılarak hata payı incelendi.

3.5. KUMARİN-FTALONİTRİL TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

3.5.1. 4-[7-Oksi-3-fenilkumarin]ftalonitril Sentezi (K1)

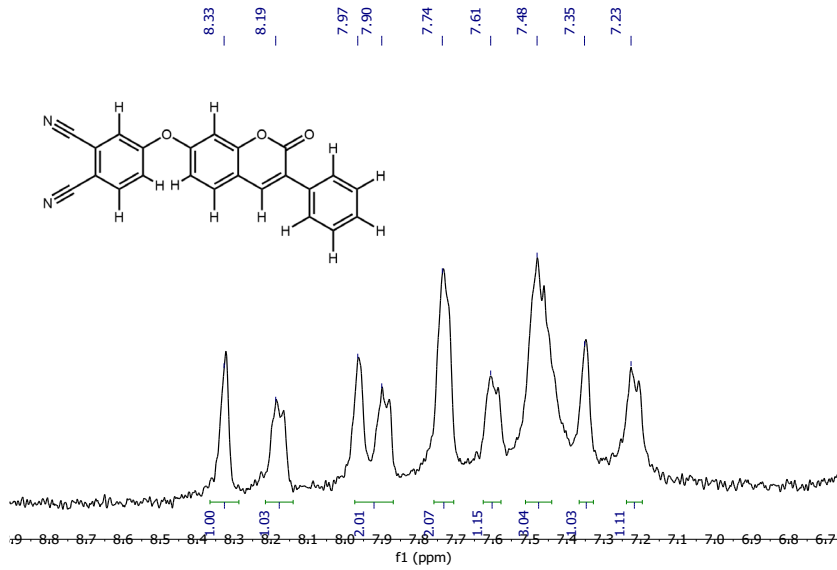
Perkin reaksiyonuna göre; 2,4-dihidroksibenzaldehit ve fenilasetik asit karışımı, susuz sodyum asetat (CH_3COONa) ve asetik anhidrit (Ac_2O) ile 160-170 °C’de 24 saat boyunca karıştırılarak ısıtıldı. 24 saat sonra reaksiyon ince tabaka kromatografisi (TLC) ile kontrol edildi ve buzlu suya çöktürülerek sonlandırıldı. Çöken ham ürün süzgeç kağıdıyla süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Ham ürün, lityum hidroksit (LiOH) ve tetrahidrofuran (THF)/metanol (CH_3OH) varlığında oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak deasetilleme işlemi gerçekleştirildi ve asidik suya çöktürülüp süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen 7-hidroksi-3-fenilkumarin, 4-nitroftalonitril ile birlikte dimetilformamid (DMF) içerisinde çözüldü ve üzerine yavaş yavaş potasyum karbonat (K_2CO_3) ilave edildi. Ekleme işlemi bittikten sonra

reaksiyon 48 saat boyunca 65 °C’de karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı ve asidik suya çöktürüldü. Oluşan ürün süzüldü ve vakum etüvünde kurutuldu. Tüm ürünler kolon kromatografisiyle kloroform veya diklorometan solventi kullanılarak temizlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: K1 bileşiğinin sentez reaksiyonu.

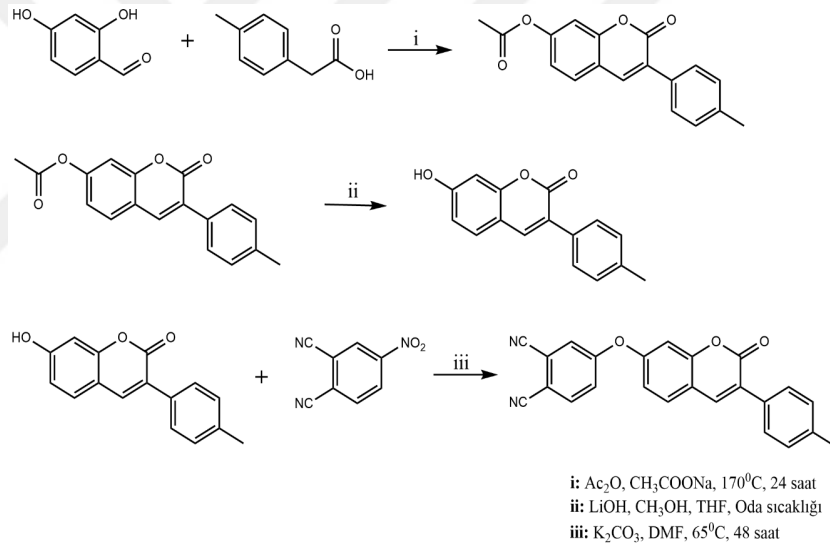
FT-IR (ATR, ν_{max} , cm^{-1}), 3075 (Aromatik-CH), 2928,2853 (Alifatik-CH), 2232 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1714 ($\text{C}=\text{O}$), 1611-1594 (Aromatik- $\text{C}=\text{C}$). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.33 (s, 1H), 8.19 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 26.0$ Hz, 2H), 7.74 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 7.35 (s, 1H), 7.23 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: K1 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

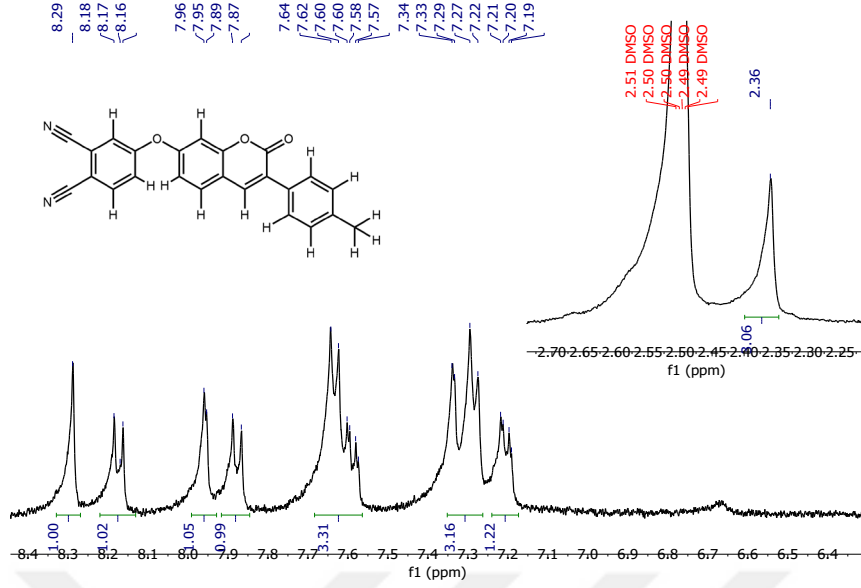
3.5.2. 4-[7-Oksi-3-(p-tolil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K2)

Perkin reaksiyonuna göre; 2,4-dihidroksibenzaldehit ve p-tolilasetik asit karışımı, susuz CH_3COONa ve Ac_2O ile 160-170 °C'de 24 saat boyunca karıştırılarak ısıtıldı. 24 saat sonra reaksiyon TLC ile kontrol edildi ve buzlu suya çöktürülerek sonlandırıldı. Çöken ham ürün süzgeç kağıdıyla süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Ham ürün, LiOH ve $\text{THF}/\text{CH}_3\text{OH}$ varlığında oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak deasetilleme işlemi gerçekleştirildi ve asidik suya çöktürülüp süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen 7-hidroksi-3-(p-tolil)kumarin, 4-nitroftalonitril ile birlikte DMF içerisinde çözüldü ve üzerine yavaş yavaş K_2CO_3 ilave edildi. Ekleme işlemi bittikten sonra reaksiyon 48 saat boyunca 65 °C'de karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı ve asidik suya çöktürüldü. Oluşan ürün süzüldü ve vakum etüvünde kurutuldu. Tüm ürünler kolon kromatografisiyle kloroform veya diklorometan solventi kullanılarak temizlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: K2 bileşiğinin sentez reaksiyonu.

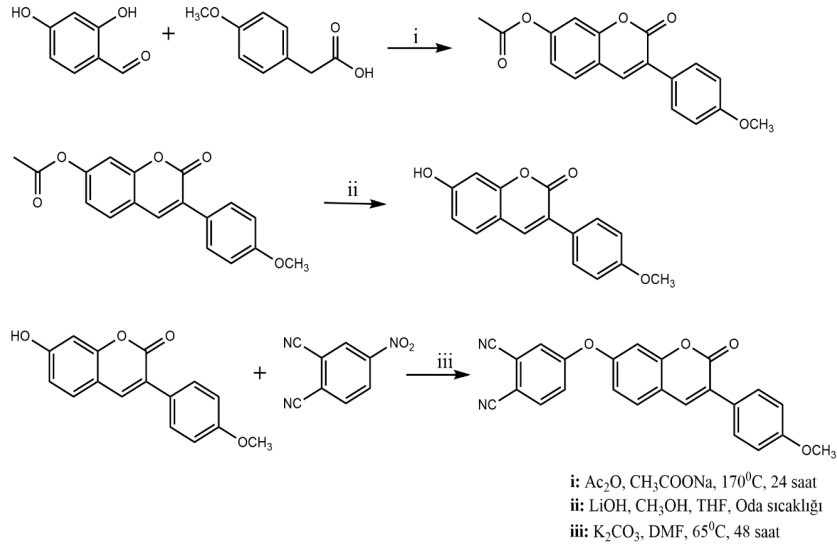
FT-IR (ATR, ν_{max} , cm^{-1}), 3048 (Aromatik-CH), 2920,2853 (Alifatik-CH), 2232 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1725 ($\text{C}=\text{O}$), 1616-1592 (Aromatik- $\text{C}=\text{C}$). ^1H -NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.29 (s, 1H), 8.18 (dd, $J = 12.1, 5.9$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.68 – 7.57 (m, 3H), 7.31 (dd, $J = 20.6, 5.3$ Hz, 3H), 7.21 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.36 (s, 3H) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: K2 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

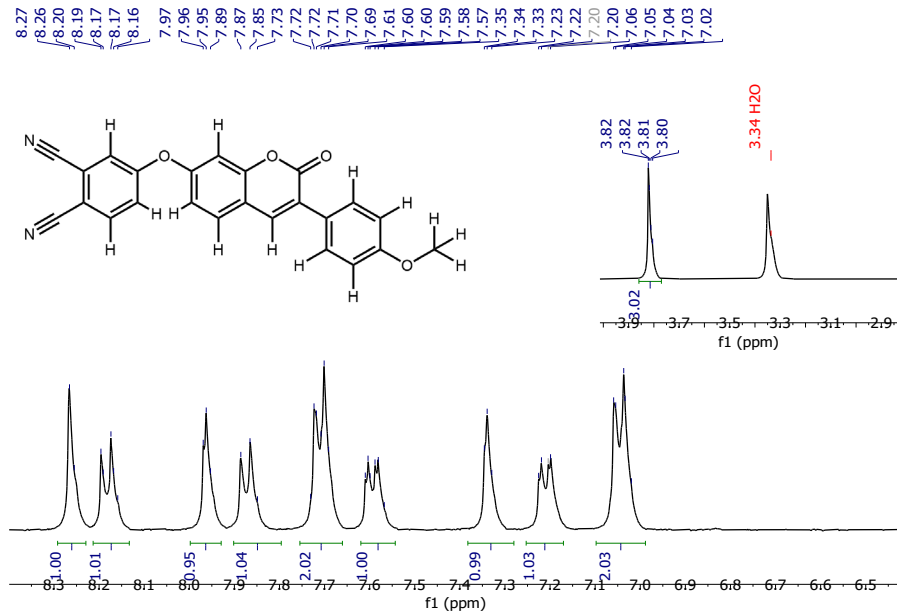
3.5.3. 4-[7-Oksi-3-(4-metoksifenil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K3)

Perkin reaksiyonuna göre; 2,4-dihidroksibenzaldehit ve p-metoksifenilasetik asit karışımı, susuz CH₃COONa ve Ac₂O ile 160-170 °C’de 24 saat boyunca karıştırılarak ısıtıldı. 24 saat sonra reaksiyon TLC ile kontrol edildi ve buzlu suya çöktürülerek sonlandırıldı. Çöken ham ürün süzgeç kağıdıyla süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Ham ürün, LiOH ve THF/CH₃OH varlığında oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak deasetilleme işlemi gerçekleştirildi ve asidik suya çöktürülüp süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen 7-hidroksi-3-(4-metoksifenil)kumarin, 4-nitroftalonitril ile birlikte DMF içerisinde çözüldü ve üzerine yavaş yavaş K₂CO₃ ilave edildi. Ekleme işlemi bittikten sonra reaksiyon 48 saat boyunca 65 °C’de karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı ve asidik suya çöktürüldü. Oluşan ürün süzüldü ve vakum etüvünde kurutuldu. Tüm ürünler kolon kromatografisiyle kloroform veya diklorometan solventi kullanılarak temizlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: K3 bileşiğinin sentez reaksiyonu.

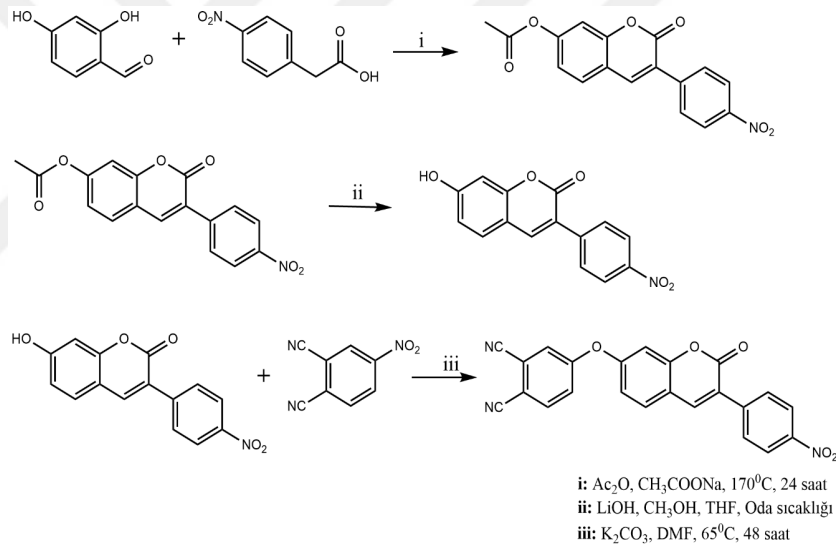
FT-IR (ATR, ν_{max} , cm^{-1}), 3081 (Aromatik-CH), 2925,2852 (Alifatik-CH), 2230 ($-\text{C}\equiv\text{N}$), 1721 ($-\text{C}=\text{O}$), 1615-1594 (Aromatik- $\text{C}=\text{C}$), 1244 ($\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$). ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.26 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J = 8.9, 2.7$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.82 (s, 1H) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: K3 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.

3.5.4. 4-[7-Oksi-3-(4-nitrofenil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K4)

Perkin reaksiyonuna göre; 2,4-dihidroksibenzaldehit ve p-nitrofenilasetik asit karışımı, susuz CH_3COONa ve Ac_2O ile 160-170 °C’de 24 saat boyunca karıştırılarak ısıtıldı. 24 saat sonra reaksiyon TLC ile kontrol edildi ve buzlu suya çöktürülerek sonlandırıldı. Çöken ham ürün süzgeç kağıdıyla süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Ham ürün, LiOH ve $\text{THF}/\text{CH}_3\text{OH}$ varlığında oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak deasetilleme işlemi gerçekleştirildi ve asidik suya çöktürülüp süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen 7-hidroksi-3-(4-nitrofenil)kumarin, 4-nitroftalonitril ile birlikte DMF içerisinde çözüldü ve üzerine yavaş yavaş K_2CO_3 ilave edildi. Ekleme işlemi bittikten sonra reaksiyon 48 saat boyunca 65 °C’de karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı ve asidik suya çöktürüldü. Oluşan ürün süzüldü ve vakum etüvünde kurutuldu. Tüm ürünler kolon kromatografisiyle kloroform veya diklorometan solventi kullanılarak temizlendi (Şekil 3.7).



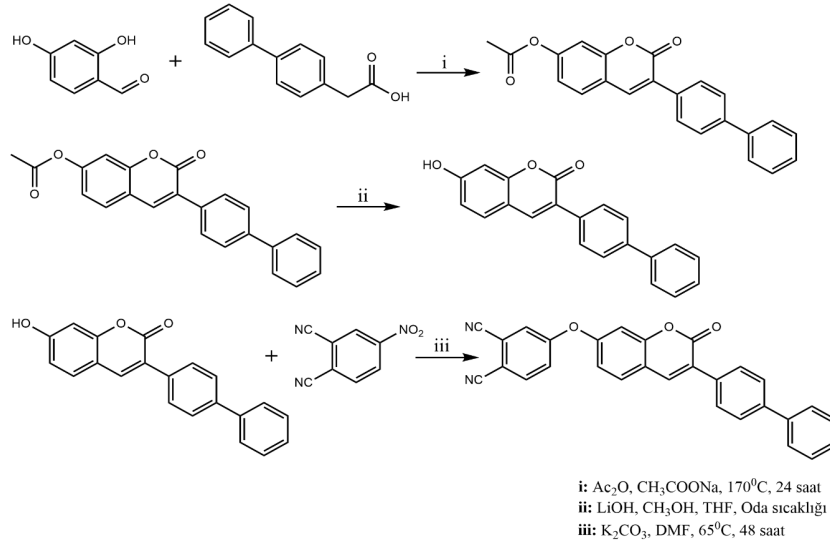
Şekil 3.7: K4 bileşiğinin sentez reaksiyonu.

FT-IR (ATR, ν_{max} , cm^{-1}), 3077 (Aromatik-CH), 2930,2851 (Alifatik-CH), 2231 ($-\text{C}\equiv\text{N}$), 1729 ($-\text{C}=\text{O}$), 1619-1592 (Aromatik- $\text{C}=\text{C}$), 1562, 1348 ($-\text{NO}_2$). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.53 (s, 1H), 8.34 (dd, $J = 9.3, 2.2$ Hz, 2H), 8.19 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.07 – 8.00 (m, 2H), 7.98 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.24 (dd, $J = 8.6, 2.5$ Hz, 1H) (Şekil 3.8).

Şekil 3.8: K4 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.

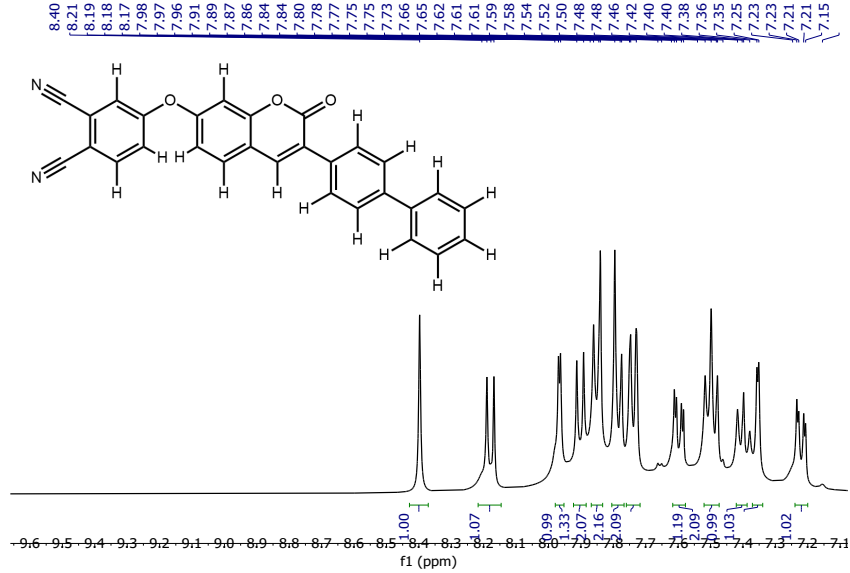
3.5.5. 4-[7-Oksi-3-(bifenil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K5)

Perkin reaksiyonuna göre; 2,4-dihidroksibenzoaldehit ve p-bifenilasetik asit karışımı, susuz CH_3COONa ve Ac_2O ile 160-170 °C'de 24 saat boyunca karıştırılarak ısıtıldı. 24 saat sonra reaksiyon TLC ile kontrol edildi ve buzlu suya çöktürülerek sonlandırıldı. Çöken ham ürün süzgeç kağıdıyla süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Ham ürün, LiOH ve THF/ CH_3OH varlığında oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak deasetilleme işlemi gerçekleştirildi ve asidik suya çöktürülüp süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen 7-hidroksi-3-(bifenil)kumarin, 4-nitroftalonitril ile birlikte DMF içerisinde çözüldü ve üzerine yavaş yavaş K_2CO_3 ilave edildi. Ekleme işlemi bittikten sonra reaksiyon 48 saat boyunca 65 °C'de karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı ve asidik suya çöktürüldü. Oluşan ürün süzüldü ve vakum etüvünde kurutuldu. Tüm ürünler kolon kromatografisiyle kloroform veya diklorometan solventi kullanılarak temizlendi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: K5 bileşiğinin sentez reaksiyonu.

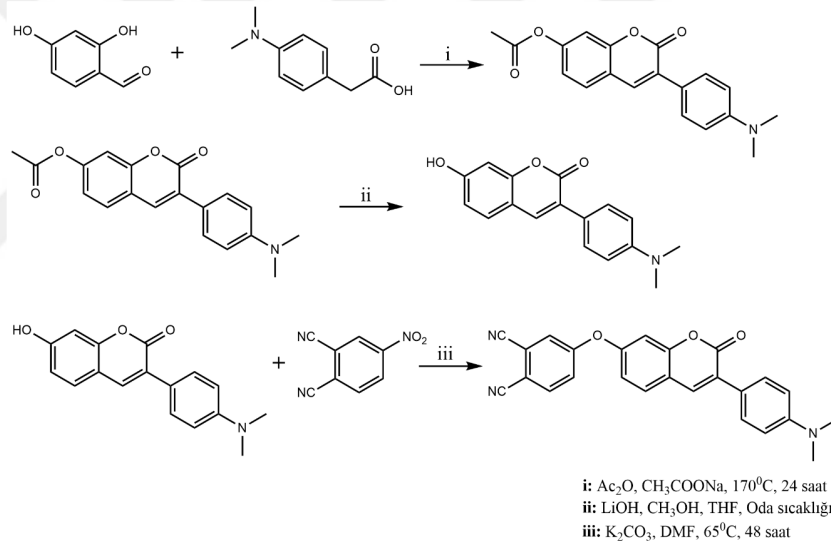
FT-IR (ATR, ν_{max} , cm^{-1}), 3086 (Aromatik-CH), 2927,2853 (Alifatik-CH), 2233 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1721 ($\text{C}=\text{O}$), 1616-1595 (Aromatik- $\text{C}=\text{C}$). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.40 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.74 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.60 (dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 7.50 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.22 (dd, $J = 8.5, 2.4$ Hz, 1H) (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: K5 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

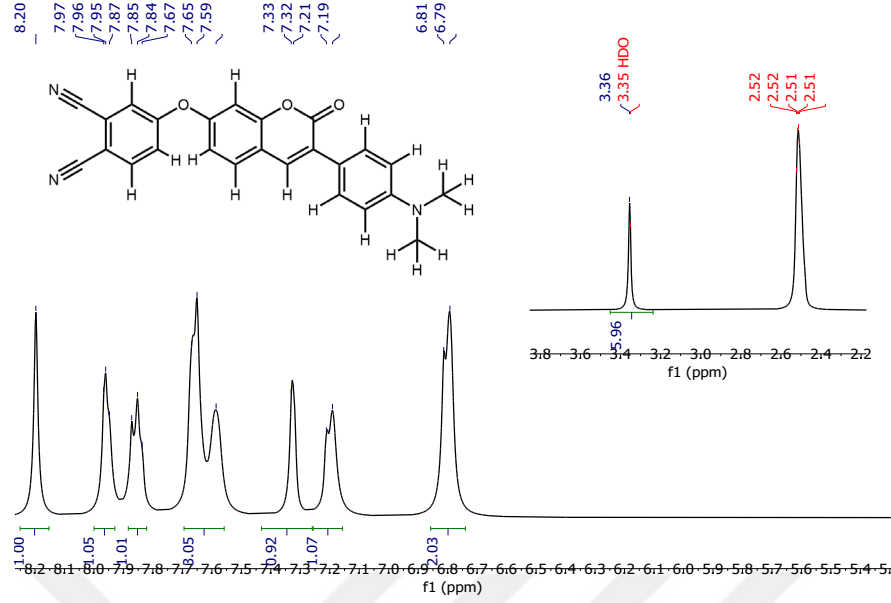
3.5.6. 4-[7-Oksi-3-(4-dimetilaminofenil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K6)

Perkin reaksiyonuna göre; 2,4-dihidroksibenzaldehit ve 4-N,N-dimetilaminofenilasetik asit karışımı, susuz CH_3COONa ve Ac_2O ile 160-170 °C'de 24 saat boyunca karıştırılarak ısıtıldı. 24 saat sonra reaksiyon TLC ile kontrol edildi ve buzlu suya çöktürülerek sonlandırıldı. Çöken ham ürün süzgeç kağıdıyla süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Ham ürün, LiOH ve THF/ CH_3OH varlığında oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak deasetilleme işlemi gerçekleştirildi ve asidik suya çöktürülüp süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen 7-hidroksi-3-(4-dimetilaminofenil)kumarin, 4-nitroftalonitril ile birlikte DMF içerisinde çözüldü ve üzerine yavaş yavaş K_2CO_3 ilave edildi. Ekleme işlemi bittikten sonra reaksiyon 48 saat boyunca 65 °C'de karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı ve asidik suya çöktürüldü. Oluşan ürün süzüldü ve vakum etüvünde kurutuldu. Tüm ürünler kolon kromatografisiyle kloroform veya diklorometan solventi kullanılarak temizlendi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: K6 bileşiğinin sentez reaksiyonu.

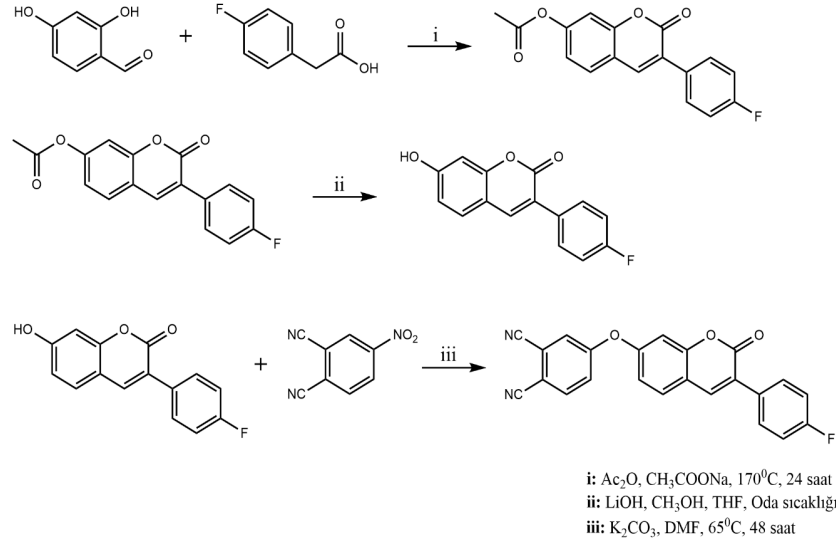
FT-IR (ATR, ν_{max} , cm^{-1}), 3071 (Aromatik-CH), 2923,2851 (Alifatik-CH), 2231 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1703 ($\text{C}=\text{O}$), 1615-1593 (Aromatik- $\text{C}=\text{C}$), 1281 ($\text{C}-\text{N}$). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.20 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.69 – 7.56 (m, 3H), 7.33 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.36 (s, 6H) (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: K6 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

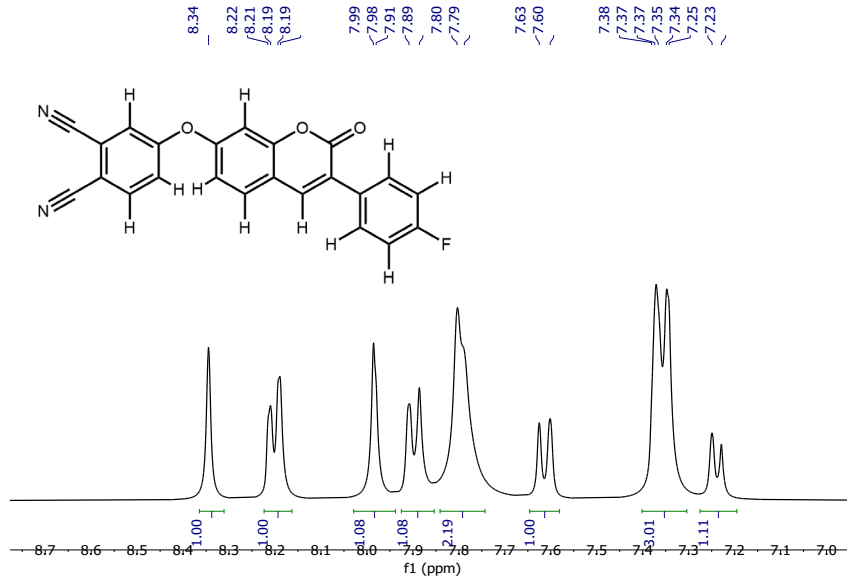
3.5.7. 4-[7-Oksi-3-(4-florofenil)kumarin]ftalonitril Sentezi (K7)

Perkin reaksiyonuna göre; 2,4-dihidroksibenzaldehit ve p-florofenilasetik asit karışımı, susuz CH₃COONa ve Ac₂O ile 160-170 °C’de 24 saat boyunca karıştırılarak ısıtıldı. 24 saat sonra reaksiyon TLC ile kontrol edildi ve buzlu suya çöktürülerek sonlandırıldı. Çöken ham ürün süzgeç kağıdıyla süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Ham ürün, LiOH ve THF/ CH₃OH varlığında oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak deasetilleme işlemi gerçekleştirildi ve asidik suya çöktürülüp süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen 7-hidroksi-3-(4-florofenil)kumarin, 4-nitroftalonitril ile birlikte DMF içerisinde çözüldü ve üzerine yavaş yavaş K₂CO₃ ilave edildi. Ekleme işlemi bittikten sonra reaksiyon 48 saat boyunca 65 °C’de karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı ve asidik suya çöktürüldü. Oluşan ürün süzüldü ve vakum etüvünde kurutuldu. Tüm ürünler kolon kromatografisiyle kloroform veya diklorometan solventi kullanılarak temizlendi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: K7 bileşiğinin sentez reaksiyonu.

FT-IR (ATR, ν_{max} , cm^{-1}), 3089 (Aromatik-CH), 2926,2854 (Alifatik-CH), 2231 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1716 ($\text{C}=\text{O}$), 1625-1591 (Aromatik- $\text{C}=\text{C}$). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.34 (s, 1H), 8.20 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 9.8, 2.7$ Hz, 3H), 7.24 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H) (Şekil 3.14).

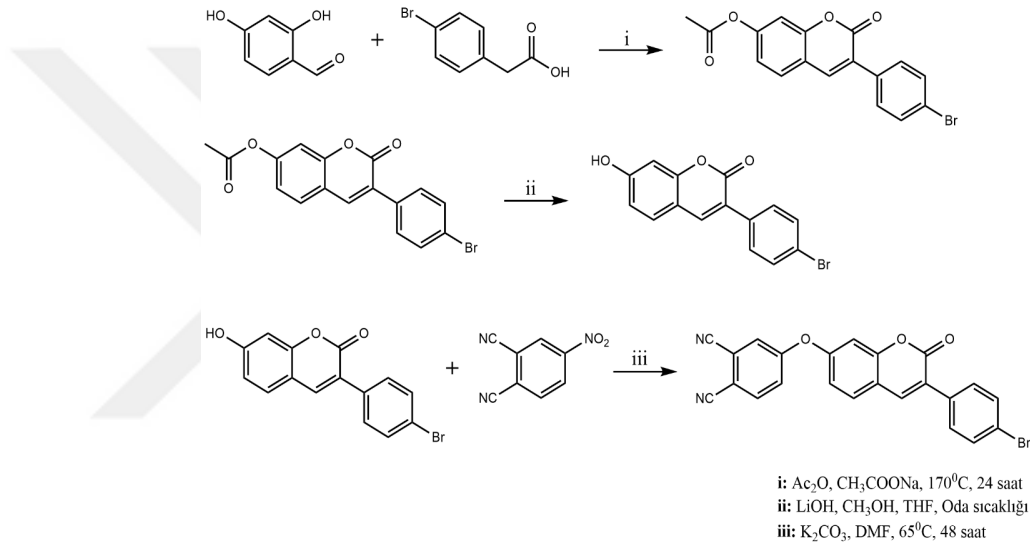


Şekil 3.14: K7 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

3.5.8. 4-[7-Oksi-3-(4-bromofenil)-kumarin]ftalonitril Sentezi (K8)

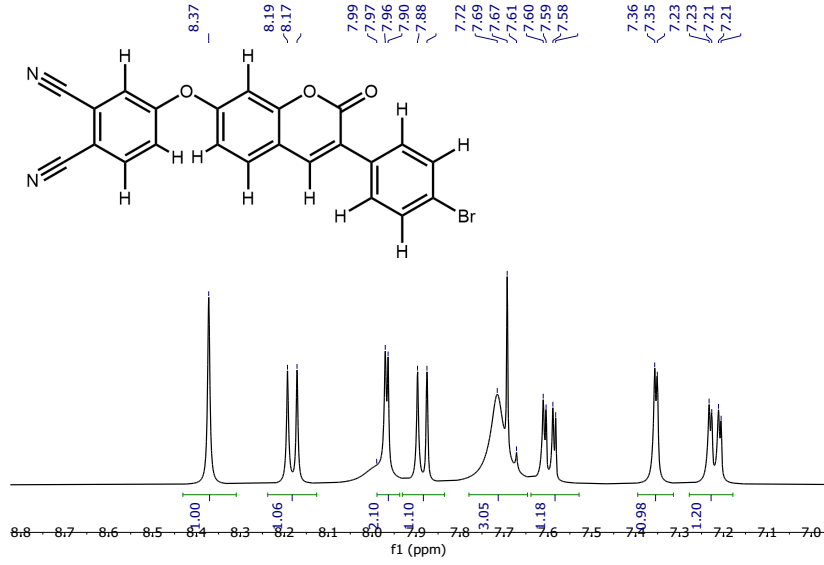
Perkin reaksiyonuna göre; 2,4-dihidroksibenzaldehit ve p-bromofenilasetik asit karışımı, susuz CH_3COONa ve Ac_2O ile $160\text{-}170^\circ\text{C}$ 'de 24 saat boyunca karıştırılarak ısıtıldı.

24 saat sonra reaksiyon TLC ile kontrol edildi ve buzlu suya çöktürülerek sonlandırıldı. Çöken ham ürün süzgeç kağıdıyla süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Ham ürün, LiOH ve THF/CH₃OH varlığında oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak deasetilleme işlemi gerçekleştirildi ve asidik suya çöktürülüp süzülerek vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen 7-hidroksi-3-(4-bromofenil)kumarin, 4-nitroftalonitril ile birlikte DMF içerisinde çözüldü ve üzerine yavaş yavaş K₂CO₃ ilave edildi. Ekleme işlemi bittikten sonra reaksiyon 48 saat boyunca 65 °C’de karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı ve asidik suya çöktürüldü. Oluşan ürün süzüldü ve vakum etüvünde kurutuldu. Tüm ürünler kolon kromatografisiyle kloroform veya diklorometan solventi kullanılarak temizlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15: K8 bileşiğinin sentez reaksiyonu.

FT-IR (ATR, $\nu_{\max}$, cm⁻¹), 3082 (Aromatik-CH), 2919,2850 (Alifatik-CH), 2235 (–C≡N), 1720 (–C=O), 1615-1593 (Aromatik-C=C). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.37 (s, 1H), 8.18 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 2.6 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.72 – 7.58 (m, 3H), 7.60 (dd, J = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H) (Şekil 3.16).



Şekil 3.16: K8 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

3.6. BİYOKİMYASAL ANALİZ

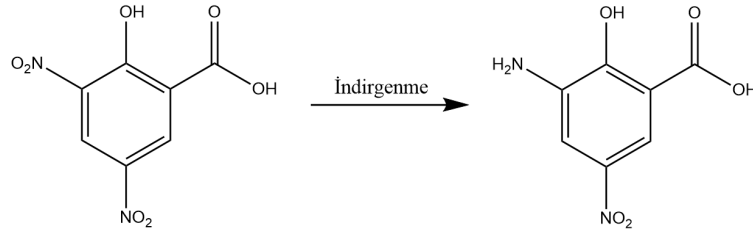
3.6.1. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Çalışmaları

Sentezlenmiş olan kumarin-ftalonitril türevlerinin α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri belirlenerek inhibitör potansiyelleri araştırıldı. Çalışılan bileşikler, her bir enzim için DMSO'da çözülerek reaksiyon ortamına katıldı ve kullanılan çözücünün enzim üzerine olan etkisi tespit edilerek enzim aktivitesini etkilemeyecek bir seviyede olması sağlandı. Tüm deneylerde inhibitör moleküllerini çözmek için kullanılan çözücü kontrol karışımına ilave edildi ve inhibisyon değerleri buna göre hesaplandı. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan tüm kumarin türevlerinin DMSO çözücüsünde ana çözeltileri hazırlandı. Kumarin türevlerinin enzim inhibisyon çalışmalarındaki konsantrasyonları bu ana stok çözelti üzerinden çalışılarak gerçekleştirildi. Enzim inhibisyonunu gözlemlemek için tüm yapıların enzimle ön inkübasyonu yapıldı. Kumarin-ftalonitril türevlerinin α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz enzimlerinin aktivitesini %50 inhibe eden inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) belirlendi.

3.6.2. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin α -Amilaz İnhibisyon Aktivitesi

α -Amilaz inhibisyon çalışması 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) yöntemi ile tayin edildi. Bu yöntemin prensibi; α -amilaz enziminin nişastayı parçalaması sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarının (maltoz) ölçülmesine dayanır. Serbest aldehit veya keton grupları içeren şekerler DNSA ile reaksiyona girerek DNSA'yı 3-amino-5-nitro salisilik aside indirgerler.

DNSA'nın indirgenmiş formu kırmızı-kahverengi bir renge sahiptir. Renk şiddetindeki artış indirgen şeker miktarıyla doğru orantılıdır ve bu yapının absorbanısı spektrofotometre ile ölçülür (Şekil 3.17) (Bernfeld, 1955).



Şekil 3.17: DNSA indirgenme reaksiyonu.

Kullanılan Çözeltiler:

Yöntemde kullanılan çözeltiler literatürde belirtilen şekilde hazırlandı (Bhutkar ve Bhise, 2012; Gao ve diğ., 2013).

Deneyin Yapılışı:

Deney çözeltileri kör, kontrol ve numune olarak adlandırıldı. Kontrol ve numune tüplerine 80 µL, kör tüpüne 120 µL 20 mM fosfat tamponu (6 mM NaCl, pH 6.9) eklendi. Kör ve kontrol tüplerine inhibitör çözücüsü olan DMSO'dan 40 µL ilave edildi ve numune tüplerine değişen konsantrasyon aralığındaki 40 µL inhibitör stok çözeltileri (K1: 0-4000 µM, K2: 0-8000 µM, K3: 0-5000 µM, K4: 0-8000 µM, K5: 0-4000 µM, K6: 0-8000 µM, K7: 0-7000 µM K8: 0-8000 µM) eklendi. Kontrol ve numune tüplerine α-amilaz çözeltisi (5 U/mL) ilave edildikten sonra tüm deney tüpleri 37 °C'de su banyosunda 10 dakika ön inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Bu işlemi takiben reaksiyonun gerçekleşmesi için tüm tüplere 40 µL %1 nişasta çözeltisinden eklenerek 10 dakika boyunca 37 °C'de su banyosunda tekrar inkübasyona devam edildi. Bu sürenin sonunda su banyosundan alınan tüplere 100 µL DNSA eklendi ve reaksiyon karışımı 5 dakika boyunca 100 °C'deki su banyosunda inkübe edildi. İşlem tamamlandıktan sonra ısı dengenin sağlanması amacıyla 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve daha sonra reaksiyon karışımlarının 540 nm'de köre karşı absorbanları okundu. Pozitif kontrol olarak akarboz kullanıldı.

Kumarin-ftalonitril türevlerinin α-amilaz inhibisyon aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(K_{\text{abs}} - N_{\text{abs}})/K_{\text{abs}}] \times 100$$

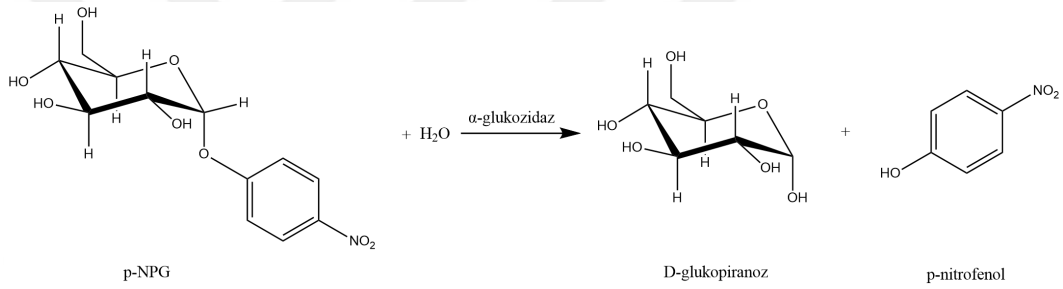
N_{abs} : Kumarin-ftalonitril türevlerini içeren denemeye ait absorbands değeri

K_{abs} : İnhibitör içermeyen kontrol denemesine ait absorbands değeri

Kumarin-ftalonitril türevlerinin α -amilaz enzimi için IC_{50} değerleri, absise bileşiklerin konsantrasyonları ve ordinata % α -amilaz enzim inhibisyon verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon ile hesaplandı.

3.6.3. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin α -Glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi

α -Glukozidaz inhibisyon çalışması, α -glukozidaz ile p-nitrofenil-D-glukopiranozit'in (p-NPG) hidroliz reaksiyonu sonucu açığa çıkan p-nitrofenol'ün 405 nm'de köre karşı absorpsiyonunun mikropilaka okuyucu ile spektrofotometrik ölçümüne dayanır (Şekil 3.18) (Tao ve diğ., 2013).



Şekil 3.18: p-NPG hidroliz reaksiyonu.

Kullanılan Çözeltiler:

Yöntemde kullanılan çözeltiler literatürde belirtilen şekilde hazırlandı (Tao ve diğ., 2013).

Deneyin Yapılışı:

Deney çözeltileri kör, kontrol ve numune olarak adlandırıldı ve mikropilaka içerisinde çalışıldı. Kontrol ve numune çözeltilerine 75 μ L, kör çözeltilisine 80 μ L 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) eklendi. Kör ve kontrol çözeltilerine inhibitör çözücüsü olan DMSO'dan 5 μ L ilave edildi ve numune çözeltilerine değişen konsantrasyon aralığındaki 5 μ L inhibitör stok çözeltileri (K1: 0-1000 μ M, K2: 0-1000 μ M, K3: 0-4000 μ M, K4: 0-1000 μ M, K5: 0-2000 μ M, K6: 0-4000 μ M, K7: 0-3000 μ M, K8: 0-1000 μ M) eklendi. Kontrol ve numune çözeltilerine α -glukozidaz çözeltisi (0.15 U/mL) ilave edildikten sonra mikropilaka içerisinde 35 °C'de 10 dakika ön inkübasyonu yapıldı. Bu işleme takiben reaksiyonun gerçekleşmesi için tüm

çözeltilere 20 µL 5 mM p-NPG eklenerek 10 dakika boyunca 35 °C’de tekrardan inkübasyona devam edildi. Bu sürenin sonunda 96 kuyucuklu mikropalakada serbest kalan p-nitrofenol miktarı 405 nm’de köre karşı absorbanası okundu. Pozitif kontrol olarak kuarsetin kullanıldı.

Kumarin-ftalonitril türevlerinin α-glukozidaz inhibisyon aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(K_{\text{abs}} - N_{\text{abs}})/K_{\text{abs}}] \times 100$$

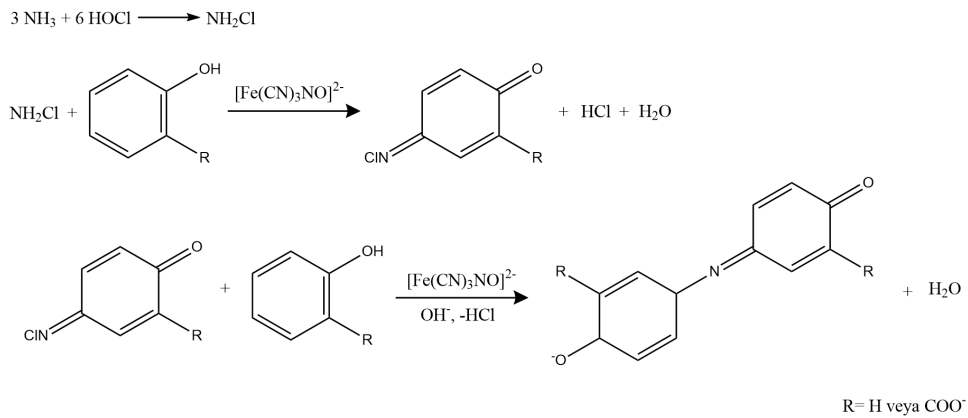
N_{abs} : Kumarin-ftalonitril türevlerini içeren denemeye ait absorbanas değeri

K_{abs} : İnhibitör içermeyen kontrol denemesine ait absorbanas değeri

Kumarin-ftalonitril türevlerinin α-glukozidaz enzimi için IC_{50} değerleri, absise bileşiklerin konsantrasyonları ve ordinata % α-glukozidaz enzim inhibisyon verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon ile hesaplandı.

3.6.4. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Üreaz İnhibisyon Aktivitesi

Weatherburn yöntemi kullanılarak üreaz enziminin inhibisyon çalışmaları yapıldı. Bu yöntem; üre moleküllerinin hidroliz olması sonucunda birim zamanda açığa çıkan amonyak miktarını ölçen spektrofotometrik bir yöntemdir. Bu yöntemde üreazın, üre ile enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan amonyak, sodyum hipoklorit ve sodyum nitroprussiyat varlığında fenol ile reaksiyon vererek mavi renkli bir çözelti oluşturmaktadır. Reaksiyon sonucu oluşan renk spektrofotometrik olarak 625 nm’de ölçülmektedir ve ölçülen renk yoğunluğu üreaz aktivitesi ile doğru orantılıdır (Şekil 3.19) (Weatherburn, 1967; Hanif ve diğ., 2012).



Şekil 3.19: İndofenol oluşum mekanizması.

Kullanılan Çözeltiler:

Yöntemde kullanılan çözeltiler literatürde belirtilen şekilde hazırlandı (Hanif ve diğ., 2012).

Deneyin Yapılışı:

Deney çözeltileri kör, kontrol ve numune olarak adlandırıldı ve mikrolaka içerisinde çalışıldı. Kontrol ve numune çözeltilerine 40 µL, kör çözeltisine 50 µL 0.1 M substrat çözeltisi eklendi. Kör ve kontrol çözeltilerine inhibitör çözücüsü olan DMSO'dan 10 µL ilave edildi ve numune çözeltilerine değişen konsantrasyon aralığındaki 10 µL inhibitör stok çözeltileri (K1: 0-4000 µM, K2: 0-8000 µM, K3: 0-10000 µM, K4: 0-8000 µM, K5: 0-8000 µM, K6: 0-8000 µM, K7: 0-4000 µM, K8: 0-8000 µM) eklendi. Kontrol ve numune çözeltilerine üreaz çözeltisi (5 U/mL) ilave edildikten sonra mikrolaka içerisinde 37 °C'de 10 dakika ön inkübasyonu yapıldı. Bu işleme takiben reaksiyonun gerçekleşmesi için tüm çözeltilere 40 µL fenol ayracı (%1 fenol ve %0.005 sodyum nitroprusiyat) ve 40 µL alkali ayracı (%0.5 NaOH ve %0.1 sodyum hipoklorit) eklenerek 10 dakika boyunca 37 °C'de tekrardan inkübasyona devam edildi. Bu sürenin sonunda 96 kuyucuklu mikrolakada serbest kalan amonyak miktarı 625 nm'de köre karşı absorbanı okundu. Pozitif kontrol olarak tiyoüre kullanıldı.

Kumarin-ftalonitril türevlerinin üreaz inhibisyon aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(K_{\text{abs}} - N_{\text{abs}})/K_{\text{abs}}] \times 100$$

N_{abs} : Kumarin-ftalonitril türevlerini içeren denemeye ait absorbanı değeri

K_{abs} : İnhibitör içermeyen kontrol denemesine ait absorbanı değeri

Kumarin-ftalonitril türevlerinin üreaz enzimi için IC_{50} değeri, absise bileşiklerin konsantrasyonları ve ordinata % üreaz enzim inhibisyon verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon ile hesaplandı.

3.6.5. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Tromboplastik Aktiviteleri

Tromboplastik aktivitenin (TF) tayini, Ingram ve Hills'in (1976) geliştirdikleri Quick metoduna göre yapıldı (Ingram ve Hills, 1976). Sağlıklı bireyden alınan kan tromboplastin

kaynağı kan plazması kullanıldı. Kalsiyum klorür (CaCl_2) ilavesi ile fibrin oluşumu için geçen süre incelendi.

Kullanılan Çözeltiler:

%3.8 Sodyum sitrat çözeltisi, serum fizyolojik ve 0.02 M CaCl_2 çözeltileri destile su içerisinde hazırlandı. Plazma örneği; 1 mL %3.8 sodyum sitrat üzerine 9 mL kan eklendikten sonra 15 dakika 3000 rpm’de santrifüj edildi ve üst kısımda kalan plazma alınarak denemelerde kullanıldı.

Deneyin Yapılışı:

3 μL DMSO üzerine 97 μL serum fizyolojik ilave edilip 2 dakika boyunca 37 °C’de bekletildi. Üzerine 0.1 mL plazma eklendi ve tekrardan 37 °C’de 30 sn boyunca inkübe edildi. Ardından 0.02 M CaCl_2 eklenerek, pıhtı oluşumu için geçen süre ölçüldü. Lanset ile fibrin oluşumuna bakıldı ve sonuçlar saniye cinsinden hesaplandı. Bu ölçüm kontrol olarak etiketlendi.

Örnekler için 3 μL kumarin-ftalonitril türevi üzerine 97 μL serum fizyolojik ilave edilip 2 dakika boyunca 37 °C’de bekletildi. Üzerine 0.1 mL plazma eklendi ve tekrardan 37 °C’de 30 sn boyunca inkübe edildi. Ardından 0.02 M CaCl_2 eklenerek, pıhtı oluşumu için geçen süre ölçüldü. Lanset ile fibrin oluşumuna bakıldı ve sonuçlar saniye cinsinden hesaplandı. Tüm örneklerin nihai konsantrasyonları 800 μM olacak şekilde çalışıldı.

3.6.6. İstatiksel Analiz

İstatiksel analiz için elde edilen tüm verilerin değerlendirmeleri GraphPad 6.0 Prism yazılımı (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA. USA) kullanılarak yapıldı. Kumarin-ftalonitril türevlerinin IC_{50} değerleri, % inhibisyon grafiklerinin lineer regresyon analizi ile hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. KUMARİN-FTALONİTRİL TÜREVLERİNİN HESAPSAL ÇALIŞMALARI

Kumarin-ftalonitril türevlerinin ilaç olarak kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla ADME ve Lipinski'nin beş kuralına uygunlukları (Tablo 4.1) araştırıldı. Lipinski beş kuralı, farmakolojik aktiviteye sahip herhangi bir bileşiğin oral bir ilaç olarak uygulanabilirliğini test etmek için kullanılan bir yöntemdir. Lipinski'nin 5 kuralı;

- Hidrojen bağı donör sayısı 5'ten fazla olmamalıdır.
- Hidrojen bağı akseptör sayısının 10'dan fazla olmamalıdır.
- Yapıların molekül ağırlıklarının 500 Da'dan küçük olmalıdır.
- Su ayrılım katsayısı (log P, oktanol) değerinin 5'ten büyük olmaması gerekmektedir.

Tablo 4.1: K1-K8, akarboz, kuersetin ve tiyoüre bileşiklerinin ADME özellikleri.

Bileşikler	XLOGP	MA	Polarite	LOG S	Csp3	Esneklik	*GI	*KBB	Lipinski
K1	4.51	364.35	87.02	-5.32	0	3	Yüksek	-	Uyar
K2	4.88	378.38	87.02	-5.62	0.04	3	Yüksek	-	Uyar
K3	4.48	394.38	96.25	-5.39	0.04	4	Yüksek	-	Uyar
K4	4.34	409.35	132.84	-5.37	0	4	Düşük	-	Uyar
K5	6.14	440.45	87.02	-6.78	0	4	Düşük	-	Uyar
K6	4.63	407.42	90.26	-5.54	0.08	4	Yüksek	-	Uyar
K7	4.61	382.34	87.02	-5.48	0	3	Yüksek	-	Uyar
K8	5.20	443.25	87.02	-6.23	0	3	Yüksek	-	Uyar
Akarboz	-8.53	645.60	321.17	2.13	0.92	9	Düşük	-	Uymaz
Kuersetin	1.54	302.24	131.36	-3.16	0	1	Yüksek	-	Uyar
Tiyoüre	-0.83	76.12	84.13	0.21	0	0	Yüksek	-	Uyar

*-0.7 < Lipofilisite (XLOGP) < +5.0, 150 g/mol < MA (Molekül Ağırlığı) < 500 g/mol, 20 Å² < Polarite (TPSA) < 130 Å², 0 < Çözünürlük (Log S [ESOL]) < 6, 0.25 < Doygunluk (Fraksiyon Csp3) < 1, 0 < Esneklik (Dönebilen bağ sayısı) < 9, GI: Gastrointestinal Emilim, KBB: Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliği

Kumarin-ftalonitril türevlerinin AutoDock Vina programı kullanılarak α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz enzimlerinin aktif bölgelerine moleküler yerleştirmeleri yapıldı. Bu yerleştirmeler sonucunda K1-K8 bileşiklerinin her bir enzim için en düşük bağlanma enerjileri ve ligand verimliliği değerleri hesaplandı (Tablo 4.2, 4.3 ve 4.4). Kumarin bileşiklerinin enzimlerin aktif bölgesindeki konformasyonları ve amino asit kalıntıları ile yapmış oldukları etkileşim türleri belirlendi. Her bir enzim için bilinen inhibitörleri ile kıyaslamaları yapıldı.

Tablo 4.2: Kumarin-ftalonitril türevlerinin α -amilaz enzimine bağlanma enerjileri ve ligand verimliliği (LV) değerleri.

Bileşikler	En düşük Bağlanma Enerjisi (ΔG , kcal/mol)	Ağır Atom Sayısı	*LV (ΔG , kcal/mol)
K1	-10,1	28	-0,361
K2	-10,8	29	-0,372
K3	-10,3	30	-0,343
K4	-10,7	31	-0,345
K5	-10,2	34	-0,300
K6	-9,9	31	-0,319
K7	-10,8	29	-0,372
K8	-10,1	29	-0,348
Akarboz	-7,8	44	-0,177

*LV= ΔG /Ağır atom sayısı (H atomları hariç)

Tablo 4.3: Kumarin-ftalonitril türevlerinin α -glukozidaz enzimine bağlanma enerjileri ve ligand verimliliği (LV) değerleri.

Bileşikler	En düşük Bağlanma Enerjisi (ΔG , kcal/mol)	Ağır Atom Sayısı	LV (ΔG , kcal/mol)
K1	-10,9	28	-0,389
K2	-11	29	-0,379
K3	-10,2	30	-0,340
K4	-10,4	31	-0,335
K5	-12	34	-0,353
K6	-10,7	31	-0,345
K7	-11,3	29	-0,390
K8	-10,1	29	-0,348
Kuarsetin	-8,4	22	-0,382

Tablo 4.4: Kumarin-ftalonitril türevlerinin üreaz enzimine bağlanma enerjileri ve ligand verimliliği (LV) değerleri.

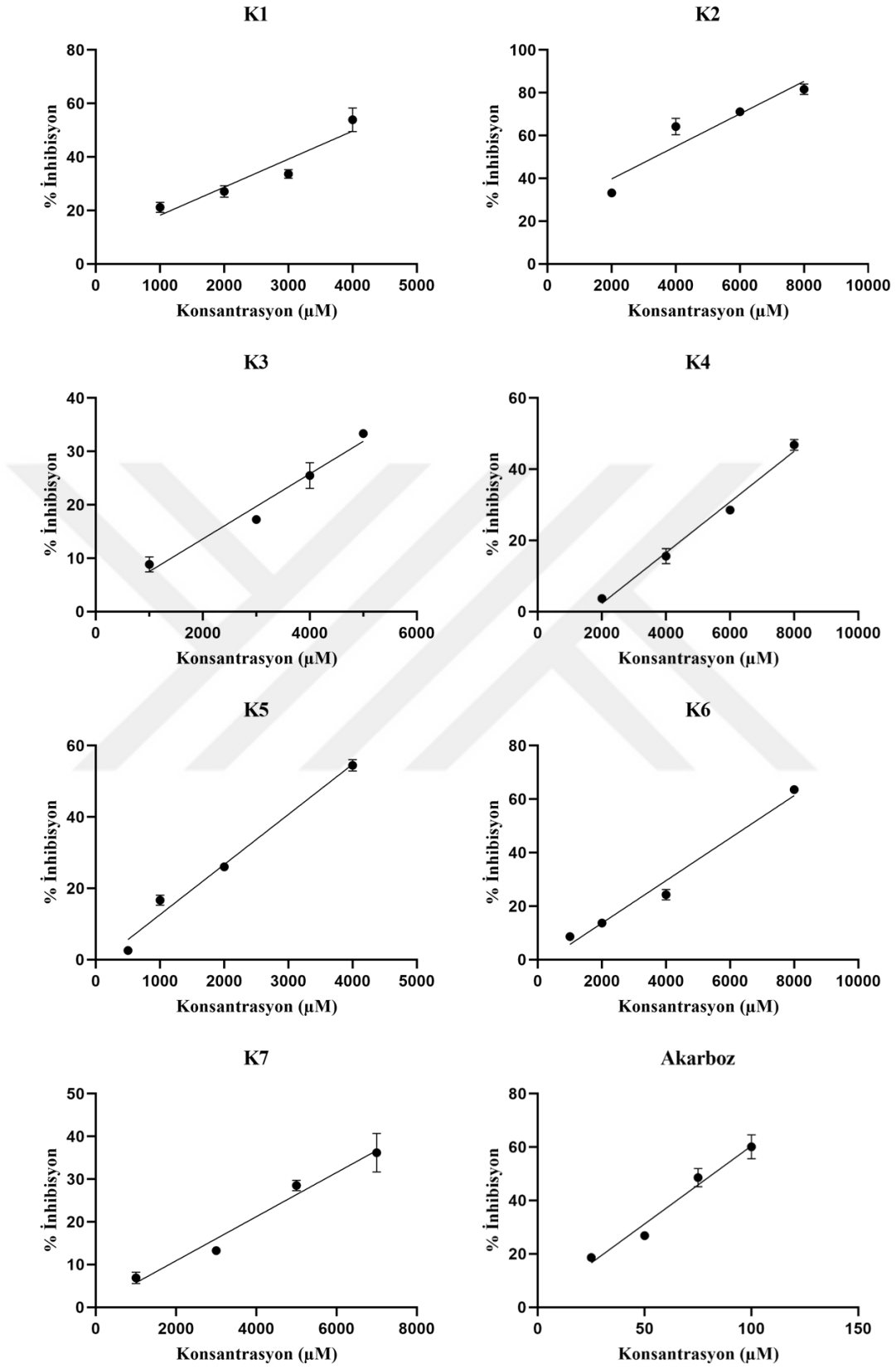
Bileşikler	En düşük Bağlanma Enerjisi (ΔG , kcal/mol)	Ağır Atom Sayısı	LV (ΔG , kcal/mol)
K1	-9,9	28	-0,354
K2	-10,3	29	-0,355
K3	-9,8	30	-0,327
K4	-10,3	31	-0,332
K5	-10,2	34	-0,300
K6	-10,1	31	-0,326
K7	-9,9	29	-0,341
K8	-9,8	29	-0,338
Tiyoüre	-3,3	4	-0,825

4.2. KUMARİN-FTALONİTRİL TÜREVLERİNİN ENZİM İNHİBİSYONU VE TROMBOPLASTİK AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİLERİ

Verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism 6.0 programı kullanıldı. Kumarin-ftalonitril türevlerinin IC_{50} değerleri arasında anlamlı farklılığın incelenmesi için one way ANOVA ve iki kuyruklu t- testi uygulandı. K1, K2, K5 ve K7 bileşiklerinin üç enzim içinde sonuçlarının birbirinden anlamlı olarak farklı oldukları belirlendi ($p < 0.0001$). Ayrıca K3, K4 ve K6 türevlerinin karşılaştırılması için iki kuyruklu t-testi uygulandı. Test sonucunda α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri için K3, K4 ve K6 türevlerine ait IC_{50} değerlerinin birbirinden anlamlı şekilde farklı olduğu ($p < 0.0018$) saptandı.

4.2.1. α -Amilaz Enzimi Aktivitesine Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Etkisi

K1-K7 bileşiklerinin ve α -amilaz enziminin bilinen inhibitörü olan akarboz için inhibisyon çalışmaları Bölüm 3.6.2’de anlatıldığı gibi yapıldı ve bileşiklerin IC_{50} değerlerinin (Tablo 4.5) hesaplandığı konsantrasyon - % inhibisyon grafikleri Şekil 4.1’de verildi. Yapılan inhibisyon çalışmalarında K8 bileşiğinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerinde etki etmediği bulundu.



Şekil 4.1: K1-K7 ve akarboz bileşiklerinin konsantrasyon – α -amilaz % inhibisyon grafikleri.

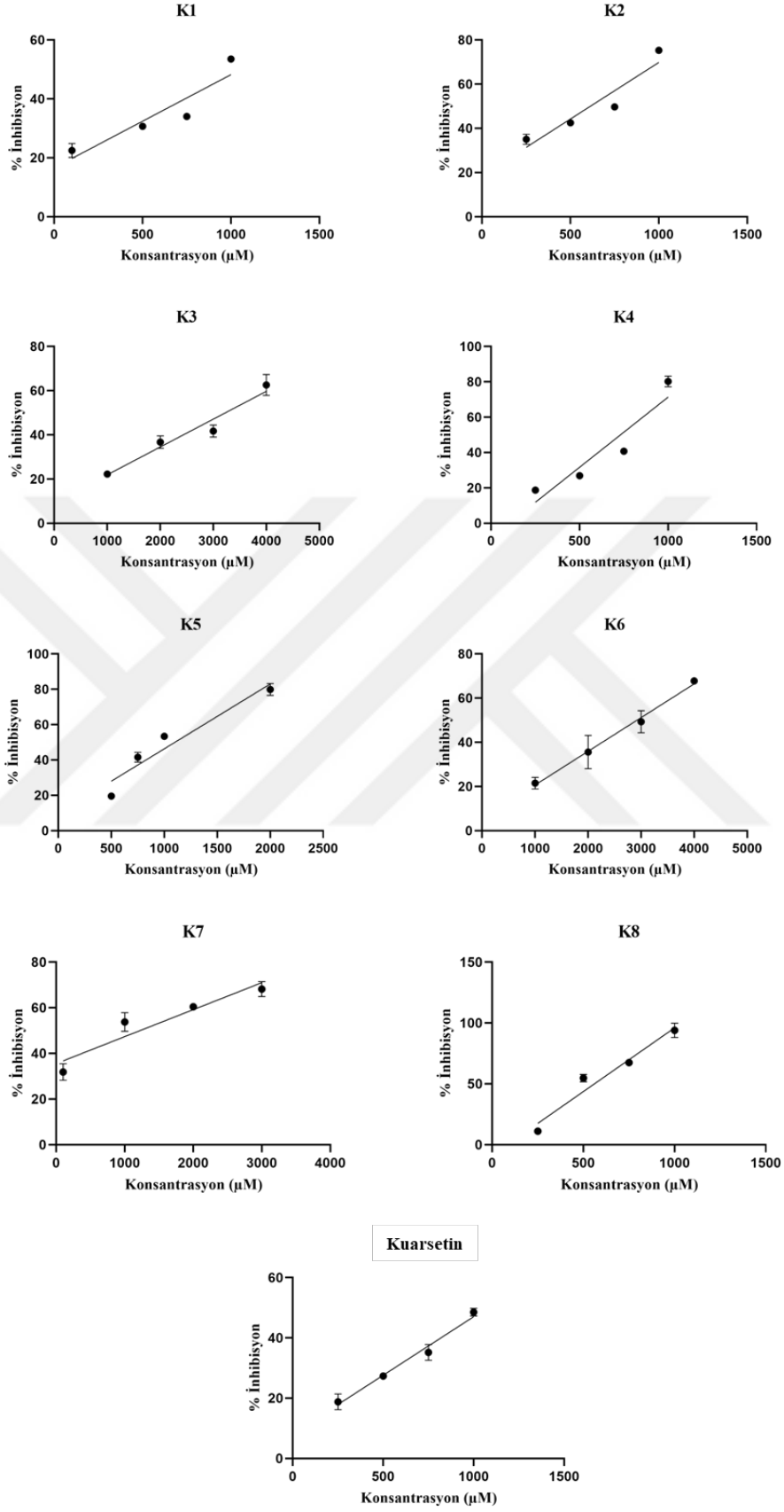
Tablo 4.5: K1-K8 ve akarboz bileşiklerinin α -amilaz için IC₅₀ değerleri.

Bileşikler	IC ₅₀ Değeri (μM)*
K1	4032.73 ± 345.82
K2	3351.32 ± 243.18
K3	7973.40 ± 260.20
K4	8700.66 ± 249.41
K5	3660.90 ± 101.50
K6	6576.23 ± 212.08
K7	9578.85 ± 933.92
K8	-
Akarboz	82.15 ± 5.94

*Ortalama ± SD

4.2.2. α -Glukozidaz Enzimi Aktivitesine Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Etkisi

K1-K8 bileşiklerinin ve α -glukozidaz enziminin bilinen inhibitörü olan kuarsetin ile yapılan inhibisyon çalışmaları Bölüm 3.6.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirildi ve bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin (Tablo 4.6) hesaplandığı konsantrasyon - % inhibisyon grafikleri Şekil 4.2'de verildi.



Şekil 4.2: K1-K8 ve kuarsetin bileşiklerinin konsantrasyon – α -glukozidaz % inhibisyon grafikleri.

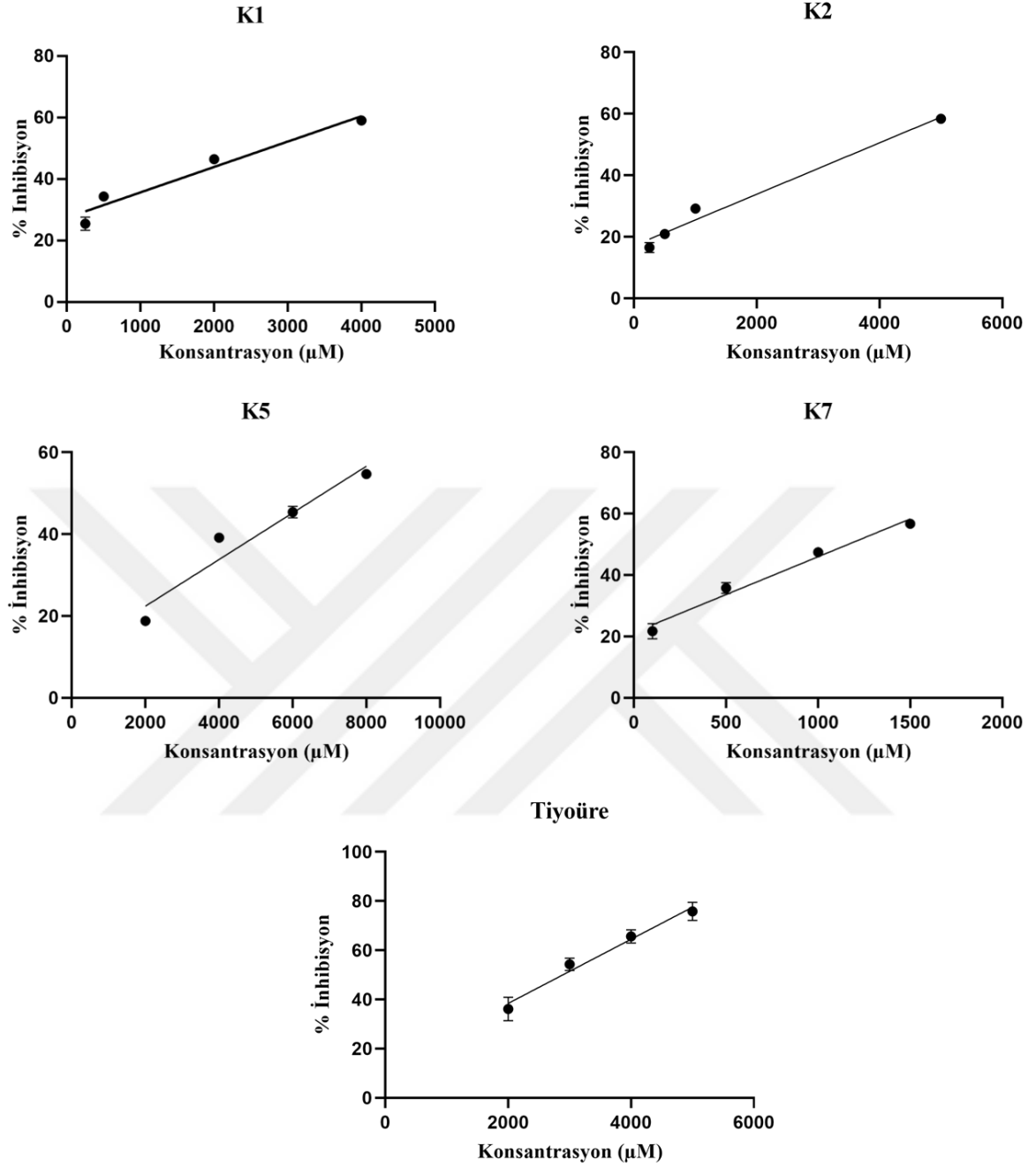
Tablo 4.6: K1-K8 ve kuarsetin bileşiklerinin α -glukozidaz için IC_{50} değerleri.

Bileşikler	IC_{50} Değeri (μM)*
K1	1056.31 ± 3.80
K2	612.85 ± 19.17
K3	3231.93 ± 277.46
K4	731.12 ± 25.09
K5	1101.04 ± 60.21
K6	2923.20 ± 222.87
K7	1224.39 ± 265.50
K8	560.61 ± 23.36
Kuarsetin	1076.80 ± 38.24

*Ortalama $\pm$ SD

4.2.3. Üreaz Enzimi Aktivitesine Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Etkisi

K1, K2, K5 ve K7 bileşiklerinin ve üreaz enziminin bilinen inhibitörü olan tiyoüre için inhibisyon çalışmaları Bölüm 3.6.4'te anlatıldığı gibi yapıldı ve bileşiklerin IC_{50} değerlerinin (Tablo 4.7) hesaplandığı konsantrasyon - % inhibisyon grafikleri Şekil 4.3'te verildi.



Şekil 4.3: K1, K2, K5, K7 ve tiyoüre bileşiklerinin konsantrasyon – üreaz % inhibisyon grafikleri.

Tablo 4.7: K1-K8 ve tiyoüre bileşiklerinin üreaz için IC₅₀ değerleri.

Bileşikler	IC ₅₀ Değeri (μM)*
K1	2728.92 ± 108.54
K2	3934.43 ± 58.02
K3	-
K4	-
K5	6845.61 ± 134.29
K6	-
K7	1163.89 ± 20.85
K8	-
Tiyoüre	2887.95 ± 286.29

*Ortalama ± SD

4.2.4. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin Tromboplastik Aktivite Üzerine Etkileri

K1-K8 bileşiklerinin ve tromboplastik aktivite üzerine etkileri Bölüm 3.6.5'te anlatıldığı gibi yapıldı ve plazma pıhtılaşma süreleri belirlendi (Tablo 4.8)

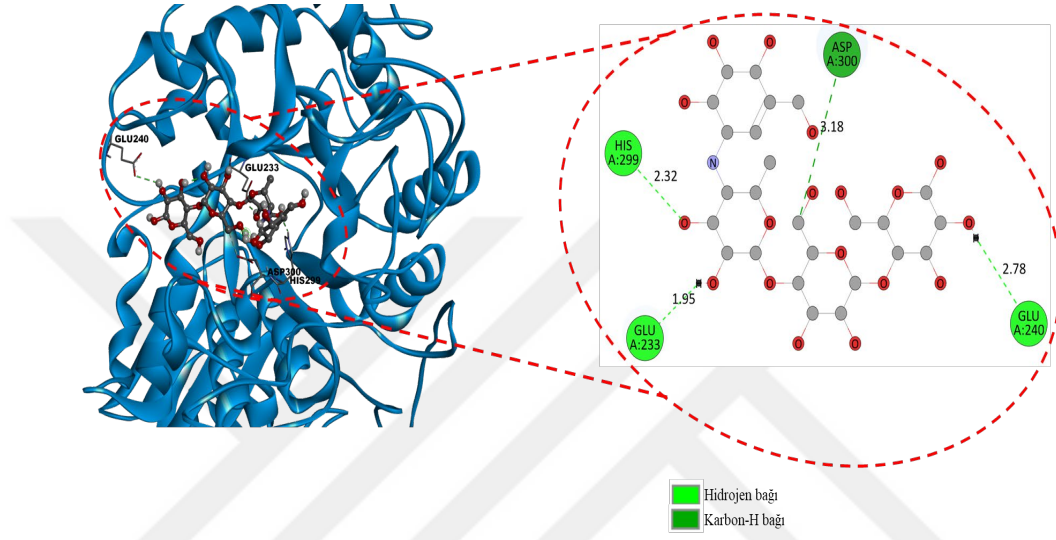
Tablo 4.8: Kumarin-ftalonitril türevlerinin tromboplastik aktivite (TF) değerleri.

Bileşik	TF (saniye)
Kontrol	638.5 ± 8.5
K1	615 ± 0
K2	652.5 ± 2.5
K3	723.5 ± 1.5
K4	635 ± 5
K5	614.5 ± 2.5
K6	711.5 ± 11.5
K7	705.5 ± 4.5
K8	628.5 ± 1.5

*Ortalama ± SD

4.2.5. Kumarin-ftalonitril Türevlerinin *In Vitro* ve *In Silico* Çalışmaları

α -Amilaz enziminin *in silico* bölümünde; K1-K8 bileşiklerinin, enzimin bilinen inhibitörü olan akarboz molekülünden daha düşük bağlanma enerjilerine ve ligand verimliliği değerlerine sahip oldukları görüldü. Yapılan *in vitro* çalışmada ise; K1-K8 bileşiklerinin akarboza kıyasla daha düşük IC_{50} değerine sahip olmadıkları belirlendi. Akarboz molekülünün α -amilaz enziminin aktif bölgesinde H bağları yaptığı tespit edildi (Şekil 4.4 ve Tablo 4.9).



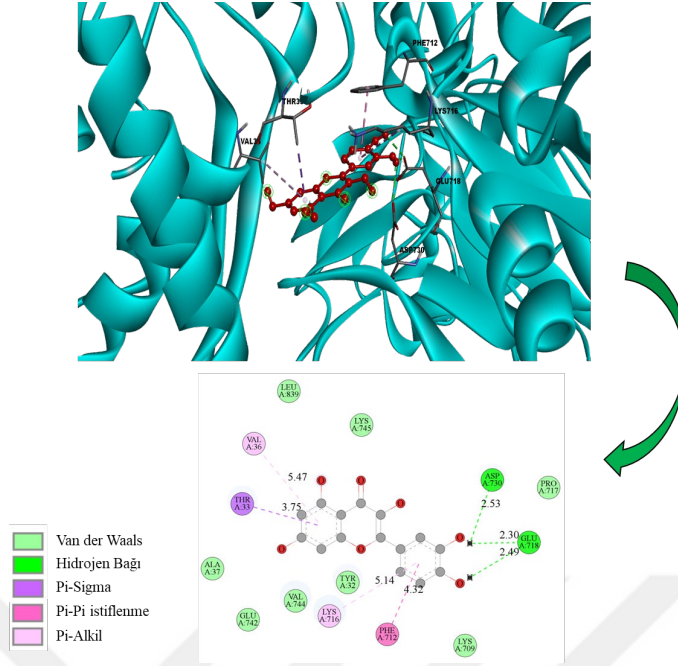
Şekil 4.4: Akarboz bileşiğinin α -amilaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.

Tablo 4.9: Akarboz bileşiğinin α -amilaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşim türleri.

Bileşikler	Hidrojen bağı etkileşimi yapan amino asit kalıntıları	Hidrofobik ve diğer etkileşimleri yapan amino asit kalıntıları
Akarboz	Glu233, Glu240, His299	Asp300

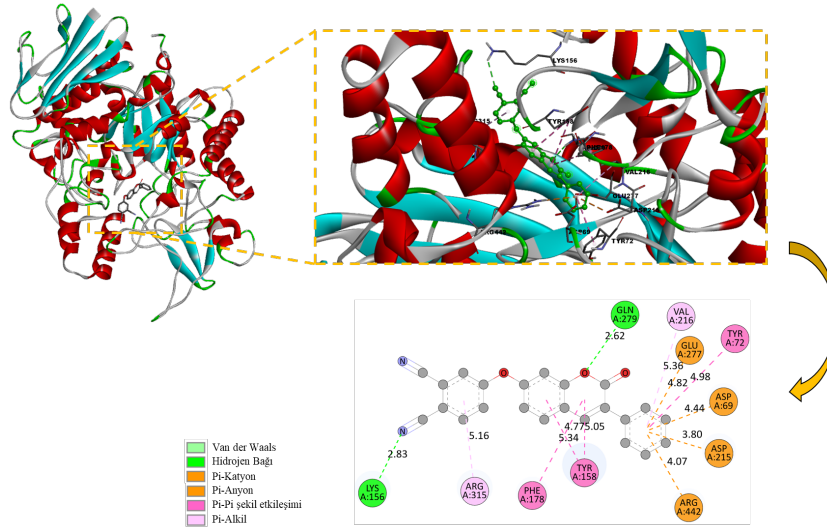
α -Glukozidaz enziminin *in silico* bölümünde; K1-K8 bileşiklerinin, enzimin bilinen inhibitörü olan kuarsetin molekülünden daha düşük bağlanma enerjilerine ve ligand verimliliği değerlerine sahip oldukları belirlendi. Yapılan *in vitro* çalışmada ise; K2, K4 ve K8 bileşiklerinin kuarsetine kıyasla daha düşük IC_{50} değerine sahip oldukları görüldü.

Kuarsetin molekülünün α -glukozidaz enziminin aktif bölgesinde H bağları ve diğer etkileşimlerde bulundukları tespit edildi (Şekil 4.5 ve Tablo 4.10).



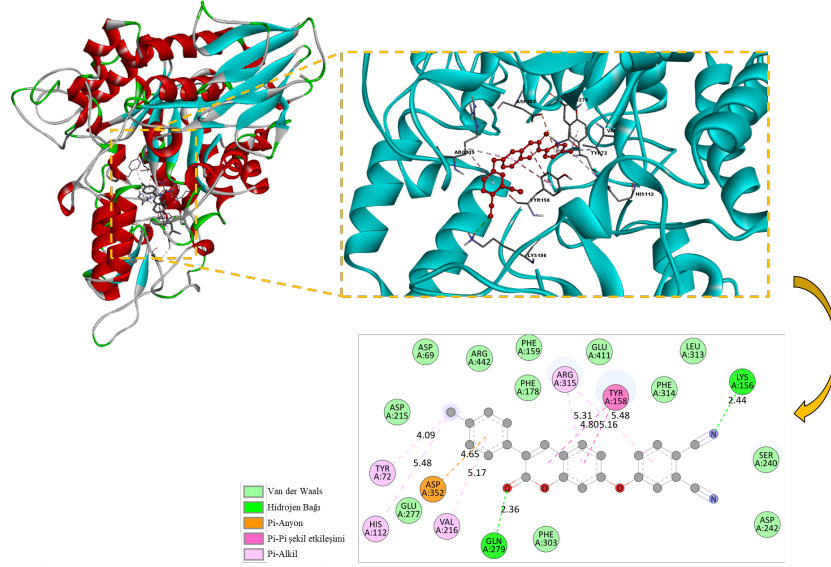
Şekil 4.5: Kuarsetin bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.

K1 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesinde çeşitli amino asit kalıntıları ile hidrojen bağları, pi-anyon, pi-katyon pi-alkil, pi-pi şekil ve van der Waals etkileşimleri yaptıkları belirlendi (Şekil 4.6 ve Tablo 4.10).



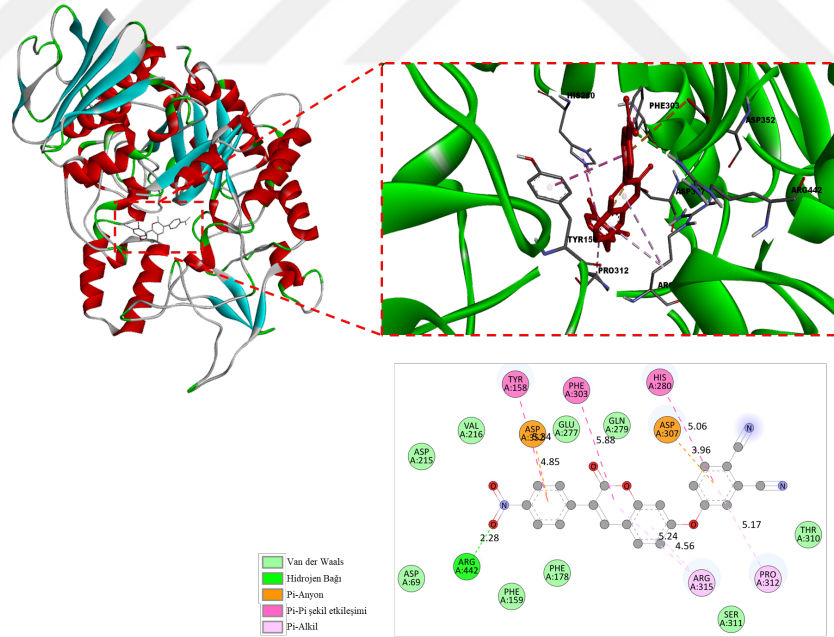
Şekil 4.6: K1 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.

K2 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesinde çeşitli amino asit kalıntıları ile hidrojen bağları, pi-anyon, pi-alkil, pi-pi şekil ve van der Waals etkileşimleri yaptıkları belirlendi (Şekil 4.7 ve Tablo 4.10).



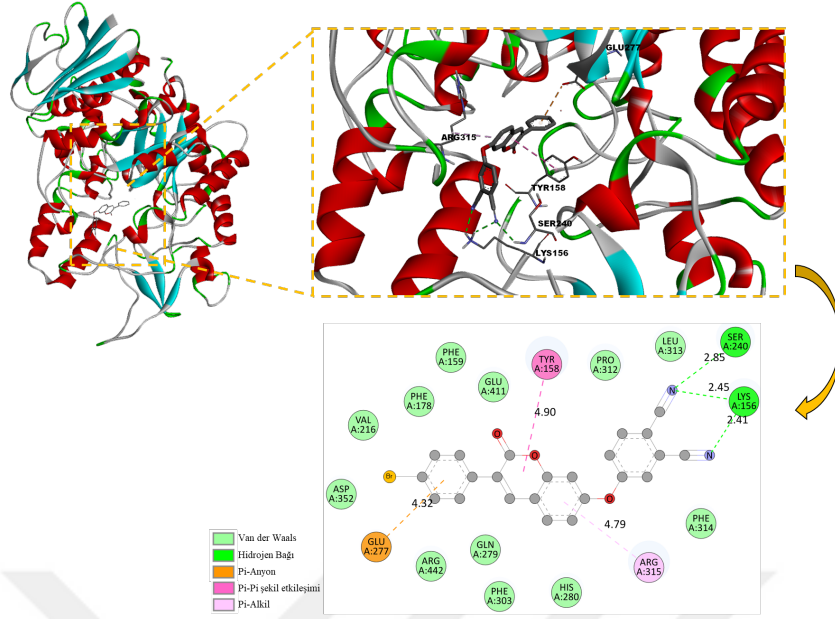
Şekil 4.7: K2 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.

K4 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesinde çeşitli amino asit kalıntıları ile hidrojen bağları, pi-anyon, pi-alkil, pi-pi ve van der Waals etkileşimleri yaptıkları görüldü (Şekil 4.8 ve Tablo 4.10).



Şekil 4.8: K4 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.

K8 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesinde çeşitli amino asit kalıntıları ile hidrojen bağları, pi-anyon, pi-alkil, pi-pi şekil ve van der Waals etkileşimleri yaptıkları bulundu (Şekil 4.9 ve Tablo 4.10).



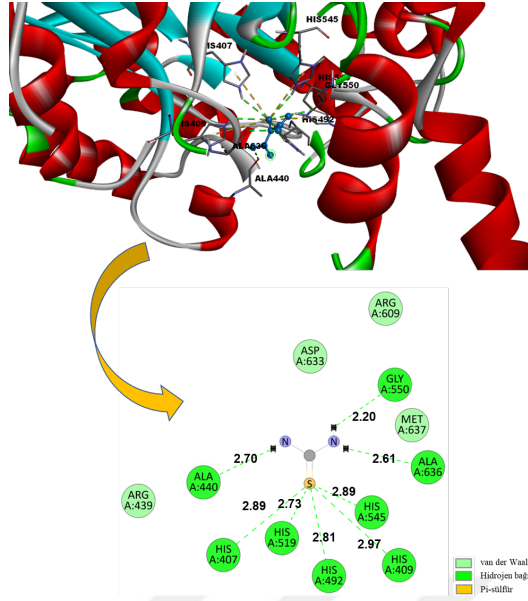
Şekil 4.9: K8 bileşiğinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.

Tablo 4.10: K1, K2, K4, K8 ve kuarsetin bileşiklerinin α -glukozidaz enziminin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları ile etkileşim türleri.

Bileşikler	Hidrojen bağı etkileşimi yapan amino asit kalıntıları	Hidrofobik ve diğer etkileşimleri yapan amino asit kalıntıları
Kuarsetin	Glu718, Asp730	Thr33, Val36, Phe712, Lys716
K1	Lys156, Gln279	Asp69, Tyr72, Tyr158, Phe178, Asp215, Val216, Glu277, Arg315, Arg442
K2	Lys156, Gln279	Tyr72, His112, Tyr158, Val216, Arg315, Asp352
K4	Arg442	Tyr158, His280, Phe303, Asp307, Pro312, Arg315, Asp352
K8	Lys156, Ser240	Tyr158, Glu277, Arg315

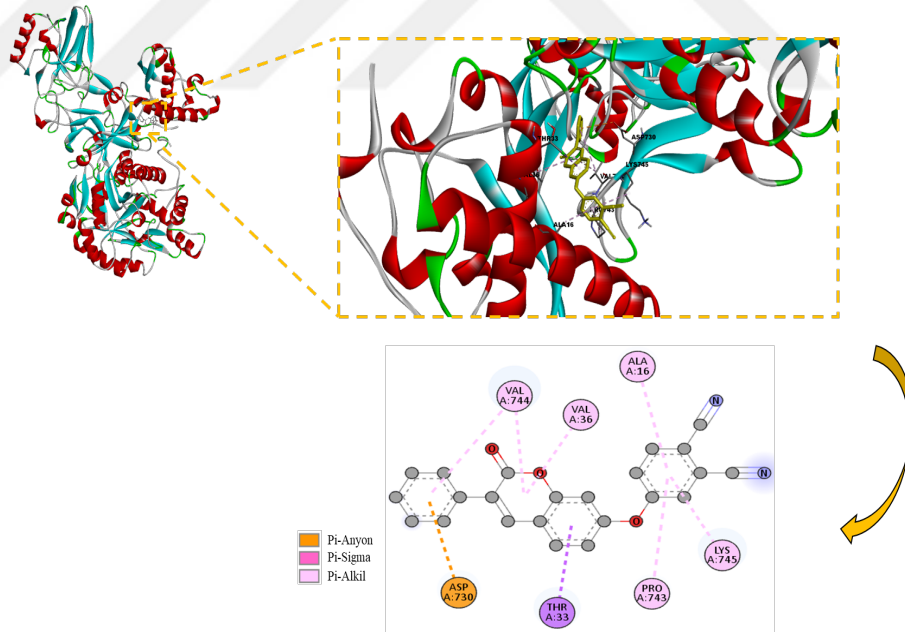
Üreaz enziminin *in silico* bölümünde; K1-K8 bileşiklerinin, enzimin bilinen inhibitörü olan tiyoüre molekülünden daha düşük bağlanma enerjilerine ve ligand verimliliği değerlerine sahip oldukları belirlendi. Yapılan *in vitro* çalışmada ise; K1 ve K7 bileşiğinin tiyoüreye kıyasla daha düşük IC_{50} değerine sahip oldukları görüldü.

Tiyoüre molekülünün üreaz enziminin aktif bölgesinde H bağları, van der Waals ve pi-sülfür etkileşimlerinde bulundukları tespit edildi (Şekil 4.10 ve Tablo 4.11).



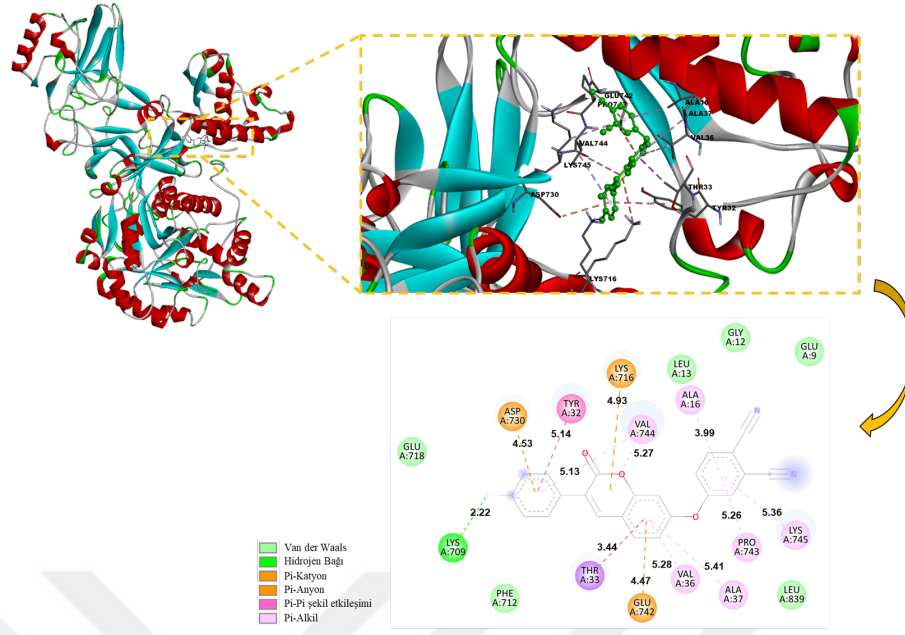
Şekil 4.10: Tiyoüre bileşiğinin üreaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.

K1 bileşiğinin üreaz enziminin aktif bölgesinde çeşitli amino asit kalıntıları ile pi-anyon, pi-sigma ve pi-alkil etkileşimleri yaptıkları belirlendi (Şekil 4.11 ve Tablo 4.11).



Şekil 4.11: K1 bileşiğinin üreaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.

K7 bileşiğinin üreaz enziminin aktif bölgesinde çeşitli amino asit kalıntıları ile pi-anyon, pi-katyon, pi-alkil, pi-pi şekil ve van der Waals etkileşimleri yaptıkları belirlendi (Şekil 4.12 ve Tablo 4.11).



Şekil 4.12: K7 bileşiğinin üreaz enziminin aktif bölgesindeki etkileşimleri.

Tablo 4.11: K1, K7 ve tiyoüre bileşiklerinin üreaz enziminin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları ile etkileşim türleri.

Bileşikler	Hidrojen bağı etkileşimi yapan amino asit kalıntıları	Hidrofobik ve diğer etkileşimleri yapan amino asit kalıntıları
Tiyoüre	His407, His409, Ala440, His492, His519, His545, Gly550, Ala636	His407, His409, His492, His519, His545
K1	-	Ala16, Thr33, Val36, Pro743, Val744, Lys745
K7	Lys709	Ala16, Val36, Tyr32, Thr33, Ala37, Lys716, Asp730, Glu742, Pro743, Val744, Lys745

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamız kapsamında, daha güvenli ve daha etkili yeni α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz inhibitörü ilaçlarla birlikte anti-trombotik aktivite gösteren maddelere duyulan gereksinim dikkate alınarak, bu enzimler üzerine inhibitör aktivite gösterdiği ve antikoagülan etkiye sahip olduğu bilinen 7-hidroksi kumarin yapılarına, eter köprüsü aracılığıyla ftalonitril grubu bağlandı. Bu şekilde tasarlanan bileşiklerin, türevlendirilmesinde kumarin çekirdeğine 3. pozisyondan bağlı bulunan benzen halkasının para pozisyonu aracılığıyla 8 adet farklı kumarin-ftalonitril türevi sentezlendi ve olası etkilerinin ortaya çıkarılması hedeflendi. Bu 3. pozisyondaki benzen halkasına farklı grupların bağlanmasıyla aromatik/heteroaromatik halka üzerinde farklı biyolojik ve sterik özelliklere sahip sübstitüentleri içeren türevler sentezlendi.

Final bileşiklerimizin yapıları, spektral (FT-IR, ^1H NMR) analiz yöntemleriyle teyit edildi. Çalışmamızda sentezlenen K2, K3 ve K5 bileşikleri dışında kalan 5 adet bileşik yeni olup; K1, K4, K6, K7 ve K8 bileşiklerinin sentezleri, spektral bulguları ve biyolojik aktiviteleri ilk kez bu tez çalışması kapsamında rapor edilmektedir. K2, K3 ve K5 bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri de yine ilk kez tarafımızdan bildirilmektedir.

5.1. KUMARİN-FTALONİTRİL TÜREVLERİNİN SPEKTRAL BULGULARININ İNCELENMESİ

Bu tez çalışmasında, ilk olarak kumarin bileşikleri ve ardından kumarin-ftalonitril türevleri sentezlenmiştir.

Kumarin ve kumarin-ftalonitril türevlerinin FT-IR spektrumları incelendiğinde; hidroksi kumarin türevlerine ait karakteristik piklerden olan; hidroksi grubunun ($-\text{OH}$) piki ve karbonil grubunun ($-\text{C}=\text{O}$) piki sırasıyla 3300 cm^{-1} ve 1700 cm^{-1} civarlarında gelmektedir. Kumarin türevlerinin, 4-nitroftalonitril ile nükleofilik aromatik sübstitüsyon reaksiyonu sonucu, yeni elde edilen bileşiklerin, FT-IR spektrumları incelendiğinde hidroksi grubu kaybolmakta, onun yerine benzodinitril ve kumarine ait fenil halkası arasında eter köprüsü oluşmaktadır. Hidroksi grubuna ait pikin kaybolmasıyla beraber ftalonitril üzerinde bulunan nitril gruplarının spesifik piki olan nitril piki, yeni elde edilen yapıların, FT-IR spektrumlarında 2230 cm^{-1} civarlarında ($-\text{C}\equiv\text{N}$) ortaya çıkmıştır. Sentezlenen moleküller, aromatik halkalı

yapılar içermesinden kaynaklı aromatik C–H titreşimleri 3060 cm^{-1} civarlarında, alifatik C–H titreşimleri ise $2960\text{--}2870\text{ cm}^{-1}$ civarlarında gözlenmiştir. Hedef ürünlerinin FT-IR spektrumları, beklenen pik ve band değişimleri sonucu uygun piklerin görülmesiyle kumarin-ftalonitril türevlerinin sorunsuz sentezlendiği konusunda bir perspektif sunmaktadır.

Kumarin-ftalonitril türevlerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde;

K1 bileşiğinin yapı üzerinde herhangi bir alifatik grup olmamasından kaynaklı alifatik bölgede bir sinyal görülmedi. Aromatik bölgede ise $8.33\text{--}7.23\text{ ppm}$ aralığında 8 adet sinyal gözlemlendi ve bu sinyallere ait olan integrasyonlar, hidrojen sayıları ile uyumlu olduğu tespit edildi. K1 bileşiğinin gerektirdiği yarılmalara, spektrumda doğru şekilde gözlemlendi.

K2 bileşiğinin tolil grubuna ait olan metil, alifatik bölgede singlet olarak 2.36 ppm 'de sinyal verdi ve bu sinyalin integrasyonu ile uyumlu olduğu görüldü. Aromatik bölgede ise $8.29\text{--}7.19\text{ ppm}$ aralığında 7 adet sinyal izlendi. Bu sinyallere ait olan integrasyonlar, hidrojen sayıları ile uyumlu olduğu tespit edildi. K2 bileşiğinin gerektirdiği yarılmalara spektrumda doğru şekilde gözlemlendi.

K3 bileşiğinin metoksibenzen grubuna ait olan metil, singlet olarak alifatik bölgede 3.81 ppm 'de sinyal verdi ve sinyalin integrasyon sonucu uyumlu olarak görüldü. Aromatik bölgede ise $8.27\text{--}7.02\text{ ppm}$ aralığında 9 adet sinyal görüldü ve bu sinyallere ait olan integrasyonlar, hidrojen sayıları ile uyumlu olduğu tespit edildi. K3 bileşiğinin gerektirdiği yarılmalara spektrumda doğru şekilde gözlemlendi.

K4 bileşiğinin yapı üzerinde herhangi bir alifatik grup olmamasından kaynaklı alifatik bölgede bir sinyal görülmedi. Aromatik bölgede ise $8.53\text{--}7.16\text{ ppm}$ aralığında 9 adet sinyal izlendi ve bu sinyallere ait olan integrasyonlar, hidrojen sayıları ile uyumlu olduğu tespit edildi. K4 bileşiğinin gerektirdiği yarılmalara spektrumda doğru şekilde gözlemlendi.

K5 bileşiğinin yapı üzerinde herhangi bir alifatik grup olmamasından kaynaklı alifatik bölgede sinyal görülmedi. Aromatik bölgede ise $8.40\text{--}7.15\text{ ppm}$ aralığında 12 adet sinyal gözlemlendi ve bu sinyallerin integrasyonları, hidrojen sayıları ile uyumlu olduğu tespit edildi. K5 bileşiğinin gerektirdiği yarılmalara spektrumda doğru şekilde gözlemlendi.

K6 bileşiğinin *N,N*-dimetilamino grubunun metilleri, singlet olarak alifatik bölgede 3.36 ppm 'de sinyal verdi ve bu sinyale ait olan integrasyon uyumlu olarak görüldü. Aromatik

bölgede ise 8.20-6.79 ppm aralığında 7 adet sinyal görüldü ve bu sinyallerin integrasyonları, hidrojen sayıları ile uyumlu olduğu tespit edildi. K6 bileşiğinin gerektirdiği yarımalar spektrumda doğru şekilde gözlemlendi.

K7 bileşiğinin yapı üzerinde herhangi bir alifatik grup olmamasından kaynaklı alifatik bölgede sinyal görülmedi. Aromatik bölgede ise 8.34-7.23 ppm aralığında 8 adet sinyal görüldü ve bu sinyallere ait olan integrasyonlar, hidrojen sayıları ile uyumlu olduğu tespit edildi. K7 bileşiğinin gerektirdiği yarımalar spektrumda doğru şekilde gözlemlendi.

K8 bileşiğinin yapı üzerinde herhangi bir alifatik grup olmamasından kaynaklı alifatik bölgede sinyal görülmedi. Aromatik bölgede ise 8.37-7.21 ppm aralığında 8 adet sinyal gözlemlendi ve bu sinyallere ait olan integrasyonlar, hidrojen sayıları ile uyumlu olduğu tespit edildi. K8 bileşiğinin gerektirdiği yarımalar spektrumda doğru şekilde gözlemlendi.

5.2. KUMARİN-FTALONİTRİL TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTE BULGULARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Sentezlenen bileşiklerin α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz inhibitör aktiviteleri ile antikoagülasyon etkileri *in vitro* olarak tayin edildi. Enzim inhibisyon çalışmalarının yanında teorik olarak moleküler yerleştirme çalışmaları (*in silico*) ile kumarin türevlerinin, enzimlerle aktif bölge bağlanma enerjileri, ligand verimliliği değerleri, konformasyonları ve amino asit kalıntıları ile etkileşim türleri belirlendi.

Tez çalışmaları sırasında kullanılan kumarin-ftalonitril türevlerinin çözücüsü olarak tercih edilen DMSO'nun, enzimleri belli oranlarda inhibe ettiği görüldü. Bu yüzden tüm ölçümlerde çözücünden kaynaklı olumsuzlukları gözlemleyebilmek ve giderebilmek için kontrol çözeltileri hazırlandı ve tüm hesaplamalar buna göre yapıldı. Ayrıca yine enzim inhibisyonu ile ilgili yapılan çalışmalar sırasında bazı kumarin türevlerinin yüksek konsantrasyondaki çözeltilerinin, reaksiyon karışımı içerisinde tampon çözeltiden kaynaklı sulu ortam olması sebebiyle çöktükleri görüldü. Bu nedenle enzim inhibisyon çalışmaları sırasında her bir kumarin için tek bir konsantrasyon referans alınmadı, kullanılan kumarinlerin farklı konsantrasyon aralıkları ile ölçümler gerçekleştirildi.

α -Amilaz enziminin inhibisyon çalışmalarında, bileşiklerin enzim aktivitesinin %50'sini inhibe eden madde konsantrasyonları (IC_{50} ; μM), Tablo 4.5'te verildi. Sonuçlar, bu bileşiklerin enzimin bilinen inhibitörü olan akarboz ile kıyaslandığında belirgin bir α -amilaz

inhibitör aktivite taşımadığını göstermektedir. Buna göre, bileşiklerimizin (K1-K7) IC_{50} değeri 3351.32-9578.85 μM arasında değişen değerlerde ve referans bileşik olan akarbozdan (IC_{50} değeri 82.15 μM) daha düşük aktivite göstermişlerdir. K2 bileşiği, diğer bileşiklere kıyasla daha yüksek inhibisyon aktivitesi vardır ($IC_{50} = 3351.32 \mu M$), ancak akarboza kıyasla yeterli seviyede değildir. Akarboz, yapısı gereği büyük bir moleküldür (molekül ağırlığı fazla) ve polaritesi çok yüksektir. Bileşiklerimiz, akarboz kadar yüksek moleküler ağırlığa ve polariteye sahip değildir. Bu sebeplerden dolayı bileşiklerin, enzimin aktif bölgesi ile akarboz kadar etkileşime giremediğini ve bağlanmanın gerçekleşmediğini söyleyebiliriz.

α -Glukozidaz enziminin inhibisyon çalışmalarında, bileşiklerin α -glukozidaz enzim aktivitesinin %50'sini inhibe eden madde konsantrasyonları (IC_{50} ; μM), Tablo 4.6'te verildi. Sonuçlar, bu grup bileşiklerin enzimin bilinen inhibitörü olan kuarsetin ile kıyaslandığında belirgin bir α -glukozidaz inhibitör aktivite taşıdığını göstermektedir. α -Glukozidaz enziminin bilinen inhibitörü kuarsetinin IC_{50} değeri 1076.80 μM olarak bulundu. K1, K2, K4 ve K8 bileşiklerinin α -glukozidaz enzimine karşı IC_{50} değerleri sırasıyla 1056.31 μM , 612.85 μM , 731.12 μM ve 560.61 μM olarak belirlendi. Bu bileşiklerin, kuarsetine kıyasla daha düşük IC_{50} değerlerine sahip oldukları ve dolayısıyla yüksek derecede inhibitör etki gösterdikleri görüldü.

Bileşiklerin, α -glukozidaz enzimi ile *in silico* çalışmaları incelendiğinde; inhibitör moleküllerinin, enzimin aktif bölgeye bağlanma enerjileri ve ligand verimliliği değerleri Tablo 4.3'te verildi. Ayrıca bu inhibitör moleküllerinin aktif bölgede bulunan amino asit kalıntıları ile yapmış oldukları etkileşim türleri Tablo 4.10'da gösterildi. Enzimin bilinen inhibitörü olan kuarsetinin sahip olduğu benzen halkaları enzimin aktif bölgesinde bulunan Thr33, Val36, Phe712 ve Lys716 amino asit kalıntıları ile hidrofobik etkileşimleri yaptığı belirlendi. Molekülün sahip olduğu hidroksil gruplarının, hidrojen bağı yapabilme potansiyelleri moleküler yerleştirme sonucunda Glu718 ve Asp730 amino asit kalıntıları ile yaptığı hidrojen bağları ile görüldü. K1, K2, K4 ve K8 bileşiklerinde düzlemsel olarak bulunan ve birbirine kaynaşmış olan iki halkanın genel olarak enzimin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları ile hidrofobik etkileşimlerde oldukları görülmektedir. Ayrıca tüm bileşikler için yüksek oranlarda van der Waals etkileşimleri mevcuttur. Yapıların 3. pozisyonunda var olan benzen halkasının, K1, K2, K4 ve K8 bileşikleri için enzimin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları ile pi-kasyon veya pi-anyon etkileşimleri yaptığı görülmektedir. Yine bu bileşiklerin 7. pozisyonunda eter köprüsü ile bağlanmış olan ftalonitril grubunun hidrojen bağları yapabilme potansiyelleri vardır. K1 bileşiğinin, 3. pozisyonundaki benzen halkasının pi-kasyon ve pi-anyon

etkileşimlerinin (Asp69, Asp215, Glu277, Arg442) daha baskın oldukları görülmektedir. Piron halkasındaki oksijen atomunun ve ftalonitril grubunun sahip olduğu azot atomunun hidrojen bağı etkileşimleri (Lys156 ve Gln279) mevcuttur. K2 bileşiğinin, 3. pozisyonundaki benzen halkasının pi-anyon etkileşimi (Asp352) ve kumarin halkasının sahip olduğu çifte bağlı oksijen atomu ile birlikte ftalonitril grubunun azot atomunun hidrojen bağı etkileşimleri (Lys156 ve Gln279) olduğu tespit edildi. K4 bileşiğinin, 3. pozisyonundaki benzen halkasının ve ftalonitril halkasının pi-anyon etkileşimleri (Asp307 ve Asp352) vardır. Ayrıca 3. pozisyondaki benzen halkasına bağlı olarak bulunan nitro grubuna ait oksijen atomunun, hidrojen bağı yaptığı (Arg442) görülmektedir. K8 bileşiğinin, 3. pozisyonundaki benzen halkasının pi-anyon etkileşimi (Glu277) vardır. Bileşiğin ayrıca ftalonitril grubu azotlarının her ikisinin de hidrojen bağları yaptıkları (Lys156, Ser240) görülmektedir.

Tüm bu etkileşimler göz önüne alındığında; K1, K2, K4 ve K8 türevlerinin, enzimin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları ile benzer etkileşimler yaptıkları belirlendi. Bu etkileşim türleri arasında, en kuvvetli etkileşim olan hidrojen bağının, α -glukozidaz inhibisyonunda kilit role sahip olduğunu söyleyebiliriz. K1, K2, K4 ve K8 bileşiklerinin amino asit kalıntıları ile hidrojen bağları mevcuttur. Ancak hidrojen bağlarının mesafelerinin ve sayılarının farklı olduğu görülmektedir. K1 için; 2 (Lys156 [2.83 Å] ve Gln259 [2.62 Å]), K2 için; 2 (Lys156 [2.44 Å] ve Gln279 [2.36 Å]), K4 için; 1 (Arg442 [2.28 Å]) ve K8 için; 3 (Lys156 [2.41 Å ve 2.45 Å] ve Ser240 [2.85 Å]) olmak üzere hidrojen bağları ve mesafeleri mevcuttur. Ayrıca, moleküler yerleştirme sonucunda elde edilen, en düşük bağlanma enerjisi ve ligand verimliliği değerleri beraber incelendiğinde, *in vitro* olarak en aktif bulunan K8 bileşiğinin *in silico* olarak da diğer bileşikler ile kıyaslanması sonucu, daha kararlı konformasyona ve amino asit kalıntıları ile daha kuvvetli etkileşimleri olduğu görülmektedir.

Üreaz enziminin inhibisyon çalışmalarında, bileşiklerin üreaz enzim aktivitesinin %50'sini inhibe eden madde konsantrasyonları (IC_{50} ; μM), Tablo 4.7'te verildi. Enzimin bilinen inhibitörü olan tiyoürenin, IC_{50} değeri 2887.95.80 μM olarak bulundu. K1 ve K7 bileşiğinin üreaz enzime karşı IC_{50} değerleri sırasıyla 2728.92 μM ve 1163.89 μM olarak belirlendi. Bu bileşiklerin tiyoüre ile kıyaslandığında daha düşük IC_{50} değerine sahip oldukları ve dolayısıyla daha yüksek derecede inhibitör etki gösterdikleri saptandı.

Üreaz enziminin *in silico* çalışmalarında; inhibitör moleküllerinin enzimin aktif bölgesine bağlanma enerjileri ve ligand verimliliği değerleri Tablo 4.4'te verildi. Ayrıca

inhibitör moleküllerinin aktif bölgede bulunan amino asit kalıntıları ile yapmış oldukları etkileşim türleri Tablo 4.7’de gösterildi. Referans molekül olarak kullanılan tiyoürenin sahip olduğu azot atomları, hidrojen bağları (His407, His409, Ala440, His492, His519, His545, Gly550, Ala636) ve kükürt atomu ise pi-sülfür etkileşimleri (His407, His409, His492, His519, His545) yaptıkları görülmektedir.

Üreaz enzimi üzerine deneysel olarak en etkili bulunan K7 bileşiğinin, lineer ve birbiri ile kaynaşmış iki halkası, üreaz enziminin aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları ile hidrofobik etkileşimler ve pi-anyon/pi-kasyon etkileşimleri yaptıkları belirlendi. Kumarin halkasına 3. pozisyondan bağlı bulunan benzen halkasının ve 7.grubundan bağlı olan ftalonitril grubunun, hidrofobik ve pi-kasyon etkileşimlerine katkıda bulunduğu tespit edildi. Ayrıca bu halkaya bağlı olarak bulunan flor atomu Lys709 kalıntısı ile hidrojen bağı (2.22 Å) yapmaktadır. K1 bileşiği ise enzimin aktif bölgesinde pi-anyon, pi-sigma ve pi-alkil gibi hidrofobik etkileşimleri yaptığı belirlendi. Tüm bu etkileşimler ile birlikte *in silico* ve *in vitro* çalışmalar göz önüne alındığına K7 bileşiğinin hem tiyoüre hem de K1 bileşiğine kıyasla farklı etkileşim türlerine ve hidrojen bağına sahip olması onun enzimin aktif bölgesinde daha kararlı olarak tutunmasına ve yüksek inhibitör etki göstermesine neden olduğunu söyleyebiliriz.

Kumarin türevlerinin anti-trombotik aktivite çalışmaları doku faktörünün pıhtılaşma süresi hesaplanarak yapıldı. Yapılan pıhtılaşma süresi denemelerinde kumarin türevlerinin farklı konsantrasyonları ile çalışıldı. Bu konsantrasyonlar arasından tüm bileşikler için aktivasyon veya inhibisyon etki gösterdiği ortak konsantrasyon belirlendi (800 µM). K1, K4, K5 ve K8 bileşiklerinin kontrole kıyasla pıhtılaşma süresini uzatmadığı saptandı. K2, K3, K6 ve K7 bileşiklerinin kontrole kıyasla pıhtılaşma süresini uzattıkları tespit edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında 8 kumarin-ftalonitril türevinin anti-diyabetik, anti-koagülasyon etkileri ile birlikte bakteri kolonizasyonu üzerinde etkili olan üreaz enzimi üzerine aktiviteleri araştırıldı. Bu 8 bileşiğin 5 tanesi (K1, K4, K6, K7 ve K8) ilk kez sentezlenerek literatüre kazandırıldı. Literatürde daha önce sentezlenmiş olan üç bileşiğin ise (K2, K3 ve K5) çalışma konusundaki biyolojik aktivitelere olan etkisi ilk kez olarak araştırıldı.

Tez kapsamında sentezlenen kumarin türevlerinin *in vitro* ve *in silico* çalışmalar neticesinde; α -amilaz enzimi üzerine inhibitör aktivitelerinin, enzimin bilinen inhibitörü olan akarboza kıyasla daha yüksek etki göstermedikleri belirlenmiştir. Ayrıca, K1-K8 bileşiklerimizin arasından, K1 ve K2 yapılarının diğer kumarin türevlerine kıyasla daha düşük IC_{50} değerine sahip oldukları tespit edildi (IC_{50} değerleri arasındaki ilişki; Akarboz<K2<K5<K1<K6<K3<K4<K7). K8 bileşiğinin α -amilaz inhibitör aktivitesinin çok düşük olmasından kaynaklı, enzimi etkilemediği sonucuna varıldı.

K1, K2, K4 ve K8 türevlerinin α -glukozidaz enzimi için yapılan *in vitro* ve *in silico* çalışmalar sonucunda; bileşiklerin, α -glukozidaz enzim aktivitesini, bilinen inhibitörü olan kuarsetinden daha düşük bir IC_{50} değeri ile inhibe ettikleri gösterildi. Moleküler yerleştirme sonuçlarında, enzimin aktif bölgesinde bulunan amino asit kalıntıları ile etkileşim türleri, konformasyonları ve bağlanma enerjileri belirlendi. Bu değerlendirmeler ışığında; K1, K2, K4 ve K8 moleküllerinin yüksek inhibitör etki gösterdikleri sonucuna varıldı. Bu bileşikler içerisinde K8, serinin en aktif bileşiği olarak tespit edildi (IC_{50} değerleri arasındaki ilişki; K8<K2<K4<K1<Kuarsetin<K5<K7<K6<K3).

Üreaz enziminin *in vitro* çalışmalar neticesinde; K3, K4, K6 ve K8 bileşiklerinin çok yüksek IC_{50} değerlerine sahip olmaları nedeniyle enzim aktivitesi üzerine etki etmedikleri belirlendi. K1 ve K7 bileşiklerinin, üreaz enzimi ile yapılan *in vitro* ve *in silico* çalışmalar sonucunda; enzimin bilinen inhibitörü olan tiyoüre ile kıyaslandığında daha kuvvetli etki gösterdikleri bulundu (IC_{50} değerleri arasındaki ilişki; K7<K1<Tiyoüre<K2<K5).

Kumarin bileşiklerinin tromboplastik aktivite üzerine olan etkileri incelendiğinde; K2, K3, K6 ve K7 bileşiklerinin pıhtılaşma süresini uzattıkları bulundu. Bu kumarin türevlerinin pıhtılaşma mekanizması üzerinde etkilerinin olabileceği ve bu tür bileşiklerin antikoagülant madde olarak kullanılabileceklerini söyleyebiliriz.

Bütün bu sonuçlar değerlendirildiğinde; çalışmamızda kullanılan ve yüksek aktiviteye sahip olan kumarin-ftalonitril türevlerinin antikoagülan, anti-diyabetik ve anti-bakteriyel ajanlar olması nedeniyle yeni ilaçların geliştirilmesinde ve hastalıkların tedavisinde potansiyel aday oldukları düşünülmektedir. Tez çalışmamızdan elde edilen verilerin, potansiyel α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz inhibitörü olan ayrıca anti-trombotik aktivite gösteren yeni bileşiklerin tasarımıda araştırmacılara yol gösterici olacaktır. Bileşiklerin sentezleri ile biyolojik aktiviteleri ilk kez bu çalışma ile rapor edilmiştir. Bu bilgiler ışığında, özgün değere sahip olan tez çalışmamızın, literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızın devamında, yüksek aktiviteye sahip bileşiklerimizin moleküler simülasyon yöntemi ile daha ileri enzim-ligand etkileşimleri araştırılacaktır. Kumarin-ftalonitril türevlerimizin, α -amilaz, α -glukozidaz ve üreaz enzimleri için inhibisyon mekanizmaları ve geri dönüşümlülükleri incelenecektir. Ayrıca, bileşiklerimizin *in vivo* çalışmaları ile toksisite denemelerinin yapılması hedeflerimiz arasındadır.

KAYNAKLAR

Abid, O. U. R., Daud, S., Sardar, A., Rehman, W., Wadood, A., Rehman, A. U., Akhter, T., Bibi, I., Ahmad, Z., & Yasir, M., 2021, Synthesis, urease inhibition screening and molecular docking studies of piperonal based imine derivatives, *Medicinal Chemistry Research*, 30, 226-235.

Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. Z., 1998, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, Provisional report of a WHO consultation, *Diabetic Medicine*, 15 (7), 539-553.

Alcántara, A. R., Hernaiz, M. J., & Sinisterra, J. V. 2011, *Biocatalyzed production of fine chemicals*, Comprehensive biotechnology (Second Edition), Moo-Young, M. (ed.), 3.28, Pergamon, ISBN: 9780080885049, 309-331.

Almonacid, D. E., & Babbitt, P. C., 2011, Toward mechanistic classification of enzyme functions, *Current Opinion in Chemical Biology*, 15 (3), 435-442.

Alomari, M., Taha, M., Imran, S., Jamil, W., Selvaraj, M., Uddin, N., & Rahim, F., 2019, Design, synthesis, in vitro evaluation, molecular docking and ADME properties studies of hybrid bis-coumarin with thiadiazole as a new inhibitor of urease, *Bioorganic Chemistry*, 92, 103235.

Aman, H., Rashid, N., Ashraf, Z., Bibi, A., Chen, H. T., & Sathishkumar, N., 2020, Synthesis, density functional theory (DFT) studies and urease inhibition activity of chiral benzimidazoles, *Heliyon*, 6 (10), e05187.

Association, A. D., 2014, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care*, 37, 81-90.

Amtul, Z., Siddiqui, R. A., & Choudhary, M. I., 2002, Chemistry and mechanism of urease inhibition, *Current Medicinal Chemistry*, 9 (14), 1323-1348.

Ar, C., 2012, K vitaminine bağlı koagülasyon faktörü bozuklukları ve tedavisi, *Türk Hematoloji Derneği*, 2 (2), 132-140.

Asakura, H., & Ogawa, H., 2021, COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation, *International Journal of Hematology*, 113, 45-57.

Atalan, N., 2013, Hemostaz, *Göğüs Kalp Damar Anestezi Dergisi*, 19 (3), 109-112.

Atamer, T., 2006, Hemostaz mekanizması, Türk hematoloji derneği - temel hemostaz tromboz kursu, *Türk Hematoloji Derneği*, 7-12.

Au, N., & Rettie, A. E., 2008, Pharmacogenomics of 4-hydroxycoumarin anticoagulants, *Drug Metabolism Reviews*, 40 (2), 355-375.

Auiewiriyankul, W., Saburi, W., Kato, K., Yao, M., & Mori, H., 2018, Function and structure of GH 13_31 α -glucosidase with high α -(1 $\rightarrow$ 4)-glucosidic linkage specificity and transglucosylation activity, *FEBS Letters*, 592.13, 2268-2281.

Baier, F., & Tokuriki, N., 2014, Connectivity between catalytic landscapes of the metallo- β -lactamase superfamily, *Journal of Molecular Biology*, 426 (13), 2442-2456.

Balasubramanian, A., & Ponnuraj, K., 2010, Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure, *Journal of Molecular Biology*, 400 (3), 274-283.

Bashton, M., & Chothia, C., 2007, The generation of new protein functions by the combination of domains, *Structure*, 15 (1), 85-99.

Bastaki, S., 2005, Diabetes mellitus and its treatment, *Dubai Diabetes and Endocrinology Journal*, 13, 111-134.

Bernfeld, P., 1955, Amylase, α and β , *Methods in enzymology*, 1, 149-158.

Bhagavan, N. V., 2002, *Enzymes I: General properties, kinetics, and inhibition*, Medical biochemistry (Fourth Edition), Bhagavan, N. V. (ed.), Chapter 6, Academic Press, Hawaii, USA, ISBN: 9780120954407, 85-108.

Bhutkar, M. A., & Bhise, S. B., 2012, *In vitro* assay of alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants, *International Journal of Chemical Sciences*, 10 (1), 457-462.

Bischoff, H., 1995, The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes, *Medecine Clinique et Experimentale*, 18 (4), 303-311.

Bisswanger, H., 2014, Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1 (1-6), 41-55.

Bridge, K. I., Philippou, H., & Ariëns, R. A., 2014, Clot properties and cardiovascular disease, *Thrombosis and Haemostasis*, 112 (11), 901-908.

Brown, A. J., 1902, XXXVI.—Enzyme action, *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 81, 373-388.

Burne, R. A., & Chen, Y. Y. M., 2000, Bacterial ureases in infectious diseases, *Microbes and Infection*, 2 (5), 533-542.

Butterworth, P. J., Bajka, B. H., Edwards, C. H., Warren, F. J., & Ellis, P. R., 2022, Enzyme kinetic approach for mechanistic insight and predictions of *in vivo* starch digestibility and the glycaemic index of foods, *Trends in Food Science and Technology*, 120, 254-264.

Cardullo, N., Muccilli, V., Pulvirenti, L., Cornu, A., Pouységu, L., Deffieux, D., Quideau, S., & Tringali, C., 2020, C-glucosidic ellagitannins and galloylated glucoses as potential functional food ingredients with anti-diabetic properties: A study of α -glucosidase and α -amylase inhibition, *Food Chemistry*, 313, 126099.

Carneiro, A., Matos, M. J., Uriarte, E., & Santana, L., 2021, Trending topics on coumarin and its derivatives in 2020, *Molecules*, 26 (2), 501.

Chapman-Smith, A., & Cronan, J. E., 1999, The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity, *Trends in Biochemical Sciences*, 24 (9), 359-363.

Chaudhry, R., Usama, S. M., & Babiker, H., M., 2022, *Physiology, coagulation pathways*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/?report=printable>, [Ziyaret Tarihi: 03 Şubat 2023].

Chen, A., Stecker, E., & A. Warden, B., 2020, Direct oral anticoagulant use: a practical guide to common clinical challenges, *Journal of the American Heart Association*, 9 (13), e017559.

Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., & Laakso, M., 2002, Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial, *The Lancet*, 359 (9323), 2072-2077.

Choudhury, A. K. R., 2020, *Introduction to enzymes*, Sustainable technologies for fashion and textiles, Nayak, R. (ed.), 4, Woodhead Publishing, West Bengal, ISBN: 9780081028674, 75-90.

Chronopoulou, E. G., & Labrou, N. E., 2009, Glutathione transferases: emerging multidisciplinary tools in red and green biotechnology, *Recent Patents on Biotechnology*, 3 (3), 211-223.

Chylova, M., Motovska, Z., Fialova, A., Stetkarova, I., Peisker, T., & Kalvach, P., 2021, The effect of warfarin administration on platelet aggregation, *Bratislava Medical Journal*, 122 (5), 320-324.

Cisneros-Yupanqui, M., Lante, A., Mihaylova, D., Krastanov, A. I., & Rizzi, C., 2023, The α -amylase and α -glucosidase inhibition capacity of grape pomace: a review, *Food and Bioprocess Technology*, 16 (4), 691-703.

Clemens, D. L., Lee, B. Y., & Horwitz, M. A., 1995, Purification, characterization, and genetic analysis of Mycobacterium tuberculosis urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction, *Journal of Bacteriology*, 177 (19), 5644-5652.

Cook, P. F., & Cleland, W. W., 2007, *Enzyme kinetics and mechanism*, Garland Science, Michigan University, ISBN: 9780815341406.

Copley, S. D., 2020, Evolution of new enzymes by gene duplication and divergence, *The FEBS Journal*, 287 (7), 1262-1283.

Cornish-Bowden, A., 2014, Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics, *Perspectives in Science*, 1 (1-6), 74-87.

Cuesta, S. M., Rahman, S. A., Furnham, N., & Thornton, J. M., 2015, The classification and evolution of enzyme function, *Biophysical Journal*, 109 (6), 1082-1086.

Çapan, İ., 2022, Methimazole analogs as urease inhibitors: synthesis, *in silico* and *in vitro* evaluation, *Chemistry Select*, 7 (4), e202104076.

Dabhi, A. S., Bhatt, N. R., & Shah, M. J., 2013, Voglibose: an alpha glucosidase inhibitor, *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 7 (12), 3023.

De Bolster, M. W. G., 1997, Glossary of terms used in bioinorganic chemistry (IUPAC recommendations 1997), *Pure and Applied Chemistry*, 69 (6), 1251-1304.

de Groot, P. G., Urbanus, R. T., & Roest, M., 2012, Platelet interaction with the vessel wall, *Antiplatelet Agents*, 87-110.

de Souza Vandenberghe, L. P., Karp, S. G., Pagnoncelli, M. G. B., von Linsingen Tavares, M., Junior, N. L., Diestra, K. V., Viesser, J. A., & Soccol, C. R., 2020, *Classification of enzymes and catalytic properties*, Biomass, Biofuels, Biochemicals, Sudhir, P., Pandey, S. A., Singhania, R. R., Larroche, C., Li, Z. (ed.), Chapter 2, Elsevier, Florianopolis, ISBN: 9780128198209, 11-30.

Doust, J. A., Bonner, C., & Bell, K. J., 2020, Future directions in cardiovascular disease risk prediction, *Australian Journal of General Practice*, 49 (8), 488-494.

Dybkær, R., 2001, Unit" katal" for catalytic activity (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 73 (6), 927-931.

Egan, D., O'Kennedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., & Thornes, R. D., 1990, The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds, *Drug Metabolism Reviews*, 22 (5), 503–529.

Eisenthal, R., & Danson, M. J., 2002, *Enzyme assays: a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, U. K., ISBN: 9780199638215.

Engelking, L. R., 2015, *Enzyme Kinetics*, Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition), Engelking, L. R. (ed.), Chapter 6, Academic Press, North Grafton, ISBN: 9780123919090, 32-38.

Etsassala, N. G., Badmus, J. A., Waryo, T. T., Marnewick, J. L., Cupido, C. N., Hussein, A. A., & Iwuoha, E. I., 2019, Alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities of novel abietane diterpenes from *Salvia africana-lutea*, *Antioxidants*, 8 (10), 421.

Fischer, E., 1894, Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 27 (3), 2985-2993.

Folina, A., Tataridas, A., Mavroeidis, A., Kousta, A., Katsenios, N., Efthimiadou, A., Travlos, I. S., Roussis, I., Darawsheh, M. K., Papastylianou, P., & Kakabouki, I., 2021, Evaluation of various nitrogen indices in N-Fertilizers with inhibitors in field crops: A review, *Agronomy*, 11 (3), 418.

Francula-Zaninovic, S., & Nola, I. A., 2018, Management of measurable variable cardiovascular disease'risk factors, *Current Cardiology Reviews*, 14 (3), 153-163.

Freilich, S., Spriggs, R. V., George, R. A., Al-Lazikani, B., Swindells, M., & Thornton, J. M., 2005, The complement of enzymatic sets in different species, *Journal of Molecular Biology*, 349 (4), 745-763.

Gale, A. J., 2011, Continuing education course# 2: current understanding of hemostasis, *Toxicologic Pathology*, 39 (1), 273-280.

Gao, J., Xu, P., Wang, Y., Wang, Y., & Hochstetter, D., 2013, Combined effects of green tea extracts, green tea polyphenols or epigallocatechin gallate with acarbose on inhibition against α -amylase and α -glucosidase in vitro, *Molecules*, 18 (9), 11614-11623.

Garazd, Y. L., Kornienko, E. M., Maloshtan, L. N., Garazd, M. M., & Khilya, V. P. 2005, Modified coumarins. 17. Synthesis and anticoagulant activity of 3, 4-cycloannelated coumarin D-glycopyranosides, *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 508-512.

Gebauer, M., 2007, Synthesis and structure–activity relationships of novel warfarin derivatives, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15 (6), 2414-2420.

Gezer, S., 2012, Koagülasyon testlerinin klinikte kullanımı, *Türk Hematoloji Derneği*, 2 (2), 8-23.

Gharraavi, A. M., Jafar, A., Ebrahimi, M., Mahmodi, A., Pourhashemi, E., Haseli, N., Talaie, N., & Hajiasgarli, P., 2018, Current status of stem cell therapy, scaffolds for the treatment of diabetes mellitus, *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 12 (6), 1133-1139.

Goldenberg, R., & Punthakee, Z., 2013, Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome, *Canadian Journal of Diabetes*, 37, 8-11.

Guengerich, F. P. 2018, *Mechanisms of enzyme catalysis and inhibition*, Comprehensive Toxicology (Third Edition), McQueen, C. A. (ed.), 10.03, Elsevier Science, United-States, ISBN: 9780081006016, 45-53.

Hameed, A., Yaqub, M., Hussain, M., Hameed, A., Ashraf, M., Asghar, H., Ain, Q., Naseer, M. M., Mahmood, K., Muddassar, M., Tahir, N. M., & Shafiq, Z., 2016, Coumarin-based thiosemicarbazones as potent urease inhibitors: synthesis, solid state self-assembly and molecular docking, *RSC Advances*, 6 (68), 63886-63894.

Hanif, M., Shoaib, K., Saleem, M., Hasan Rama, N., Zaib, S., & Iqbal, J., 2012, Synthesis, urease inhibition, antioxidant, antibacterial, and molecular docking studies of 1, 3, 4-oxadiazole derivatives, *International Scholarly Research Notices*, 2012, 1-9.

Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R., 2012, Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *Journal of Cheminformatics*, 4 (1), 1-17.

Hendaus, M. A., & Jomha, F. A., 2022, From COVID-19 to clot: the involvement of the complement system, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40 (4), 1909-1914.

Henri, V., 1903, Lois générales de l'action des diastases, *Librairie Scientifique A, Hermann*.

Henri, V., 2006, General theory of the action of some glycoside hydrolases, *Comptes Rendus Biologies*, 329 (1), 47-50.

Holliday, G. L., Rahman, S. A., Furnham, N., & Thornton, J. M. 2014, Exploring the biological and chemical complexity of the ligases, *Journal of Molecular Biology*, 426 (10), 2098-2111.

Hu, L. T., & Mobley, H. L., 1990, Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*, *Infection and Immunity*, 58 (4), 992-998.

Hult, K., & Berglund, P., 2007, Enzyme promiscuity: mechanism and applications, *Trends in Biotechnology*, 25 (5), 231-238.

Hurrell, R. F., & Finot, P. A., 1984, Nutritional consequences of the reactions between proteins and oxidized polyphenolic acids, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 177, 423-435.

Iba, T., & Levy, J. H., 2018, Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 16 (2), 231-241.

Ibrar, A., Shehzadi, S. A., Saeed, F., & Khan, I., 2018, Developing hybrid molecule therapeutics for diverse enzyme inhibitory action: Active role of coumarin-based structural leads in drug discovery, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26 (13), 3731-3762.

Ighodaro, O. M., 2018, Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 656-662.

Ingram, G. C., & Hills, M., 1976, Reference method for the one-stage prothrombin time test on human blood, *Thrombosis and Haemostasis*, 36 (1), 237-238.

Iranshahi, M., Askari, M., Sahebkar, A., & Adjipavlou-Litina, D., 2009, Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17 (2), 99-103.

Islam, M., Khan, A., Shehzad, M. T., Hameed, A., Ahmed, N., Halim, S. A., Khiat, M., Anwar, M. U., Hussain, J., Csuk, R., Shafiq, Z., & Al-Harrasi, A., 2019, Synthesis and characterization of new thiosemicarbazones, as potent urease inhibitors: *In vitro* and *in silico* studies, *Bioorganic Chemistry*, 87, 155-162.

Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P., & Karplus, P. A., 1995, The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*, *Science*, 268 (5213), 998-1004.

Jain, P. K., & Joshi, H., 2012, Coumarin: chemical and pharmacological profile, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2 (6), 236-240.

Johnson, K. A., & Goody, R. S., 2011, The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper, *Biochemistry*, 50 (39), 8264-8269.

Karplus, P. A., Pearson, M. A., & Hausinger, R. P., 1997, 70 years of crystalline urease: what have we learned?, *Accounts of Chemical Research*, 30 (8), 330-337.

Karthic, K., Kirthiram, K. S., Sadasivam, S., Thayumanavan, B., & Palvannan, T., 2008, Identification of amylase inhibitors from *Syzygium cumini* Linn seeds, *Indian Journal of Experimental Biology*, 46, 677-680.

Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R., 2001, Applications of pectinases in the commercial sector: a review, *Bioresource Technology*, 77 (3), 215-227.

Kasperkiewicz, K., Ponczek, M. B., Owczarek, J., Guga, P., & Budzisz, E., 2020, Antagonists of vitamin K—popular coumarin drugs and new synthetic and natural coumarin derivatives, *Molecules*, 25 (6), 1465.

Kato, T., & Nagano, N., 2011, Discriminative structural approaches for enzyme active-site prediction, *BMC Bioinformatics*, 12 (1), 1-8.

Kaur, L., Shabnam, Ashish, S., & Singh, R., 2022, Alpha amylase inhibitor as an anti-diabetic potential from medicinal plants: A Review, *International Journal of Ayurvedic Medicine*, 13 (4), 925-932.

Kedderis, G. L., 2018, Toxicokinetics: *Biotransformation of Toxicants*, Comprehensive Toxicology (Third Edition), McQueen, C. A. (ed.), 1.07, Elsevier Science, Chapel Hill, NC, USA, ISBN: 9780081006016, 128-142.

Keller, M. A., Piedrafita, G., & Ralser, M. 2015, The widespread role of non-enzymatic reactions in cellular metabolism, *Current Opinion in Biotechnology*, 34, 153-161.

Kenakin, T. P., 2012, *Enzymes as Drug Targets*, Pharmacology in Drug Discovery, Kenakin, T. P. (ed.), Chapter 6, Academic Press, Chapel Hill, NC, USA, ISBN: 9780123848567, 105-124.

Kenakin, T. P., 2017, *Enzymes as Drug Targets*, Pharmacology in Drug Discovery and Development (Second Edition), Kenakin, T. P. (ed.), Chapter 6, Academic Press, Chapel Hill, NC, USA, ISBN: 9780128037522, 131-156.

Kermasha, S., & Eskin, M. N.A., 2021, *Enzymes*, Kermasha, S., & Eskin, M. N.A. (ed.), Chapter Two, Academic Press, Canada, ISBN: 9780128002179, 15-44.

Khan, I., Khan, A., Halim, S. A., Saeed, A., Mehsud, S., Csuk, R., Al-Harrasi, A., & Ibrar, A., 2020, Exploring biological efficacy of coumarin clubbed thiazolo[3, 2-b][1, 2, 4] triazoles as efficient inhibitors of urease: a biochemical and in silico approach, *International Journal of Biological Macromolecules*, 142, 345-354.

Knoevenagel, E., & Fries, A., 1898, Synthesen in der Pyridinreihe. Ueber eine Erweiterung von Malonester auf β -Amidocrotonester, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 31 (1), 767-776.

Koshland Jr, D. E., 1959, Enzyme flexibility and enzyme action, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 54 (S1), 245-258.

Koshland Jr, D. E., 1995, The key-lock theory and the induced fit theory, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33 (23-24), 2375-2378.

Kraut, D. A., Carroll, K. S., & Herschlag, D., 2003, Challenges in enzyme mechanism and energetics, *Annual Review of Biochemistry*, 72 (1), 517-571.

Krentz, A. J., & Bailey, C. J., 2005, Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus, *Drugs*, 65, 385-411.

Kuddus, M., 2019, *Introduction to food enzymes*, Enzymes in food biotechnology, Kuddus, M. (ed.), Chapter 1, Academic Press, Saudi Arabia, ISBN: 9780128132807, 1-18.

Kusters, J. G., Van Vliet, A. H., & Kuipers, E. J., 2006, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (3), 449-490.

Küpeli Akkol, E., Genç, Y., Karpuz, B., Sobarzo-Sánchez, E., & Capasso, R., 2020, Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer, *Cancers*, 12 (7), 1959.

LaPelusa, A., Dave, H. D., 2022, *Physiology, Hemostasis*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545263>, [Ziyaret Tarihi: 11 Mayıs 2023].

Lebovitz, H. E., 1997, Alpha-glucosidase inhibitors, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 26 (3), 539-551.

Lewis, N. E., Schramm, G., Bordbar, A., Schellenberger, J., Andersen, M. P., Cheng, J. K., Patel, N., Yee, A., Lewis, R. A., Eils, R., König, R., & Palsson, B. Ø., 2010, Large-scale in silico modeling of metabolic interactions between cell types in the human brain, *Nature Biotechnology*, 28 (12), 1279-1285.

Lineweaver, H., & Burk, D., 1934, The determination of enzyme dissociation constants, *Journal of the American Chemical Society*, 56 (3), 658-666.

Lippi, G., & Favaloro, E. J., 2018, Laboratory hemostasis: from biology to the bench, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 56 (7), 1035-1045.

Litwack, G., 2022, *Enzymes*, Human Biochemistry (Second Edition), Litwack, G. (ed.), Chapter 5, Academic Press, ISBN: 9780323857185, 109-146.

LiverTox, 2021, *Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31643176>, [Ziyaret Tarihi: 22 Mart 2023]

Mahindrakar, K. V., & Rathod, V. K., 2021, Antidiabetic potential evaluation of aqueous extract of waste *Syzygium cumini* seed kernel's by in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibition, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51 (6), 589-598.

Mahmood, N., 2016, A review of α -amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological state such as obesity and diabetes, *Comparative Clinical Pathology*, 25 (6), 1253-1264.

Makhlynets, O. V., Raymond, E. A., & Korendovych, I. V., 2015, Design of allosterically regulated protein catalysts, *Biochemistry*, 54 (7), 1444-1456.

Marín-Peñalver, J. J., Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., & del Cañizo-Gómez, F. J., 2016, Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus, *World Journal of Diabetes*, 7 (17), 354.

Martinez-Gonzalez, A. I., Díaz-Sánchez, Á. G., de la Rosa, L. A., Vargas-Requena, C. L., Bustos-Jaimes, I., & Alvarez-Parrilla, E., 2017, Polyphenolic compounds and digestive enzymes: *In vitro* non-covalent interactions, *Molecules*, 22 (4), 669.

Matos, M. J., Rodríguez-Enríquez, F., Vilar, S., Santana, L., Uriarte, E., Hripcsak, G., Estrada, M., Rodríguez-Franco, M.I., & Vina, D., 2015, Potent and selective MAO-B inhibitory activity: amino-versus nitro-3-arylcoumarin derivatives, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25 (3), 642-648.

Matsuo, T., Odaka, H., & Ikeda, H., 1992, Effect of an intestinal disaccharidase inhibitor (AO-128) on obesity and diabetes, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55 (1), 314-317.

Mazzei, L., Cianci, M., Benini, S., & Ciurli, S., 2019, The structure of the elusive urease-urea complex unveils the mechanism of a paradigmatic nickel-dependent enzyme, *Angewandte Chemie International Edition*, 58 (22), 7415-7419.

Mazzei, L., Ciurli, S., & Zambelli, B., 2016, *Isothermal titration calorimetry to characterize enzymatic reactions*, Methods in enzymology, Feig, A. L. (ed.), Chapter Nine, Academic Press, ISBN: 9780128029060, 215-236.

Mbachu, K. A., Umm, E., Khan, M. A., Hameed, S., Lateef, M., Atta, L., Ul-Haq, Z., Khan, K. M., & Ekundayo, O., 2023, Urease inhibitory activity on 1, 2, 3-triazoles-linked indomethacin derivatives; *In vitro* and *in silico* studies, *Journal of Molecular Structure*, 134945.

McDonald, A. G., & Tipton, K. F., 2014, Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties, *The FEBS Journal*, 281 (2), 583-592.

McDonald, A. G., Boyce, S., & Tipton, K. F., 2009, ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list, *Nucleic Acids Research*, 37 (suppl_1), 593-597.

Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M., 2011, Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery, *Current Computer-Aided Drug Design*, 7 (2), 146-157.

Menteşe, E., Karaali, N., Akyüz, G., Yılmaz, F., Ülker, S., & Kahveci, B., 2016, Synthesis and evaluation of α -glucosidase and pancreatic lipase inhibition by quinazolinone-coumarin hybrids, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 52, 1017-1024.

Miller, B. G., 2007, The mutability of enzyme active-site shape determinants, *Protein Science*, 16 (9), 1965-1968.

Mobley, H. L., & Hausinger, R. P., 1989, Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiological Reviews*, 53 (1), 85-108.

Modolo, L. V., da-Silva, C. J., Brandão, D. S., & Chaves, I. S., 2018, A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s, *Journal of Advanced Research*, 13, 29-37.

Mohiuddin, M., Arbain, D., Islam, A. K. M., Ahmad, M. S., & Ahmad, M. N., 2016, Alpha-glucosidase enzyme biosensor for the electrochemical measurement of antidiabetic potential of medicinal plants, *Nanoscale Research Letters*, 11 (1), 1-12.

Mojsov, K., 2011, Application of enzymes in the textile industry: a review, *II International congress engineering, ecology and materials in the processing industry*, 09-11 March 2011, Jahorina, Bosnia and Hercegovina, 230-239.

Moran, J. I., Cyras, V. P., Vazquez, A., & Foresti, M. L., 2011, Characterization of chemically modified potato starch films through enzymatic degradation, *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 217-224.

Moremen, K., Trimble, R. B., & Herscovics, A., 1994, Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway, *Glycobiology*, 4 (2), 113-125.

Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J., 2009, Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of Computational Chemistry*, 16, 2785-2791.

Moya-Alvarado, G., Yañez, O., Morales, N., González-González, A., Areche, C., Núñez, M. T., Fierro, A., & García-Beltrán, O., 2021, Coumarin-chalcone hybrids as inhibitors of MAO-B: Biological activity and *in silico* studies, *Molecules*, 26 (9), 2430.

Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E., 2022, Molecular docking: Principles, advances, and its applications in drug discovery, *Letters in Drug Design and Discovery*, 19, 1-16.

Mukherjee, S., Haubner, J., & Chakraborty, A., 2020, Targeting the inositol pyrophosphate biosynthetic enzymes in metabolic diseases, *Molecules*, 25 (6), 1403.

Murray, J. M., 1982, *The natural coumarins: occurrence chemistry and biochemistry*, Wiley-Blackwell, New Jersey, ISBN: 9780471280576.

Nawaz, M., Taha, M., Qureshi, F., Ullah, N., Selvaraj, M., Shahzad, S., Chigurupati, S., Abubshait, S. A., Ahmad, T., Chinnam, S., & Hisaindee, S., 2022, Synthesis, α -amylase and α -glucosidase inhibition and molecular docking studies of indazole derivatives, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40 (21), 10730-10740.

Nepal, M. R., Kang, M. J., Kim, G. H., Cha, D. C., Kim, J., & Jeong, T. C., 2020, Role of intestinal microbiota in metabolism of voglibose *in vitro* and *in vivo*, *Diabetes and Metabolism Journal*, 44 (6), 908-918.

Novichikhina, N., Ilin, I., Tashchilova, A., Sulimov, A., Kutov, D., Ledenyova, I., Krysin, M., Shikhaliev, K., Gantseva, A., Gantseva, E., Podoplelova, N., & Sulimov, V., 2020, Synthesis, docking, and *in vitro* anticoagulant activity assay of hybrid derivatives of pyrrolo [3, 2, 1-ij] quinolin-2 (1H)-one as new inhibitors of Factor Xa and Factor Fxii. *Molecules*, 25 (8), 1889.

Obiro, W. C., Zhang, T., & Jiang, B., 2008, The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor, *British Journal of Nutrition*, 100 (1), 1-12.

Opneja, A., Kapoor, S., & Stavrou, E. X., 2019, Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing, *Thrombosis Research*, 179, 56-63.

Ortiz-Andrade, R. R., Garcia-Jimenez, S., Castillo-Espana, P., Ramirez-Avila, G., Villalobos-Molina, R., & Estrada-Soto, S., 2007, α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent, *Journal of Ethnopharmacology*, 109 (1), 48-53.

Ouertani, A., Neifar, M., Ouertani, R., Masmoudi, A. S., Mosbah, A., & Cherif, A., 2019, Effectiveness of enzyme inhibitors in biomedicine and pharmacotherapy, *Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5, 85-90.

Palanisamy, S., Yien, E. L. H., Shi, L. W., Si, L. Y., Qi, S. H., Ling, L. S. C., Lun, T. W., & Chen, Y. N., 2018, Systematic review of efficacy and safety of newer antidiabetic drugs approved from 2013 to 2017 in controlling HbA1c in diabetes patients, *Pharmacy*, 6 (3), 57.

Parato, V. M., Notaristefani, C., D'Agostino, S., D'Emilio, V., Colella, S., Kadiyala, M., Pierantozzi, S., & Principi, T., 2021, COVID-19-related pericarditis with pericardial clotting as a hallmark: two cases and a review, *Journal of Cardiovascular Echography*, 31 (1), 1.

Paul, P. E. V., Sangeetha, V., & Deepika, R. G. 2019, Emerging trends in the industrial production of chemical products by microorganisms, *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 107-125.

Payen, A., & Persoz, J. F., 1833, Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions, et leurs applications aux arts industriels, *Annales de Chimie et de Physique*, 53 (2), 73-92.

Pechmann, V. H., 1884, Neue bildungsweise der cumarine. *Synthese des daphnetins. I. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 17 (1), 929-936.

Perkin, W. H., 1868, VI.—On the artificial production of coumarin and formation of its homologues, *Journal of the Chemical Society*, 21, 53-63.

Phutdhawong, W., Chuenchid, A., Taechowisan, T., Sirirak, J., & Phutdhawong, W. S., 2021, Synthesis and biological activity evaluation of coumarin-3-carboxamide derivatives, *Molecules*, 26 (6), 1653.

Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org>, [Ziyaret Tarihi: 07 Eylül 2022].

Prywer, J., Olszynski, M., & Mielniczek Brzóska, E., 2017, Green tea and struvite crystals in relation to infectious urinary stones: The role of (–)-epicatechin, *Crystal Growth and Design*, 17 (11), 5953-5964.

Purich, D. L., 2001, Enzyme catalysis: a new definition accounting for noncovalent substrate-and product-like states, *Trends in Biochemical Sciences*, 26 (7), 417-421.

Radulian, G., Rusu, E., Dragomir, A., & Posea, M., 2009, Metabolic effects of low glycaemic index diets, *Nutrition Journal*, 8, 1-8.

Reddy, N. S., Nimmagadda, A., & Rao, K. S., 2003, An overview of the microbial α -amylase family, *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 645-648.

Rick, W., & Stegbauer, H. P., 1974, *α -Amylase measurement of reducing groups*, Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition), Bergmeyer, H. U. (ed.), Volume 2, Academic Press, ISBN: 9780120913022, 885-890.

Robinson, P. K., 2015, Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays in Biochemistry*, 59, 1.

Roskoski, R., 2007, *Principles of Enzymes*, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, Enna, S. J., Bylund, D. B. (ed.), Principles of Enzymes, Elsevier, ISBN: 9780080552323, 1-5.

Salar, U., Taha, M., Khan, K. M., Ismail, N. H., Imran, S., Perveen, S., Gul, S., & Wadood, A., 2016, Syntheses of new 3-thiazolyl coumarin derivatives, in vitro α -glucosidase inhibitory activity, and molecular modeling studies, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 122, 196-204.

Scanlon, M. G., Henrich, A. W., & Whitaker, J. R., 2018, *Factors affecting enzyme activity in food processing*, Proteins in Food Processing, Yada R. Y. (ed.), 13, Woodhead Publishing, Sawston, ISBN: 9780081007228, 337-365.

Schomburg, I., Jeske, L., Ulbrich, M., Placzek, S., Chang, A., & Schomburg, D., 2017, The BRENDA enzyme information system—From a database to an expert system, *Journal of Biotechnology*, 261, 194-206.

Segel, I. H., 1993, *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, Wiley-Interscience, New Jersey, ISBN: 9780471303091.

Selvin, E., Marinopoulos, S., Berkenblit, G., Rami, T., Brancati, F. L., Powe, N. R., & Golden, S. H., 2004, Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus, *Annals of Internal Medicine*, 141 (6), 421-431.

Sengupta, B., Chakraborty, S., Crawford, M., Taylor, J. M., Blackmon, L. E., Biswas, P. K., & Kramer, W. H., 2012, Characterization of diadzein–hemoglobin binding using optical spectroscopy and molecular dynamics simulations, *International Journal of Biological Macromolecules*, 51 (3), 250-258.

Shivaprasad Shetty, M., Anil Kumar, H. S., & Anil Kumar, N. V., 2018, Synthesis and α -amylase inhibition studies of some coumarin derivatives, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 52, 526-530.

Shkoor, M., Mehanna, H., Shabana, A., Farhat, T., & Bani-Yaseen, A. D., 2020, Experimental and DFT/TD-DFT computational investigations of the solvent effect on the spectral properties of nitro substituted pyridino [3, 4-c] coumarins, *Journal of Molecular Liquids*, 313, 113509.

Smith, S. A., Travers, R. J., & Morrissey, J. H., 2015, How it all starts: Initiation of the clotting cascade, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 50 (4), 326-336.

Sørensen, S. H., Norén, O., Sjöström, H., & Danielsen, E. M., 1982, Amphiphilic pig intestinal microvillus maltase/glucoamylase: structure and specificity, *European Journal of Biochemistry*, 126 (3), 559-568.

Sousa, S. F., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J., 2006, Protein–ligand docking: current status and future challenges, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65 (1), 15-26.

Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C., 2021, Use of molecular docking computational tools in drug discovery, *Progress in Medicinal Chemistry*, 60, 273-343.

Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N., Krüger, A., Alam, M. T., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M., 2015, The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway, *Biological Reviews*, 90 (3), 927-963.

Sumner, J. B., 1926, The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper, *Journal of Biological Chemistry*, 69 (2), 435-441.

Sun, H., Song, X., Tao, Y., Li, M., Yang, K., Zheng, H., Jin, Z., Dodd, R. H., Pan, G., Lu, K., & Yu, P., 2018, Synthesis & α -glucosidase inhibitory & glucose consumption-promoting activities of flavonoid–coumarin hybrids, *Future Medicinal Chemistry*, 10 (9), 1055-1066.

Sun, L., & Miao, M., 2020, Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (4), 541-555.

Suzuki, H., 2015, *How enzymes work from structure to function*, Pan Stanford Publishing, USA, ISBN: 9789814463935.

Svensson, B., 1988, Regional distant sequence homology between amylases, α -glucosidases and transglucanases, *FEBS Letters*, 230 (1-2), 72-76.

Swiss Institute of Bioinformatics, <http://www.swissadme.ch>, [Ziyaret Tarihi: 21 Ekim 2022].

Taha, M., Shah, S. A. A., Khan, A., Arshad, F., Ismail, N. H., Afifi, M., Imran, S., & Choudhary, M. I., 2019, Synthesis of 3, 4, 5-trihydroxybenzohydrazone and evaluation of their urease inhibition potential, *Arabian Journal of Chemistry*, 12 (8), 2973-2982.

Talebi, M., Hamidian, E., Niasari-Naslaji, F., Rahmani, S., Hosseini, F. S., Boumi, S., Montazer, M. N., Asadi, M., & Amanlou, M., 2021, Synthesis, molecular docking, and biological evaluation of nitroimidazole derivatives as potent urease inhibitors, *Medicinal Chemistry Research*, 30, 1220-1229.

Tan, S. Y., Wong, J. L. M., Sim, Y. J., Wong, S. S., Elhassan, S. A. M., Tan, S. H., Lim, G. P. L., Tay, N. W. R., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K., & Candasamy, M., 2019, Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential

intervention, *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13 (1), 364-372.

Tao, Y., Zhang, Y., Cheng, Y., & Wang, Y., 2013, Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR, *Biomedical Chromatography*, 27 (2), 148-155.

Thyme, S. B., Jarjour, J., Takeuchi, R., Havranek, J. J., Ashworth, J., Scharenberg, A. M., Stoddard, B. L., & Baker, D., 2009, Exploitation of binding energy for catalysis and design. *Nature*, 461 (7268), 1300-1304.

Tipton, K., 2018, *Translocases (EC 7): a new EC class*, <https://www.enzyme-database.org/news.php>, [Ziyaret Tarihi: 09 Mart 2023].

Trott, O., & Olson, A.J., 2010, Software news and update autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461.

Tsou, C. L., 1993, Conformational flexibility of enzyme active sites, *Science*, 262 (5132), 380-381.

Uçak, İ., & Afreen, M., 2022, *Enzymes, Nutraceutical and Functional Food Components* (Second Edition), Galanakis, C. M. (ed.), Chapter 13, Academic Press, Niğde, ISBN: 9780323850520, 537-571.

Van Camp, G., 2014, Cardiovascular disease prevention, *Acta Clinica Belgica*, 69 (6), 407-411.

Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L., 2002, Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *Journal of Biotechnology*, 94 (2), 137-155.

Vanessa Fiorentino, T., Prioletta, A., Zuo, P., & Folli, F., 2013, Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases, *Current Pharmaceutical Design*, 19 (32), 5695-5703.

Venugopala, K. N., Rashmi, V., & Odhav, B., 2013, Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity, *BioMed Research International*, 2013, 963248.

Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W., Levi, M., & Reitsma, P. H., 2013, New fundamentals in hemostasis, *Physiological Reviews*, 93 (1), 327-358.

Vidal, L. S., Kelly, C. L., Mordaka, P. M., & Heap, J. T., 2018, Review of NAD (P) H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1866 (2), 327-347.

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W., 2016, *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*, John Wiley & Sons, United States of America, ISBN: 9781118918401.

Walsh, R., Martin, E., & Darvesh, S., 2011, Limitations of conventional inhibitor classifications, *Integrative Biology*, 3 (12), 1197-1201.

Wang, G., He, D., Li, X., Li, J., & Peng, Z., 2016, Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin thiazole derivatives as α -glucosidase inhibitors, *Bioorganic Chemistry*, 65, 167-174.

Warren, F. J., Zhang, B., Waltzer, G., Gidley, M. J., & Dhital, S., 2015, The interplay of α -amylase and amyloglucosidase activities on the digestion of starch in *in vitro* enzymic systems, *Carbohydrate Polymers*, 117, 192-200.

Weatherburn, M.W., 1967, Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Analytical Chemistry*, 39, 971-974.

Williams, L. K., Zhang, X., Caner, S., Tysoe, C., Nguyen, N. T., Wicki, J., Williams, D. E., Coleman, J., McNeill, J. H., Yuen, V., Andersen, R. J., Withers, S. G., & Brayer, G. D., 2015, The amylase inhibitor montbretin A reveals a new glycosidase inhibition motif, *Nature Chemical Biology*, 11 (9), 691-696.

Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M., & Osaki, S., 2010, Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose, *The FEBS Journal*, 277 (20), 4205-4214.

Yau, J. W., Teoh, H., & Verma, S., 2015, Endothelial cell control of thrombosis, *BMC Cardiovascular Disorders*, 15 (1), 1-11.

Yoon, S. H., & Robyt, J. F., 2002, Addition of maltodextrins to the nonreducing-end of acarbose by reaction of acarbose with cyclomaltohexaose and cyclomaltoextrin glucanyltransferase, *Carbohydrate Research*, 337 (6), 509-516.

Zawawi, N. K. N. A., Taha, M., Ahmat, N., Ismail, N. H., Wadood, A., Rahim, F., & Rehman, A. U., 2015, Synthesis, *in vitro* evaluation and molecular docking studies of biscoumarin thiourea as a new inhibitor of α -glucosidases, *Bioorganic Chemistry*, 63, 36-44.

Zhang, L., Xu, Q., Zhu, J., Xia, G., & Zang, H., 2021, Synthesis, α -glucosidase inhibition and molecular docking studies of tyrosol derivatives, *Natural Product Research*, 35 (10), 1596-1604R.

Zhang, Y., He, S., & Simpson, B. K., 2018, Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques, *Current Opinion in Food Science*, 19, 30-35.

Zhao, T., Sun, L., Wang, Z., Nisar, T., Gong, T., Li, D., Niu, P., & Guo, Y., 2019, The antioxidant property and α -amylase inhibition activity of young apple polyphenols are related with apple varieties, *LWT-Food Sciences and Technology*, 111, 252-259.

Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B., 2018, Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications, *Nature Reviews Endocrinology*, 14 (2), 88-98.

Zhou, C., Bhinderwala, F., Lehman, M. K., Thomas, V. C., Chaudhari, S. S., Yamada, K. J., Foster, K. W., Powers, R., Kielian, T., & Fey, P. D., 2019, Urease is an essential component of the acid response network of *Staphylococcus aureus* and is required for a persistent murine kidney infection, *PLoS Pathogens*, 15 (1), e1007538.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Furkan Meletli 4801191158_

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 10	% 3	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Karadeniz Teknik University Öğrenci Ödevi	% 1
5	www.turkcerrahi.com İnternet Kaynağı	% 1
6	patentscope.wipo.int İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.freepatentsonline.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
9	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<% 1

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- ☐ Kurum izni gerekmektedir.
- ☒ Kurum izni gerekmemektedir.

Furkan MELETLİ

