

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

α -AMİNOFOSFONAT BİLEŞİKLERİNİN VE SCHİFF BAZLARININ BAZI
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emel EKİNCİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2024

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Emel EKİNCİ tarafından hazırlanan “ **α -Aminofosfonat Bileşiklerinin ve Schiff Bazlarının Bazı Biyoaktif Özelliklerinin Araştırılması**” adlı tez çalışması 25/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Harun ÇİFTÇİ

Eş Danışman : Prof. Dr. Şevki ADEM

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Özcan EREL
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Harun ÇİFTÇİ
Kimya Anabilim Dalı/Çankırı Karatekin Üniversitesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı/Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Melike BİLGİ
Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Veyis KARAKOÇ
Çocuk Bakımı ve Gençlik Hizmetleri Bölümü
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ER ÇALIŞKAN
Tahıllar ve Yemeklik Baklagiller Anabilim Dalı
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ersoy YILMAZ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “ **α -Aminofosfonat Bileşiklerinin ve Schiff Bazlarının Bazı Biyoaktif Özelliklerinin Araştırılması**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (25/07/2024).

Emel EKİNCİ



Bu alışma ankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FF081123D05 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

Doktora Tezi

α -AMİNOFOSFONAT BİLEŞİKLERİNİN VE SCHİFF BAZLARININ BAZI BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emel EKİNCİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Harun ÇİFTÇİ
Eş Danışman: Prof. Dr. Şevki ADEM

Bu tez kapsamında, ilk olarak, Schiff bazı (7-11) ve bis- α -aminofosfonat türevlerinin (13-16) antioksidan kapasiteleri indirgeme, radikal giderme ve metal şelatlama yöntemleri kullanılarak belirlendi. Schiff bazlarının bis- α -aminofosfonat türevlerine göre daha yüksek metal şelatlama aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca, bu moleküllerin karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) ile asetilkolinesteraz (AChE), butirilkolinesteraz (BChE), α -glikozidaz ve tirozinaz enzimleri üzerine inhibisyon etkilerini belirlemek için *in vitro* ve *in silico* çalışmalar gerçekleştirildi. Enzim inhibisyon sonuçları bis- α -aminofosfonat türevlerinin, Schiff bazlarına göre çalışılan enzimlere karşı daha güçlü inhibitör olduklarını gösterdi. Deneysel olarak bulunan IC₅₀ değerlerine göre daha güçlü inhibitörlerin AChE için 15 molekül (IC₅₀= 6,48 μ g/mL), BChE için 13 molekül (IC₅₀= 49,51 μ g/mL), α -glikozidaz için 16 molekül (IC₅₀= 32,54 μ g/mL), tirozinaz için 9 molekül (IC₅₀= 187,34 μ g/mL) olduğu tespit edildi. Yapılan deney sonuçları ile moleküler docking sonuçlarının birbiri ile uyum içerisinde olduğu gözlemlendi. Moleküllerin elektronik yapıları ve global reaktivite parametreleri yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) yöntemi, B3LYP fonksiyoneli ve cc-pVDZ baz setiyle hesaplandı. Bunun yanında tüm moleküllerin fizikokimyasal, lipofiliklik, çözünürlük, farmakokinetik, ilaç benzerliği ve tıbbi kimya özelliklerinin araştırılması için *in silico* ADME çalışmaları da gerçekleştirildi. Moleküllerin on bir farklı mikroorganizmaya karşı antibakteriyel aktivite özellikleri değerlendirildi. Schiff bazı türevlerinin *S. epidermidis* ve *A. baumannii* bakterilerine karşı ve bis- α -aminofosfonat türevlerinin ise, *S. epidermidis*, *S. dysenteriae* ve *A. baumannii* bakterilerine karşı, pozitif kontrol ampisiline kıyaslandığında, daha güçlü antibakteriyel etki gösterdikleri bulundu.

2024, 100 sayfa

ANAHTAR KELİMELE: α -aminofosfonatlar, Schiff bazları, Biyoaktivite, Enzim inhibisyon, Moleküler docking

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF SOME BIOACTIVE PROPERTIES OF α -AMINOPHOSPHONATE COMPOUNDS AND SCHIFF BASES

Emel EKİNCİ

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Harun ÇİFTÇİ
Co-Advisor: Prof. Dr. Şevki ADEM

In this thesis, firstly, the antioxidant capacities of Schiff base (7-11) and bis- α -aminophosphonate derivatives (13-16) were determined using reduction, radical scavenging and metal chelation methods. It has been observed that Schiff bases have higher metal chelating activity than bis- α -aminophosphonate derivatives. In addition, *in vitro* and *in silico* studies were carried out to determine the inhibition effects of these molecules on carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I and II) and acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), α -glucosidase and tyrosinase enzymes. Enzyme inhibition results showed that bis- α -aminophosphonate derivatives were better inhibitors than Schiff bases against the studied enzymes. According to the experimentally obtained IC₅₀ values, the better inhibitors are found to be molecule 15 for AChE (IC₅₀ = 6,48 μ g/mL), molecule 13 for BChE (IC₅₀ = 49,51 μ g/mL), molecule 16 for α -glucosidase (IC₅₀ = 32,54 μ g/mL), and molecule 9 (IC₅₀ = 187,34 μ g/mL) for tyrosinase. It was observed that the experimental results and molecular docking results were in agreement with each other. Electronic structures of molecules and global reactivity parameters were calculated by using density functional theory (DFT) method, with B3LYP functional and cc-pVDZ basis set. In addition, *in silico* ADME studies were also carried out to investigate the physicochemical, lipophilicity, solubility, pharmacokinetics, drug similarity and medicinal chemistry properties of all molecules. The antibacterial activity properties of the molecules against eleven different microorganisms were evaluated. It was found that Schiff base derivatives showed very strong antibacterial effects against *S. epidermidis* and *A. baumannii* bacteria, and bis- α -aminophosphonate derivatives showed very strong antibacterial effects against *S. epidermidis*, *S. dysenteriae* and *A. baumannii* bacteria, compared to the positive control ampicillin.

2024, 100 pages

Keywords: α -aminophosphonates, Schiff bases, Bioactivity, Enzyme inhibition, Molecular docking

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim süresince hem insani hem de akademisyen kimliğiyle örnek aldığım, öğrenimim boyunca bilimsel ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Harun ÇİFTÇİ' ye, deneylerin tasarımı ve yürütülmesinde bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen, her türlü imkanı sağlayarak deneysel anlamda gelişmemi sağlayan ikinci tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şevki ADEM' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullanılan yeni molekülleri sentezleyen sayın Doç. Dr. Özlem GÜNDOĞDU AYTAÇ hocama, antibakteriyel çalışmalarda kullandığım bakteri suşlarını bana sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Esin KIRAY hocama ve her konuda destek ve ilgisini benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Kübra ÖZTÜRK' e teşekkürlerimi sunarım.

“Bis- α -aminofosfonat bileşiklerinin ve Schiff bazlarının bazı biyoaktif özelliklerinin araştırılması” başlıklı ve FF081123D05 numaralı tez projemi destekleyen Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' ne teşekkürlerimi sunarım.

Üzerimde büyük emekleri olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, manevi destekleriyle her daim yanımda olan anneme, babama ve kardeşlerime minnettarım.

Emel EKİNCİ

Çankırı, Ağustos 2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzimler	2
1.2 Antioksidanlar	6
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	12
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1 Kullanılan Kimyasallar	18
3.2 Kullanılan Cihazlar ve Aletler	18
3.3 Kullanılan Programlar	19
3.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	19
3.4.1 DPPH metodunda kullanılan çözeltiler	19
3.4.2 CUPRAC metodunda kullanılan çözeltiler	20
3.4.3 FRAP metodunda kullanılan çözeltiler	20
3.4.4 Metal Şelatlama metodunda kullanılan çözeltiler	20
3.4.5 AChE ve BChE enzimlerinin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler.....	21
3.4.6 CA enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler	21
3.4.7 α -Glikozidaz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler	21
3.4.8 Tirozinaz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler.....	22
3.5 Antioksidan Kapasite Testleri.....	22
3.5.1 DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil radikal süpürücü kapasite) yöntemi.....	22
3.5.2 CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi	23
3.5.3 FRAP (Demir (III) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi.....	23
3.5.4 Metal şelatlama kapasitesi yöntemi	24

3.6 Enzim İnhibisyon Çalışmaları	24
3.6.1 Asetilkolinesteraz enziminin aktivite tayini	25
3.6.2 Bütirilkolinesteraz enzimin aktivite tayini	25
3.6.3 Karbonik anhidraz (hCA I ve hCA II) izoenzimlerinin aktivite tayini	26
3.6.4 α -Glikozidaz enzimin aktivite tayini	27
3.6.5 Tirozinaz enzimin aktivite tayini.....	28
3.7 Kuantum Kimyasal Hesaplamalar	28
3.8 Moleküler Docking Çalışmaları.....	29
3.9 Farmakokinetik Çalışmaları (ADME)	30
3.10 Antibakteriyel Aktivite Testleri.....	30
3.10.1 Agar kuyucuk yöntemi	30
3.10.2 Minimal inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi.....	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
4.1 Antioksidan Kapasite Testleri.....	32
4.1.1 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü kapasite yöntemi	32
4.1.2 Bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesine ait bulgular (CUPRAC) ...	33
4.1.3 FRAP indirgeme aktivitesine ait bulgular.....	34
4.1.4 Metal şelatlama kapasitesine ait bulgular	35
4.2 Kuantum Kimyasal Hesaplamalarına Ait Bulgular	36
4.3 Moleküler Elektrostatik Potansiyel (MEP) Haritalarına Ait Bulgular	37
4.4 Enzim İnhibisyon Sonuçları.....	39
4.4.1 Asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu ve kinetik çalışmasına ait bulgular	39
4.4.2 Bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonuna ait bulgular	41
4.4.3 Karbonik anhidraz (CA I ve II) enzim inhibisyonuna ait bulgular	43
4.4.4 α -Glikozidaz enzim inhibisyonuna ait bulgular.....	43
4.4.5 Tirozinaz enzim inhibisyonuna ait bulgular	44
4.5 Moleküler Docking Sonuçlarına Ait Bulgular.....	46
4.6 Farmakokinetik Araştırmasına Ait Bulgular	61
4.7 Antibakteriyel Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER DİZİNİ

g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
%	Yüzde



KISALTMALAR DİZİNİ

DPPH	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH·	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
TPTZ	2,4,6-Tripiridil-s-triazin
ABTS	2,2'-Azino-Bis(3-Etilbenztiyazolin-6-Sülfonik Asit)
L-DOPA	3,4-hidroksi-L-fenilalanin
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik asit)
Troloks	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
Takrin	9-Amino-1,2,3,4-tetrahidro akridin
ADME	Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Atılım
AChE	Asetilkolin esteraz enzimi
CUPRAC	Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite
BHT	Bütil hidroksi toluen
BHA	Bütilhidroksianisol
BChE	Bütirilkolinesteraz enzimi
FRAP	Demir (III) indirgeyici antioksidan kapasite
DMSO	Dimetil sülfoksit
LUMO	En düşük boş moleküler orbital
HOMO	En yüksek dolu moleküler orbital
IC ₅₀	Enzim konsantrasyonu yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
HAT	Hidrojen atomu transferi
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
CA	Karbonik anhidraz enzimi
IC _{hE}	Kolinesteraz İnhibitörü
B3LYP	Lee-Yang-Parr korelasyon enerjili 3 parametreli Becke karma Metodu
MBK	Minimal Bakterizasyon Konsantrasyonu
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MEP	Moleküler Elektrostatik Potansiyel
MHA	Müller Hinton Agar
p-NPG	p-Nitrofenil β-D-glikopiranozit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
SET	Tek elektron transferi
TYR	Tirozinaz
TAK	Toplam antioksidan kapasite
TPSA	Topolojik kutupsal yüzey alanı
Tris	Trihidroksimetil amino metan
DFT	Yoğunluk fonksiyoneli teorisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Schiff bazları	10
Şekil 1.2 Bis- α -aminofosfonatlar	11
Şekil 4.1 DPPH standart grafiği	32
Şekil 4.2 CUPRAC standart grafiği	33
Şekil 4.3 FRAP standart grafiği	34
Şekil 4.4 Metal şelatma standart grafiği	35
Şekil 4.5 Schiff bazlarının MEP haritları (B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde)	38
Şekil 4.6 Bis- α -aminofosfonatların MEP haritları (B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde)	38
Şekil 4.7 Schiff bazların asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	40
Şekil 4.8 Bis- α -aminofosfonatların asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	41
Şekil 4.9 Schiff bazların bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	42
Şekil 4.10 Bis- α -aminofosfonatların bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	43
Şekil 4.11 Schiff bazların α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	44
Şekil 4.12 Bis- α -aminofosfonatların α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	44
Şekil 4.13 Schiff bazların tirozinaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	45
Şekil 4.14 Bis- α -aminofosfonatların tirozinaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	45
Şekil 4.15 AChE ile 13 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	48
Şekil 4.16 AChE ile 14 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	48
Şekil 4.17 AChE ile 15 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	49
Şekil 4.18 AChE ile 16 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	49
Şekil 4.19 BChE ile 13 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	51
Şekil 4.20 BChE ile 14 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	52
Şekil 4.21 BChE ile 15 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	52
Şekil 4.22 BChE ile 16 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	53
Şekil 4.23 α -Glukozidaz ile 7 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	55
Şekil 4.24 α -Glukozidaz ile 8 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	55

Şekil 4.25 α -Glikozidaz ile 13 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	56
Şekil 4.26 α -Glikozidaz ile 16 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	56
Şekil 4.27 Tirozinaz ile 9 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	58
Şekil 4.28 Tirozinaz ile 11 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	59
Şekil 4.29 Tirozinaz ile 14 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	59
Şekil 4.30 Tirozinaz ile 15 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	60
Şekil 4.31 Tirozinaz ile 16 numaralı molekülün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu	60
Şekil 4.32 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların biyoyararlanım radarları	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Antioksidan aktiviteyi ölçmek için kullanılan farklı yöntemler	9
Çizelge 3.1 Deneylerde kullanılan kimyasallar ve üretici firmalar.....	18
Çizelge 3.2 Deneylerde kullanılan cihaz isimleri ve markaları	19
Çizelge 3.3 Asetilkolinesteraz aktivite tayininde kullanılan madde miktarları	25
Çizelge 3.4 Bütirilkolinesteraz aktivite tayininde kullanılan madde miktarları	26
Çizelge 3.5 Karbonik anhidraz aktivite tayininde kullanılan madde miktarları	27
Çizelge 3.6 α -Glikozidaz aktivite tayininde kullanılan madde miktarları	27
Çizelge 3.7 Tirozinaz aktivite tayininde kullanılan madde miktarları	28
Çizelge 4.1 DPPH yöntemi için eşdeğer troloks miktarları	33
Çizelge 4.2 CUPRAC yöntemi için eşdeğer troloks miktarları	34
Çizelge 4.3 FRAP yöntemi için eşdeğer troloks miktarları	35
Çizelge 4.4 Metal şelatlama yöntemi için eşdeğer troloks miktarları	36
Çizelge 4.5 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların global reaktivite parametreleri.	36
Çizelge 4.6 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların AChE enzimine karşı IC ₅₀ değerleri	39
Çizelge 4.7 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların BChE enzimine karşı IC ₅₀ değerleri	41
Çizelge 4.8 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların α -glikozidaz enzimine karşı IC ₅₀ değerleri	44
Çizelge 4.9 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların tirozinaz enzimine karşı IC ₅₀ değerleri	45
Çizelge 4.10 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatlar ile referans moleküllerin asetilkolinesteraz enzimi ile moleküler docking sonuçları	46
Çizelge 4.11 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatlar ile referans moleküllerin, bütirilkolinesteraz enzimi ile moleküler docking sonuçları.....	50
Çizelge 4.12 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatlar ile referans moleküllerin α -glikozidaz enzimi ile moleküler docking sonuçları	53
Çizelge 4.13 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatlar ile referans moleküllerin tirozinaz enzimi ile moleküler docking sonuçları.....	57
Çizelge 4.14 Schiff bazlarının ilaç benzerliği özellikleri.....	63
Çizelge 4.15 Bis- α -aminofosfonatların ilaç benzerliği özellikleri	65
Çizelge 4.16 Schiff bazlarının test edilen mikroorganizmalara karşı zon çapları ve MİK değerleri	69
Çizelge 4.17 Bis- α -aminofosfonatların test edilen mikroorganizmalara karşı zon çapları ve MİK değerleri.....	72
Çizelge 5.1 Bis- α -aminofosfonatlar ile literatür verilerinin karşılaştırılması	79

1. GİRİŞ

Schiff bazları, azometin ($-N=CH-$) grubuna sahip organik bileşik sınıfıdır. Schiff bazları genellikle birincil aminlerin aldehit veya keton karbonil türevleri ile kondenzasyon reaksiyonu yoluyla hazırlanır (Yernale and Bennikallu Hire Mathada, 2014). Aromatik Schiff bazları, alifatik yapıda olanlara göre daha stabildir ve standart prosedürle daha kolay sentezlenir (Liu *et al.* 2018). Schiff bazları böcek öldürücü, antibakteriyel, antifungal, antilösemi, antiinflamatuvar, anti-HIV aktivite, antibakteriyel aktivite, antioksidan, antikanser ve bitki büyümesini düzenleyici aktivite gibi biyolojik aktiviteler gösterir (Al-Masoudi *et al.* 2009, El-Gammal *et al.* 2021, Mane *et al.* 2021, Ali *et al.* 2022, Alanazi *et al.* 2022, Daravath *et al.* 2022, Hamid and Salih 2022, Iraj *et al.* 2022, Salim Meeran *et al.* 2022). Biyolojik uygulamaların yanı sıra Schiff bazı ve metal komplekslerinin analitik kimya, boya endüstrisi ve korozyon inhibitörlerinde de yaygın uygulamaları vardır (Refat *et al.* 2022). Schiff bazları, görünür bölgede ve oda sıcaklığında sahip olduğu özel fotoluminesans özelliğinden dolayı birçok deneysel ve teorik araştırmacının dikkatini çekmiş ve mikroelektronik, optoelektronik ve biyolojik sensörler gibi birçok alanda uygulanmıştır (Zhao *et al.* 2012, Kumar *et al.* 2015, Li *et al.* 2021, Upendranath *et al.* 2022). Son yıllarda, organofosforlu bileşikler ve türevleri, biyolojik, farmakolojik, tarımsal ve tıbbi kimya özellikleri ile sentetik ara maddeler olarak kullanımları nedeniyle önemli ölçüde ilgi görmüştür (Drabowicz *et al.* 2015, Moonen *et al.* 2004). Özellikle α -aminofosfonatlar önemli bir organofosforlu bileşik sınıfını oluşturur ve son yıllarda birçok çalışmanın araştırma konusu olmuştur. Bu artan ilgi, fosfor analogları ile α -amino asitler arasındaki yapısal benzerlikten kaynaklanmaktadır, burada bir karboksilik grup, bir fosfonik asit veya ilgili bir grup ile değiştirilmiştir (Huang and Chen 2000, Naydenova *et al.* 2010). Bu bileşikler, ilginç biyolojik aktiviteleri olan önemli bir bileşik sınıfı olarak kabul edilmektedir (Albrecht *et al.* 2010, Zhao and Wang 2012). Bazı α -aminofosfonatlar ve bunların türevleri, antibiyotik, antikanser ajanları, herbisit, pestisit, enzim inhibitörleri, antioksidan, antiviral, antitrombotik ajanlar, farmakolojik ajanlar, anti-HIV ajanları, antienflamatuvar aktiviteler ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir (Bhattacharya *et al.* 2012, Fernández-Pérez *et al.* 2011, Moonen *et al.* 2004, Tang and

Zhang 2003). Bu aktiviteler, α -aminofosfonatları organik sentezde ve kimyanın diğer alanlarında dikkat çekici hedefler haline getirmektedir.

1.1 Enzimler

Enzimler, canlı hücreler tarafından üretilen ve genellikle biyokatalizör olarak adlandırılan kompleks protein molekülleridir. Enzimler olağanüstü katalitik güce sahiptirler ve substratlarına yönelik yüksek seviyedeki spesifiklikleri onları biyolojik reaksiyonlara uygun hale getirir (Voet and Voet 2011). Bir enzim tipik olarak tek bir kimyasal reaksiyonu veya bir dizi yakından ilişkili reaksiyonu katalize eder. Enzim katalizli reaksiyonlar, katalize edilmemiş reaksiyonlarla karşılaştırıldığında yan ürünlerin oluşumu nadirdir. Hücresel metabolizma için çok önemlidirler. Bitkilerde, mikroorganizmalarda ve hayvanlarda meydana gelen her kimyasal reaksiyon, enzimatik katalizin doğrudan bir sonucu olarak ölçülebilir bir hızda ilerler (Dobon *et al.* 2019). Hızlı bilimsel ilerlemeler kimya ve farmakoloji endüstrilerini enzim teknolojisini benimsemeye teşvik etmektedir (Bhatia 2018).

Enzimlerin en yaygın avantajlarından biri, hücrelerden uzaklaştırıldıktan veya ayrıldıktan sonra bile sürekli olarak görev yapabilmeleridir. Bu, hücrelerin *in vivo* ortamlardan ayrılmasından sonra bile *in vitro* koşullar altında verimli bir şekilde çalışmaya devam ettikleri anlamına gelir, bu biyokatalizörlerin izolasyondan sonra bile aktif durumda kaldıkları sonucuna varabiliriz (Bhatia 2018). Enzimlerin aktiviteleri *in vitro* çalışmalar ile belirlenebilmektedir. Ayrıca bu çalışmalar sayesinde Alzheimer, parkinson, diyabet, melanoma ve kanser gibi çeşitli hastalıklar için tedavi yöntemleri ve ilaç ajanları geliştirilmektedir. Belirtilen bu hastalıklarda aktif rol oynayan bazı enzimler şunlardır, Alzheimer ve parkinson' da AChE ve BChE, diyabette glikozidaz ve amilaz, melanoma' da tirozinaz ve bazı kanser türlerinde ise CA-I ve CA-II enzimleri.

AChE ve BChE, kolinesteraz ailesinin parçası olan iki enzimdir ve bunlara psödokolinesteraz da denir. Bu enzimler kolinerjik sinapslarda ACh' i hidrolize ederek nörotransmisyonun durdurulması için gereklidirler. Her ne kadar iki enzim yapısal ve

fonksiyonel olarak benzer olsa da substrat özellikleri ve doku dağılımları farklıdır (Lockridge 2015).

AChE, çoğunlukla periferdeki nöromusküler bağlantılarda ve merkezi sinir sistemindeki kolinerjik sinapslarda bulunur. Asetilkolinin asetat ve koline hızlı hidrolizi temel işlevidir, bu süreç kolinerjik aracılı sinaptik iletimi durdurur. Bunun gibi enzimatik aktivite, nörotransmisyonu kontrol etmek ve asetilkolin birikmesi nedeniyle çok uzun süren sinaptik sinyalleme için gereklidir. AChE' nin en seçici olduğu substrat asetilkolindir. Asetilkolini etkili bir şekilde hidrolize eder, ancak diğer kolin esterlerini yalnızca kısmen hidrolize eder (Lockridge 2015). Kolinesteraz inhibitörleri (IChE), kolinesterazların (AChE ve BChE) aktivitesini bozan kimyasal bileşiklerdir. Bunlar bileşikler ACh' in ve bütirilkolinin (BCh) hidrolizini azaltırlar, böylece vücuttaki seviyelerini artırırlar. Doğal olarak oluşan IChE, esterazları tersine çevrilebilir bir şekilde etkiler (Smyrska-Wieleba and Mroczek 2023). Şu anda tıpta kullanılan IChE sentetik olarak elde edilmektedir. Çoğunluğu doğal maddelerden elde edilmiştir. Bunlardan takrin tedavide onay almış olup, donepezil, galantamin ve rivastigmine benzer şekilde kullanılmaktadır. Ne yazık ki bunlardan ilki hepatotoksisteye yol açarken, diğerlerinin uykusuzluk, ishal, bulantı ve kusma gibi yan etkileri vardır (Smyrska-Wieleba and Mroczek 2023). IChE' ler (BChE ve AChE) ayrıca miyastenia gravis, miyopatiler, periferik sinir hasarıyla ilişkili bozukluklar, sinir uyarılarının bozulmuş iletimi, vasküler demans, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi demansla ilişkili hastalıkların tedavisinde uygulandığında terapötik aktivite de gösterir (Roger Bullock and Roger Lane 2007).

BChE, plazma ve karaciğer gibi çeşitli vücut dokularında bulunur. ACh' i de hidrolize etmesine rağmen, temel fizyolojik fonksiyonunun ksenobiyotiklerin ve ester grupları içeren ilaçların ortadan kaldırılması olduğuna inanılmaktadır. Anestezi sırasında kullanılan nöromusküler bloke edici ajanlardan biri olan süksinilkolin, kısmen BChE aktivitesi nedeniyle kan dolaşımında hidrolize edilir. Bununla birlikte BChE, AChE' den daha geniş bir yelpazedeki kolin esterlerini (bütirilkolin, propionilkolin ve süksinilkolin) hidrolize edebilir. BChE aktivitesinde eksiklik olan kişilerde süksinilkolin gibi bazı kas gevşeticilerin enjeksiyonundan sonra uzun süreli felç meydana gelebilir.

Bir kişinin BChE tarafından metabolize edilen ilaçlara tepkisi aynı zamanda bu enzimin plazma aktivite seviyelerine de bağlı olabilir (Lockridge 2015).

CA, karbon dioksitin (CO_2) bikarbonat iyonlarına (HCO_3^-) ve protonlara (H^+) geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize eden bir enzimdir. Bikarbonat ve karbonat iyonlarının oluşması, kandaki gaz hareketi ve asit-baz dengesinin düzenlenmesi bu enzimin aktivitesine bağlıdır. CA, hücresel ve doku pH' ının düzenlenmesi için gerekli bir enzimdir. CA, karbon dioksiti hidratlayan veya bikarbonat iyonlarını dehidre eden tersine çevrilebilir süreci katalize ederek hücrelerin ve dokuların spesifik fizyolojik ihtiyaçlarını karşılamalarına yardımcı olabilir. Asidozu önlemek için CA, kaslar gibi metabolik açıdan oldukça aktif dokularda hücresel solunum sırasında üretilen fazla karbondioksitin uzaklaştırılmasına yardımcı olur (Supuran 2018).

Farklı doku dağılımları ve fonksiyonları olan CA, sitozolik (CA I, CA II), membrana bağlı (CA IV, CA IX) ve mitokondriyal (CA V) olmak üzere birçok izoformu bulunmaktadır. Böbrekler, karaciğer ve gastrointestinal sistem gibi birçok farklı organdaki en yaygın sitozolik izoformlar CA I ve CA II' dir. CA IV' ün çoğunluğu, bikarbonat iyonu ve karbon dioksit değişimine yardımcı olduğu böbrekler ve akciğerler de dahil olmak üzere organlardaki endotel hücrelerinin plazma zarında bulunur. Bazı kanser hücrelerinde transmembran izoformu CA IX' un aşırı ekspresyonu, tümör gelişimi ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Glokom, ödem ve irtifa hastalığı, karbonik anhidraz inhibitörlerinin hafifletebildiği tıbbi bozukluklardan bazılarıdır. Bu ilaçlar, doku sıvısı birikimini azaltarak, gözlerdeki salgı oluşumunu azaltır ve CA aktivitesini bloke ederek rakıma bağlı hipoksi semptomlarına yardımcı olur. CA II eksikliği sendromu, CA II' yi kodlayan gendeki bozuklukların neden olduğu nadir bir genetik durumdur (Supuran 2008).

α -Glikozidaz, karbonhidratların parçalanmasına yardımcı olan bir enzimdir. Bunu, α -1,4 ile bağlanan oligosakkaritlerin ve disakkaritlerin ucundaki glikoz kalıntılarını hidrolize ederek yapar. Vücudun şekerleri emebilmesi için bu enzim, karmaşık karbonhidratların parçalanması için gereklidir. Sindirim sürecinin son aşaması olarak α -glukosidaz, daha büyük karbonhidratları glikoz moleküllerine ayırır. Başlıca konumu ince bağırsakta,

daha spesifik olarak enterositlerin fırçasmsı kenar zarı olarak bilinen özel hücre zarındadır. Maltoz, maltotrioz ve diğer oligosakkaritler dahil karbonhidratlar, α -glukosidazın yapı taşlarıdır. Substratlar glikoz moleküllerine ayrıştırılır ve bunlar daha sonra bağırsak astarı yoluyla dolaşıma alınabilir. Karbonhidratlardaki α -glikoz birimleri arasındaki glikosidik bağın hidrolizi, α -glikozidaz tarafından katalize edilir. Bir su molekülünün varlığı, glikozidik bağı ayırarak glikozu serbest bırakan bu hidroliz olayını tetikler. Tip 2 diyabet tedavisi sıklıkla α -glukosidaz inhibitörlerinin kullanımını içerir. Bu inhibitörler, karbonhidratların sindirimini ve emilimini azaltarak postprandiyal (yemek sonrası) glikoz seviyelerini düşürdüğü için glisemik yönetim iyileştirilir (Pistrosch *et al.* 2009).

Tirozinaz (TYR), memelilerde melanin biyosentez yolunda ve meyve ve sebzelerde enzimatik esmerleşme sürecinde rol oynayan önemli metabolik enzimdir. Bu nedenle TYR aktivitesinin inhibisyonu birçok endüstri için cazip bir hedeftir ve araştırmalar, doğal kökenli olanlar da dahil olmak üzere, yeni ilaç ve/veya gıda bileşenleri olma potansiyeline sahip yeni inhibitörlerin belirlenmesine odaklanmıştır (Pham *et al.* 2024). TYR melaninin biyosentezinde rol oynar. Özellikle, L-tirozinin L-dopa'ya oksidasyonunu ve ardından L-dopa'nın dopakinona oksidasyonunu katalize eder. İlk aktiviteye tirozin hidroksilaz (monofenolaz aktivitesi) adı verilir ve ikincisi ise o-difenol oksidaz, katekol oksidaz veya DOPA oksidazdır (difenolaz aktivitesi). Dopakinon oluşuktan sonra yol, son melanin pigmentlerine yol açan bir dizi spontan reaksiyondan geçerek ilerler (Kanteev *et al.* 2015). Örneğin, eumelanin (koyu kahverengiden siyaha) ve feomelanin (sarıdan kırmızıya) pigmentlerinin oluşumu bu işlemlere bağlıdır. Bakır içeren tirozinaz enzimi çoğunlukla epidermisin bazal tabakasında melanosit adı verilen uzman hücrelerde bulunur. Saç, göz ve cildin pigmentasyonundan sorumlu olan melanin üretiminin ilk adımlarında rol oynar. Tirozinaz, yara iyileşmesi ve antimikrobiyal savunma da dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik aktivitelerde rol oynar (Briganti *et al.* 2003). Meyve ve sebzelerde TYR aktivitesi enzimatik esmerleşme veya olgunlaşma ile sonuçlanır. Bu nedenle TYR inhibitörleri, gıdaların korunmasında veya melanin birikimiyle ilişkili bozuklukların ve hastalıkların tedavisinde tıbbi ajanlar olarak faydalı olabilir. Çok sayıda çalışma TYR' nin hem sentetik hem de doğal inhibitörlerini tanımlamıştır (Baber *et al.* 2023). Yaygın olarak kullanılan TYR inhibitörleri Arbutin,

Kojik asit, Hidrokinon ve Azelaik asittir. Bununla birlikte, birçok TYR inhibitörü, etkinlik eksikliği, kanserojenlik ve toksisite nedeniyle yaygın kullanım görmemiştir (Baber *et al.* 2023).

1.2 Antioksidanlar

Genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak bilinen serbest radikaller, hem zararlı hem de yararlı türler olarak ikili bir rol oynadıkları bilinmektedir. ROS ve RNS' ler UV ışığı, X ışınları, gama ışınları etkisiyle, metal katalizli reaksiyonların ürünleri olarak, mitokondri katalizli elektron taşıma reaksiyonlarının yan ürünleri olarak oluşmaktadırlar (Tan *et al.* 2018). Ayrıca lipit peroksidasyonu, ksantin oksidaz ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi çeşitli kaynaklardan oluşabilir (Tan *et al.* 2018).

ROS/RNS'nin endojen veya ekzojen saldırılar yoluyla kümülatif üretimi oksidatif stres olarak adlandırılır ve hücrel sinyal yollarının redoks düzenlemesinin değişmesiyle bağlantılı olan birçok kanser hücresi türü için yaygındır. Oksidatif stres, normal hücrelerle karşılaştırıldığında çeşitli kanser hücrelerinde mevcut olduğu bulunan hücrel redoks dengesizliğine neden olur, bu nedenle redoks dengesizliği onkojenik uyarımla ilişkili olabilir (Geng *et al.* 2023). DNA mutasyonu, kanser oluşumunda kritik bir adımdır ve çeşitli tümörlerde yüksek seviyelerde oksidatif DNA lezyonları gözlemlenmiştir, bu tür hasarlar, kanser etiolojisinde güçlü bir şekilde rol oynamaktadır. ROS ve RNS' ler DNA hasarının genel olarak başlatma süreciyle bağlantılı olduğu görülmektedir (Zhang *et al.* 2024).

Serbest radikaller, artrit, hemorajik şok, ateroskleroz, yaşlanma, birçok organın iskemi ve reperfüzyon hasarı, Alzheimer ve Parkinson hastalığı, gastrointestinal disfonksiyonlar, tümör gelişimi ve karsinogenez ve AIDS dahil olmak üzere insanlarda yüzlerce hastalık durumunda rol oynar. Antioksidanlar serbest radikallerin güçlü temizleyicileridir ve neoplastik süreçlerin inhibitörleri olarak görev yaparlar (Guan *et al.* 2021).

Serbest radikaller oksidatif strese neden olan oldukça reaktif moleküllerdir. Oksidatif stres hücredeki lipitlere, proteinlere, enzimlere, karbonhidratlara ve DNA' ya zarar verir (Geng *et al.* 2023). Bunun sonucu olarak yukarıda belirtilen hastalıklar ortaya çıkar.

Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Metabolizma tarafından sentezlenen bu antioksidanların bazıları enzimler ve enzim kofaktörleridir. Enzimatik olmayan antioksidanların kaynağı beslenmedir (Ciftci and Bakal 2009).

İnsan antioksidan savunma sistemi, enzimatik savunma sistemleri dediğimiz süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz enzimlerini içerir. Bunların yanı sıra hidrofilik süpürücüler olan askorbat, ürat, glutatyon ve flavonoidler de vardır. Lipofilik radikal süpürücüler arasında tokoferoller, karotenoidler ve ubikinon bulunur. Metabolizma tarafından sentezlenen maddelere ek olarak, diyet yoluyla alınan önemli antioksidan türevi maddeler de vardır. Bunların arasında en önemlileri askorbik asit, lipoik asit, polifenoller ve karotenoidlerdir (Yi *et al.* 2022). Hastalıkların gelişiminde ROS' a karşı savunma zayıfsa oksidatif stres artar ve bu da hücrel hasara yol açar. Bu durumda dışarıdan alınan antioksidanlar oksidatif stresin neden olduğu hasarı azaltmak için kullanılır. Epigallocateşin gallat (EGCG), likopen, kuersetin, genistein, ellajik asit, ubikinon, indol-3-karbinol, askorbik asit ve E vitamini, lipoik asit, linalool, selenyum ve hesperitin önemli antioksidanlar olarak kabul edilir. Çok sayıda sentetik ve doğal antioksidanın, insan sağlığı üzerinde yararlı etkiler oluşturduğu ve hastalıkların önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Rudrapal *et al.* 2024, Scarpa *et al.* 2024).

Biyolojik örneklerin antioksidan kapasiteleri açısından taranması, tek bir analize dayanmak yerine bir dizi analiz kullanılarak yapılır. Bunun nedeni, farklı kimyasal reaksiyonları içeren bir dizi analizle karşılaştırıldığında tek bir testin gerçekçi sonuçlar vermediği literatürde gösterilmiştir (Opitz *et al.* 2014). Antioksidanların sınırlamaları ve metabolizması, serbest radikal kimyası alanında gelecekteki araştırmalar için hala bir zorluk teşkil etmektedir ve bu nedenle araştırmacılar, bu sınırlamaların üstesinden gelmek için alternatifler veya çözümler aramaya çalışmaktadır. Bazı genel sınırlamalar şunlardır:

- Nöroproteksiyon açısından antioksidanlar, yalnızca kan-beyin bariyeri nedeniyle uygun ve etkili koruma sağlamaz (Fortalezas *et al.* 2010),
- Diyetteki antioksidanlar farelerde insanlara kıyasla daha hassastır. Bu nedenle, herhangi bir klinik araştırmadan önce bu gerçeğin dikkate alınması önemlidir (Halliwell 2011).
- Başka bir sınırlama hücre kültürleriyle bağlantılıdır.

Antioksidan analizleri toplam antioksidan kapasite (TAK) adı verilen bir kavrama dayanmaktadır. TAK, biyolojik bir numunenin antioksidan kapasitesini belirlemek için kullanılan bir test çözeltisiyle söndürülen serbest radikallerin miktarı olarak ölçülür.

İlgili kimyasal reaksiyonların mekanizmasına bağlı olarak TAK analizleri ayrıca şu şekilde sınıflandırılabilir:

- Tek elektron transferi (Single Electron Transfer, SET),
- Hidrojen atomu transferi (Hydrogen Atom Transfer, HAT) reaksiyona dayalı analizler veya
- Geçiş metallerinin şelasyonu (Santos *et al.* 2017).

Tek elektron transferi (SET) mekanizması, reaksiyonun son noktasının bir göstergesi olarak bir oksidanla redoks (indirgeme-oksidasyon) reaksiyonunu içerir. Hidrojen atomu transferi (HAT) analizleri sentetik bir radikal oluşturucuyu, oksitlenebilir bir antioksidanı içerir. Hem SET hem de HAT reaksiyon bazlı analizler, bir numunenin önleyici kapasitesi yerine radikal temizleme kapasitesini ölçer (Huang *et al.* 2005, Rubio *et al.* 2016). SET' e dayalı analizler, antioksidanların belirli molekülleri ve bileşikleri indirgeme kapasitesini ölçerken, HAT' a dayalı analizler ise hidrojen atomu verme kapasitesini ölçer (Apak *et al.* 2008). SET analizlerinde antioksidan, radikali stabilize etmek için ona bir elektron verir. Bir elektronun antioksidandan radikale transferi radikalın renginde bir değişikliğe neden olacaktır. Renk değişiminin yoğunluğu, reaksiyon karışımında mevcut olan antioksidan konsantrasyonuyla orantılıdır. Renkte herhangi bir değişiklik gözlenmediğinde, yani elektron transferi durduğunda reaksiyonun bitiş noktasına ulaşılır (Huang *et al.* 2005). SET ve HAT mekanizmalarına ek olarak antioksidanların üçüncü tip etki mekanizması Zn^{2+} , Fe^{2+} ve

Cu^{2+} gibi geçiş metallerini řelatlama yetenekleridir. Geçiş metallerinin řelasyonu aynı zamanda bir ekstraktın veya bileřiřin antioksidan kapasitesini tahmin etmek için de dűřünülebilir (Santos *et al.* 2017).

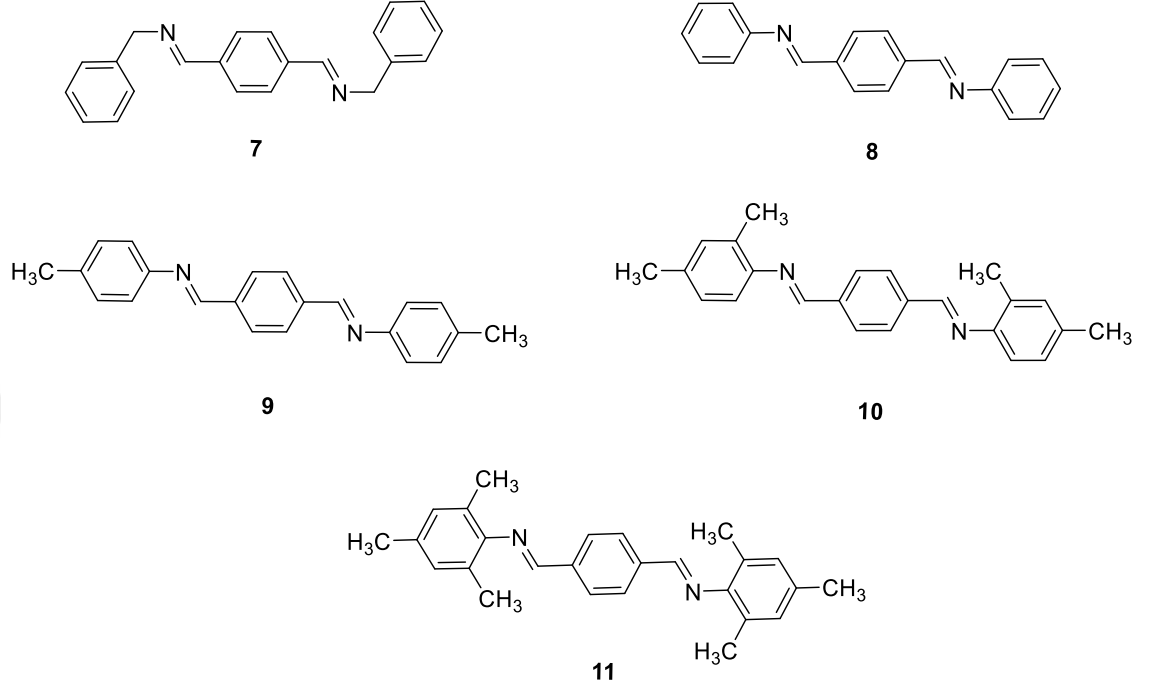
Biyolojik örneklerin antioksidan özelliğini ölçmek için çok sayıda yöntem mevcuttur. Bunlardan bazıları izelge 1.1' de gösterilmiştir:

Çizelge 1.1 Antioksidan aktiviteyi ölçmek için kullanılan farklı yöntemler (Moharram and Youssef 2014)

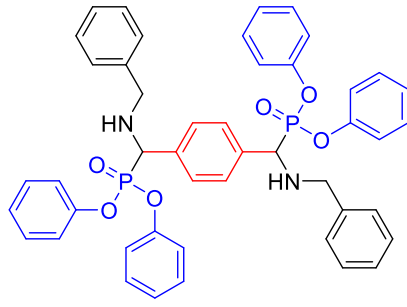
Antioksidan Testi	Yöntemin alışma Prensibi
1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil (DPPH) Radikalini Sűpűrűcű Kapasitesi 2,2'-azino-bis(3-etil-bezotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) Radikalini Sűpűrűcű Kapasitesi N, N'-dimethyl-p-fenilendiamin (DMPD) Radikalini Sűpűrűcű Kapasitesi	Radikal Giderme
Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Kapasite (FRAP) Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC)	İndirgeme
Metal İyonlarını (Fe^{2+}) şelatlama Antioksidan Kapasite	şelatlama

Bu tez kapsamında Schiff bazları (1,1'-(1,4-phenylene)bis(N-benzylmethanimine)(7), 1,1'-(1,4-phenylene)bis(N-phenylmethanimine) (8), 1,1'-(1,4-phenylene)bis(N-p-tolylmethanimine) (9), 1,1'-(1,4-phenylene)bis(N-(2,4-dimethylphenyl)methanimine) (10), 1,1'-(1,4-phenylene)bis(N-mesitylmethanimine) (11)) ve bunlardan sentezlenen bis- α -aminofosfonat (Tetraphenyl(1,4-phenylenebis((benzylamino)methylene))bis(phosphonate) (13), Tetraphenyl(1,4-phenylenebis((p-tolylamino)methylene))bis(phosphonate) (14), Tetraphenyl(1,4-phenylenebis(((2,4-dimethylphenyl)amino)methylene))bis(phosphonate) (15), Tetraphenyl (1,4-phenylenebis((mesitylamino)methylene))bis(phosphonate) (16)) molekűllerinin antioksidan kapasiteleri, AChE, BChE, CA I ve II, α -glikozidaz ve tirozinaz enzimlerine karřı enzim inhibitörleri, çeřitli gram-pozitif ve gram-negatif bakteri suřlarına karřı antibakteriyel etkileri *in vitro* ve *in silico* (Molekűler Docking, ADME) alıřılmıřtır. Bunun yanı sıra göz nűne alınan Schiff bazları ve bis- α -

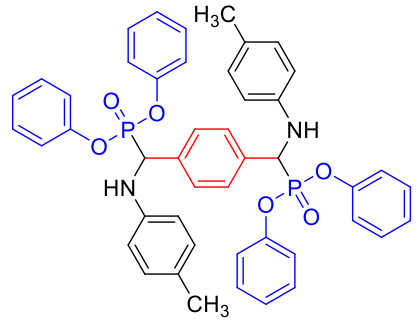
aminofosfonatların (Şekil 1.1 ve 1.2) elektronik yapıları Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (Density Functional Theory, DFT) ile incelenmiştir.



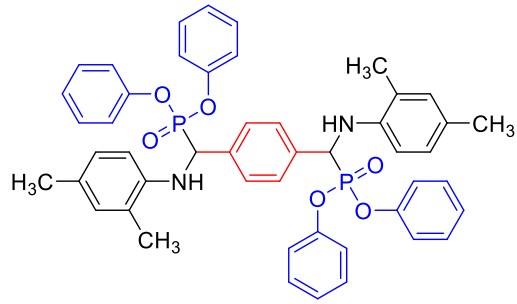
Şekil 1.1 Schiff bazları



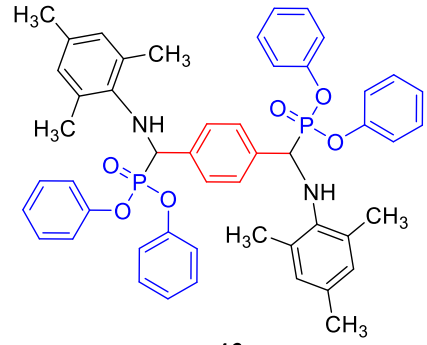
13



14



15



16

Şekil 1.2 Bis- α -aminofosfonatlar

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Taha *et al.* (2024) yaptıkları bir çalışmada indazol bazlı Schiff bazı türevlerini, başlangıç maddesi olarak 1-metil-1H-indazol-3-karboksilik asitten başlayarak üç aşamalı bir reaksiyon yolu ile sentezlemişlerdir. Çalışmada sentezlenen tüm türevler, *in vitro* α -glukosidaz ve α -amilaz inhibitör aktiviteleri açısından test edilmiştir. Serinin tüm analoglarının, standart ilaç akarboz ile karşılaştırıldığında, α -glukosidaz için $0,40 \pm 0,01$ ile $16,20 \pm 0,30$ μ M ve α -amilaz için $0,70 \pm 0,01$ ile $17,40 \pm 0,30$ μ M arasında değişen IC₅₀ değerleri ile iyi inhibitör potansiyel sergiledikleri gösterilmiştir (Taha *et al.* 2024).

Aytac *et al.* (2023) fenol grupları içeren ve sentetik antioksidan olarak kullanılma potansiyeline sahip çeşitli Schiff bazı ve hidraziniliden türevlerini ilk kez mikrodalga enerjisini kullanarak sentezlemişlerdir. Sentezlenen moleküllerin antioksidan kapasitelerini FRAP, CUPRAC, DPPH ve ABTS yöntemlerini kullanarak test etmişlerdir. Antioksidanlar üzerine yapılan çalışmalar kapsamında Schiff bazları ve hidraziniliden türevlerinin DPPH (IC₅₀: 12,15–99,01 μ g/mL) ve ABTS•+ (IC₅₀: 4,30–34,65 μ g/mL) radikal süpürücü kapasitelerinin oldukça güçlü olduğu bulunmuştur. Ayrıca Schiff bazları ve hidraziniliden türevlerinin AChE, BChE ve hCAs I ve hCA II gibi bazı metabolik enzimlere karşı inhibisyon aktiviteleri değerlendirilmiştir. Enzim inhibisyonu çalışmaları kapsamında sentezlenen Schiff bazları ve hidraziniliden türevlerinin AChE, BChE, hCAs I ve hCA II enzimlerini sırasıyla 16,11–57,75 nM, 19,80–53,31 nM, $26,08 \pm 8,53$ nM ve $85,79 \pm 24,80$ IC₅₀ değerlerinde inhibe ettiği görülmüştür (Aytac *et al.* 2023).

Akman *et al.* (2023) çalışmalarında, indol içeren bazı Schiff bazlarının asetilkolinesteraz ve insan karbonik anhidraz I ve II üzerine *in vitro* etkilerini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre Schiff bazı türevlerinin enzimleri önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. Örneğin, sentezlenen bazı bileşikler referans ilaç olan asetazolamid ile karşılaştırıldığında CA I ve II için daha iyi inhibitör etkiye sahip oldukları bulunmuştur. Ayrıca sentezlenen bu bileşiklerden bazıları da asetilkolinesteraz

için kontrol bileşiği olan takrine göre daha güçlü inhibitör etki göstermiştir (Akman *et al.* 2023).

Ullah *et al.* (2023) yaptığı başka bir çalışmada, bir dizi yeni benzoksazol içeren Schiff bazı türevinin sentezi gerçekleştirilmiş ve α -glukozidaz ve üreaz enzimlerine karşı değerlendirilmiştir. Sentezlenen tüm türevler, α -glukozidaza karşı referans ilaç olan akarboz ($IC_{50} = 38,45 \pm 0,80 \mu M$) ile karşılaştırıldığında $3,20 \pm 0,10$ ile $38,10 \pm 0,20 \mu M$ arasında değişen IC_{50} değerleri ile oldukça iyi bir inhibitör potansiyel gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca tüm türevler üreaz önleme potansiyeli durumunda, standart ilaç tiyoüre ($IC_{50} = 21,25 \pm 0,15 \mu M$) ile karşılaştırıldığında $2,70 \pm 0,40$ ile $21,20 \pm 0,10 \mu M$ arasında değişen IC_{50} değerleri göstermiştir. Tüm bileşiklerin 3T3 fare fibroblast hücre hattına karşı sitotoksosite açısından değerlendirilmiş ve toksik olmadıkları tespit edilmiştir (Ullah *et al.* 2023).

Camadan *et al.* (2022) ilaç olarak kullanılma potansiyeli olduğu düşünülen dört farklı karbazol Schiff bazı türevlerinin insan karbonik anhidraz (hCA) izoenzimleri I ve II üzerindeki etkilerini *in vitro* koşullarda araştırmışlardır. Karbazol Schiff bazı türevlerinin IC_{50} değerlerinin hCA izoenzim I için $32,09-151,2 \mu M$ ve hCA izoenzim II için $21,82-40,54 \mu M$ aralığında olduğu belirlenmiştir. Tüm bileşikler arasında (E)-3-(((9-Oktil-9H-karbazol-3-il) imino) metil) benzen-1,2-diol bileşiğinin hCA izoenzimi II üzerinde en güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca hCA I ve II reseptörleri ile en güçlü inhibitör etki gösteren karbazol Schiff bazı arasındaki kovalent olmayan etkileşimleri tespit etmek için moleküler docking çalışması da yapılmıştır (Camadan *et al.* 2022).

Farklı bir çalışmada Alsantali *et al.* (2022) bir dizi flavon türevli Schiff bazları sentezlemiş ve bu bileşiklerin tirozinaza karşı inhibitör potansiyellerini araştırmışlardır. Çalışmada flavon grubu ve hidrazon bağlantısının tirozinaz aktivitesinin kontrolünde anahtar bir rol oynadığını kesin olarak ortaya konulmuştur. Yapılan farmakolojik analizler sonucunda test edilen flavon bazlı Schiff bazı türevlerinin yüksek oranda konjuge flavon türevleri ile anti-melanojenik ajanlar gibi çeşitli amaçlar için kullanılabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal

alışmaları orta düzeyde aktivite göstermiştir. Ancak bunlardan bazıları referans bileşikler olan Siprofloksasin ve Ketokonazolden daha aktif oldukları bulunmuştur. Bunların yanında yazarların gerçekleştirdikleri *in vitro* analiz sonuçlarına göre, sentezlenen tüm moleküllerin, standart kojik asitle karşılaştırıldığında mantar tirozinazına karşı mükemmel aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Alsantali *et al.* 2022).

Buldurun *et al.* (2022), bir dizi yeni Schiff bazı içeren metal kompleksleri sentezlemişlerdir. Ayrıca bu komplekslerin enzim inhibitör ve antioksidan aktiviteleri çeşitli *in vitro* yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Enzim analizlerinin sonuçları, yeni metal komplekslerinin tirozinaz ve pankreatik lipaz enzimlerine karşı etkili inhibisyona sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca bileşiklerin antioksidan kapasiteleri ABTS, CUPRAC, DPPH ve FRAP yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin BHA, BHT, askorbik asit ve α -tokoferol gibi standartlarla karşılaştırıldığında güçlü antioksidan potansiyeline sahip oldukları da tespit edilmiştir (Buldurun *et al.* 2022).

Iraji *et al.* (2021) yapmış oldukları çalışmada, benzamid grubunu içeren bir dizi yeni Schiff bazı türevleri tasarlanıp sentezlenmiş ve bunların potansiyel tirozinaz inhibitörleri olarak kullanılabilecekleri rapor edilmiştir. Çalışmada *in vitro* tirozinaz inhibitör analizine dayanılarak, benzamid ve klorobenzen içeren Schiff bazı türevi diğerlerine kıyasla 7,57 μ M IC₅₀ değeri ile tirozinazın en güçlü inhibitörü olduğu ve ayrıca pozitif kontrol olarak kojik asitten yaklaşık 2,5 kat daha güçlü inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (Iraji *et al.* 2021).

Başka bir çalışmada Nasli-Esfahani *et al.* (2019), 1,2,3-triazol grubu içeren bir dizi yeni Schiff bazı tasarlamışlar ve α -glukosidaz inhibitörleri olarak değerlendirmişlerdir. Sentezlenen tüm bileşikler, α -glukosidaza karşı oldukça iyi bir inhibisyon göstermiş ve standart ilaç akarbozdan daha güçlü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca en güçlü inhibitör özellik gösteren Schiff bazı türevi üzerinde yapılan kinetik çalışma, bu bileşiğin yarışmalı bir α -glukosidaz inhibitörü olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada, moleküler docking çalışmasıyla sentezlenen bileşiklerin α -glukosidazın aktif

bölgesindeki önemli aminoasitlerle nasıl etkileşime girdiği de ortaya koyulmuştur (Nasli-Esfahani *et al.* 2019).

Marchán-García *et al.* (2024) bir dizi yeni α -aminofosfonat-tetrahidroizokinolin hibridi, oksitleyici madde olarak tert-butil hidroperoksit kullanarak N-aril-tetrahidroizokinolinler ve dialkilfosfitler arasındaki çapraz dehidrojenatif birleştirme reaksiyonu yoluyla sentezlemişler ve bu bileşiklerin *in vitro* kolinesteraz inhibisyon aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Sentezlenen tüm bileşikler, bütirilkolinesteraza karşı inhibisyon etki göstermiştir fakat bileşiklerden orto-tolil sübstitüenti içeren α -aminofosfonat-tetrahidroizokinolin türevi 9 nM IC₅₀ değerinde oldukça iyi inhibisyona sahip olduğu bulunmuştur. Güçlü inhibitör etki gösteren bileşiğe yapılan kinetik çalışmalar sonucunda bileşiğin yarışmasız inhibisyon olduğu ortaya koyulmuştur. Bunların yanında, çoğu α -aminofosfonat türevlerine yapılan ADME çalışmaları, bu türevlerin iyi farmakokinetik ve ilaca benzerlik özelliklerine sahip olduklarını göstermiştir (Marchán-García *et al.* 2024).

Subramanyam *et al.* (2023), nanokatalizör tarafından katalize edilen ve ultrasonikasyon tekniği kullanılarak Kabachnik-Fields reaksiyonu ile α -amino fosfonatların sentezlenmesi amacıyla etkili bir yöntem geliştirmişlerdir. Öncelikle, ilaca benzerlik ve bunların α -amilaz ve α -glikozidazı inhibe etme kapasiteleri hakkında bilgi edinmek için sentezden önce her molekül üzerinde bir *in silico* ADMET ve moleküler docking analizi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sentezlenen bileşiklerin α -amilaz ve α -glikozidaza karşı *in vitro* inhibitör etkisi değerlendirilmiştir. $103,3 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ve $105,5 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ IC₅₀ değerlerine sahip olan bileşiklerin standart ilaç olan akarboz (IC₅₀: $106,9 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$) ile karşılaştırıldığında α -amilaza karşı daha güçlü inhibitör oldukları bulunmuştur. Diğer yandan $88,4 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$, $91,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ ve $90,0 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ IC₅₀ değerlerine sahip bileşiklerin ise referans ilaç olan akarboz (IC₅₀: $93,2 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) ile karşılaştırıldığında α -glikozidaza karşı daha güçlü inhibitör oldukları bulunmuştur (Subramanyam *et al.* 2023).

Farklı bir çalışmada Zareei *et al.* (2023), yeni bir 4,5-difenil-imidazol- α -aminofosfonat hibrid serisi sentezlemişler ve bu bileşiklerin diyabet tedavisinde iki önemli hedef enzim

olan α -glukosidaz ve α -amilaza karşı etkisini incelemişlerdir. *In vitro* değerlendirmeler, sentezlenen tüm bileşiklerin, çalışılan enzimlere karşı standart inhibitör akarbozdan daha güçlü olduğunu göstermiştir. Sentezlenen α -aminofosfonat türevlerinden α -glukozidaza karşı en güçlü inhibitör olan bileşik (IC₅₀: 5,96 nM), standart madde akarbozdan (IC₅₀: 106,63 nM) 18 kat daha güçlü inhibisyona sahip olduğu rapor edilmiştir. Yine bu inhibitörün (IC₅₀: 1,62 nM) α -amilaza karşı, standart madde akarbozdan (IC₅₀: 44,16 nM) 27 kat daha güçlü inhibisyona sahip olduğu görülmüştür (Zareei *et al.* 2023).

Yapılan bir diğer çalışmada ise Sobati *et al.* (2023), bir dizi sülfonamid içeren α -aminofosfonat türevlerini sentezlemişler ve dört karbonik anhidraz izoformu, yani sitozolik insan hCA I ve II'nin yanı sıra kanser ile ilişkili olan hCA IX ve XII üzerinde inhibisyon çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri bileşiklerin IC₅₀ değerlerini belirlemiş ve karbonik anhidraz izoformları üzerine etkili olduklarını bildirmişlerdir (Sobati *et al.* 2023).

K'tir *et al.* (2022), 1,2,3-oksatzolidin-2,2-dioksit grubu içeren yeni α -aminofosfonatları sentezlemişler ve tüm bileşikleri, disk difüzyonu, MIC (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) ve MBC (Minimal Bakterisidal Konsantrasyon) yöntemleri kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri açısından *in vitro* test etmişlerdir. α -aminofosfonatlar ve gentamisin, YpDHPS (Yersinia pestis Dihidropteroat Sentaz) hedefi için potansiyel inhibisyonlarını incelemek üzere *in silico* olarak test edilmiştir. Sonuç olarak bileşiklerin, Gentamisin ve referans ligandla karşılaştırıldığında her açıdan benzer ve çok iyi sonuçlara sahip olduğunu bildirmişlerdir (K'tir *et al.* 2022).

Kandula *et al.* (2021), piperazin-1,2,3-triazol grubu içeren yeni bir α -aminofosfonat türevlerini bakır katalizörlüğünde Click reaksiyonuyla sentezlemişlerdir. Bileşiklerin *in vitro* α -glukozidaz ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Antioksidan kapasiteleri DPPH ve H₂O₂ antioksidan kapasite yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerden bazılarının α -glukozidaza karşı standart maddeden (akarboz) daha güçlü inhibitör oldukları ve antioksidan potansiyellerini de daha güçlü olduğu bulunmuştur (Kandula *et al.* 2021).

Aissa *et al.* (2021) yaptıkları çalışmada, bis- α -aminofosfonatları sentezlemek amacıyla kiral organokatalizör olarak (S, S)-1-okso-1-hidroksi-2-c,5-tdifenilfosfolan kullanmışlardır. 0,02 mg/mL' nin altındaki IC₅₀' ye sahip bileşikler, *Fusarium oxysporum* ve *Botrytis cinerea*'ya karşı oldukça iyi bir antifungal kapasite sergilediklerini ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca, sentezlenen tüm bileşikler güçlü bir antioksidan etki sergilerken hem AChE hem de BChE' a karşı düşük inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Ancak bileşiklerin çoğu tirozinaza karşı çok zayıf bir inhibitör aktivite sergiledikleri belirlenmiştir (Aissa *et al.* 2021).

Reddy *et al.* (2017) yaptıkları bir çalışmalarında, selüloz-SO₃H katalizörlüğünde yeni bis- α -aminofosfonat türevlerini sentezlemişlerdir. Elde edilen tüm bileşikler, antioksidan aktiviteleri açısından DPPH, NO ve H₂O₂ radikal temizleme yöntemlerine karşı test edilmiştir ve bileşiklerin iyi ve orta düzeyde antioksidan aktivite sergilediğini bildirmişlerdir (Reddy *et al.* 2017).

Farklı bir çalışmada Hellal *et al.* (2017), Kabachnik-Fields reaksiyonu yoluyla *orto* ve *para* pozisyonlarında aminofenol grubu içeren bir dizi α -aminofosfonat türevi sentezlemişler ve iki Gram-pozitif ve iki Gram-negatif klinik suşa karşı antibakteriyel aktiviteleri açısından Agar disk difüzyon yöntemi, MİK ve MBK yöntemlerini uygulanarak değerlendirmişlerdir. Sentezlenen α -aminofosfonatların *in vitro* antimikrobiyal taraması, bazı patojenik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı iyi antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Bileşiklerden nitro grubu içerenler tüm bakteri türlerine karşı standart Kloramfenikol ile karşılaştırıldığında daha iyi aktivite sergilediği bildirilmiştir (Hellal *et al.* 2017).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların üretici firmalarının isimleri, Çizelge 3.1' de yer almaktadır.

Çizelge 3.1 Deneylerde kullanılan kimyasallar ve üretici firmalar

Kimyasal madde adı	Kaynak
Neokuprin	Sigma Aldrich
Butirilkolinesteraz	Sigma Aldrich
Amonyun asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$)	Sigma Aldrich
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma Aldrich
Ferrozin	Sigma Aldrich
Asetiltiyokoliniyodat	Sigma Aldrich
Asetilkolinesteraz	Sigma Aldrich
α -Glikozidaz	Sigma Aldrich
4-Nitrofenil β -D-glikopiranozit	Sigma Aldrich
3,4-Dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA)	Sigma Aldrich
5,5'-Ditiyo-bis(2-nitro benzoik Asit) (DTNB)	Sigma Aldrich
Tirozin	Sigma Aldrich
p-nitrofenil asetat	Sigma Aldrich
Karbonik anhidraz	Sigma Aldrich
Tris(hidroksimetil)aminometan ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)	Sigma Aldrich
$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich
1,1-Difenil-2-pikril-hidrazil radikali (DPPH $\cdot$)	Sigma Aldrich
Demir (II) sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Demir (III) klorür (FeCl_3)	Merck
Metanol	Merck
Hidroklorik asit	Merck
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chromone-2-carboxylic acid (Trolox)	Merck
KH_2PO_4	Merck
Bakır (II) klorür (CuCl_2)	Merck
2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ)	Merck

3.2 Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Tez çalışma kapsamında moleküllerin biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan cihazların ve marka isimlerinin listesi Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Deneylerde kullanılan cihaz isimleri ve markaları

Kullanılan alet ve cihazlar	Marka
Hassas analitik terazi	Radwag AS 220.R2 PLUS
Otomatik pipet	Eppendorf Research Plus
pH-metre	Mettler Toledo S210-Basic Seven-Compact
Saf su cihazı	Merck Millipore Direct-Q® 8 UV
Ultrasonik banyo	Elmasonic P
Ultraviyole-Spektrofotometre küveti	1 cm ³ ' lük Kuartz küvet
Ultraviyole-Görünür Spektrofotometre	BioTek Epoch 2
Vorteks	Velp Scientific TX4 Vortex
Çalkalayıcı	DAIHAN SMHS Multi-Hotplate Stirrer

3.3 Kullanılan Programlar

Tez çalışmasında kullanılacak ligandlar ChemOffice Suite 2022 (PerkinElmer Informatics, Inc.) programı kullanılarak çizilmiştir. Ligand-enzim arasındaki bağlanma konformasyonlarını ve non-kovalent etkileşimleri incelemek amacıyla Molegro Virtual Docker (MVD) programı kullanılmıştır (Thomsen and Christensen 2006). Docking hesaplamaları sonucunda elde edilen ligand-enzim komplekslerinin iki ve üç boyutlu diyagramları BIOVIA Discovery Studio programı kullanılarak görselleştirilmiştir. Ligandların denge geometrilerini elde etmede Gaussian 09 paket programı kullanılmıştır (Frisch *et al.* 2009). Ligandların global reaktivite parametrelerini hesaplamak için Multiwfn programından yararlanılmıştır (Lu and Chen 2012).

3.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

3.4.1 DPPH metodunda kullanılan çözeltiler

- DPPH· çözeltisi (0,025 mM): Işıktan korunmuş karanlık ortamda kaplanmış erlen içerisine 1 mg DPPH tartılarak, 25 mL % 96' lık metanol içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Böylece 0,025 mM' lık radikal çözeltisi elde edilmiştir.

3.4.2 CUPRAC metodunda kullanılan çözeltiler

- Bakır (II) klorür çözeltisi (10 mM): 6,6 mg bakır (II) klorür tartılarak 4 mL saf suda çözülmüş ve son hacim 5 mL' ye tamamlanmıştır.
- Neocuprin çözeltisi (7,5 mM): 7,75 mg Neocuprin tartılarak 5 mL %99,5' lik etanol içinde çözülmüştür.
- $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ tamponu (1 M, pH 7,0): 4,62 g $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ tartılarak 50 mL saf suda çözülmüş ve son hacim saf su ile 60 mL' ye tamamlanmıştır. Daha sonra pH metre ile 0,1 M'lık asit/baz çözeltileri ile pH 7,0' a ayarlanmıştır.

3.4.3 FRAP metodunda kullanılan çözeltiler

- $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ tamponu (30 mM, pH 3,6): 408,24 mg sodyum asetat trihidrat tartılarak 1,6 mL glacial asetik asitte çözülmüştür. Hacim saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır. Daha sonra pH metre ile 0,1 M'lık asit/baz çözeltileri ile pH 3,6' ya ayarlanmıştır.
- Tripiridil triazin (TPTZ) (10 mM): 3,34 mg TPTZ tartılarak 40 mM 1 mL %37' lik HCl çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır.
- Demir (III) Klorür (20 mM): 5,4 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak az miktar saf su içerisinde çözülerek son hacim saf su ile 1 mL' ye tamamlanmıştır.
- FRAP reaktifi: 10 mL sodyum asetat tamponu (30 mM), 1 mL TPTZ (10 mM) ve 1 mL demir (III) klorür (20 mM) çözeltileri karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.4.4 Metal Şelatlama metodunda kullanılan çözeltiler

- $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ tamponu (100 mM, pH 5,5): 0,68 g sodyum asetat tartılarak az miktar saf su içerisinde çözülerek son hacim 50 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Daha sonra pH metre ile uygun asit/baz çözeltileri ile pH 5,5' e ayarlanmıştır.
- Demir (II) klorür (FeCl_2) (0,5 mM): 1,39 mg demir klorür tartılarak 9 mL saf su ile çözülerek son hacim 10 mL' ye tamamlanmıştır.

- Ferrozin (5 mM): 5 mg ferrozin tartılarak az miktar saf suda çözülerek son hacim 2 mL' ye tamamlanmıştır.

3.4.5 AChE ve BChE enzimlerinin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

- Tris HCl tamponu (100 mM, pH 8,0): 0,6 g Tris tartılarak 40 mL %37' lik HCl ile çözülmüştür ve uygun asit/baz çözeltileri ile pH 8,0' e ayarlanmıştır. Son hacim saf su ile 50 mL' ye tamamlanmıştır.
- 5'-dithiobis-(2- nitrobenzoik asit) (DTNB) (6 mM): 11,2 mg substrat tartılarak 1 mL 100 mM tris HCl tamponu ile çözülmüş ve hacmi saf su ile 5 mL' ye tamamlanmıştır.
- Asetilkolin iyodat substratı (15 mM): 14 mg asetilkolin iyodat tartılmıştır. 1 mL 100 mM tris HCl tamponu ile çözülerek hacmi saf su ile 5 mL' ye tamamlanmıştır.
- Bütirilkolin iyodat substratı (15 mM): 14 mg bütirilkolin iyodat tartılmıştır. 1 mL 100 mM tris HCl tamponu ile çözülerek hacmi saf su ile 5 mL' ye tamamlanmıştır.

3.4.6 CA enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

- Tris HCl tamponu (100 mM, pH 8,0): 0,6 g Tris tartılarak, 40 mL %37' lik HCl ile çözülerek uygun asit/baz çözeltileri ile pH 8,0' e ayarlanmıştır. Son hacim saf su yardımıyla 50 mL' ye tamamlanmıştır.
- 4-nitrofenil asetat substratı: 4 mg 4-nitrofenil asetat 150 µL %99,8' lik aseton içerisinde çözüldürülmüş ve daha sonra 7 mL saf suyun içerisine damla damla ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.4.7 α-Glikozidaz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

- Potasyum fosfat tamponu (100 mM, pH 6,8): 0,60 g KH_2PO_4 tartılarak 40 mL saf suda çözülerek son hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra pH metre ile uygun asit/baz çözeltileri ile pH 6,8' e ayarlanmıştır.

- p-Nitrofenil β -D-glikopiranozit substratı (p-NPG) (5 mM): 7,4 mg substrattan tartılarak 5 mL fosfat tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.

3.4.8 Tirozinaz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

3,4-hidroksi-L-fenilalanin substratı (L-DOPA) (5 mM): 10 mg substrattan tartılarak 100 mM 5 mL fosfat tamponu (pH 6,8) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.5 Antioksidan Kapasite Testleri

Daha önce sentezlenen beş adet Schiff bazı ve dört adet bis- α -aminofosfonat türevi moleküllerin antioksidan aktivite testleri DPPH, CUPRAC, FRAP ve metal şelatlama antioksidan kapasite yöntemleri ile incelenmiştir. Her bir molekülün stok çözeltisi kullanılarak antioksidan kapasite testleri yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar ile örneklerin antioksidan aktiviteleri troloks eşdeğeri olarak belirlenmiştir. Tüm testler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.5.1 DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil radikal süpürücü kapasite) yöntemi

DPPH radikal süpürme kapasitesi analiz yöntemleri antioksidan özelliği gösteren maddelerin antioksidan kapasitesini ölçmede çok sık kullanılan bir metottur (Moğ *et al.* 2011). Bu yöntemde DPPH radikalinin antioksidan bileşenlerden elektron alması sonucu menekşe mor rengin açılması ve spesifik olarak 517 nm’ de spektrofotometrik analizini esas alır. Bu çalışmada Schiff bazı ve bis- α -aminofosfonat türevlerinin DPPH· radikali üzerindeki etkisi Blois metodu modifiye edilerek test edilmiştir (Blois 1958).

Deneyde 3 mg/mL konsantrasyonunda maddeler DMSO ile çözülerek stok çözeltiler hazırlanmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu plakada 50 μ L Schiff bazı (7-11) ve bis- α -aminofosfonat (13-16) molekülleri ile 250 μ L 0,025 mM DPPH çözeltisi karıştırılmıştır. Kör olarak DPPH radikali yerine saf su kullanılmıştır. Standart olarak troloks kullanılmıştır. Karışım 30 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona

bırakılmış ve 517 nm’ de mikropilaka okuyucu spektrofotometre cihazı kullanılarak absorpsansları ölçülerek kaydedilmiştir. Tüm testler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.5.2 CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi

Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntem temel olarak 2,9-dimetil-1, 10-fenantrolin (Neokuproin Nc)’ in Cu(II) ile oluşturduğu bakır (II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm’ de maksimumu absorpsans veren bakır (I)neokuproin (Cu(I)-Nc) şelatına indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır (Apak *et al.* 2008). Bu çalışmada Schiff bazı ve bis- α -aminofosfonat türevlerinin Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite testleri Apak ve arkadaşlarının metodu laboratuvar ortamına göre mofiyede edilerek gerçekleştirilmiştir.

Deneyde 5,0 mL CuCl₂ çözeltisi, 5,0 mL neokuproin çözeltisi ve 5,0 mL amonyum asetat tamponu karıştırılarak CUPRAC reaktifi hazırlanmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu plakada 50 μ L farklı konsantrasyonlardaki moleküller ile 35 μ L saf su ve 165 μ L CUPRAC reaktifi karıştırılmıştır. 50 μ L örnek, 145 μ L saf su ve 55 μ L tampon karışımı kör olarak kullanılmıştır. Standart olarak troloks kullanılmıştır. Karışım 30 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve 450 nm’ de mikropilaka okuyucu spektrofotometre cihazı kullanılarak absorpsansları ölçülerek ve kaydedilmiştir. Tüm testler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.5.3 FRAP (Demir (III) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi

Benzie ve Strain tarafından geliştirilen bu metodoloji, demir (III)’ün indirgenme kapasitesine dayanarak antioksidanların toplam miktarını ölçmektedir (Benzie and Strain 1996, Benzie and Szeto 1999, Pulido *et al.* 2000). Düşük pH koşullarında Fe (III), tripiridiltriazin (TPTZ) ile reaksiyona girerek [Fe (III)–TPTZ] kompleksini oluşturur. Bu kompleks, antioksidanların varlığıyla Fe (II)-tripiridiltriazin [Fe (II)-TPTZ] kompleksine indirgenir. Oluşan mavi renkli kompleks, 595 nm dalga boyunda maksimum absorpsans göstermektedir (Benzie and Strain 1996, Benzie and Szeto 1999,

Pulido *et al.* 2000). Bu şekilde, örnekteki toplam antioksidan kapasitesi doğrudan belirlenebilir.

Deneyde 30 μ M asetat tamponu, 10 μ M TPTZ ve 20 μ M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10:1:1) oranında karıştırılarak Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonat türevleri ile 96 kuyucuklu plakaya eklenmiştir. Standart olarak yine troloks kullanılmıştır. Karışım 593 nm’ de mikropilaka okuyucu spektrofotometre cihazı kullanılarak absorbansları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Tüm testler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.5.4 Metal şelatlama kapasitesi yöntemi

Metal iyonları şelatlama aktivitesi testleri serbest halde bulunan ağır metallerin yıkıcı etkilerini inhibe etmek amacıyla kullanılan bir yöntemidir. Bu çalışmada Decker ve arkadaşının belirlediği yöntemde bazı değişiklikler yapılarak çalışılmıştır (Decker and Welch 1990).

Deneyde 96 kuyucuklu plakada 50 μ L farklı konsantrasyonlardaki örnekler ile 100 μ L tampon, 85 μ L saf su ve 25 μ L FeCl_2 homojen olarak karıştırılarak 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra karışıma 25 μ L ferrozin ilave edilerek 10 dakika daha inkübasyona bırakıldıktan sonra 562 nm’ de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Kör olarak 25 μ L ferrozin yerine 25 μ L saf su ilave edilerek kullanılmıştır. Standart olarak troloks kullanılmıştır. Tüm testler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.6 Enzim İnhibisyon Çalışmaları

Daha önce sentezlenen beş adet Schiff bazı ve dört adet bis- α -aminofosfonat türevi moleküllerin karbonik anhidraz, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, α -glukozidaz ve tirozinaz enzimleri üzerine aktiveleri incelenmiştir. DMSO’ da çözünmüş her bir bileşiğin beş farklı konsantrasyonu kullanılarak enzim aktivite ölçümleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir. Tüm testler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.6.1 Asetilkolinesteraz enziminin aktivite tayini

Örneklerin asetilkolinesteraz enzimini inhibe etme kapasiteleri Ellman metoduna göre incelenmiştir (Ellman *et al.* 1961). Ellman metodu kolinesterazların, asetilkolinyodadın tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizlemesi ve açığa çıkan tiyokolinin ortama eklenen DTNB ile reaksiyonu sonucu sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin 412 nm’ de absorbands vermesi esasına dayanır.

Deneyde 96 kuyucuklu mikro plakada Çizelge 3.3’ de belirtilen sıra ve miktarlarda maddeler karıştırılarak reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Asetilkolin iyodat ilave edilmeden önce karışımın kör absorbandsı okunmuştur. Daha sonra substrat eklenerek örneklerin 37 °C’ de 10 dakika bekletildikten sonra 492 nm’ de absorbands değerleri okunarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlardan yararlanılarak Schiff bazı ve bis- α -aminofosfonat türevlerinin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Her bir örnek için beş farklı konsantrasyonu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 3.3 Asetilkolinesteraz aktivite tayininde kullanılan madde miktarları

Kullanılan Maddeler	Numune Tüpü	Kontrol Tüpü
Saf su*	50 μ L	50 μ L
Tampon (Tris HCl pH: 8,0)	25 μ L	25 μ L
Substrat (Asetilkolin iyodat)	15 μ L	15 μ L
Enzim (Asetilkolinesteraz)	10 μ L	10 μ L
5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	30 μ L	30 μ L
İnhibitör	Değişken	-
Toplam hacim	130 μL	130 μL
* İnhibitör miktarına göre değişken		

3.6.2 Bütirilkolinesteraz enzimin aktivite tayini

Örneklerin bütirilkolinesteraz enzimini inhibe etme kapasiteleri Ellman metoduna göre ve asetilkolinesteraz enzim prosedürüne göre çalışılmıştır.

Deneyde 96 kuyucuklu mikro plakada Çizelge 3.4’ de belirtilen sıra ve miktarlarda maddeler karıştırılarak reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Asetilkolin iyodat ilave edilmeden önce karışımın kör absorbansı okunmuştur. Daha sonra substrat eklenerek örneklerin 37 °C’ de 10 dakika bekletildikten sonra 492 nm’ de absorbans değerleri okunarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlardan yararlanılarak Schiff bazı ve bis- α -aminofosfonat türevlerinin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Her bir örnek için beş farklı konsantrasyonu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 3.4 Bütirilkolinesteraz aktivite tayininde kullanılan madde miktarları

Kullanılan Maddeler	Numune Tüpü	Kontrol Tüpü
Saf su	50 μ L	50 μ L
Tampon (Tris HCl pH: 8,0)	50 μ L	50 μ L
Substrat (Bütirilkolin iyodat)	15 μ L	15 μ L
Enzim (Bütirilkolinesteraz)	10 μ L	10 μ L
DTNB		
İnhibitör	Değişken	-
Toplam hacim	125 μL	125 μL
* İnhibitör miktarına göre değişken		

3.6.3 Karbonik anhidraz (hCA I ve hCA II) izoenzimlerinin aktivite tayini

Örneklerin hCA I ve hCA II enzim aktivite tayinleri, Armstrong ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek çalışılmıştır (Armstrong *et al.* 1966, Verpoorte *et al.* 1967). Tris-HCl tamponu (pH 8.0) ve 4-nitrofenil asetat substrat çözeltileri enzim aktivite testinde kullanmak amacıyla hazırlanmıştır. Bu enzim aktivite testinde 96 kuyucuklu mikro plakada Çizelge 3.5’ te belirtilen miktarlarda maddeler karıştırılarak reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Substrat ilave edilmeden önce karışımın kör absorbansı okunmuştur. Daha sonra substrat eklenerek örneklerin 37 °C ve 348 nm’ de absorbans değerleri okunarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlardan yararlanılarak moleküllerin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Her bir örnek için beş farklı konsantrasyonu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 3.5 Karbonik anhidraz aktivite tayininde kullanılan madde miktarları

Kullanılan Maddeler	Numune Tüpü	Kontrol Tüpü
Saf su*	50 µL	50 µL
Tampon (Tris HCl pH: 8,0)	50 µL	50 µL
Substrat (4-nitrofenil asetat)	30 µL	30 µL
Enzim (CA izoenzimi)	10 µL	10 µL
İnhibitör	Değişken	-
Toplam hacim	140 µL	140 µL
* İnhibitör miktarına göre değişken		

3.6.4 α-Glikozidaz enzimin aktivite tayini

Örneklerin α-Glikozidaz enzim aktivitesi, Tao ve arkadaşların geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek çalışılmıştır (Sarıkurkcu *et al.* 2018). 100 mM fosfat tamponu (pH 6,8) ve 5 mM p-NPG substrat çözeltileri enzim aktivite testinde kullanmak amacıyla hazırlanmıştır. Bu enzim aktivite testinde 96 kuyucuklu mikro plakada Çizelge 3.6’ da belirtilen miktarlarda maddeler karıştırılarak reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Substrat ilave edilmeden önce karışımın kör absorbansı okunmuştur. Daha sonra substrat eklenerek örneklerin 37 °C ve 340 nm’ de absorbans değerleri okunarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlardan yararlanılarak Schiff bazı ve bis-α-aminofosfonat türevlerinin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Her bir örnek için beş farklı konsantrasyonu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 3.6 α-Glikozidaz aktivite tayininde kullanılan madde miktarları

Kullanılan Maddeler	Numune Tüpü	Kontrol Tüpü
Saf su	50 µL	50 µL
Tampon (Sodyum fosfat tamponu pH: 6,8)	50 µL	50 µL
Substrat (p-NPG)	20 µL	20 µL
Enzim (α- Glikozidaz)	10 µL	10 µL
İnhibitör	Değişken	-
Toplam hacim	130 µL	130 µL
* İnhibitör miktarına göre değişken		

3.6.5 Tirozinaz enzimin aktivite tayini

Örneklerin tirozinaz enzim aktivitesi, Addar ve arkadaşların geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek çalışılmıştır (Addar *et al.* 2019). 100 mM fosfat tamponu (pH 6,8) ve 5 mM L-DOPA substrat çözeltileri enzim aktivite testinde kullanmak amacıyla hazırlanmıştır. Deneyde 96 kuyucuklu mikro plakada Çizelge 3.7’ de belirtilen miktarlarda maddeler karıştırılarak reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Substrat ilave edilmeden önce karışımın kör absorbansı okunmuştur. Daha sonra substrat eklenerek örneklerin 37 °C’ de 10 dakika bekletildikten sonra 492 nm’ de absorbans değerleri okunarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlardan yararlanılarak Schiff bazı ve bis- α -aminofosfonat türevlerinin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Her bir örnek için beş farklı konsantrasyonu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 3.7 Tirozinaz aktivite tayininde kullanılan madde miktarları

Kullanılan Maddeler	Numune Tüpü	Kontrol Tüpü
Saf su*	50 μ L	50 μ L
Tampon (Sodyum fosfat tamponu pH: 6,8)	50 μ L	50 μ L
Substrat (L-DOPA)	15 μ L	15 μ L
Enzim (Tirozinaz)	10 μ L	10 μ L
İnhibitör	Değişken	-
Toplam hacim	125 μL	125
* İnhibitör miktarına göre değişken		

3.7 Kuantum Kimyasal Hesaplamalar

Tüm kuantum kimyasal hesaplamalar Gaussian 16 programı kullanılarak yapılmıştır (Frisch *et al.* 2009). Moleküllerin geometri optimizasyonu ve harmonik titreşim frekansı hesaplamaları, yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) yöntemi, B3LYP (Becke 1993, Lee *et al.* 1988) fonksiyoneli ve cc-pVDZ (Dunning 1989) baz seti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Global reaktivite parametreleri (iyonlaşma potansiyeli, IP, elektron ilgisi, A, elektronegatiflik, χ , kimyasal potansiyel, μ , kimyasal sertlik, η , kimyasal yumuşaklık, σ ve elektrofiliklik, ω), moleküllerin kimyasal reaktivitesini ve kinetik

stabilitesini anlamamızı sağlayan önemli kuantum kimyasal parametrelerdir. Moleküllere ait bu parametreler, B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde hesaplanmıştır.

MEP haritaları, moleküllerin boyutunu, yük dağılımını ve şeklini gösterir ve "potansiyel enerji haritaları veya moleküler elektrostatik potansiyel yüzeyler" olarak bilinir. Bir molekülün yükünü, elektronegatifliğini, moleküler polaritesini ve dipol momentini anlamamızı sağlayan ve ayrıca moleküldeki toplam yük dağılımının ürettiği net elektrostatik etki hakkında bilgi sağlayan optik bir yöntemdir. Elektron yoğunluğu yüzeyi renk kodlu bir haritadır. Bu haritalara göre kırmızı bölgeler yüksek elektron yoğunluğuna sahip, mavi bölgeler ise düşük elektron yoğunluğuna sahip bölgeleri göstermektedir (Choudhary *et al.* 2019, Khalid *et al.* 2019, Qi *et al.* 2021). Moleküllere ait MEP haritaları B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde hesaplanmıştır.

3.8 Moleküler Docking Çalışmaları

Moleküler docking, kararlı bir kompleks oluşturmak için tercih edilen bir molekülün diğer moleküle bağlanırken tercih ettiği konformasyonları belirleyen bir metottur. Diğer bir ifadeyle, protein ile ligand arasındaki bağlanma sırasındaki etkileşimleri ve hareketleri inceleyen bir yöntemdir (Lengauer and Rarey 1996). Moleküler modellemenin birçok olası metotları ve uygulamaları mevcuttur. Yapı oluşturma, yapının görüntülenmesi, konformasyon analizi, biyoaktif konformasyonların türevlendirilmesi, moleküler süperpozisyon ve karşılaştırma, farmakoforik kalıpların türevlendirilmesi, reseptör haritalandırımı, inhibisyon aktivitelerin tahmini, moleküler etkileşimler, docking, moleküler özelliklerin hesaplanması, enerji hesapları gibi alanlarda moleküler modellemeye dayanılmaktadır (Lengauer and Rarey 1996).

Moleküller ile hedef enzimler arasındaki bağlanma konformasyonlarını ve kovalent olmayan etkileşimleri tahmin etmek için moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Moleküler docking hesaplamaları, Molegro Virtual Docker programı kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca iki boyutlu ve üç boyutlu etkileşim diyagramları BIOVIA Discovery Studio programı ile görselleştirilmiştir. Hedef proteinlerin (AChE, BChE, α -glukozidaz ve tirozinaz sırasıyla PDB ID: 4EY7, 4BDS,

3A4A ve 2Y9X) kristal yapıları RCSB database (www.pdb.org) sitesinden alınmıştır. Deneyssel yolla elde edilmiş 4EY7 (AChE), 4BDS (BChE), α -glikozidaz (3A4A) ve tirozinaz (2Y9X) kodlu yapılarından, AChE, BChE, α -glikozidaz ve tirozinaz enzimlerinin aktif bölgeleri belirlenmiş ve 7-11 ve 13-16 moleküllerinin bu aktif bölgelerde yaptığı etkileşimleri analiz etmek için docking prosedürü uygulanmıştır (Cheung *et al.* 2012, Nachon *et al.* 2013).

3.9 Farmakokinetik Çalışmaları (ADME)

Moleküllerin ADME parametreleri, ilaç benzerliklerini, suda çözünürlüklerini, farmakokinetik ve fizikokimyasal özelliklerini belirlemek için SwissADME web aracı (<http://www.swissadme.ch/>) kullanılarak değerlendirilmiştir (Daina *et al.* 2017).

3.10 Antibakteriyel Aktivite Testleri

Sentezlenen moleküllerin antibakteriyel aktiviteleri altı gram pozitif ve beş gram negatif olmak üzere on bir farklı bakteri suşu kullanılarak (Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1222), *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)) agar kuyucuk yöntemi ile test edilmiştir (Magaldi *et al.* 2004). Test edilen bakteri suşları Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvarından temin edilmiştir.

3.10.1 Agar kuyucuk yöntemi

Bakteri suşları Müller Hinton Agar (MHA) besiyerine çizgi ekim yöntemiyle yayılmış ve 37 °C' de gece boyunca inkübasyona bırakılarak çoğaltılmıştır. Çoğalan mikroorganizmaların tek kolonilerinden öze yardımıyla alınmış ve steril serum fizyoloji

(% 0,9 NaCl) içerisinde homojen hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Mc-Farland 0,5 değerine ayarlanan hücre süspansiyonları steril eküvyon çubuğu kullanılarak MHA besiyerine yayma ekimleri yapıldıktan sonra steril cork-borer yardımıyla 4 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Ardından kuyucukların her birine 2500 µg/mL derişime sahip test solüsyonlarından 50 µL eklenerek, 37 °C sıcaklıkta 1 gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kuyucuk etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol ampisilin (10 mg/mL), negatif kontrol olarak ise % 5 DMSO solüsyonu kullanılmıştır. Tüm testler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama değer olarak verilmiştir.

3.10.2 Minimal inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi

Agar kuyucuk yöntemi kullanılarak etki gösteren maddelerin MİK değerleri 96 kuyucuklu mikropłaka kullanılarak Broth mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir (Kumar *et al.* 2014). 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15 moleküllerinin farklı konsantrasyonları bakteriler için MHB (Müller Hinton Broth) sıvı besi yerleri kullanılarak 2500 µg/mL-19,81 µg/mL (2500, 1250, 625, 312,5, 156,25, 78,125, 39,62, 19,81) aralığında hazırlanmıştır. E-plakanın her bir kuyucuğuna, uygun besiyeri, test molekülleri ve Mc-Farland 0,5 bulanıklığına sahip süspansiyonlardan eklenmiştir. Plakalar bakteriler için 37°C’ de yaklaşık 16-18 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve ardından MİK değerleri belirlenmiştir.

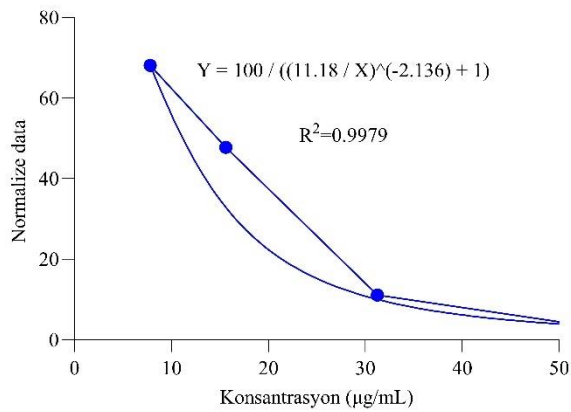
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Antioksidan Kapasite Testleri

Tez çalışmasında kullanılan tüm moleküllerin antioksidan kapasiteleri DPPH, CUPRAC, FRAP ve metal şelatlama antioksidan ölçüm yöntemleri ile belirlenmiştir.

4.1.1 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü kapasite yöntemi

Bu yöntemde DPPH radikalının antioksidan bileşenlerden elektron alması sonucu menekşe mor rengin açılması ve spesifik olarak 517 nm’ de absorbans ölçümüne dayanır (Blois 1958). Kontrol maddesi olarak troloks kullanılmıştır. Troloks stok çözeltisi hazırlanarak, ardışık seyreltme yoluyla farklı konsantrasyonlardaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı normalize edilen absorbans değerleri kullanılarak 0-50 µg/mL çalışma aralığının nonlineer standart eğri grafiği çizilmiştir (Şekil 4.1). Daha sonra bütün moleküllerin stok çözeltileri hazırlanarak aynı yöntemle ölçüldü ve troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri standart eğri grafiğinden elde edilen formül ile hesaplanmıştır. DPPH yöntemi için eşdeğer troloks miktarları Çizelge 4.1’ de verilmiştir.



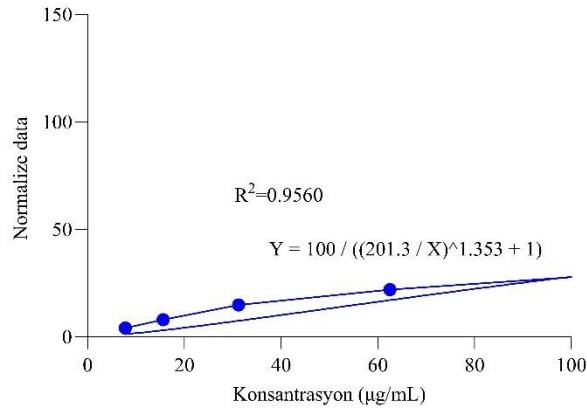
Şekil 4.1 DPPH standart eğri grafiği

Çizelge 4.1 DPPH yöntemi için eşdeğer troloks miktarları

Moleküller	Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite (µg/mL)
7	0,00
8	9,95
9	11,57
10	9,28
11	7,47
13	2,19
14	2,22
15	2,24
16	2,55

4.1.2 Bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesine ait bulgular (CUPRAC)

Çalışmamızda moleküllerin Cu^{2+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri 450 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ile belirlenmiştir (Apak *et al.* 2008). Kontrol maddesi olarak troloks kullanılmıştır. Troloks stok çözeltisi hazırlanarak, ardışık seyreltme yoluyla farklı konsantrasyonlardaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı normalize edilen absorbans değerleri kullanılarak 0-100 µg/mL çalışma aralığının nonlineer standart eğri grafiği çizilmiştir (Şekil 4.2). Daha sonra bütün moleküllerin stok çözeltileri hazırlanarak aynı yöntemle ölçüldü ve troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri standart eğri grafiğinden elde edilen formül ile hesaplanmıştır. CUPRAC yöntemi için eşdeğer troloks miktarları Çizelge 4.2’ de verilmiştir.



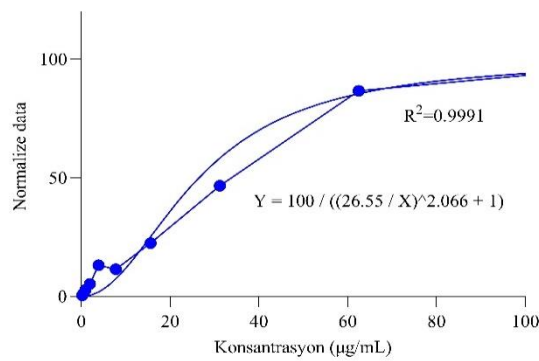
Şekil 4.2 CUPRAC standart grafiği

Çizelge 4.2 CUPRAC yöntemi için eşdeğer troloks miktarları

Moleküller	Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite (µg/mL)
7	2,19
8	7,60
9	0,00
10	5,98
11	43,14
13	8,16
14	14,63
15	26,48
16	23,51

4.1.3 FRAP indirgeme aktivitesine ait bulgular

Bu yöntem Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) kompleksinin antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks olan Fe(II)-TPTZ' yi oluşturması ve bu kompleksin 593 nm' de maksimum absorbans ölçümüne dayanır (Benzie and Strain 1996, Benzie and Szeto 1999, Pulido *et al.* 2000). Kontrol maddesi olarak troloks kullanılmıştır. Troloks stok çözeltisi hazırlanarak, ardışık seyreltme yoluyla farklı konsantrasyonlardaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı normalize edilen absorbans değerleri kullanılarak 0-100 µg/mL çalışma aralığının nonlineer standart eğri grafiği çizilmiştir (Şekil 4.3). Daha sonra bütün moleküllerin stok çözeltileri hazırlanarak aynı yöntemle ölçüldü ve troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri standart eğri grafiğinden elde edilen formül ile hesaplanmıştır. FRAP yöntemi için eşdeğer troloks miktarları Çizelge 4.3' de verilmiştir.



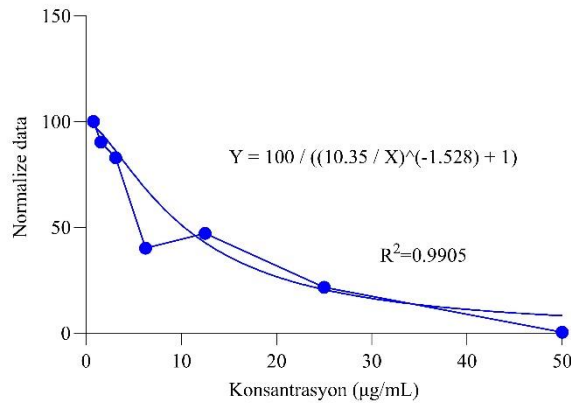
Şekil 4.3 FRAP standart eğri grafiği

Çizelge 4.3 FRAP yöntemi için eşdeğer troloks miktarları

Moleküller	Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite (µg/mL)
7	1,68
8	5,86
9	17,23
10	26,22
11	72,46
13	6,97
14	3,54
15	5,45
16	6,44

4.1.4 Metal şelatlama kapasitesine ait bulgular

Metal iyonu şelatlama aktivitesi, moleküllerin serbest halde bulunan ağır metalleri bağlayabilmek için güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile reaksiyonuna dayanmaktadır (Decker and Welch 1990). Bu antioksidan testi için kontrol olarak troloks kullanılmıştır. Troloks stok çözeltisi hazırlanarak, ardışık seyreltme yoluyla farklı konsantrasyonlardaki absorbands değerleri ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı normalize edilen absorbands değerleri kullanılarak 0-50 µg/mL çalışma aralığının nonlinear standart eğri grafiği çizilmiştir (Şekil 4.4). Daha sonra bütün moleküllerin stok çözeltileri hazırlanarak aynı yöntemle ölçülmüş ve troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri standart eğri grafiğinden elde edilen formül ile hesaplanmıştır. Metal şelatlama yöntemi için eşdeğer troloks miktarları Çizelge 4.4’ de verilmiştir.



Şekil 4.4 Metal şelatma standart grafiği

Çizelge 4.4 Metal şelatlama yöntemi için eşdeğer troloks miktarları

Moleküller	Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite (µg/mL)
7	42,18
8	40,15
9	40,36
10	43,67
11	24,63
13	28,95
14	17,83
15	11,37
16	15,11

4.2 Kuantum Kimyasal Hesaplamalarına Ait Bulgular

Yapılan tez çalışmasında global reaktivite parametreleri (iyonlaşma potansiyeli, I , elektron ilgisi, A , elektronegatiflik, χ , kimyasal potansiyel, μ , kimyasal sertlik, η , kimyasal yumuşaklık, σ ve elektrofiliklik, ω), yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) yöntemi, B3LYP (Lee *et al.* 1988, Becke 1993) fonksiyoneli ve cc-pVDZ (Dunning 1989) baz setiyle hesaplanmıştır.

Çizelge 4.5 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların global reaktivite parametreleri

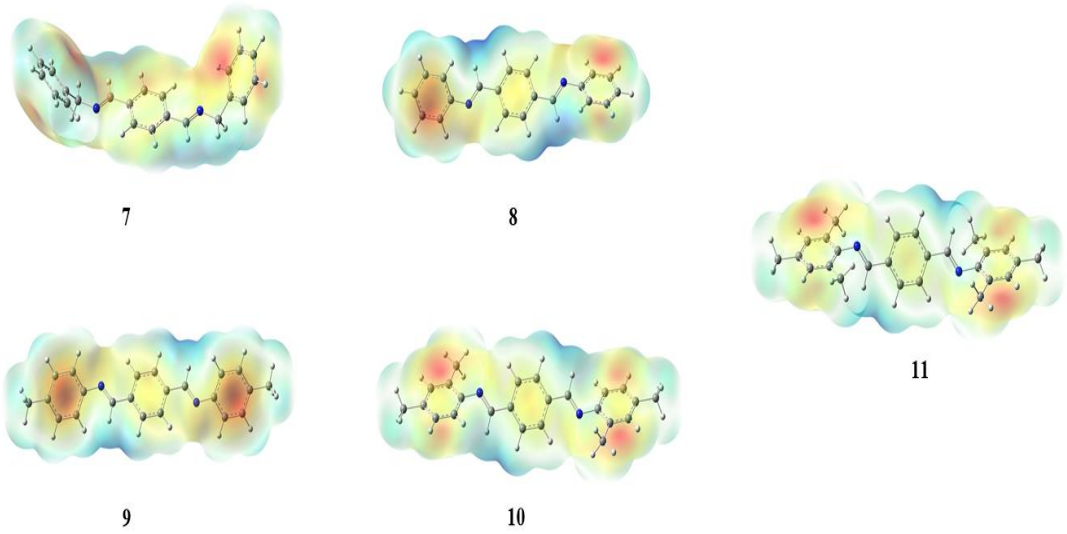
Molekül	ΔE (eV)	I (eV)	A (eV)	χ (eV)	μ (eV)	η (eV)	σ (eV) ⁻¹	ω (eV)
7	4,546	-0,493	-7,808	-4,151	4,151	7,315	0,137	1,177
8	3,630	-1,027	-7,218	-4,123	4,123	6,191	0,162	1,373
9	3,525	-0,972	-6,972	-3,972	3,972	6,001	0,167	1,315
10	3,459	-0,976	-6,871	-3,923	3,923	5,895	0,170	1,306
11	3,481	-0,890	-6,827	-3,858	3,858	5,937	0,168	1,254
13	5,417	0,229	-7,351	-3,561	3,561	7,581	0,132	0,836
14	4,549	0,154	-6,699	-3,273	3,273	6,852	0,146	0,782
15	4,429	0,146	-6,566	-3,210	3,210	6,712	0,149	0,767
16	4,767	0,265	-6,746	-3,241	3,241	7,012	0,143	0,749

Global reaktivite parametreleri, en yüksek dolu moleküler orbital (HOMO) ve en düşük boş moleküler orbital (LUMO) enerjileri ile tanımlanabilir. HOMO ve LUMO, kuantum kimyasında moleküllerin birçok özelliğinin tanımlanmasında önemli rol oynar (Ashfaq *et al.* 2022, Ayaz *et al.* 2022, K'tir *et al.* 2022). 7-11 ve 13-16 için Global reaktivite parametreleri, B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde hesaplanmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.5' te

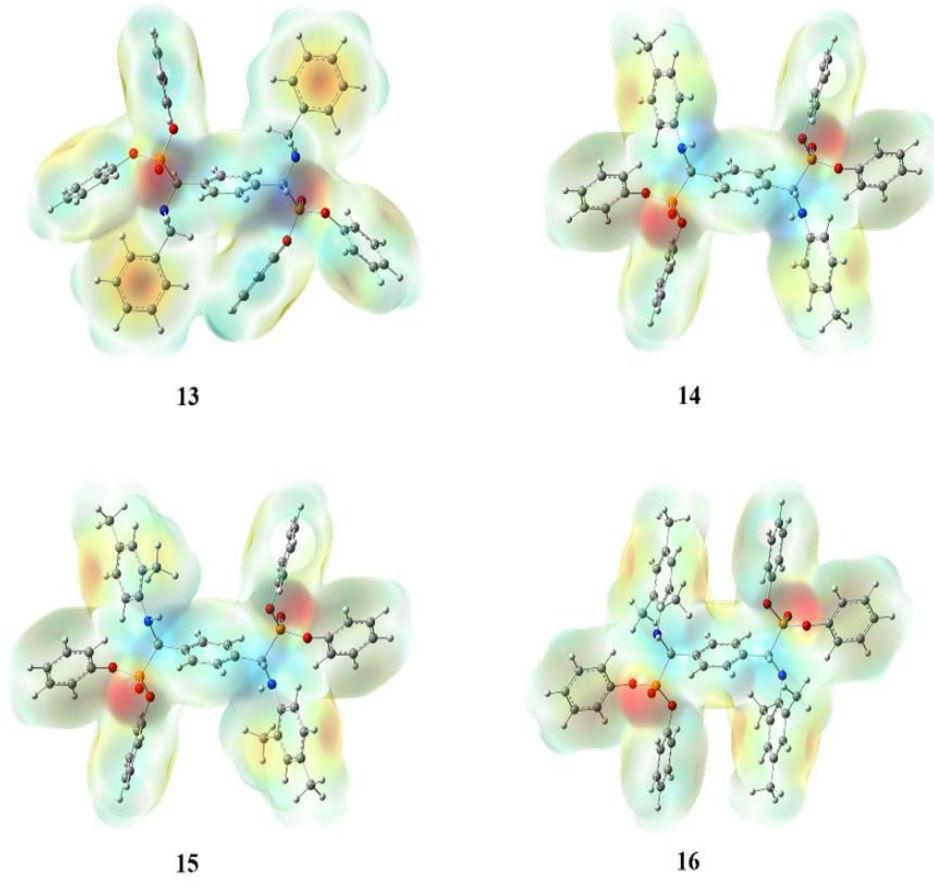
gösterilmiştir. Schiff bazları arasından molekül 10, en küçük enerji aralığına sahip olduğundan 0,170 eV yumuşaklık değeriyle daha yumuşak ve daha reaktiftir. Hesaplanan yumuşaklık değerlerinin sırası $10 > 11 > 9 > 8 > 7'$ dir. Bis- α -aminofosfonat türevleri arasında ise 15, enerji aralığı en küçük olan, dolayısıyla 0,149 eV yumuşaklık değeriyle daha yumuşak ve reaktif olanıdır. Hesaplanan kimyasal sertlik değerleri Schiff bazları için 5,895 - 7,315 eV arasında iken bis- α -aminofosfonatlar için 6,712 - 7,581 eV arasındadır. 7-11 için hesaplanan kimyasal sertlik değeri (7,315 eV), yumuşaklığından (0,170 eV) daha yüksektir bu da Schiff bazlarının daha az reaktiviteye ve daha fazla stabiliteye sahip olduğunu gösterir. 13-16 için hesaplanan kimyasal sertlik değeri yumuşaklığından daha yüksektir, bu da bis- α -aminofosfonatların daha az reaktiviteye ve daha fazla stabiliteye sahip olduğunu gösterir.

4.3 Moleküler Elektrostatik Potansiyel (MEP) Haritalarına Ait Bulgular

Moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) haritaları, moleküllerin yük dağılımını gösterir ve "potansiyel enerji haritaları veya moleküler elektrostatik potansiyel yüzeyleri" olarak bilinir. Elektron yoğunluğu yüzeyi renk kodlu bir haritadır. Bu haritalara göre kırmızı bölgeler elektron yoğunluğunun yüksek olduğu bölgeleri, mavi bölgeler ise düşük elektron yoğunluğunun olduğu bölgeleri göstermektedir (Khalid *et al.* 2019, Choudhary *et al.* 2019, Qi *et al.* 2021). 7-11 ligandlarının MEP haritalarına (Şekil 4.5) bakıldığında en fazla elektron yoğunluğunun olduğu bölgeler benzen halkalarında, elektron açısından fakir bölgeler ise imin grubundaki hidrojen üzerindedir ($-N = CH-$). 13-16 ligandlarında elektron bakımından en yoğun bölgeler fosfonat gruplarında bulunurken, elektron bakımından fakir bölgeler amin grubundaki ($-NH - CH-$) hidrojenlerdedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5 Schiff bazlarının MEP haritları (B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde)



Şekil 4.6 Bis- α -aminofosfonatların MEP haritları (B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde)

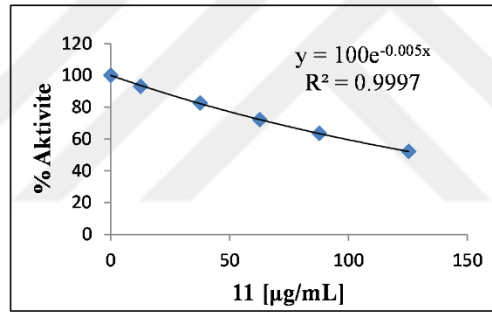
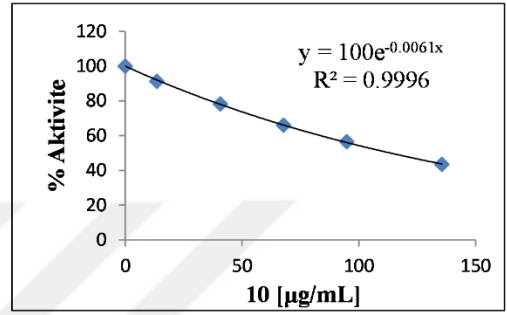
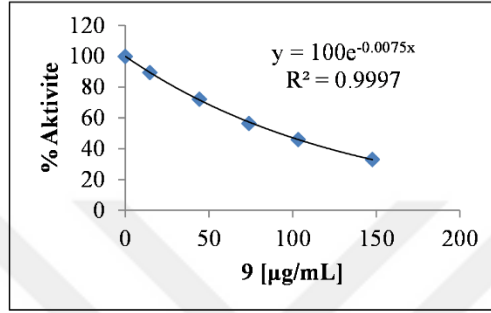
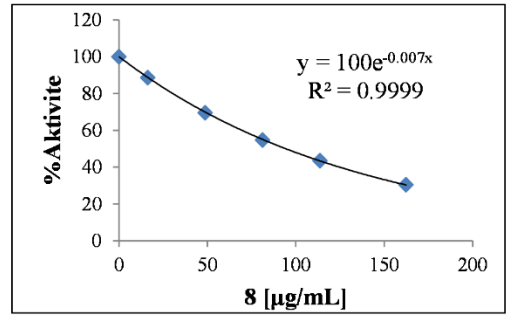
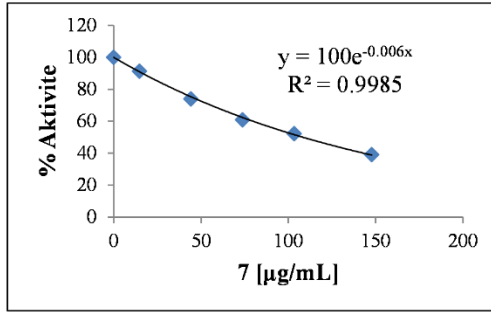
4.4 Enzim İnhibisyon Sonuçları

4.4.1 Asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu ve kinetik çalışmasına ait bulgular

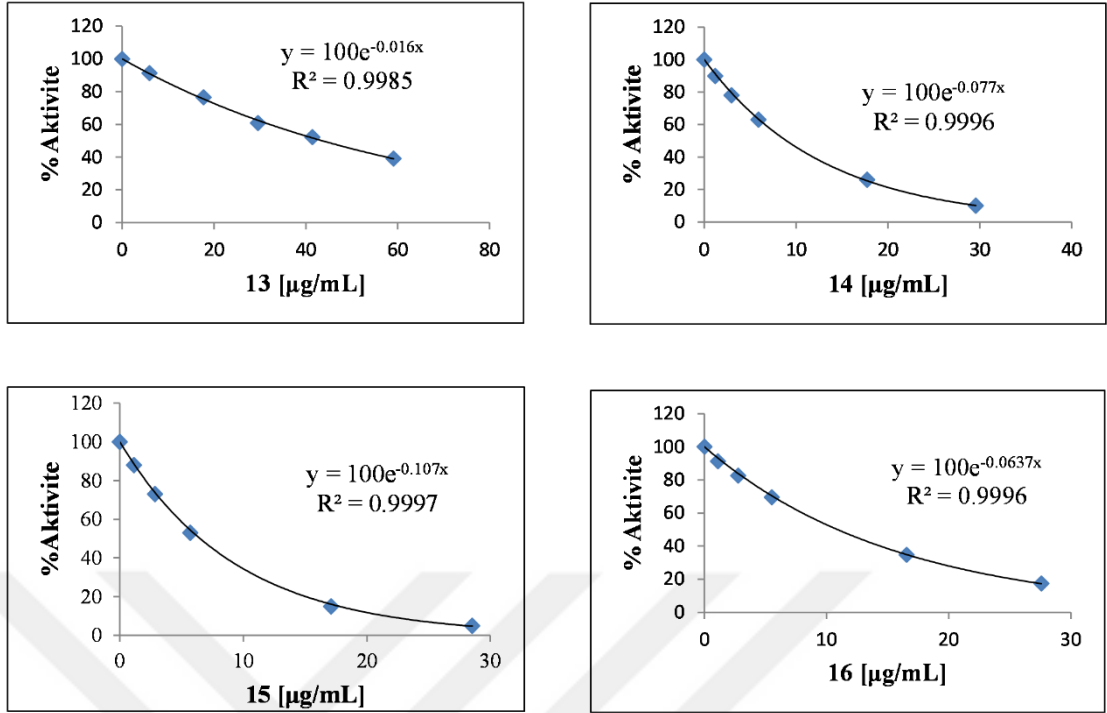
Yapılan tez çalışmasında tüm moleküllerin asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi beş farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Her bir molekül için Aktivite (%) - Konsantrasyon grafiği çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.6’ da ve Aktivite (%) - Konsantrasyon grafikleri Şekil 4.7 - 4.8’ de verilmiştir.

Çizelge 4.6 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların AChE enzimine karşı IC₅₀ değerleri

Moleküller	IC ₅₀ (μ g/mL)	Moleküller	IC ₅₀ (μ g/mL)
7	115,52 $\pm$ 1,2	13	43,32 $\pm$ 0,9
8	99,02 $\pm$ 0,9	14	9,00 $\pm$ 0,4
9	92,42 $\pm$ 1,8	15	6,48 $\pm$ 0,2
10	113,63 $\pm$ 1,1	16	10,88 $\pm$ 0,4
11	138,63 $\pm$ 1,3		



Şekil 4.7 Schiff bazların asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



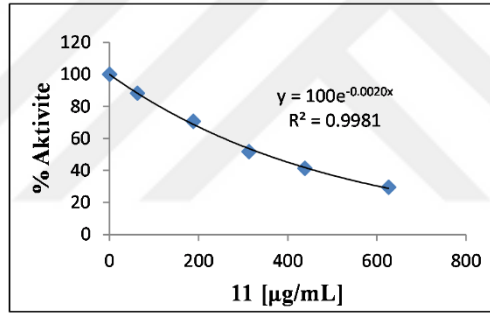
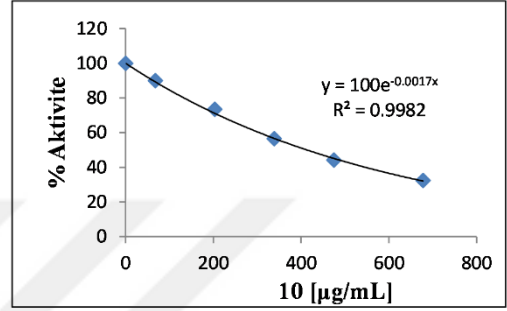
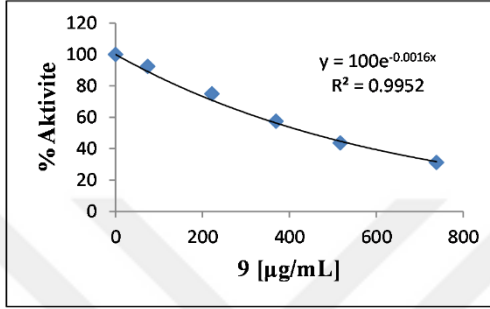
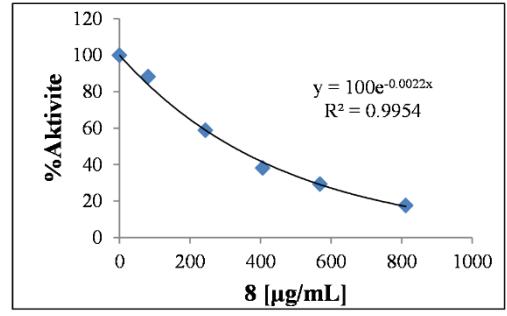
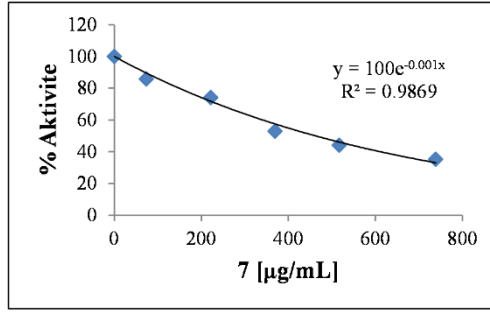
Şekil 4.8 Bis-α-aminofosfonatların asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

4.4.2 Bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonuna ait bulgular

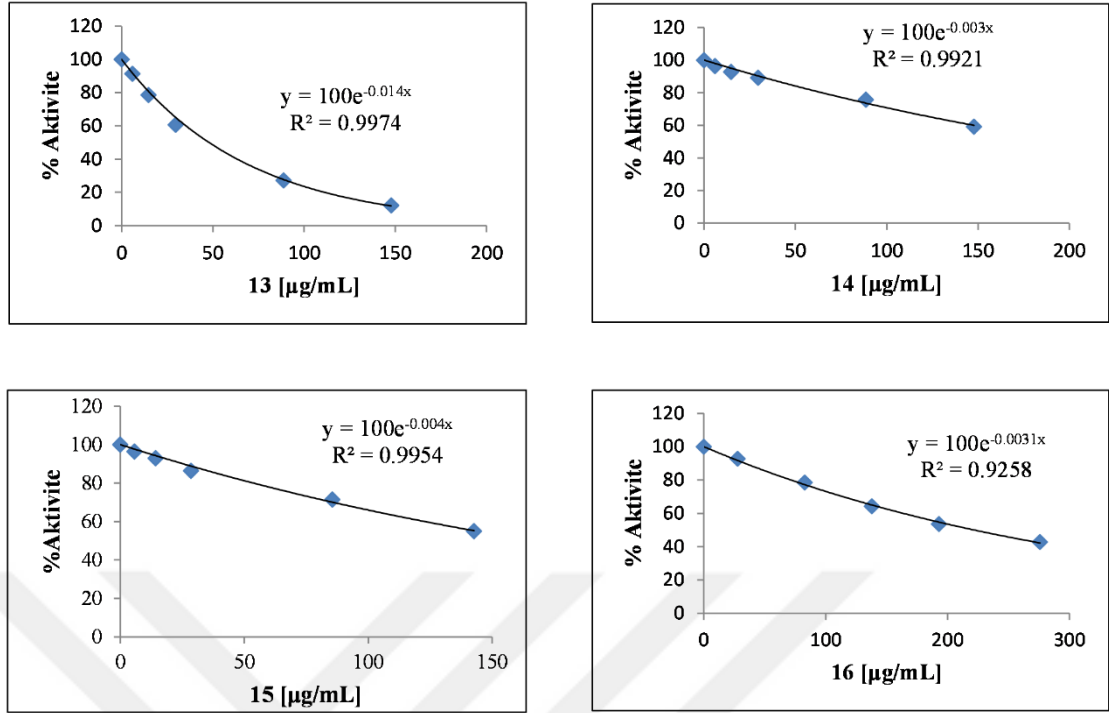
Yapılan tez çalışmasında tüm moleküllerin bütirilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi beş farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Her bir molekül için Aktivite (%) - Konsantrasyon grafiği (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10) çizilerek IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.7’ de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Schiff bazları ve bis-α-aminofosfonatların BChE enzimine karşı IC_{50} değerleri

Moleküller	IC_{50} (μg/mL)	Moleküller	IC_{50} (μg/mL)
7	693,15±6,8	13	49,51±0,9
8	315,07±3,1	14	231,05±2,3
9	433,23±4,3	15	173,29±3,4
10	407,73±4,0	16	223,59±4,4
11	346,57±3,4		



Şekil 4.9 Schiff bazların bütirikolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.10 Bis-α-aminofosfonatların bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

4.4.3 Karbonik anhidraz (CA I ve II) enzim inhibisyonuna ait bulgular

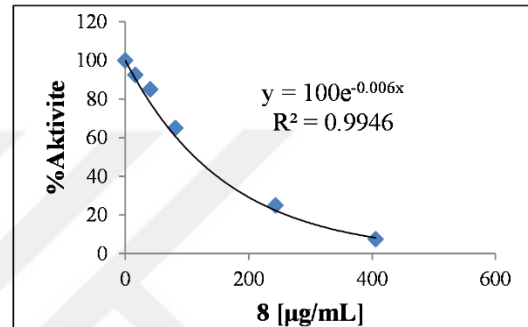
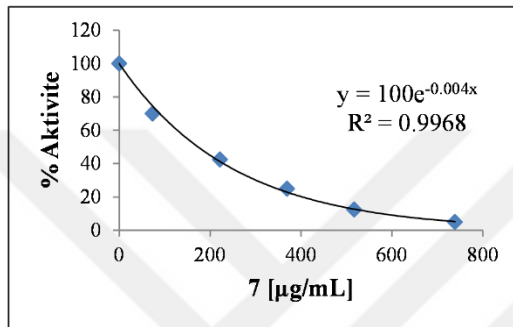
Yapılan tez çalışmasında tüm moleküllerin karbonik anhidraz (CA I ve II) enzimi üzerine inhibisyon etkisi beş farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Ancak göz önüne alınan tüm moleküllerin CA I ve CA II enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

4.4.4 α-Glikozidaz enzim inhibisyonuna ait bulgular

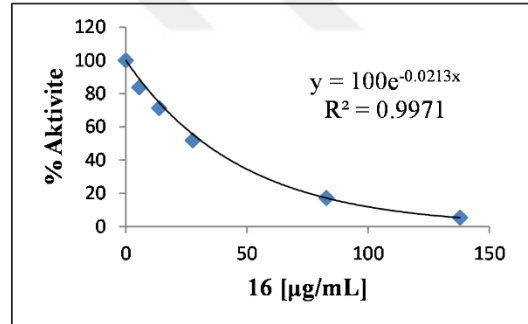
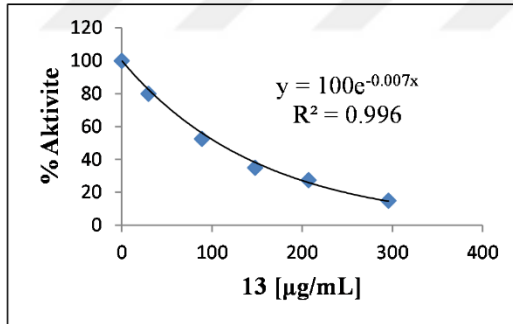
Yapılan tez çalışmasında tüm moleküllerin α-glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi beş farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Her bir molekül için Aktivite (%)-Konsantrasyon grafiği (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12) çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.8’ de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların α -glikozidaz enzimine karşı IC₅₀ değerleri

Moleküller	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Moleküller	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
7	173,29 $\pm$ 3,4	13	99,02 $\pm$ 0,9
8	115,52 $\pm$ 2,3	14	-
9	-	15	-
10	-	16	32,54 $\pm$ 0,6
11	-		
(-) İnhibisyon yoktur.			



Şekil 4.11 Schiff bazların α -glikozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



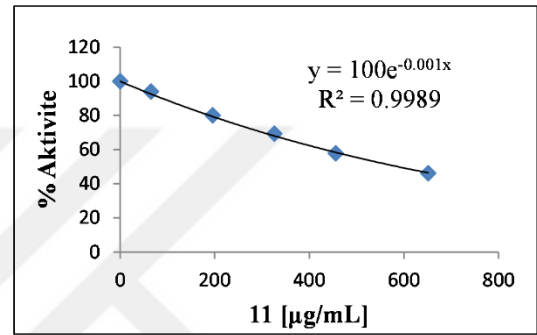
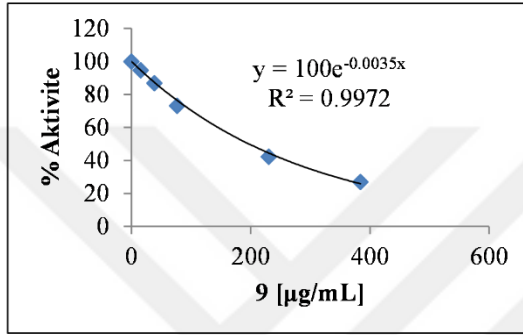
Şekil 4.12 Bis- α -aminofosfonatların α -glikozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

4.4.5 Tirozinaz enzim inhibisyonuna ait bulgular

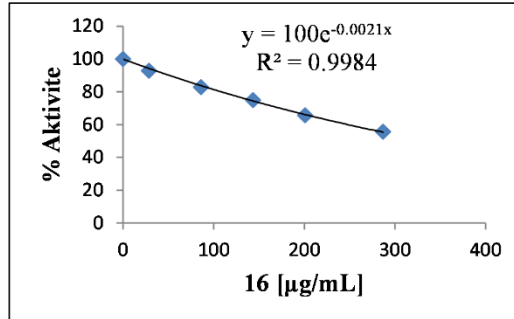
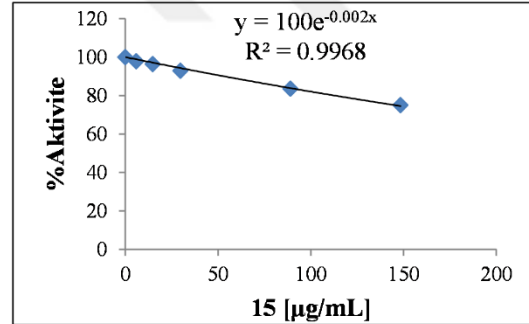
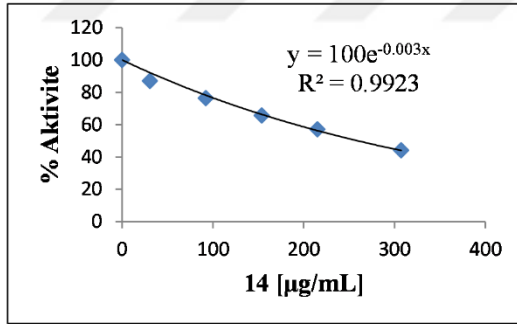
Yapılan tez çalışmasında tüm moleküllerin tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi beş farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Her bir molekül için Aktivite (%)-Konsantrasyon grafiği (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14) çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.9' da verilmiştir.

Çizelge 4.9 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların tirozinaz enzimine karşı IC₅₀ değerleri

Moleküller	IC ₅₀ (µg/mL)	Moleküller	IC ₅₀ (µg/mL)
7	-	13	-
8	-	14	231,05±2,5
9	187,34±3,7	15	346,57±3,2
10	-	16	330,07±3,0
11	693,15±6,8		
(-) İnhibisyon yoktur.			



Şekil 4.13 Schiff bazların tirozinaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.14 Bis- α -aminofosfonatların tirozinaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

4.5 Moleküler Docking Sonuçlarına Ait Bulgular

Bu tez çalışmasında Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatlar ile ilgili enzimler arasındaki bağlanma konformasyonlarını ve kovalent olmayan etkileşimleri tahmin etmek için moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Moleküler docking hesaplamaları, Molegro Virtual Docker programı kullanılarak yapılmıştır (Wang *et al.* 2023).

Asetilkolinesteraz ile Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların oluşturduğu komplekslerin moleküler docking hesaplama sonuçları ve ilgili ligandların asetilkolinesteraz ile yaptığı kovalent olmayan etkileşimler (Hidrojen bağ) Çizelge 4.10’ da sunulmuştur. Ayrıca Çizelge 4.10’ da verilen docking sonuçlarına göre Schiff bazları AChE ile referans molekül olan donepezilden daha zayıf etkileşim gösterirken, bis- α -aminofosfonatlar donepezilden daha güçlü etkileşim göstermiştir. Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların AChE ile oluşturdukları komplekslerin MolDock skorları –121.77 ile –237.28 arasında olduğu hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatlar ile referans moleküllerin asetilkolinesteraz enzimi ile moleküler docking sonuçları

Molekül	MolDock Skoru	H-bağ
Asetilkolinesteraz (PDB: 4EY7)		
7	-146.54	0
8	-127.19	0
9	-121.77	0
10	-134.93	0
11	-146.35	0
13	-237.28	-0.58
14	-185.07	2.25
15	-203.03	8.55
16	-165.12	3.25
Donepezil	-159.53	-1.95

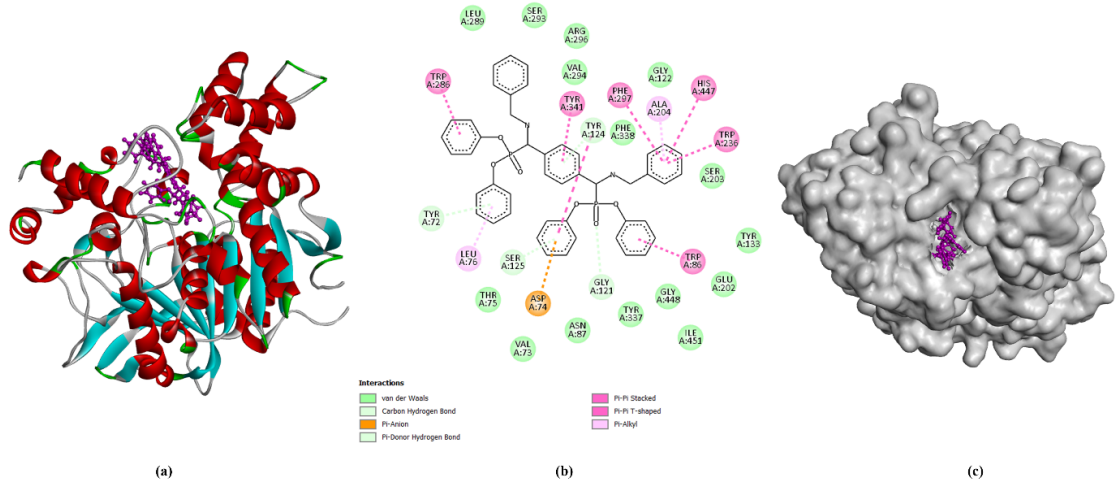
Asetilkolinesteraz ile bis- α -aminofosfonatların (13-16) oluşturduğu komplekslerin 2D ve 3D diyagramları ve bağlanma pozları Şekil 4.15 - 4.18’ de gösterilmiştir. İlgili komplekslerin bağlanma pozlarında bis- α -aminofosfonatlar pembe renk ile asetilkolinesteraz enziminin yüzeyi ise gri renk ile gösterilmiştir. 13 molekülü, zayıf

hidrojen bağlarıyla (karbon hidrojen bağ ve π -donor hidrojen bağ) AChE' nin bağlanma bölgesindeki Tyr 72, Tyr124, Gly121 ve Ser125 aminoasitlerine bağlanmıştır. Ayrıca 13 molekül, ilgili enzimin aynı bölgesinde bulunan Asp74 ile elektrostatik etkileşim (π -anyon etkileşimi) yaptığı tespit edilmiştir. Leu76 ve Ala204 ile 13 molekül arasında hidrofobik tipte bir etkileşimin (π -alkil) olduğu gözlemlenmiştir. 13 molekülündeki benzen halkaları, Trp286, Tyr341, Phe297, His447, Trp236 ve Trp86 ile π - π etkileşimi yapmıştır (Şekil 4.15).

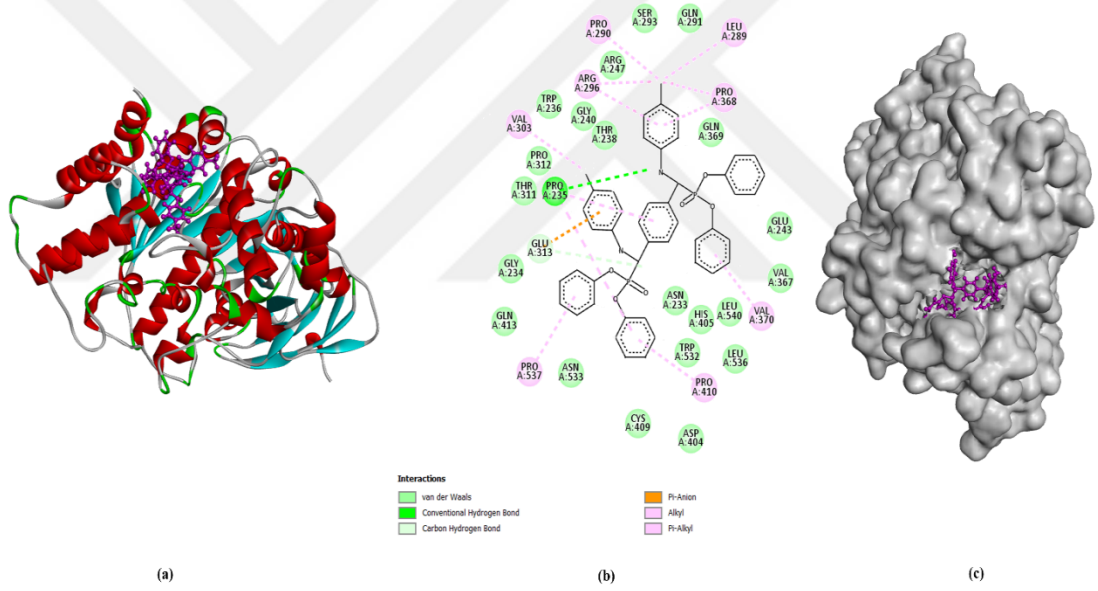
14 molekül, AChE' nin bağlanma bölgesindeki Pro235 ile hidrojen bağı etkileşimi yaparken, Glu313 aminoasiti ile zayıf hidrojen bağı (karbon hidrojen bağ) yaptığı görülmüştür. Ayrıca 14 molekül, ilgili enzimin aktif bölgesinde bulunan Glu313 ile π -anyon etkileşimi yaptığı tespit edilmiştir. Val303, Val370, Arg296, Leu289, Pro290, Pro368, Pro410 ve Pro537 ile 14 molekül arasında hidrofobik tipte bir etkileşimin (alkil ve π -alkil) olduğu da görülmektedir (Şekil 4.16).

15 molekül, zayıf hidrojen bağıyla (karbon hidrojen bağ) AChE' nin bağlanma bölgesindeki Pro235 aminoasitine bağlanmıştır. Ayrıca 15 molekül, ilgili enzimin aynı bölgesinde bulunan Arg296 ile π -kation etkileşimi yaptığı gözlemlenmiştir. Val303, Trp532, Leu540, Leu289, Pro290, Cys409, Pro410 ve Pro537 ile 15 molekül arasında hidrofobik tipte bir etkileşimin (alkil ve π -alkil) olduğu bulunmuştur (Şekil 4.17).

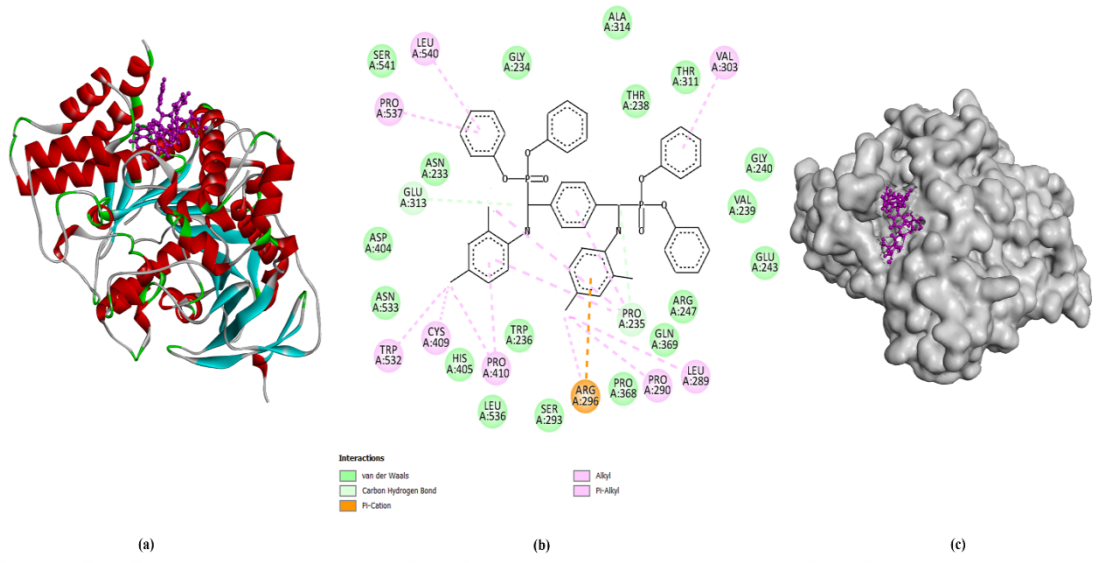
16 molekülünün, AChE' nin bağlanma bölgesindeki Pro235 ve Arg296 ile hidrojen bağı etkileşimi yaptığı görülmüştür. Ayrıca 16 molekül, ilgili enzimin aynı bölgesinde bulunan Glu313 ile π -anyon etkileşimi yaptığı belirlenmiştir. Val239, Val370, Pro368, Pro537, Pro290, Pro410, Cys409, Trp532, Leu540 ve Leu536 ile 16 molekül arasında hidrofobik tipte bir etkileşimin (alkil ve π -alkil) olduğu tespit edilmiştir. 16 molekülündeki azota bağlı benzen halkası, His405 ile π - π etkileşimi yapmıştır (Şekil 4.18).



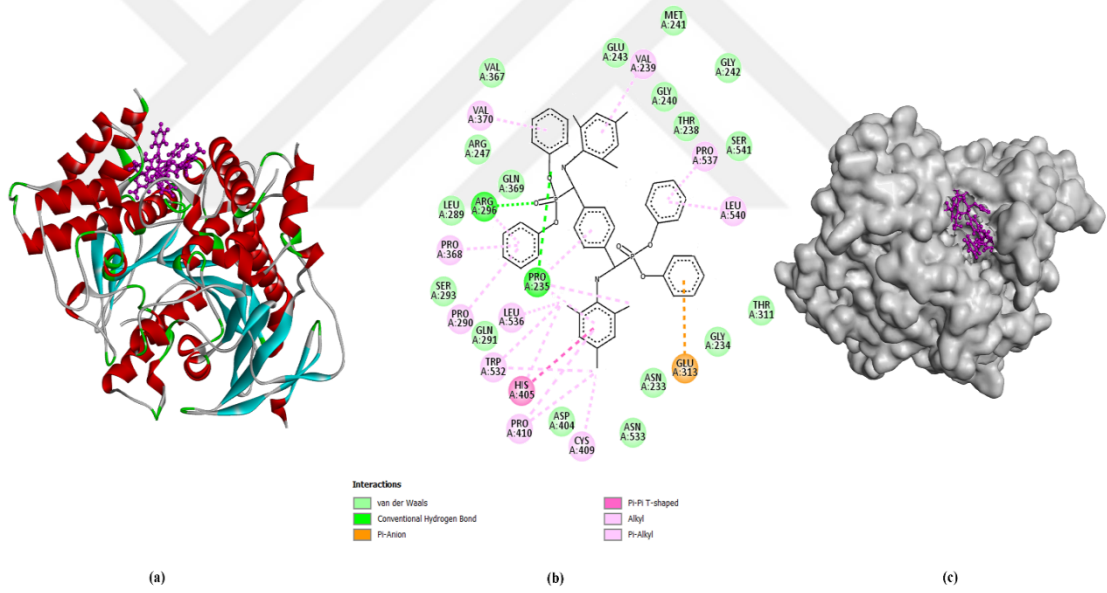
Şekil 4.15 AChE ile 13 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozunu



Şekil 4.16 AChE ile 14 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozunu



Şekil 4.17 AChE ile 15 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozunu



Şekil 4.18 AChE ile 16 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozunu

Bütirikolinesteraz ile Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların oluşturduğu komplekslerin moleküler docking hesaplama sonuçları ve ilgili ligandların BChE ile yaptığı kovalent olmayan etkileşimler (Hidrojen bağ) Çizelge 4.11' de sunulmuştur. Ayrıca Çizelge 4.11' de verilen docking sonuçlarına göre hem Schiff bazları hem de bis- α -aminofosfonatlar BChE ile referans molekül olan takrinden daha güçlü etkileşim

göstermiştir. Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların bütirilkolinesteraz ile oluşturdıkları komplekslerin MolDock skorları -97.35 ile -227.69 arasında olduğu hesaplanmıştır.

Çizelge 4.11 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatlar ile referans moleküllerin, bütirilkolinesteraz enzimi ile moleküler docking sonuçları

Ligand	MolDock Skoru	H-bağ
Bütirilkolinesteraz (PDB: 4BDS)		
7	-112,46	0,00
8	-97,35	-0,15
9	-103,78	0,00
10	-112,45	0,00
11	-113,03	-0,02
13	-208,95	0,00
14	-218,12	-2,73
15	-227,69	-1,74
16	-224,71	0,00
Takrin	-77,76	-2,07

Bütirilkolinesteraz ile bis- α -aminofosfonatların (13-16) oluşturduğu komplekslerin 2D ve 3D diyagramları ve bağlanma pozları Şekil 4.19 – 4.22’ de gösterilmiştir. İlgili komplekslerin bağlanma pozlarında bis- α -aminofosfonatlar pembe renk ile bütirilkolinesteraz enziminin yüzeyi ise gri renk ile gösterilmiştir.

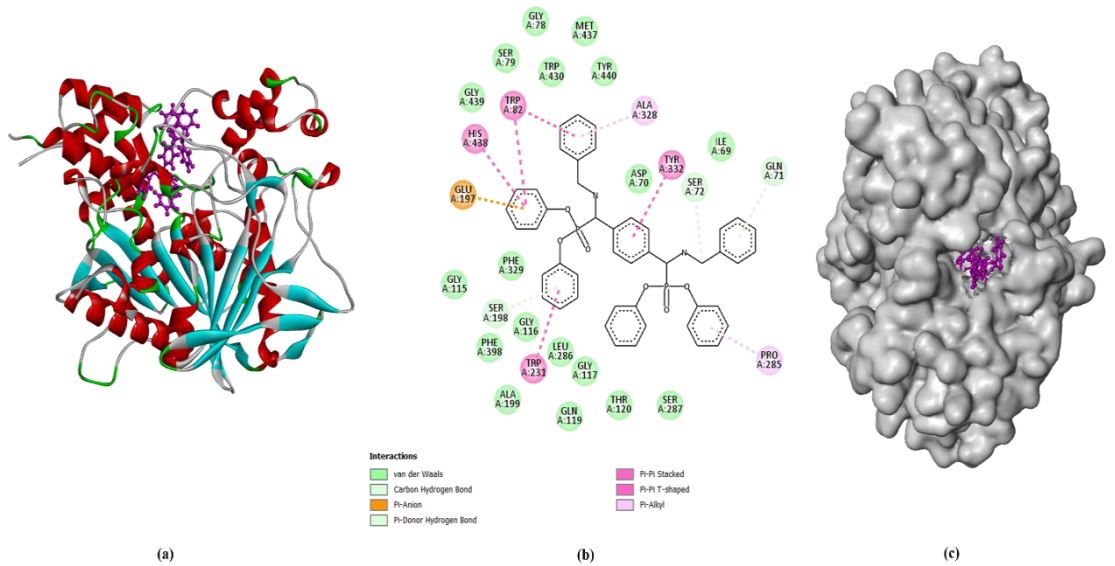
Bütirilkolinesterazın bağlanma bölgesinde bulunan Ser72, Ser198 ve Gln71 ile 13 molekülü karbon hidrojen ve π -donor hidrojen bağı yapmıştır. Bunun yanında Glu197 ile π -anyon etkileşimi yaptığı tespit edilmiştir. Pro285 ve Ala328 ile 13 molekülü arasında π -alkil etkileşimi olduğu belirlenmiştir. 13 molekülündeki benzen halkaları, His438, Trp82, Tyr332 ve Trp231 ile π - π etkileşimi yapmıştır (Şekil 4.19).

14 molekülü, bütirilkolinesterazın bağlanma bölgesindeki Pro285 ve Ser287 ile hidrojen bağı etkileşimi yaparken, Ser19 aminoasiti ile π -donor hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. His438, Phe398 ve Trp231 ile 14 molekülü arasında π -alkil etkileşimi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 14 molekülündeki fosfonat grubuna bağlı benzen halkaları, His438 ve Trp82 ile π - π etkileşimi yapmıştır. Bunun yanında ilgili enzimin

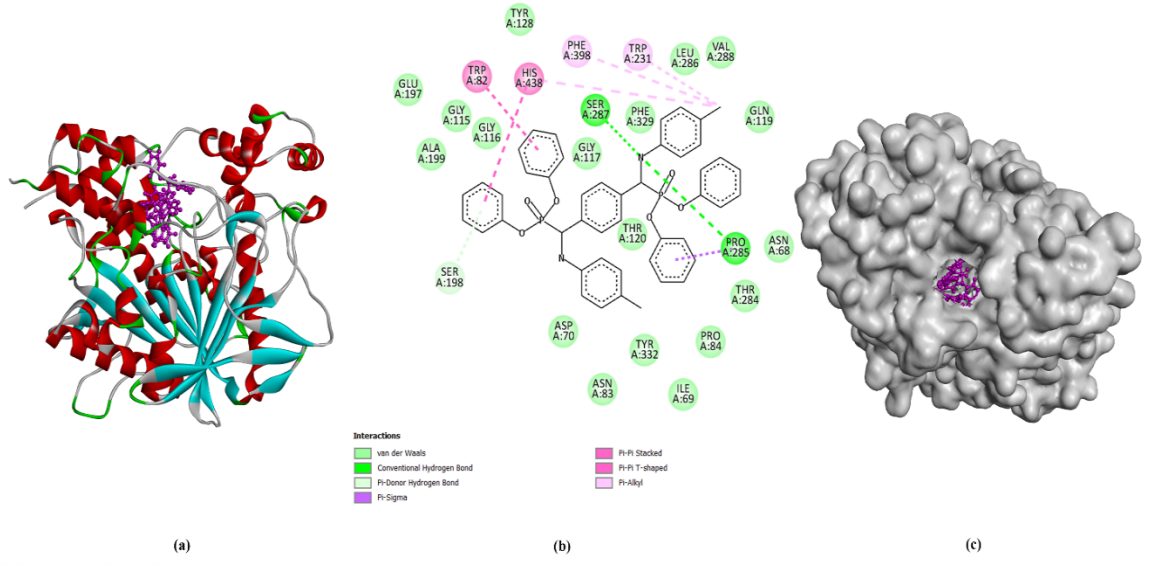
aktif bölgesinde bulunan Pro285 ile 14 molekülü arasında π -sigma bağı oluşmuştur (Şekil 4.20).

Bütirilkolinesterazın bağlanma bölgesinde bulunan Pro285 ile 15 molekülü karbon hidrojen bağı, Trp120 ve Asn289 ile de π -donor hidrojen bağı etkileşimi yaptığı görülmektedir. Bunun yanında Ala277, Leu125, Ala328, Leu286, Pro285 ve Tyr332 ile 15 molekülü arasında alkil ve π -alkil etkileşimleri olduğu tespit edilmiştir. 15 molekülündeki fosfonat grubuna bağlı benzen halkaları, enzimin aktif bölgesindeki Phe329 ile π - π etkileşimi yapmıştır. Ayrıca ilgili enzimin aktif bölgesinde bulunan Trp82 ve Gln119 ile 15 molekülü arasında π -sigma bağı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).

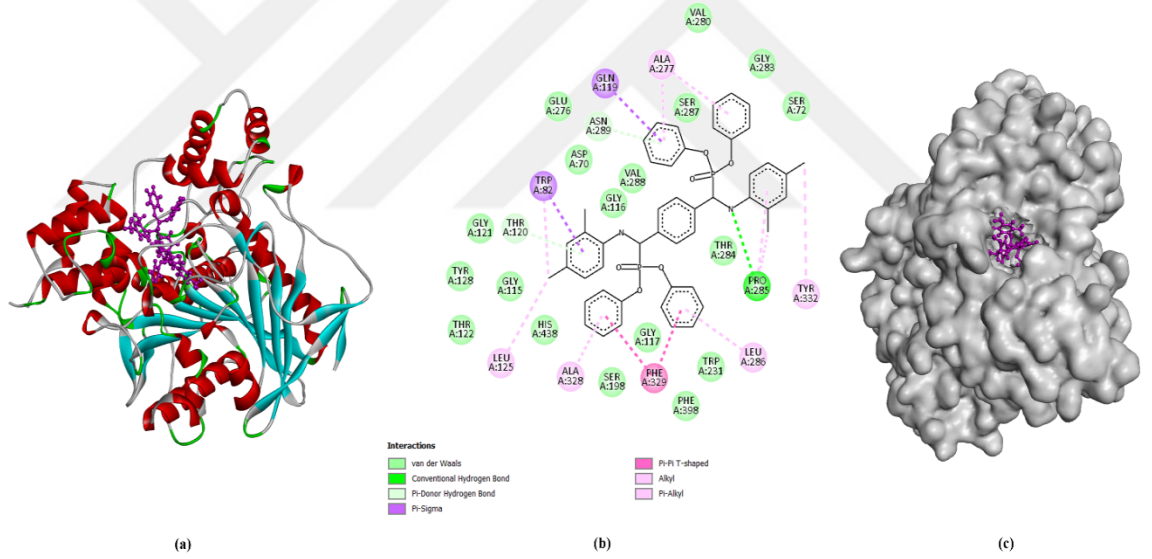
16 molekülü, bütirilkolinesterazın bağlanma bölgesinde bulunan Thr120 ve Gly116 ile sırasıyla π -donor hidrojen ve karbon hidrojen bağı yapmıştır. Bunun yanında Asp70 ve Glu197 ile de π -anyon etkileşimi yaptığı bulunmuştur. Trp82, Tyr332, Trp430, Ala328, Phe329 ve His438 aminoasitleri ile 16 molekülü arasında alkil ve π -alkil etkileşimi olduğu gözlemlenmiştir. 16 molekülündeki benzen halkaları, Trp82, Tyr332 ve Trp231 ile π - π etkileşimi yapmıştır (Şekil 4.22).



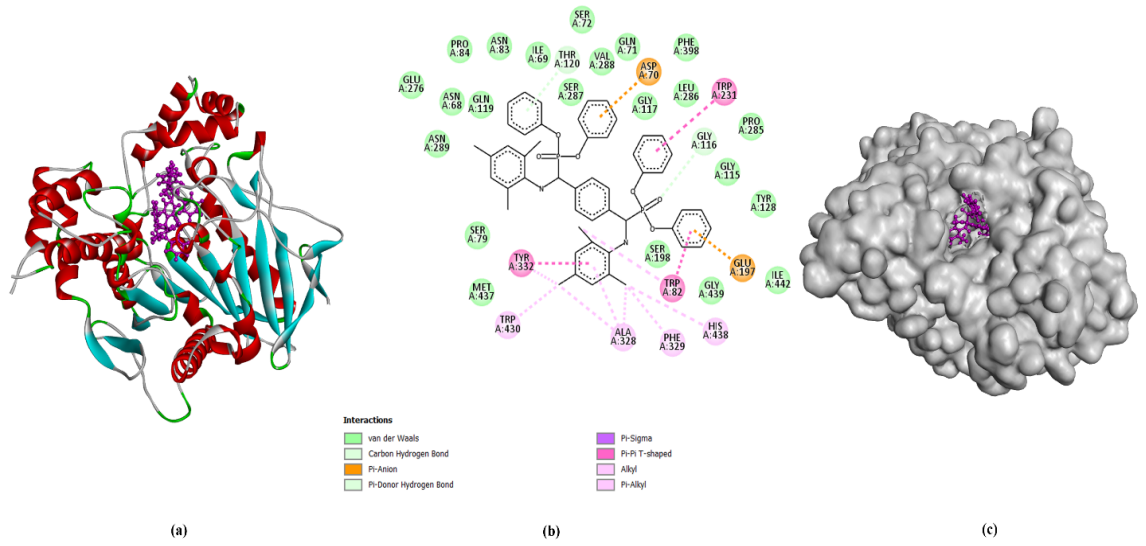
Şekil 4.19 BChE ile 13 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozuzu



Şekil 4.20 BChE ile 14 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozusu



Şekil 4.21 BChE ile 15 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozusu



Şekil 4.22 BChE ile 16 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozunu

α -Glikozidaz ile Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların oluşturduğu komplekslerin moleküler docking hesaplama sonuçları ve ilgili ligandların α -glikozidaz ile yaptığı kovalent olmayan etkileşimler (Hidrojen bağ) Çizelge 4.12’ de sunulmuştur. Ayrıca Çizelge 4.12’ de verilen docking sonuçlarına göre hem Schiff bazları hem de bis- α -aminofosfonatlar α -glikozidaz ile referans molekül olan akarboz daha güçlü etkileşim göstermiştir. Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların α -glikozidaz ile oluşturdukları komplekslerin MolDock skorları -112.07 ile -191.14 arasında olduğu hesaplanmıştır.

Çizelge 4.12 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatlar ile referans moleküllerin α -glikozidaz enzimi ile moleküler docking sonuçları

Ligand	MolDock Skoru	H-bağ
α -Glikozidaz (PDB: 3A4A)		
7	-123,71	0,00
8	-112,07	-2,12
13	-191,14	-2,57
16	-189,47	-1,28
Akarboz	-71,77	-15,76

α -Glikozidaz ile Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların (7, 8, 13 ve 16) oluşturduğu komplekslerin 2D ve 3D diyagramları ve bağlanma pozları Şekil 4.23 - 4.26’ da

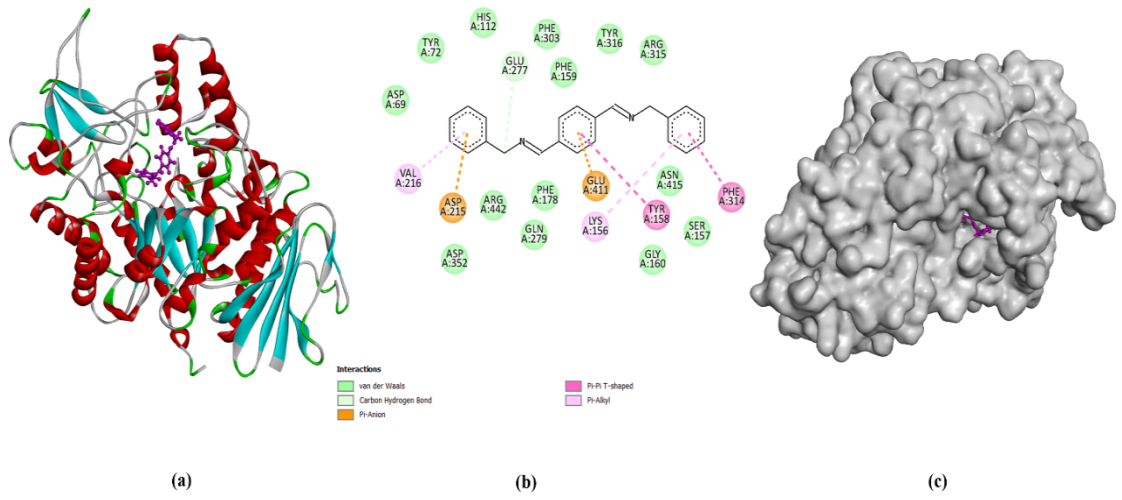
gösterilmiştir. İlgili komplekslerin bağlanma pozlarında ilgili moleküller pembe renk ile α -glikozidaz enziminin yüzeyi ise gri renk ile gösterilmiştir.

7 molekül, karbon hidrojen bağı etkileşimiyle α -glikozidaz enziminin bağlanma bölgesindeki Glu277 aminoasidine bağlanmıştır. Ayrıca 7 molekül, ilgili enzimin aynı bölgesinde bulunan Asp215 ve Glu411 ile elektrostatik etkileşim (π -anyon etkileşimi) yaptığı gözlemlenmiştir. Val216 ve Lys156 ile 7 molekül arasında hidrofobik tipte bir etkileşimin (π -alkil) olduğu da tespit edilmiştir. 7 molekülündeki benzen halkaları ile, Tyr158 ve Phe314 aminoasitleri π - π etkileşimi yapmıştır (Şekil 4.23).

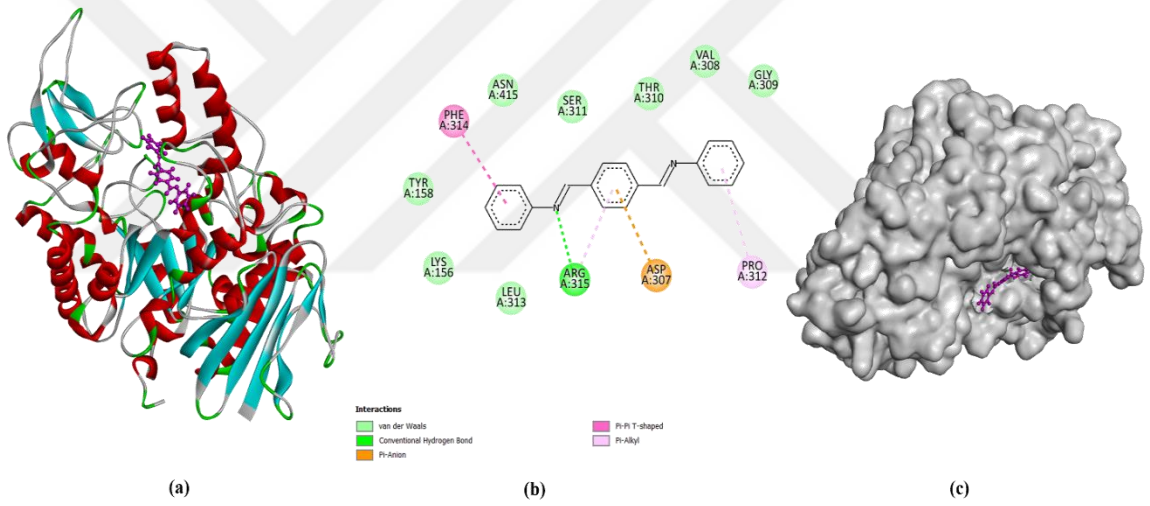
8 molekül, hidrojen bağı etkileşimiyle α -glikozidaz enziminin bağlanma bölgesindeki Arg315 aminoasidine bağlanmıştır. Ayrıca 8 molekül, ilgili enzimin aynı bölgesinde bulunan Asp307 ile elektrostatik etkileşim yaptığı belirlenmiştir. Arg315 ve Pro312 ile 8 molekül arasında hidrofobik tipte bir etkileşimin (π -alkil) olduğu gözlemlenmiştir. 8 molekülünün yapısında bulunan benzen halkası ile, Phe314 aminoasitleri π - π etkileşimi yapmıştır (Şekil 4.24).

α -Glikozidazın bağlanma bölgesinde bulunan Gln279 ile 13 molekül hidrojen bağı, Ser241 ile π -donor hidrojen bağı ve Ser240 ile de karbon hidrojen bağı yapmıştır. Bunun yanında Asp307 ve Asp352 ile π -anyon etkileşimi yaptığı bulunmuştur. Val216, Lys156 ve Arg315 aminoasitleri ile 13 molekül arasında π -alkil etkileşimi olduğu tespit edilmiştir. 13 molekülündeki benzen halkaları, Phe303, Phe314 ve Tyr158 ile π - π etkileşimi yapmıştır (Şekil 4.25).

16 molekül, α -glikozidazın bağlanma bölgesinde bulunan Arg442 ile hidrojen bağı ve Arg315 ile π -donor hidrojen bağı yapmıştır. Ayrıca Asp242, Asp307 ve Asp352 ile π -anyon etkileşimi, Arg315 ile de π -kation etkileşimi yaptığı tespit edilmiştir. Val216, Phe303, Phe178, Phe314 ve Lys156 ile 16 molekül arasında alkil, Val216 ve Arg442 ile de 16 molekül arasında π -alkil etkileşimi olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanında ilgili molekül, Tyr72 ve Pro312 ile de π -sigma etkileşimi yaptığı bulunmuştur. 16 molekülündeki fosfonat grubuna bağlı benzen halkası, Phe303 ile π - π etkileşimi yapmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.23 α -Glikozidaz ile 7 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu



Şekil 4.24 α -Glikozidaz ile 8 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu

Çizelge 4.13 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatlar ile referans moleküllerin tirozinaz enzimi ile moleküler docking sonuçları

Ligand	MolDock Skoru	H-bağ
Tirozinaz (PDB: 2Y9X)		
9	-96,10	0,00
11	-93,19	0,00
14	-142,93	0,00
15	-171,32	-1,94
16	-123,63	0,00
Tropolon	-64,36	-4,69

Tirozinaz ile Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların (9, 11, 14, 15 ve 16) oluşturduğu komplekslerin 2D ve 3D diyagramları ve bağlanma pozları Şekil 4.27 - 4.31' de gösterilmiştir. İlgili komplekslerin bağlanma pozlarında ilgili moleküller pembe renk ile tirozinaz enziminin yüzeyi ise gri renk ile gösterilmiştir.

Tirozinazın bağlanma bölgesinde bulunan Asn260 ile 9 molekülü hidrojen bağı yapmıştır. Bunun yanında His85 ile π -sigma etkileşimi yaptığı gözlemlenmiştir. Met257, Phe264 ve Val248 aminoasitleri ile 9 molekülü arasında π -alkil etkileşimi olduğu belirlenmiştir. 9 molekülündeki benzen halkaları, Phe264 ve His244 ile π - π etkileşimi yapmıştır (Şekil 4.27).

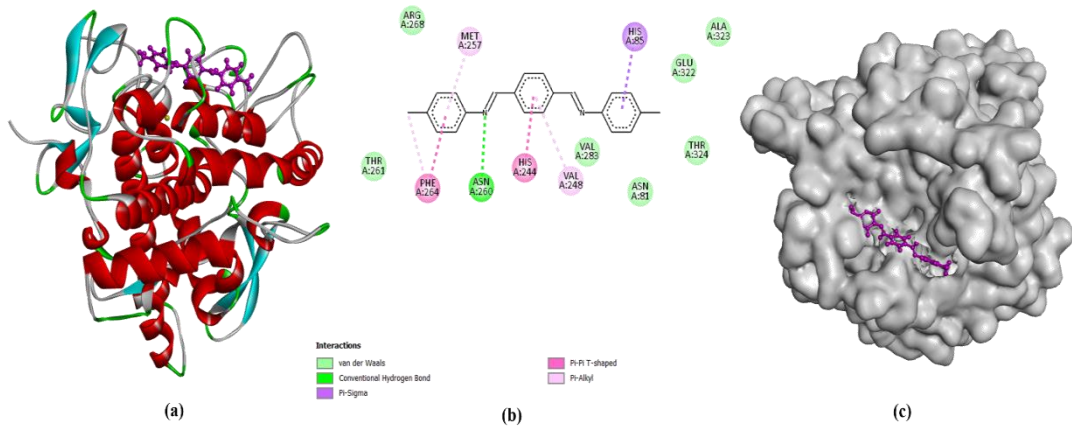
11 molekülü, π -sigma bağı aracılığıyla tirozinaz enziminin bağlanma bölgesindeki His85 aminoasidine bağlanmıştır. Ayrıca 11 molekülü, His244, Met257, Phe264 ve Val283 ile alkil, Val248 ile de hidrofobik etkileşimin (π -alkil) olduğu tespit edilmiştir. 11 molekülündeki imin grubuna bağlı benzen halkası ile, Phe264 aminoasitleri π - π etkileşimi yapmıştır (Şekil 4.28).

Tirozinazın bağlanma bölgesinde bulunan Thr261 ile 14 molekülü zayıf hidrojen bağı yapmıştır. Bunun yanında 14 molekülü, π -sigma bağı aracılığıyla tirozinaz enziminin bağlanma bölgesindeki Val248 aminoasidine bağlanmıştır. Ayrıca 14 molekülü, Val283, Phe292, His296, His263, His259, His61, His94 ve His85 ile π -alkil bağıyla etkileştiği gözlemlenmiştir. 14 molekülündeki amin grubuna bağlı benzen halkası ile,

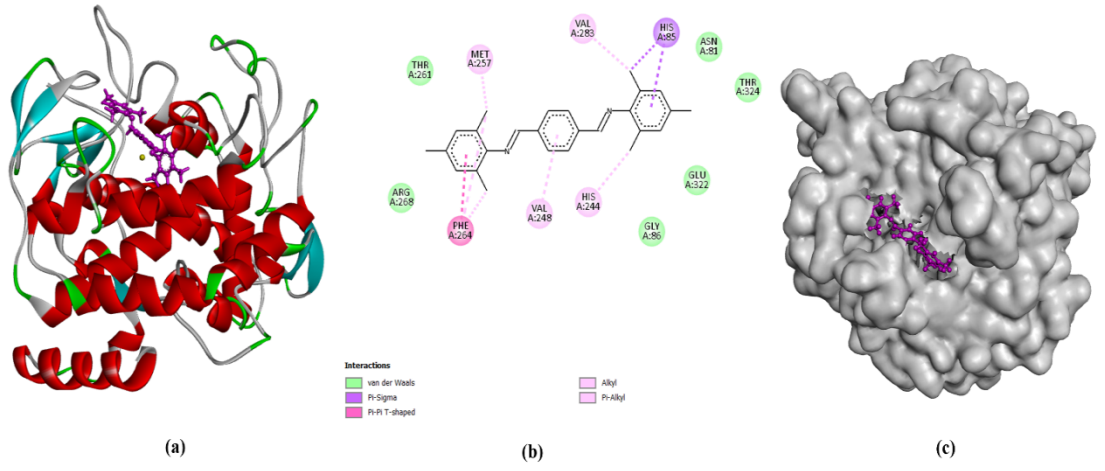
Met257 aminoasiti π -sülfür etkileşimi yapmıştır. Tirozinazın aktif bölgesindeki Arg268 ile 14 molekülü arasında π -katyon etkileşimi görülmüştür (Şekil 4.29).

Tirozinazın bağlanma bölgesinde bulunan Arg268 ile 15 molekülü hidrojen bağı yapmıştır. 15 molekülü, π -sigma bağı aracılığıyla tirozinaz enziminin bağlanma bölgesindeki Val248, Val283 ve His263 aminoasitlerine bağlanmıştır. 15 molekülünün yapısında bulunan fosfonat grubuna bağlı benzen halkası ile, Cys83 aminoasiti π -sülfür etkileşimi yapmıştır. His85 ile 15 molekülündeki amin grubuna bağlı benzen halkası arasında π - π etkileşimi tespit edilmiştir. Ayrıca 15 molekülü, His85, His259, His263, Val283, Ala286, Val248 ve Met257 ile de alkil ve π -alkil etkileşimleri yapmıştır (Şekil 4.30).

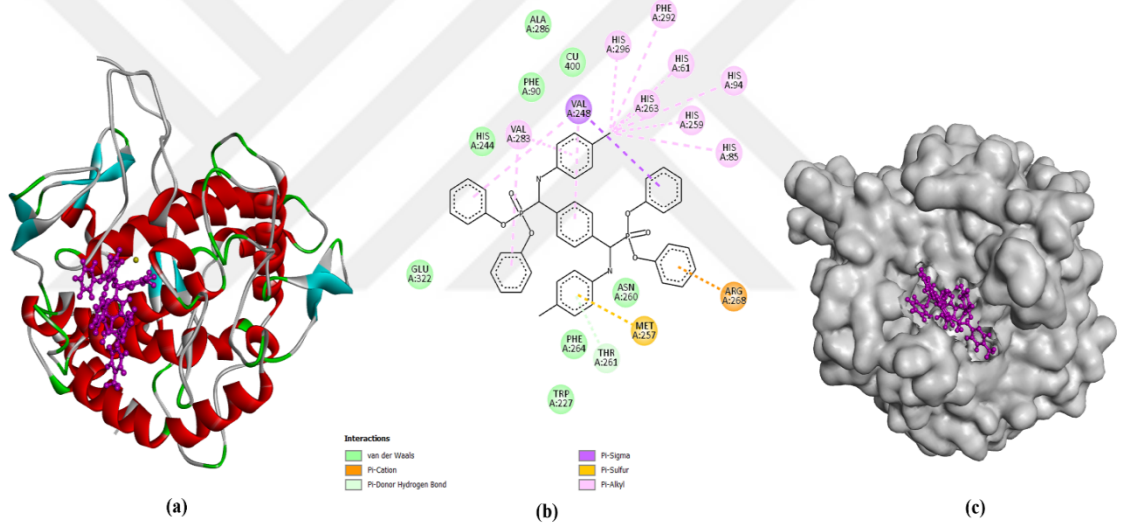
16 molekülü, zayıf hidrojen bağı aracılığıyla tirozinaz enziminin bağlanma bölgesindeki His244 aminoasidine bağlanmıştır. Ayrıca 16 molekülü, Arg268 ile π -katyon etkileşimi yaptığı tespit edilmiştir. 16 molekülünün fosfonat grubuna bağlı benzen halkası ile, Phe192 aminoasiti π - π etkileşimi yapmıştır. 16 molekülü, Val283, Pro284, Pro277, Leu275, Phe264, Val248 ve Met257 aminoasitleri ile de alkil ve π -alkil etkileşimleri yaptığı bulunmuştur (Şekil 4.31).



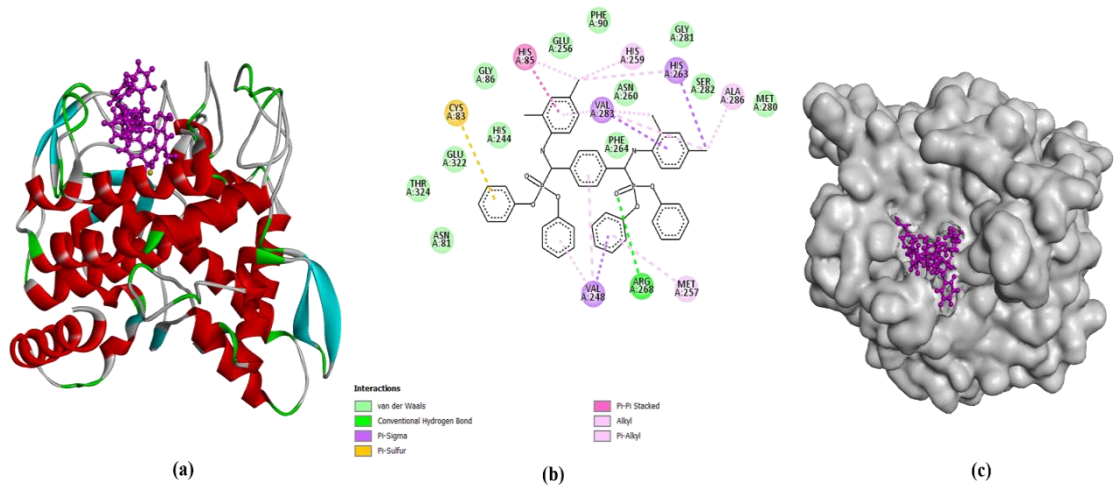
Şekil 4.27 Tirozinaz ile 9 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozunu



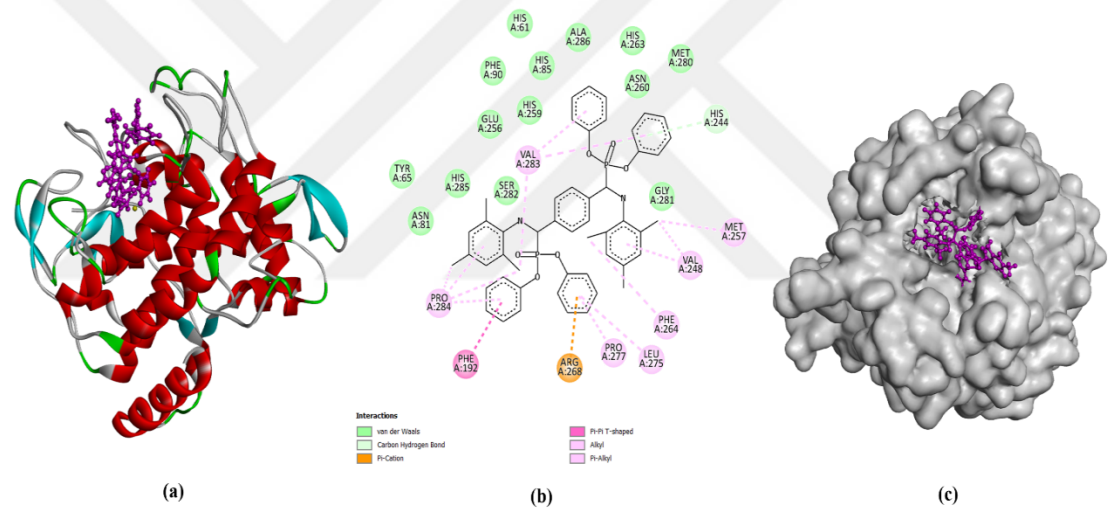
Şekil 4.28 Tirozinaz ile 11 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozunu



Şekil 4.29 Tirozinaz ile 14 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozunu

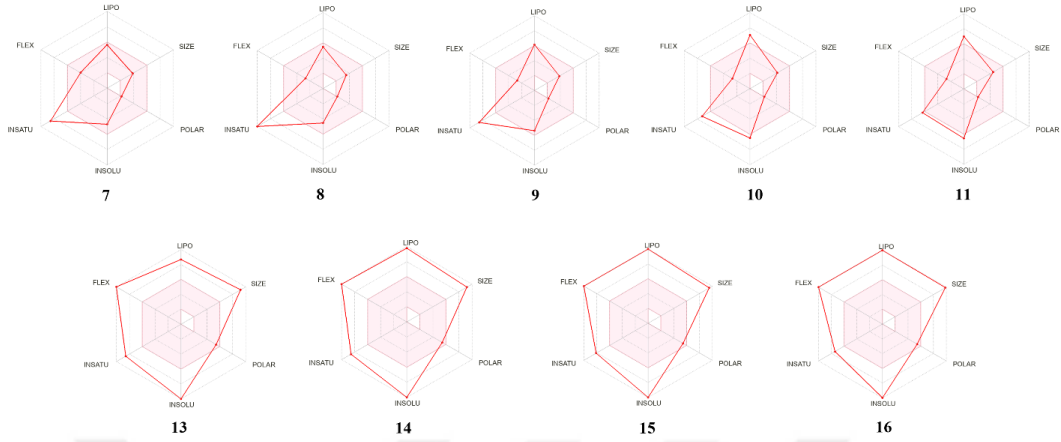


Şekil 4.30 Tirozinaz ile 15 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu



Şekil 4.31 Tirozinaz ile 16 molekülünün (a) 3D, (b) 2D diyagramı ve (c) 3D kenetlenme pozu

4.6 Farmakokinetik Araştırmasına Ait Bulgular



Şekil 4.32 Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların biyoyararlanım radarları

Tüm moleküllerin biyoyararlanım radarlarını Şekil 4.32’ de gösterilmiştir. Şekil 4.32’ deki pembe alan, her bir özellik için en uygun aralığı temsil eder. Bu özellikler, Lipo: Lipofiliklik, Boyut: Molekül ağırlığı, Polar: Toplam Polar Yüzey Alanı, Insolu: Çözünmezlik, Insatu: Doymamışlık, Esneklik: Esneklik. Bu tez çalışmasında ayrıca tüm Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların fizikokimyasal, lipofiliklik, çözünürlük, farmakokinetik, ilaç benzerliği ve tıbbi kimya özelliklerini de incelenmiştir. İlaç keşfi ve geliştirilmesinde bir molekülün hem yüksek biyoaktiviteye hem de düşük toksisiteye sahip olması gerekir (Daina *et al.* 2017). Organizmanın terapötik hedefe ulaşma ve bu hedefe konsantrasyon olma yeteneği de aynı derecede önemlidir (Daina *et al.* 2017). İlaç keşif aşamalarındaki ADME (Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Boşaltım) tahmininin, klinik çalışmalar sırasında farmakokinetik ile ilişkili başarısızlık yüzdesini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Hay *et al.* 2014). Negatif işaretli deri geçirgenliğinin ($\log K_p$) artmasıyla molekülün deriden geçirgenliği azalır. Tüm moleküllerin $\log K_p$ değeri $-2,12$ ile $-5,11$ cm/s arasındadır. Örneğin, 7 molekülünün cilt geçirgenliği düşük iken ($\log K_p = -5,11$ cm/s), 16 molekülü ise iyi cilt geçirgenliğine sahiptir ($\log K_p = -2,12$ cm/s). Polarite için topolojik polar yüzey alanı (TPSA) 20 ila 130 Å² aralığında olmalıdır. İncelenen tüm moleküllerin TPSA değerleri 20 - 130 Å² arasındadır. Moleküllerin sentetik erişilebilirlik skorları 1 (çok kolay) ile 10 (son derece zor) arasında değişmektedir. Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15’ te verilen

ADME sonuçlarına bakıldığında Schiff bazı moleküllerinin sentetik erişilebilirliğinin bis- α -aminofosfonat moleküllerinden daha iyi olduğu görülmektedir. Çözünürlük (log S) ölçeğindeki değerler, -10 (suda çözünmez), -6 (suda az çözünür), -4 (suda çözünür), -2 (suda aşırı çözünür) ve 0 (çok çözünür) olarak ifade edilir. ADME sonuçlarına göre, 13 - 16 moleküllerinin suda çözünmediği tespit edilmiştir. 7 - 9 moleküllerinin orta derecede çözünür olduğu ve 10 ve 11 moleküllerinin ise suda az çözünür olduğu bulunmuştur. Çizelge 4.14' e göre, 7, 8 ve 9 molekülleri Kan-Beyin Bariyerini geçerken, diğer moleküller Kan-Beyin Bariyerini geçemediği tespit edilmiştir. Lipinski' nin beş kuralına göre ilaç olabilecek bir molekülün molekül ağırlığı (MW) ≤ 500 g/mol, lipofilikliği (log P) ≤ 5 , hidrojen bağı donörü ≤ 5 , hidrojen bağı alıcısı ≤ 10 ve molar kırılma (MR) değeri de 4 - 130 arasında olmalıdır. Lipinski' nin yukarıda bahsedilen parametrelerine ve ADME çalışmasının diğer fizikokimyasal özelliklerine göre, ki bunların tümü Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15' te sunulmuştur, 7 ve 8 molekülleri potansiyel bir ilaç ajanı olabileceği bulunmuştur.

Çizelge 4.14 Schiff bazlarının ilaç benzerliği özellikleri

Molekül		7	8	9	10	11
Fiziko kimyasal özellikleri	Molekül ağırlığı(g/mol)	312,41	284,35	312,41	340,46	368,51
	Ağır atom sayısı	24	22	24	26	28
	Aromatik ağır atom sayısı	18	18	18	18	18
	Csp3 hibrit fraksiyonu	0,09	0,00	0,09	0,17	0,23
	Dönebilir Bağ Sayısı	6	4	4	4	4
	H-bağı akseptörü sayısı	2	2	2	2	2
	H-bağı donörü sayısı	0	0	0	0	0
	Molar Kırılma	102,33	93,83	103,77	113,70	123,63
	TPSA (Å ²)	24,72	24,72	24,72	24,72	24,72
Lipofilitik	Log P _{o/w} (iLOGP)	3,63	3,34	3,88	4,22	4,68
	Log P _{o/w} (XLOGP3)	4,39	4,12	5,25	6,81	6,71
	Log P _{o/w} (WLOGP)	4,62	5,19	5,80	6,42	7,04
	Log P _{o/w} (MLOGP)	3,92	4,02	4,46	4,88	5,30
	Log P _{o/w} (SILICOS-IT)	6,60	5,83	6,86	7,90	8,96
	Consensus Log P _{o/w}	4,63	4,50	5,25	6,05	6,54
	Log S (ESOL)	-4,70	-4,54	-5,38	-6,49	-6,56
Suda çözünürlük	Çözünürlük	6,21e-03 mg/ml , 1,99e-05 mol/l	8,20e-03 mg/ml , 2,88e-05 mol/l	1,32e-03 mg/ml , 4,21e-06 mol/l	1,10e-04 mg/ml , 3,24e-07 mol/l	1,01e-04 mg/ml , 2,73e-07 mol/l
	Sınıf	Orta derecede çözünür	Orta derecede çözünür	Orta derecede çözünür	Az çözünür	Az çözünür
Farmakokinetik	GI emilimi	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
	KBB kalıcılığı	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır
	P-gp substratı	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet
	CYP1A2 inhibitor	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır
	CYP2C19 inhibitor	Evet	Evet	Evet	Evet	Hayır
	CYP2C9 inhibitor	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
	CYP2D6 inhibitor	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
	CYP3A4 inhibitor	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet
	Log K _p (deri geçirgenliği)	-5,09 cm/s	-5,11 cm/s	-4,48 cm/s	-3,54 cm/s	-3,78 cm/s

Çizelge 4.14 (Devam) Schiff bazlarının ilaç benzerliği özellikleri

İlaç benzerlik	Lipinski	Evet, 0 ihlal	Evet, 0 ihlal	Evet, 1 ihlal: MLOGP>4,15	Evet, 1 ihlal: MLOGP>4,15	Evet, 1 ihlal: MLOGP>4,15
	Ghose	Evet	Evet	Hayır, 1 ihlal: WLOGP>5,6	Hayır, 1 ihlal: WLOGP>5,6	Hayır, 1 ihlal: WLOGP>5,6
	Veber	Evet	Evet	Yes	Yes	Yes
	Egan	Evet	Evet	Yes	Hayır, 1 ihlal: WLOGP>5,88	Hayır, 1 ihlal: WLOGP>5,88
	Muegge	Evet	Evet	Hayır, 1 ihlal: XLOGP3>5	Hayır, 1 ihlal: XLOGP3>5	Hayır, 1 ihlal: XLOGP3>5
	Biyoyararlanım puanı	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Tıbbi kimyasal özellikler	Tüm test girişim yapıları	0 alert	0 alert	0 alert	0 alert	0 alert
	Brenk	1 alert: imin_1	1 alert: imin_1	1 alert: imin_1	1 alert: imin_1	1 alert: imin_1
	İlaç benzerlik	Hayır, 1 ihlal: XLOGP3>3,5	Hayır, 1 ihlal: XLOGP3>3,5	Hayır, 1 ihlal: XLOGP3>3,5	Hayır, 1 ihlal: XLOGP3>3,5	Hayır, 2 ihlal: MW>350, XLOGP3>3,5
	Sentetik erişilebilirlik	2,88	2,46	2,71	3,00	3,23

Çizelge 4.15 Bis- α -aminofosfonatların ilaç benzerliği özellikleri

Molekül		13	14	15	16
Fiziko kimyasal özellikleri	Molekül ağırlığı (g/mol)	780,78	780,78	808,84	836,89
	Ağır atomların sayısı	56	56	58	60
	Aromatik ağır atom sayısı	42	42	42	42
	Csp3 hibrit fraksiyonu	0,09	0,09	0,12	0,16
	Dönebilir Bağ Sayısı	18	16	16	16
	H-bağı akseptörü sayısı	8	6	6	6
	H-bağı donör sayısı	2	2	2	2
	Molar Kırılma	221,94	225,34	235,27	245,20
	TPSA ($\text{\AA}^2$)	114,74	114,74	114,74	114,74
Lipofilitik	Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	5,20	5,48	6,09	6,31
	Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	9,66	11,62	12,35	13,08
	Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	11,01	12,20	12,81	13,43
	Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	6,10	6,64	6,96	7,27
	Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	6,98	7,24	8,34	9,44
	Consensus Log $P_{o/w}$	7,79	8,63	9,31	9,91
Suda çözünürlük	Log S (ESOL)	-10,13	-11,50	-12,12	-12,73
	Çözünürlük	5,74e-08 mg/ml , 7,35e-11 mol/l	2,47e-09 mg/ml , 3,16e-12 mol/l	6,20e-10 mg/ml , 7,67e-13 mol/l	1,55e-10 mg/ml , 1,86e-13 mol/l
	Sınıf	Çözünmez	Çözünmez	Çözünmez	Çözünmez
Farmakokinetik	GI emilimi	Düşük	Düşük	Düşük	Düşük
	KBB kalıcılığı	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
	P-gp substratı	Hayır	Evet	Evet	Evet
	CYP1A2 inhibitor	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
	CYP2C19 inhibitor	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
	CYP2C9 inhibitor	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
	CYP2D6 inhibitor	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
	CYP3A4 inhibitor	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
	Log K_p (deri geçirgenliği)	-4,20 cm/s	-2,81 cm/s	-2,47 cm/s	-2,12 cm/s
İlaç benzerlik	Lipinski	Hayır, 2 ihlal: MW>500, MLOGP>4,15	Hayır, 2 ihlal: MW>500, MLOGP>4,15	Hayır, 2 ihlal: MW>500, MLOGP>4,15	Hayır, 2 ihlal: MW>500, MLOGP>4,15

Çizelge 4.15 (Devam) Bis- α -aminofosfonatların ilaç benzerliği özellikleri

İlaç benzerlik	Ghose	Hayır, 4 ihlal: MW>480, WLOGP>5,6, MR>130, #atoms>70	Hayır, 4 ihlal: MW>480, WLOGP>5,6, MR>130, #atoms>70	Hayır, 4 ihlal: MW>480, WLOGP>5,6, MR>130, #atoms>70	Hayır, 4 ihlal: MW>480, WLOGP>5,6, MR>130, #atoms>70
	Veber	Hayır, 1 ihlal: Rotors>10	Hayır, 1 ihlal: Rotors>10	Hayır, 1 ihlal: Rotors>10	Hayır, 1 ihlal: Rotors>10
	Egan	Hayır, 1 ihlal: WLOGP>5,88	Hayır, 1 ihlal: WLOGP>5,88	Hayır, 1 ihlal: WLOGP>5,88	Hayır, 1 ihlal: WLOGP>5,88
	Muegge	Hayır, 3 ihlal: MW>600, XLOGP3>5, Rotors>15	Hayır, 3 ihlal: MW>600, XLOGP3>5, Rotors>15	Hayır, 3 ihlal: MW>600, XLOGP3>5, Rotors>15	Hayır, 3 ihlal: MW>600, XLOGP3>5, Rotors>15
	Biyoyararlanım puanı	0,17	0,17	0,17	0,17
Tıbbi kimyasal özellikler	Tüm testi girişim yapıları	0 alert	0 alert	0 alert	0 alert
	Brenk	1 alert: fosfor	1 alert: fosfor	1 alert: fosfor	1 alert: fosfor
	İlaç benzerlik	Hayır, 3 ihlal: MW>350, Rotors>7, XLOGP3>3,5	Hayır, 3 ihlal: MW>350, Rotors>7, XLOGP3>3,5	Hayır, 3 ihlal: MW>350, Rotors>7, XLOGP3>3,5	Hayır, 3 ihlal: MW>350, Rotors>7, XLOGP3>3,5
	Sentetik erişilebilirlik	6,61	6,52	6,80	7,06

4.7 Antibakteriyel Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

Tez çalışmasının son aşamasında Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların on bir farklı mikroorganizmaya karşı antibakteriyel aktivite özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1222), *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) suşları kullanılmıştır. İnhibisyon zon çapları ve MİK sonuçları Çizelge 4.16 ve 4.17’ de verilmiştir. Çözücü olarak DMSO kullanılmıştır ve DMSO’ nun test edilen organizmaların hiçbirine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir.

Agar kuyucuk yöntemi ile Schiff bazlarından olan 7 molekülü için elde edilen sonuçlar incelendiğinde beş Gram-negatif bakteri (*Shigella dysenteriae* (ATCC 13313), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)) üzerinde 11 ± 0.20 ile 17 ± 0.10 mm arasında, altı Gram-pozitif bakteri (Vankomisine dirençli enterokoklar, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1222)) üzerinde ise 10 ± 0.64 ile 18 ± 0.42 mm arasında değişen zon çapları ile etkili olduğu görülmektedir (Çizelge 4.16). Sonuçlardan da görüldüğü üzere 7 molekülü *S. epidermidis* bakterisi üzerinde en etkilidir. 7 molekülünün VRE, *S. aureus*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi için gerçekleştirilen deneyler sonucunda 7 molekülün MİK değerlerinin 77,5 – 625,0 $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.16). Aynı yöntem ile 8 molekülü için gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite sonuçlarına göre, Gram-negatif bakteriler üzerinde $10\pm0,64$ – $17\pm0,10$ mm arasında değişen zon çapları ile etkili olduğu görülmektedir. 8 molekülünün *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* Gram-negatif bakterileri üzerinde herhangi bir antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı

tespit edilmiştir. 8 molekülü için Gram-pozitif bakterilere karşı gerçekleştirilen deneyler sonucunda *E. faecalis* ve *S. epidermidis* üzerinde sırasıyla $14\pm0,15$ ve $14\pm0,15$ mm zon çapları gözlemlenmiştir. Diğer Gram-pozitif bakteriler üzerinde herhangi bir antibakteriyel aktivite tespit edilmemiştir. Ayrıca 8 molekülünün MİK değerlerinin $155,0 - 625,0$ µg/mL arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Agar kuyucuk yöntemi sonucunda 9 molekülü için Gram-negatif bakterilere $8\pm0,31 - 18\pm0,32$ mm, Gram-pozitif bakterilere $10\pm0,21 - 20\pm0,10$ mm zon çapı arasında etki ettiği tespit edilmiştir. Çizelge 4.16' ya bakıldığında 9 molekülünün VRE, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı etkili olmadığı görülmektedir. 9 molekülünün MİK değerlerine bakıldığında $157,5 - 625,0$ µg/mL arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Aynı yöntem ile 10 molekülü için gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite sonuçlarına göre, Gram-negatif bakteriler üzerinde $12\pm0,40 - 22\pm0,40$ mm arasında değişen zon çapları ile etkili olduğu görülmektedir. 10 molekülü için Gram-pozitif bakterilere karşı gerçekleştirilen deneyler sonucunda *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* üzerinde sırasıyla $17\pm0,25$, $16\pm0,21$, $13\pm0,15$ ve $9\pm0,10$ mm zon çapları gözlemlenmiştir. Gram-pozitif bakterilerden olan VRE, *S. aureus* ve Gram-negatif bakteri olan *P. aeruginosa* üzerinde herhangi bir antibakteriyel aktivite tespit edilmemiştir. Çizelge 4.16' da 10 molekülünün MİK değerlerinin $157,5 - 1250,0$ µg/mL arasında değiştiği görülmektedir. Agar kuyucuk yöntemi ile 11 molekülü için elde edilen sonuçlar incelendiğinde Gram-negatif bakteriler üzerinde $11\pm0,25$ ile $20\pm0,10$ mm arasında, Gram-pozitif bakteriler üzerinde ise $8\pm0,10$ ile $15\pm0,26$ mm arasında değişen zon çapları ile etkili olduğu görülmektedir. 11 molekülünün iki Gram-pozitif (VRE ve *S. aureus*) ve iki Gram-negatif (*K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*) bakteri üzerinde antibakteriyel etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda 11 molekülünün MİK değerlerinin $77,5 - 1250,0$ µg/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.16 Schiff bazlarının test edilen mikroorganizmalara karşı zon çapları ve MİK değerleri

Bakteri Adı	Zon Çapları (mm)						MİK Değerleri (µg/mL)				
	7	8	9	10	11	Ampisilin	7	8	9	10	11
Gram-pozitif bakteriler											
Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE)	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	12±0,50	-	10±0,21	9±0,10	8±0,10	20±0,90	312,5	-	625,0	625,0	625,0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	11±0,60	14±0,15	14±0,25	16±0,21	10±0,15	21±1,00	312,5	312,5	312,5	625,0	77,5
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	10±0,64	-	12±0,15	13±0,15	15±0,15	19±0,90	625,0	-	312,5	312,5	312,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 1222	18±0,42	19±0,15	20±0,10	17±0,25	15±0,26	21±0,50	625,0	625,0	157,5	312,5	312,5
Gram-negatif bakteriler											
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	17±0,10	15±0,20	16±0,25	14±0,36	14±0,21	20±0,95	77,5	312,5	312,5	625,0	625,0
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	16±0,53	17±0,10	18±0,32	22±0,40	20±0,10	22±0,92	312,5	312,5	312,5	157,5	157,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	8±0,31	12±0,40	-	20±0,94	-	-	312,5	625,0	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11±0,20	10±0,64	12±0,31	12±0,60	11±0,25	18±0,80	77,5	155,0	312,5	1250,0	1250,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
(-) Antibakteriyel etki yoktur.											

Bis- α -aminofosfonat türevlerinden 13 molekülünün antibakteriyel aktivite sonuçları incelendiğinde, Gram-negatif bakteriler üzerinde $10\pm0,76 - 15\pm0,90$ mm arasında değişen zon çapları ile etkili olduğu görülmektedir (Çizelge 4.17). 13 molekülünün *P. aeruginosa* Gram-negatif bakterisi üzerinde herhangi bir antibakteriyel aktivite tespit edilmemiştir. Ayrıca yapılan çalışmada 13 molekülünün Gram-pozitif bakterilerden *E. faecalis*, *L. monocytogenes* ve *S. epidermidis*'e karşı sırasıyla $10\pm0,72$, $11\pm0,50$ ve $17\pm0,68$ mm zon çaplarında etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu molekül VRE, *S. aureus* ve *B.cereus* Gram-pozitif bakterilerine karşı herhangi bir antibakteriyel etki göstermemiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda 13 molekülünün MİK değerlerinin $312,5 - 2500,0$ $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği görülmektedir. Çizelge 4.17' de verilen antibakteriyel aktivite sonuçlarına göre, 14 molekülü Gram-negatif bakteriler üzerinde $10\pm0,76 - 13\pm0,70$ mm ve Gram-pozitif bakteriler üzerinde ise $11\pm0,60 - 16\pm0,75$ mm arasında değişen zon çaplarında etkili olmuştur. 14 molekülünün iki Gram-pozitif (VRE ve *S. aureus*) ve bir Gram-negatif (*P. aeruginosa*) bakteri üzerinde antibakteriyel etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. 14 molekülünün MİK değerlerinin $312,5 - 2500,0$ $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği görülmektedir. 15 molekülüne bakıldığında ise Gram-negatif bakteriler üzerinde $9\pm0,32 - 16\pm0,15$ mm ve Gram-pozitif bakteriler üzerinde ise $10\pm0,64 - 16\pm0,85$ mm arasında değişen zon çaplarında etkili olmuştur. Ayrıca bu molekülün iki Gram-pozitif (VRE ve *S. aureus*) ve iki Gram-negatif (*E.coli* ve *P. aeruginosa*) bakteri üzerinde antibakteriyel etkisinin olmadığı da tespit edilmiştir. 15 molekülünün MİK değerlerinin $625,0 - 1250,0$ $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği tespit edilmiştir. Aynı yöntem ile 16 molekülü için gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite sonuçlarına göre, Gram-negatif bakteriler üzerinde $13\pm0,40 - 16\pm0,26$ mm arasında değişen zon çapları ile etkili olduğu görülmektedir. 16 molekülünün *P. aeruginosa* Gram-negatif bakterisi üzerinde herhangi bir antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca 16 molekülü Gram-pozitif bakterilere karşı $9\pm0,30 - 15\pm0,64$ mm arasında değişen zon çapları ile etkili olduğu görülmektedir. Diğer Gram-pozitif (VRE ve *S. aureus*) bakteriler üzerinde herhangi bir antibakteriyel aktivite tespit edilmemiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda 16 molekülünün MİK değerlerinin $625,0 - 2500,0$ $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Literatürde Schiff bazlarının güçlü antibakteriyel etkiye sahip oldukları görülmektedir (Hamed *et al.* 2020, Salihović *et al.* 2021, Ayaz *et al.* 2022). Schiff bazlarının antibakteriyel aktivitesi, yapıdaki azometin grubunun şelatlayıcı özelliklerinden kaynaklanabilir. Schiff bazları, metal iyonları ile oksijen veya azot donör atomları aracılığıyla lipopolisakkaritlere bağlanarak bakteri hücre zarına nüfuz edebilir. Bu durum, hücre zarının zarar görmesine ve bakterilerin büyümesinin engellenmesine neden olur. Ayrıca, başka bir etki mekanizması, azometin azot atomu ile hücre bileşenlerinin aktif bölgeleri arasında hidrojen bağları oluşturarak normal hücre süreçlerine müdahale etmeyi içerir (Momani *et al.* 2013, Ajlouni *et al.* 2016). Bunun yanında literatürde α -aminofosfonat türevlerinin hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakteri suşlarına karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Awad *et al.* 2019, Litim *et al.* 2022). Bu yüksek antibakteriyel aktivitenin, α -aminofosfonatların aromatik halkası ile P=O ve P-O-Ar gruplarındaki aktif fonksiyonel gruplardan kaynaklandığı öne sürülebilir. Literatür verileri ve çalışmamızın sonuçları göz önüne alındığında, fosfonat gruplarının yapıya dahil edilmesinin antibakteriyel özellikler üzerinde olumlu etkiler yarattığı söylenebilir.

Çizelge 4.17 Bis- α -aminofosfonatların test edilen mikroorganizmalara karşı zon çapları ve MİK değerleri

Bakteri Adı	Zon Çapları (mm)					MİK Değerleri (µg/mL)			
	13	14	15	16	Ampisilin	13	14	15	16
Gram-pozitif bakteriler									
Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE)	-	-	-	-		-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-		-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	12±0.95	10±0.64	13±0.15	21±0,98	-	625.0	1250.0	1250.0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10±0.72	11±0.60	14±0.50	9±0.30	22±1,05	625.0	312.5	625.0	1250.0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	11±0.50	12±0.50	12±0.81	10±0.72	20±1,07	1250.0	1250.0	1250.0	1250.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 1222	17±0.68	16±0.75	16±0.85	15±0.64	22±1,00	312.5	312.5	625.0	625.0
Gram-negatif bakteriler									
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	15±0.30	13±0.70	14±0.61	16±0.26	19±0,90	1250.0	625.0	1250.0	1250.0
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	15±0.90	12±0.85	16±0.15	14±0.72	21±0,93	1250.0	1250.0	625.0	2500.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	12±0.81	10±0.76	9±0.32	13±0.40	21±0,96	1250.0	312.5	1250.0	1250.0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10±0.76	11±0.95	-	14±0.72	19±0,87	2500.0	2500.0	-	1250.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-		-	-	-	-
(-) Antibakteriyel etki yoktur.									

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında biyolojik aktiviteleri olduğu bilinen Schiff bazları ve bunlardan sentezlenen bis- α -aminofosfonatların 1,1-difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme kapasitesi, Cu^{2+} indirgeme kapasitesi (CUPRAC), Fe^{3+} indirgeme kapasitesi (FRAP), metal şelatlama kapasitesi metodları ile antioksidan kapasiteleri belirlenerek asetilkolinesteraz (AChE), bütirilkolinesteraz (BChE), karbonik anhidraz (CA I ve II), α -glikozidaz ve tirozinaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri *in vitro* ve *in silico* (Moleküler Docking) olarak araştırılmıştır. Çalışılan Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların elektronik yapıları Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (Density Functional Theory, DFT) ile incelenmiştir. İlâveten, bileşiklerin fizikokimyasal, lipofiliklik, çözünürlük, farmakokinetik, ilaç benzerliği ve tıbbi kimya özellikleri ADME programı yardımıyla belirlenmiştir.

Tez çalışmasında ilk olarak moleküllerin antioksidan kapasiteleri DPPH, CUPRAC, FRAP ve metal şelatlama yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. Bu yöntemlerde troloks kontrol maddesi olarak kullanılmıştır. Troloks' un stok çözeltisi hazırlanmış ve ardışık dilüsyonlar yapılarak farklı konsantrasyonlarda absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu değerler normalize edilip, konsantrasyona karşı 0-50 ve 0-100 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralıklarında nonlineer standart eğri grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Daha sonra tüm moleküllerin stok çözeltileri hazırlanarak aynı yöntemle ölçümler yapılmış ve troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri standart eğri grafiklerinden elde edilen formüller ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1' de verilen DPPH radikal süpürücü antioksidan kapasite sonuçlara göre genel olarak Schiff bazları, bis- α -aminofosfonatlara kıyasla troloks eşdeğer antioksidan kapasitelerinin daha güçlü olduğu bulunmuştur. Schiff bazlarının (7-11) hesaplanan troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri sırasıyla 0,00, 9,95, 11,57, 9,28 ve 7,47 $\mu\text{g/mL}$ dir. Dolayısıyla Schiff bazları arasında antioksidan kapasitesi en güçlü olan 9 molekülü, en zayıf ise 7 molekülünün olduğu görülmektedir. Bis- α -aminofosfonatlara bakıldığında ise antioksidan kapasiteleri birbirine oldukça yakın değerler olduğu görülmektedir. Bis- α -aminofosfonatların (13-16) hesaplanan troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri

sırasıyla 2,19, 2,22, 2,24 ve 2,55 $\mu\text{g/mL}$ ' dir. Bu sonuçlara göre bis- α -aminofosfonat molekülleri arasında 16 molekülü en güçlü antioksidan kapasiteye sahip iken, en zayıf ise 13 molekülü olduğu tespit edilmiştir.

Moleküllerin antioksidan kapasitelerini belirlemede kullanılan bir diğer yöntem ise CUPRAC testidir. Bu yöntemde de kontrol maddesi olarak troloks kullanılmıştır. Troloksun ve moleküllerin stok çözeltilerinin hazırlanması ve absorbans ölçümleri DPPH testi deneyinde olduğu gibi yapılmıştır. CUPRAC testi sonuçları bis- α -aminofosfonatların Schiff bazlarına göre troloks eşdeğer antioksidan kapasitelerinin oldukça güçlü olduğunu göstermektedir. Schiff bazlarının (7-11) hesaplanan troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri sırasıyla 2,19, 7,60, 0,00, 5,98 ve 43,14 $\mu\text{g/mL}$ ' dir (Çizelge 4.2). Schiff bazları arasında antioksidan kapasitesi en güçlü olan 11 molekülü, en zayıf ise 9 molekülü olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, bis- α -aminofosfonatların (13-16) hesaplanan troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri sırasıyla 8,16, 14,63, 26,48 ve 23,51 $\mu\text{g/mL}$ ' dir (Çizelge 4.2). Bu sonuçlara göre fosfonat molekülleri arasında 15 molekülü en güçlü antioksidan kapasiteye sahip iken, en zayıf ise 13 molekülünün olduğu tespit edilmiştir.

Moleküllerin antioksidan kapasiteleri FRAP yöntemi ile de değerlendirilmiştir ve sonuçlar Çizelge 4.3' te sunulmuştur. Bu yöntemin sonuçlarına göre, Schiff bazlarının (7-11) troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri sırasıyla 1,68, 5,86, 17,23, 26,22 ve 72,46 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Schiff bazları arasında antioksidan kapasitesi en güçlü olan 11 molekülü, en zayıf ise 7 molekülü olduğu görülmektedir. Bis- α -aminofosfonatların (13-16) belirlenen troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri ise sırasıyla 6,97, 3,54, 5,45 ve 6,44 $\mu\text{g/mL}$ ' dir. Bu sonuçlara göre fosfonat molekülleri arasında 13 molekülü en güçlü antioksidan kapasiteye sahip iken, en zayıf ise 14 molekülü olduğu tespit edilmiştir. Moleküllerin belirlenen troloks eşdeğer kapasiteleri dikkate alındığında 11 (72,46 $\mu\text{g/mL}$) molekülü diğer moleküllere kıyasla oldukça güçlü antioksidan özellik göstermektedir.

Moleküllerin antioksidan kapasitelerini belirlemek için ayrıca metal şelatlama yöntemi de kullanılmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.4' te verilmiştir. Metal şelatlama antioksidan

kapasite test sonuçlarına göre, Schiff bazlarının (7-11) troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri sırasıyla 42,18, 40,15, 40,36, 43,67 ve 24,63 $\mu\text{g/mL}$ ' dir. Schiff bazları arasında antioksidan kapasitesi en güçlü olan 10 molekülü, en zayıf ise 11 molekülü olduğu görülmektedir. Bis- α -aminofosfonatların (13-16) belirlenen troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri ise sırasıyla 28,95, 17,83, 11,37 ve 15,11 $\mu\text{g/mL}$ ' dir. Bu sonuçlara göre bis- α -aminofosfonat molekülleri arasında 13 molekülü en güçlü antioksidan kapasiteye sahip iken, en zayıf ise 15 molekülü olduğu tespit edilmiştir. Diğer antioksidan kapasite yöntemleriyle kıyaslandığında genel olarak metal şelatlama yönteminde bütün moleküller yüksek antioksidan özellik göstermiştir. Bunun nedeni ise Schiff bazlarının yapısındaki imin grubu, bis- α -aminofosfonatların ise yapısındaki fosfonat gruplarından dolayıdır. Bu grupların oldukça iyi metal şelatlayıcı oldukları literatürce bilinmektedir.

Literatürde bis-azometin grubu içeren moleküllerle yapılan çalışmalarda azometin gruplarına bağlı benzen halkasına farklı sübstituentler bağlanarak bunların antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. Bu bağlamda Jiang ve arkadaşları azometin grubuna bağlı benzen halkasına farklı pozisyonlarda hidroksil grubu bağlayarak moleküllerin antioksidan kapasitelerini incelemişler ve $15,4 \pm 2,0 - 45,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ' lık IC_{50} aralığında standart antioksidan olan resveratrola (IC_{50} : $104,3 \pm 3,8 \mu\text{M}$) göre daha güçlü antioksidan özellik gösterdiğini bildirmişlerdir (Jiang *et al.* 2015). Diğer bir çalışmada benzen grubuna hidroksil ve klor/metil grupları bağlayıp Schiff bazlarının antioksidan özelliklerini incelemişler ve $80.69 - 67.29 \mu\text{M}$ ' lık IC_{50} aralığında referans standart olarak kullanılan askorbik asite kıyasla daha güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduklarını rapor etmişlerdir (Salimath and Pathak 2024). Lolak ve arkadaşları ise azometin grubuna histamin bağlayarak Schiff bazlarının antioksidan kapasitesini DPPH, ABTS, CUPRAC ve metal şelatlama yöntemleriyle incelemişler ve sentezledikleri tüm Schiff bazlarının standartlara (BHA ve BHT) göre daha düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Lolak *et al.* 2022). Azometin grubuna benzen halkasından farklı bir grup (histamin) bağlandığında antioksidan özelliğinde düşüş meydana gelmektedir (Lolak *et al.* 2022). Tez kapsamında çalışılan Schiff bazı türevlerinde azometin gruplarına bağlı benzen halkasına herhangi bir grup bağlı olmadığı halde antioksidan özellik göstermişlerdir. Ancak azometin grubuna bağlı

benzen halkalarına hidroksil/halojen/metil grupları bağlandığında antioksidan özelliklerinin arttığı literatürde bildirilmiştir (Jiang *et al.* 2015, Salimath and Pathak 2024).

Bu tez çalışmasında ikinci olarak Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların elektronik yapıları Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi ile incelenmiştir. Global reaktivite parametreleri iyonlaşma potansiyeli (I), elektron ilgisi (A), elektronegatiflik (χ), kimyasal potansiyel (μ), kimyasal sertlik (η), kimyasal yumuşaklık (σ) ve elektrofiliklik (ω) B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde hesaplanmıştır. Schiff bazları arasından 0.170 eV yumuşaklık değeriyle molekül 10 daha yumuşak ve daha reaktif olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5). Bis- α -aminofosfonat türevleri arasında ise 0.149 eV yumuşaklık değeriyle molekül 15 daha yumuşak ve reaktif olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5). Schiff bazları için hesaplanan kimyasal sertlik değeri (7.315 eV), yumuşaklığından (0.170 eV) daha yüksektir bu da Schiff bazlarının daha az reaktiviteye ve daha fazla stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.5). Bis- α -aminofosfonatlar için hesaplanan kimyasal sertlik değeri yumuşaklığından daha yüksektir, bu da bis- α -aminofosfonatların daha az reaktiviteye ve daha fazla stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca tüm moleküllerin I değerleri A değerlerinden daha yüksektir, bu da moleküllerin elektron verme eğilimlerinin elektron alma eğilimlerinden daha yüksek olduğunu göstermektedir. Molekülün elektronegatiflik (χ) veya kimyasal potansiyelinin (μ) negatif olması, elektronların denge sisteminden ayrılma eğilimini ifade etmektedir. Yüksek kimyasal potansiyel değerine sahip bir molekül daha az kararlı ve daha reaktiftir. 7 ve 8 Schiff bazları serideki diğer moleküllere göre daha yüksek kimyasal potansiyele sahip olduğu bulunmuştur. Elektrofiliklik indeksi (ω), bir molekülün elektronları kabul etme yeteneğini ölçer. Tüm moleküllerin I değerlerinin elektrofiliklik indeksinden daha düşük olması, moleküllerin elektrofilik özellikte olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.5).

Daha sonra moleküllerin moleküler elektrostatik potansiyel haritaları (MEP) belirlenmiştir. MEP, moleküllerin yük dağılımını gösterir ve elektron yoğunluğu yüzeyi renk kodlu bir haritadır. Bu haritalarda kırmızı bölgeler elektron yoğunluğunun yüksek olduğu bölgeleri, mavi bölgeler ise düşük elektron yoğunluğunun olduğu bölgeleri

göstermektedir. Schiff bazlarının B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde hesaplanan MEP haritalarına bakıldığında en fazla elektron yoğunluğunun olduğu bölgeler benzen halkalarında, elektron açısından fakir bölgeler ise imin grubundaki hidrojen üzerindedir ($-N = CH-$). Bis- α -aminofosfonatlarda ise elektron yoğunluğu bakımından en yoğun bölgeler fosfonat gruplarında bulunmuşken, elektron bakımından fakir bölgeler amin grubundaki ($-N - CH-$) hidrojenler üzerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

Tez kapsamında üçüncü çalışma olarak tüm moleküllerin asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Schiff bazlarının AChE' ye karşı IC_{50} değerleri 92,42 ile 138,63 μM arasında değişirken, bis- α -aminofosfonatlar için bu değerler 6,48 ile 43,32 μM arasında değişmektedir. Schiff bazı türevleri arasında 9 molekülü, AChE' ye karşı diğerlerine göre daha iyi inhibisyon ($IC_{50} = 92,42 \mu M$) göstermiştir. Öte yandan bis- α -aminofosfonatlardan 15 molekülü AChE' ye karşı 6,48 μM ' lık IC_{50} değeriyle en güçlü inhibisyonu göstermiştir. Göz önüne alınan moleküllerin inhibitör aktivitelerinin sırası güçlüden zayıfa doğru: Schiff bazı türevleri için 9, 8, 10, 7, 11 ve bis- α -aminofosfonat türevleri için 15, 14, 16, 13 şeklinde olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardan, bis- α -aminofosfonat türevleri AChE' ye karşı öncülleri olan Schiff bazı türevlerinden daha güçlü inhibisyon aktivite gösterdiği çıkarımına varılmıştır.

Ayrıca tüm moleküllerin bütirilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Schiff bazlarının BChE' ye karşı IC_{50} değerleri 315,07 ile 693,15 μM arasında değişirken, bis- α -aminofosfonatlar için bu değerler 49,51 ile 231,05 μM arasında değişmektedir. Schiff bazı türevleri arasında molekül 8, BChE' ye karşı diğerlerine göre daha iyi inhibisyon ($IC_{50} = 315,07 \mu M$) göstermiştir. Diğer yandan bis- α -aminofosfonatlardan molekül 13 BChE' ye karşı 49,51 μM ' lık IC_{50} değeriyle en güçlü inhibisyonu göstermiştir. Göz önüne alınan moleküllerin inhibitör aktivitelerinin sırası güçlüden zayıfa doğru: Schiff bazı türevleri için 8, 10, 9, 11, 7 ve bis-a-aminofosfonat türevleri için 13, 15, 16, 14 şeklinde olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardan, bis- α -aminofosfonat türevleri BChE' ye karşı

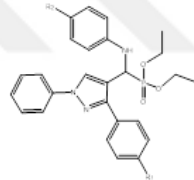
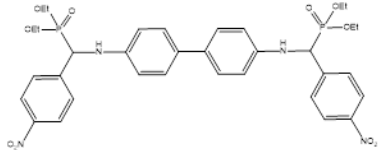
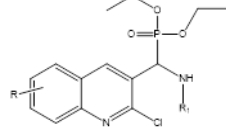
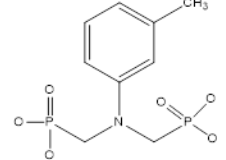
öncülleri olan Schiff bazı türevlerinden daha güçlü inhibisyon aktivite gösterdiği çıkarımına varılmıştır.

Göz önüne alınan moleküllerin karbonik anhidraz (CA I ve II) enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir. Ancak ilgili moleküllerin CA I ve CA II enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

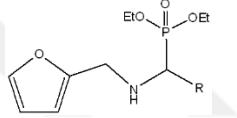
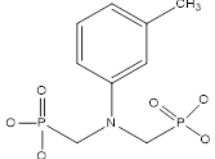
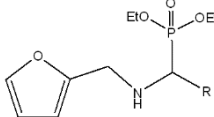
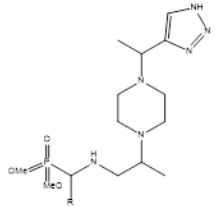
Ardından α -glukozidaz enzimine karşı tüm moleküllerin inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Gerçekleştirilen aktivite çalışmaları sonucunda moleküllerden Schiff bazlarından 9 - 11 ve bis- α -aminofosfonatlardan 14 ve 15 molekülü, α -glukozidaza karşı inhibisyon göstermemiştir. Diğer taraftan Schiff bazı 7 ve 8 sırasıyla 173,29, 115,52 μM 'lık IC_{50} değerleriyle inhibisyon göstermiştir. Bis- α -aminofosfonatlar arasında ise 13 ve 16 molekülleri sırasıyla 99,02 ve 32,54 μM 'lık IC_{50} değerleriyle inhibisyon göstermiştir. Dolayısıyla bis- α -aminofosfonatların, Schiff bazlarıyla kıyaslandığında, α -glukozidaza karşı daha güçlü inhibisyon gösterdiği açıktır. Ayrıca elde edilen IC_{50} değerlerine göre moleküller arasında en güçlü inhibitör özellik gösteren 16 moleküldür.

Enzim inhibisyon çalışmalarında son olarak tüm moleküllerin tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Enzim aktivite çalışmasına göre 7, 8, 10 ve 13 molekülleri tirozinaza karşı inhibisyon etki göstermemiştir. Schiff bazlarından olan 9 ve 11 moleküllerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 187,34 ve 693,15 μM olarak hesaplanmıştır. Öte yandan bis- α -aminofosfonatlardan olan 14, 15 ve 16 moleküllerinin IC_{50} değerleri ise sırasıyla 231,05, 346,57 ve 330,07 μM olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan IC_{50} değerlerine göre moleküller arasında en iyi inhibitör özellik gösteren 9 moleküldür.

Çizelge 5.1 Bis- α -aminofosfonatlar ile literatür verilerinin karşılaştırılması

Enzim	Molekül	IC ₅₀ (µg/mL)	Literatürdeki Aminofosfonat Türevleri	IC ₅₀ (µg/mL)	Referans
Asetilkolinesteraz	15	6,48		3,16 – 9,04	Ren <i>et al.</i> 2016
	14 15 16	9,00 6,48 10,88		34,13	Aissa <i>et al.</i> 2021)
	14 15 16	9,00 6,48 10,88		28,42±0,02	Bazine <i>et al.</i> 2020
	13 14 15 16	43,32 9,00 6,48 10,88		67,32±0,52	Haddadi <i>et al.</i> 2022

Çizelge 5.1 (Devam) Bis- α -aminofosfonatlar ile literatür verilerinin karşılaştırılması

	15	6,48		$0,884 \pm 0,002 - 4,458 \pm 0,009$	Uparkar <i>et al.</i> 2022
Bütirikolinesteraz	13	49,51		$34,80 \pm 0,76$	Haddadi <i>et al.</i> 2022
				$02,297 \pm 0,091 - 18,587 \pm 0,134$	Uparkar <i>et al.</i> 2022
Glikozidaz	16	39,54		$57,9 \pm 0,05$	Kandula <i>et al.</i> 2024

Literatür verileri incelendiğinde bis- α -aminofosfonatların AChE, BChE, karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri, α -glikozidaz ve tirozinaz enzimleri üzerine inhibisyon çalışmaları oldukça sınırlıdır. Aissa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bazı bis- α -aminofosfonat türevleri AChE, BChE ve tirozinaz enzimlerine karşı inhibisyonları incelenmiş ve moleküllerin AChE (IC_{50} : 34,13 – > 200 μ g/mL) ve BChE (IC_{50} : 39,42 – > 200 μ g/mL)’ ye karşı referans madde olan galantamine kıyasla (sırasıyla IC_{50} : 6,27 ve 34,75 μ g/mL) düşük, tirozinaza (IC_{50} : 12,11 – > 200 μ g/mL) karşı referans madde olan kojik asite kıyasla (IC_{50} : 25,23 μ g/mL) ise çok zayıf inhibisyon etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Aissa *et al.* 2021). Tez kapsamında çalışılan bis- α -aminofosfonatlardan 14 (IC_{50} : 9,00 μ g/mL), 15 (IC_{50} : 6,48 μ g/mL) ve 16 (IC_{50} : 10,88 μ g/mL) moleküllerinin AChE üzerine inhibisyon etkileri literatürde belirtilen referans madde galantamin (IC_{50} : 6,27 μ g/mL) ile yakın inhibisyon etki gösterdikleri bulunmuştur. Bunun yanında çalıştığımız bis- α -aminofosfonatlar ile pirazol grubu içeren α -aminofosfonat türevleri (IC_{50} : 3,16- 9,04 mg/L) AChE’ ye karşı benzer inhibitör etki göstermiştir (Ren *et al.* 2016). Diğer bir çalışmada kinolin ve kinolon içeren α -aminofosfonat türevlerinin AChE’ ye karşı inhibitör etkileri incelenmiş ve $28,42 \pm 0,02 - > 500$ μ g/mL’ lik IC_{50} değerleri bulunmuştur (Bazine *et al.* 2020). Çalışılan 14 (IC_{50} : 9,00 μ g/mL), 15 (IC_{50} : 6,48 μ g/mL) ve 16 (IC_{50} : 10,88 μ g/mL) moleküllerin AChE’ ye karşı inhibitör özellikleri kıyaslandığında kinolin ve kinolon içeren α -aminofosfonat türevlerinden daha güçlü etki gösterdiği tespit edilmiştir. Haddadi ve diğerleri α -Aminofosfonik asit ve α -aminofosfonat esterini sentezleyerek AChE ve BChE’ ye karşı inhibisyon etkilerini incelenmişlerdir. Hem α -aminofosfonik asit hem de α -aminofosfonat esterini AChE (IC_{50} : $67,32 \pm 0,52$ ve $92,71 \pm 0,91$ μ g/mL) ve BChE (IC_{50} : $34,80 \pm 0,76$ ve $79,16 \pm 0,47$ μ g/mL)’ ye karşı inhibisyon etki gösterdiği bildirilmiştir (Haddadi *et al.* 2022). Tez çalışmasındaki bis- α -aminofosfonat türevleri 14 (IC_{50} : 9,00 μ g/mL), 15 (IC_{50} : 6,48 μ g/mL) ve 16 (IC_{50} : 10,88 μ g/mL), α -Aminofosfonik asit ve α -aminofosfonat esterine göre AChE’ ye karşı daha güçlü inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. Ancak BChE’ de ise çalışılan moleküllerden 13 (IC_{50} : $49,51 \pm 0,9$ μ g/mL), α -aminofosfonat esterinden daha güçlü ve α -Aminofosfonik asitten ise daha zayıf inhibitör etki göstermiştir. Referans madde olan galatamin ile kıyaslandığında ise bis- α -aminofosfonat türevlerinin daha etkili olduğu bulunmuştur. Uparkar ve diğerleri yaptığı çalışmada furan içeren α -aminofosfonat türevleri sentezlemiş ve bu molekülleri AChE ve BChE’ ye karşı

inhibisyon aktivitelerini değerlendirmişlerdir. AChE' ye karşı $0,884 \pm 0,002 - 4,458 \pm 0,009 \mu\text{g/mL}$ ' lik IC_{50} aralığında, BChE' ye karşı ise $02,297 \pm 0,091 - 18,587 \pm 0,134 \mu\text{g/mL}$ ' lik IC_{50} aralığında güçlü inhibisyon etki bulmuşlardır (Uparkar *et al.* 2022). Başka bir çalışmada α -aminofosfonatların α -glikozidaza karşı inhibisyon etkileri incelenmiş ve α -aminofosfonatların (IC_{50} : $5,96 - > 200 \text{ nM}$) referans madde akarboz (IC_{50} : 106.63 nM) ile karşılaştırıldığında daha güçlü inhibisyon etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Zareei *et al.* 2023). Kandula ve diğerleri piperazin ve 1,2,3-triazol içeren α -aminofosfonat türevleri sentezlemiş ve α -glikozidaza karşı inhibitör etkilerini araştırmışlardır (Kandula *et al.* 2024). Sentezlenen tüm moleküllerin α -glikozidaza karşı inhibisyon etkisi bis- α -aminofosfonat türevlerinden (14, 15 ve 16) daha zayıf olduğu bulunmuştur. Yine bis- α -aminofosfonat türevlerinin glikozidaza karşı literatürde çalışılan referans madde akarboz (IC_{50} : $79,1 \pm 0,05$)' dan daha güçlü inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Tez kapsamında göz önüne aldığımız bis- α -aminofosfonatlar AChE ve BChE' ye karşı güçlü inhibisyon göstermiş ve bu çalışma literatürdeki eksikliğin giderilmesine katkı sağlayacaktır. Ayrıca çalışılan bis- α -aminofosfonatların α -glikozidaz enzimine karşı inhibisyon çalışmaları da literatürdeki ilk çalışmalardır.

Tez kapsamında dördüncü çalışma olarak Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatlar ile ilgili enzimler arasındaki bağlanma konformasyonlarını ve kovalent olmayan etkileşimleri tahmin etmek için moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *In vitro* çalışmalar ile doking çalışmaları sonuçlarının uyumluluğu değerlendirildi. Asetilkolinesteraz enzimi ile moleküllerin moleküler docking hesaplamalarında Schiff bazları (7-11) için sırasıyla $-146,54$, $-127,19$, $-121,77$, $-134,93$ ve $-146,35$ ' lik MolDock skorları elde edilmiştir. Bis- α -aminofosfonatlar (13 - 16) için ise sırasıyla $-237,28$, $-185,07$, $-203,03$ ve $-165,12$ ' lik MolDock skor değerleri bulunmuştur. Ayrıca referans ligand olan donepezil için bu skor $-159,53$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar Schiff bazlarının referans liganda göre asetilkolinesteraza daha zayıf, bis- α -aminofosfonatların ise daha kuvvetli kenetlendiğini göstermektedir.

Bütirilkolinesteraz enzimi ile moleküllerin moleküler docking hesaplamalarında Schiff bazları (7 - 11) için sırasıyla -112,46, -97,35, -103,78, -112,45 ve -113,03' lük MolDock skorları elde edilmiştir. Bis- α -aminofosfonatlar (13 - 16) için ise sırasıyla -208,95, -218,12, -227,69 ve -224,71' lik MolDock skor değerleri bulunmuştur. Ayrıca referans ligand olan takrin için bu skor -77,76 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar hem Schiff bazları hem de bis- α -aminofosfonatlar takrin ile kıyaslandığında bütirilkolinesteraz enzimine daha kuvvetli kenetlendiğini göstermektedir.

α -glikozidaz enzimi ile moleküllerin moleküler docking hesaplamalarında Schiff bazları (7 ve 8) için sırasıyla -123,71 ve -112,07' lik MolDock skorları elde edilmiştir. Bis- α -aminofosfonatlar (13 ve 16) için ise sırasıyla -191,14 ve -189,47' lik MolDock skor değerleri bulunmuştur. Ayrıca referans ligand olan akarboz için bu skor -71,77 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar 7, 8, 13 ve 16 molekülleri akarboz ile kıyaslandığında α -glikozidaz enzimine daha kuvvetli kenetlendiğini göstermektedir.

Tirozinaz enzimi ile Schiff bazları (9 ve 11) için gerçekleştirilen moleküler docking hesaplamalarında sırasıyla -96,10 ve -93,19' luk MolDock skorları elde edilmiştir. Bis- α -aminofosfonatlar (14, 15 ve 16) için ise sırasıyla -142,93, -171,32 ve -123,63' lük MolDock skor değerleri bulunmuştur. Ayrıca referans ligand olan akarboz için bu skor -64,36 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar 9, 11, 14 ve 16 molekülleri tropolon ile kıyaslandığında tirozinaz enzimine daha kuvvetli kenetlendiğini göstermektedir.

Tez kapsamında beşinci çalışma olarak Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonat moleküllerinin fizikokimyasal, lipofiliklik, çözünürlük, farmakokinetik, ilaç benzerliği ve tıbbi kimya özelliklerinin araştırılması için *in silico* ADME çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ADME sonuçlarına göre, 13 - 16 moleküllerinin suda çözünmediği tespit edilmiştir. 7 - 9' un orta derecede çözünür olduğu ve 10 ve 11' in ise suda az çözünür olduğu bulunmuştur. İncelenen tüm moleküllerin TPSA değerleri 20 - 130 Å² arasındadır. Tüm moleküllerin Log K_p değeri -2,12 ile -5,11 cm/s arasındadır. Schiff bazlarından 7, 8 ve 9 molekülleri Kan-Beyin Bariyerini geçerken, diğer moleküller Kan-Beyin Bariyerini geçemediği tespit edilmiştir. Lipinski' nin beş kuralına ve ADME çalışmasına göre 7 ve 8 moleküllerinin potansiyel bir ilaç ajanı olabileceği bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında son olarak Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonatların farklı mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktivite özellikleri değerlendirilmiştir. Çalışmada, gram-pozitif olan, Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1222), gram-negatif olan, *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) bakteri suşları kullanılmıştır. İnhibisyon zon çapları ve MİK değerleri ölçülmüştür. Buna göre, Schiff bazları (7-11) VRE, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı antibakteriyel etki göstermemiştir. Schiff bazı türevleri için *B. cereus* bakterisine karşı $8\pm0,10 - 12\pm0,50$ mm, *E. faecalis*' e karşı $10\pm0,15 - 16\pm0,21$ mm, *L. monocytogenes*' e karşı $10\pm0,64 - 15\pm0,15$ mm, *S. epidermidis*' e karşı $15\pm0,26 - 20\pm0,10$ mm, *S. dysenteriae*' e karşı $14\pm0,21 - 17\pm0,10$ mm, *A. baumannii*' ye karşı $16\pm0,53 - 22\pm0,40$ mm, *K. pneumoniae*' e karşı $8\pm0,31 - 12\pm0,40$ mm ve *E. coli*' ye karşı $11\pm0,20 - 12\pm0,60$ mm arasında zon çapları ölçülmüştür. Ayrıca bu moleküller için belirlenen MİK değerlerinin *B. cereus* bakterisi için $312,5 - 625,0$ $\mu\text{g/mL}$, *E. faecalis* için $77,5 - 625,0$ $\mu\text{g/mL}$, *L. monocytogenes* için $312,5 - 625,0$ $\mu\text{g/mL}$, *S. epidermidis* için $157,5 - 625,0$ $\mu\text{g/mL}$, *S. dysenteriae* için $77,5 - 625,0$ $\mu\text{g/mL}$, *A. baumannii* için $157,5 - 312,5$ $\mu\text{g/mL}$, *K. pneumoniae* için $625,0 - 312,5$ $\mu\text{g/mL}$ ve *E. coli* için $77,5 - 1250,0$ $\mu\text{g/mL}$ olduğu bulunmuştur. Antibakteriyel aktivite sonuçları değerlendirildiğinde Schiff bazı türevlerinin, pozitif kontrol ampisiline kıyasla, *S. epidermidis* ve *A. baumannii* bakterilerine karşı oldukça güçlü antibakteriyel etki göstermiştir.

Bis- α -aminofosfonatlar (13-16) da VRE, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı antibakteriyel etki göstermemiştir. Bis- α -aminofosfonat türevleri için *B. cereus* bakterisine karşı $10\pm0,64 - 13\pm0,15$ mm, *E. faecalis*' e karşı $9\pm0,30 - 14\pm0,50$ mm, *L. monocytogenes*' e karşı $10\pm0,72 - 12\pm0,81$ mm, *S. epidermidis*' e karşı $15\pm0,64 - 17\pm0,68$ mm, *S. dysenteriae*' e karşı $13\pm0,70 - 16\pm0,26$ mm, *A. baumannii*' ye karşı $12\pm0,85 - 16\pm0,15$ mm, *K. pneumoniae*' e karşı $9\pm0,32 - 13\pm0,40$ mm ve *E. coli*' ye karşı $10\pm0,76 - 14\pm0,72$ mm arasında zon çapları ölçülmüştür. Ayrıca bu moleküller için belirlenen MİK değerlerinin *B. cereus* bakterisi için $625,0 - 1250,0$ $\mu\text{g/mL}$, *E.*

faecalis için 312,5 – 1250,0 µg/mL, *L. monocytogenes* için 1250,0 µg/mL, *S. epidermidis* için 312,5 – 625,0 µg/mL, *S. dysenteriae* için 625,0 – 1250,0 µg/mL, *A. baumannii* için 625,0 – 2500,0 µg/mL, *K. pneumoniae* için 312,5 – 1250,0 µg/mL ve *E. coli* için 1250,0 – 2500,0 µg/mL olduğu bulunmuştur. Antibakteriyel aktivite sonuçları değerlendirildiğinde Bis- α -aminofosfonat türevlerinin, pozitif kontrol ampisiline kıyasla, *S. epidermidis*, *S. dysenteriae* ve *A. baumannii* bakterilerine karşı oldukça güçlü antibakteriyel etki göstermiştir.

Sonuç olarak, Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonat türevlerinin günümüzün yaygın küresel hastalıkları ile ilişkili enzimler olan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri, asetilkolinesteraz, bütirikolinesteraz, α -glukozidaz ve tirozinaz üzerine olası etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucu yapılan değerlendirmelerde bis- α -aminofosfonat türevlerinin güçlü enzim inhibisyon özelliklerinden dolayı başta Alzheimer hastalığı, glukoma, epilepsi, T2DM ve melanoma gibi birçok yaygın hastalığın tedavisinde ilaç olma potansiyeline sahip moleküller oldukları tespit edilmiştir.

- Tez kapsamında çalışılan moleküllerin gelecekte farklı biyolojik özellikleri çalışılabilir.
- Bis- α -aminofosfonat türevleri ile ilgili tez çalışması yeni bis- α -aminofosfonat türevlerinin geliştirilmesine ve gelecekte yapılacak olan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara temel teşkil edebilir.
- Schiff bazları ve bis- α -aminofosfonat moleküllerinin enzim kinetik çalışmaları, ilgili hedef enzimlere olan etkilerinin nasıl olduğunu daha iyi anlamak için ileride yapılacak araştırmalarda önemli bir adım olabilir.
- Bütün bunların yanı sıra ilaç endüstrisindeki araştırmacılar, bu yeni moleküllerin yapılarını optimize ederek daha etkin ve seçici terapötik ajanlara dönüştürülmesini hedefleyen ileri çalışmalara odaklanabilir.

KAYNAKLAR

- Addar, L., Bensouici, C., Si Ahmed Zennia, S., Boudjenah Haroun, S. and Mati, A. 2019. Antioxidant, tyrosinase and urease inhibitory activities of camel α S-casein and its hydrolysate fractions. *Small. Rumin. Res.*, 173: 30-35.
- Aissa, R., Guezane-Lakoud, S., Toffano, M., Gali, L. and Aribi-Zouioueche, L. 2021. Fiaud's Acid, a novel organocatalyst for diastereoselective bis α -aminophosphonates synthesis with *in-vitro* biological evaluation of antifungal, antioxidant and enzymes inhibition potential. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 41: 128000.
- Ajlouni, A. M., Abu-Salem, Q., Taha, Z. A., Hijazi, A. K. and Al Momani, W. 2016. Synthesis, characterization, biological activities and luminescent properties of lanthanide complexes with [2-thiophenecarboxylic acid, 2-(2-pyridinylmethylene)hydrazide] Schiff bases ligand. *J. Rare. Earth.*, 34: 986-993.
- Akman, E., Sirinzade, H., Ozguven, S. Y., Dilek, E. and Suzen, S. 2023. Enzyme inhibitory potential of some indole Schiff bases on acetylcholinesterase and human carbonic anhydrase isoforms I and II enzymes: an *in vitro* and molecular docking study. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1: 1-10.
- Alanazi, M. A., Arafa, W. A. A., Althobaiti, I. O., Altaieb, H. A., Bakr, R. B. And Elkanzi, N. A. A. 2022. Green Design, Synthesis, and Molecular Docking Study of Novel Quinoxaline Derivatives with Insecticidal Potential against *Aphis craccivora*. *ACS Omega*, 7: 27674-27689.
- Albrecht, Ł., Albrecht, A., Krawczyk, H. and Jørgensen, K. A. 2010. Organocatalytic Asymmetric Synthesis of Organophosphorus Compounds. *Chem. - Eur. J.*, 16: 28-48.
- Ali, M. A., Musthafa, S. A., Munuswamy-Ramanujam, G. and Jaisankar, V. 2022. 3-Formylindole-based chitosan Schiff base polymer: Antioxidant and *in vitro* cytotoxicity studies on THP-1 cells. *Carbohydr. Polym.*, 290: 119501.
- Al-Masoudi, N. A., Aziz, N. M. and Mohammed, A. T. 2009. Synthesis and *In Vitro* Anti-HIV Activity of Some New Schiff Base Ligands Derived from 5-Amino-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol and Their Metal Complexes. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 184: 2891-2901.

- Alsantali, R. I., Mughal, E. U., Naeem, N., Alsharif, M. A., Sadiq, A., Ali, A., Jassas, Rabab. S., Javed, Q., Javid, A., Sumrra, S. H., Alsimaree, A. A., Zafar, M. N., Asghar, B. H., Altass, H. M., Moussa, Z. and Ahmed, S. A. 2022. Flavone-based hydrazones as new tyrosinase inhibitors: Synthetic imines with emerging biological potential, SAR, molecular docking and drug-likeness studies. *J. Mol. Struct.*, 1251: 131933.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. and Çelik, S. E. 2008. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Mikrochim. Acta*, 160: 413-419.
- Armstrong, J. McD., Myers, D. V., Verpoorte, J. A. and Edsall, J. T. 1966. Purification and Properties of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases. *J. Biol. Chem.*, 241: 5137-5149.
- Ashfaq, M., Khalid, M., Tahir, M. N., Ali, A., Arshad, M. N. and Asiri, A. M. 2022. Synthesis of Crystalline Fluoro-Functionalized Imines, Single Crystal Investigation, Hirshfeld Surface Analysis, and Theoretical Exploration. *ACS Omega*, 7: 9867-9878.
- Awad, M. K., Abdel-Aal, M. F., Atlam, F. M. and Hekal, H. A. 2019. Molecular docking, molecular modeling, vibrational and biological studies of some new heterocyclic α -aminophosphonates. *Petrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 206: 78-88.
- Ayaz, M., Gündoğdu, Ö., Aytac, S., Erdem, B., Çiftçi, H. and Erdogdu, Y. 2022. Microwave-assisted synthesis, characterizations, antimicrobial activities, and DFT studies on some pyridine derived Schiff bases. *J. Mol. Struct.*, 5: 1269: 133791.
- Aytac, S., Gundogdu, O., Bingol, Z. and Gulcin, İ. 2023. Synthesis of schiff bases containing phenol rings and investigation of their antioxidant capacity, anticholinesterase, butyrylcholinesterase, and carbonic anhydrase inhibition properties. *Pharm.*, 15: 3.
- Baber, M. A., Crist, C. M., Devolve, N. L. and Patrone, J. D. 2023. Tyrosinase Inhibitors: A Perspective. *Molecules*, 28: 15.
- Bazine, I., Cheraïet, Z., Bensegueni, R., Bensouici, C., and Boukhari, A. 2020. Synthesis, antioxidant and anticholinesterase activities of novel quinoline-aminophosphonate derivatives. *J. Heterocycl. Chem.*, 57: 2139-2149.

- Becke, A. D. 1993. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, 98: 5648-5652.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.*, 239: 70-76.
- Benzie, I. F. and Szeto, Y. T. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 633-636.
- Bhatia, S. 2018. Introduction to enzymes and their applications. In: *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Enzymes, proteins and bioinformatics*. IOP Publishing, 2: 64.
- Bhattacharya, A. K., Rana, K. C., Pannecouque, C. and De Clercq, E. 2012. An Efficient Synthesis of a Hydroxyethylamine (HEA) Isostere and Its α -Aminophosphonate and Phosphoramidate Derivatives as Potential Anti-HIV Agents. *Chem. Med. Chem.*, 7: 1601-1611.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Briganti, S., Camera, E. and Picardo, M. 2003. Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.*, 16: 101-110.
- Buldurun, K., Turan, N., Mahmoudi, G. and Bursal, E. 2022. Half-sandwich ruthenium(II)(η^6 -p-cymene) complexes: Syntheses, characterization, transfer hydrogenation reactions, antioxidant and enzyme inhibitory activities. *J. Mol. Struct.*, 1262: 133075.
- Camadan, Y., Çiçek, B., Adem, Ş., Çalışır, Ü. and Akkemik, E. 2022. Investigation of *in vitro* and *in silico* effects of some novel carbazole Schiff bases on human carbonic anhydrase isoforms I and II. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 40: 6965-6973.
- Cheung, J., Rudolph, M. J., Burshteyn, F., Cassidy, M. S., Gary, E. N., Love, J., Franklin, M. C. and Height, J. J. 2012. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *J. Med. Chem.*, 55: 10282-10286.
- Ciftci, H., and Bakal, U. 2009. The effect of lipoic acid on macro and trace metal levels in living tissues exposed to oxidative stress. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 9: 560–568.

- Choudhary, V., Bhatt, A., Dash, D. and Sharma, N. 2019. DFT calculations on molecular structures, HOMO-LUMO study, reactivity descriptors and spectral analyses of newly synthesized diorganotin(IV) 2-chloridophenylacetohydroxamate complexes. *J. Comput. Chem.*, 40: 2354-2363.
- Daina, A., Michielin, O. and Zoete, V. 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.*, 7: 42717.
- Daravath, S., Rambabu, A., Ganji, N., Ramesh, G., Anantha Lakshmi, P. V. and Shivaraj. 2022. Spectroscopic, quantum chemical calculations, antioxidant, anticancer, antimicrobial, DNA binding and photo physical properties of bioactive Cu(II) complexes obtained from trifluoromethoxy aniline Schiff bases. *J. Mol. Struct.*, 1249: 131601.
- Decker, E.A. and Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 674-677.
- Dobon, B., Montanucci, L., Peretó, J., Bertranpetit, J. and Laayouni, H. 2019. Gene connectivity and enzyme evolution in the human metabolic network. *Biol. Direct.*, 14: 17.
- Drabowicz, J., Jordan, F., Kudzin, M., Zbigniew, K., Stevens, C. and Urbaniak, P. 2015. Reactivity of Aminophosphonic Acids. Oxidative Dephosphonylation of 1-Aminoalkylphosphonic Acids by Aqueous Halogens. *Dalton Trans.*, 45: 2308-2317.
- Dunning, T. H., Jr. 1989. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *J. Chem. Phys.*, 90: 1007-1023.
- El-Gammal, O. A., Mohamed, F. Sh., Rezk, G. N. and El-Bindary, A. A. 2021. Synthesis, characterization, catalytic, DNA binding and antibacterial activities of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes with new Schiff base ligand. *J. Mol. Liq.*, 326: 115223.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95.

- Fernández-Pérez, H., Etayo, P., Panossian, A. and Vidal-Ferran, A. 2011. Phosphine–Phosphinite and Phosphine–Phosphite Ligands: Preparation and Applications in Asymmetric Catalysis. *Chem. Rev.*, 111: 2119-2176.
- Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P. M., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R. B. and Santos, C. N. 2010. Antioxidant Properties and Neuroprotective Capacity of Strawberry Tree Fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2: 214-229.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R. and Vreven, T. 2009. Uranyl extraction by N, N-dialkylamide ligands studied by static and dynamic DFT simulations. *Gaussian*, 9: 227.
- Geng, Y., Wang, Z., Zhou, J., Zhu, M., Liu, J. and James, T. D. 2023. Recent progress in the development of fluorescent probes for imaging pathological oxidative stress. *Chem. Soc. Rev.*, 52: 3873-3926.
- Guan, L. L., Lim, H. W., and Mohammad, T. F. 2021. Sunscreens and photoaging: a review of current literature. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 22: 819–828.
- Haddadi, I., Hellal, A., Kirouani, I., Layaida, H., and Bensouici, C. 2022. Microwave-assisted synthesis, DFT theoretical study and biological activities evaluation of two phosphonylated m-toluidine derivatives. *J. Mol. Struct.*, 1251: 131948.
- Halliwell, B. 2011. Free radicals and antioxidants – *quo vadis?*. *Trends Pharmacol. Sci.*, 32: 125-130.
- Hamed, A. A., Abdelhamid, I. A., Saad, G. R., Elkady, N. A. and Elsabee, M. Z. 2020. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a novel chitosan Schiff bases based on heterocyclic moieties. *Int. J. Biol. Macromol.*, 153: 492-501.
- Hamid, S. J. and Salih, T. 2022. Design, Synthesis, and Anti-Inflammatory Activity of Some Coumarin Schiff Base Derivatives: *In silico* and *in vitro* Study. *Drug. Des. Devel. Ther.*, 16: 2275-2288.
- Hay, M., Thomas, D. W., Craighead, J. L., Economides, C. and Rosenthal, J. 2014. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat. Biotechnol.*, 32: 40-51.
- Hellal, A., Chafaa, S., Chafai, N. and Touafri, L. 2017. Synthesis, antibacterial screening and DFT studies of series of α -amino-phosphonates derivatives from aminophenols. *J. Mol. Struct.*, 1134: 217-225.

- Huang, J. and Chen, R. 2000. An overview of recent advances on the synthesis and biological activity of α -aminophosphonic acid derivatives. *Heteroat. Chem.*, 11: 480-492.
- Huang, D., Ou, B. And Prior, R. L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1841-1856.
- Iraji, A., Panahi, Z., Edraki, N., Khoshneviszadeh, M. and Khoshneviszadeh, M. 2021. Design, synthesis, *in vitro* and *in silico* studies of novel Schiff base derivatives of 2-hydroxy-4-methoxybenzamide as tyrosinase inhibitors. *Drug Dev. Res.*, 82: 533-542.
- Iraji, M., Salehi, M., Malekshah, R. E., Khaleghian, A. and Shamsi, F. 2022. Liposomal formulation of new arsenic schiff base complex as drug delivery agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia and quantum chemical and docking calculations. *J. Drug Deliv. Technol.*, 75: 103600.
- Jiang, N., Wang, X. B., Li, Z. R., Li, S. Y., Xie, S. S., Huang, M., and Kong, L. Y. 2015. Design of a structural framework with potential use to develop balanced multifunctional agents against Alzheimer's disease. *RSC Adv.*, 5: 14242-14255.
- Kandula, M. K. R., Gundluru, M., Nemallapudi, B. R., Gundala, S., Kotha, P., Zyryanov, G. V., Chadive, S. and Cirandur, S. R. 2021. Synthesis, antioxidant activity, and α -glucosidase enzyme inhibition of α -aminophosphonate derivatives bearing piperazine-1,2,3-triazole moiety. *J. Heterocycl. Chem.*, 58: 172-181.
- Kanteev, M., Goldfeder, M. and Fishman, A. 2015. Structure–function correlations in tyrosinases. *Prot. Sci.*, 24: 1360-1369.
- Khalid, M., Ullah, M. A., Adeel, M., Usman Khan, M., Tahir, M. N. and Braga, A. A. C. 2019. Synthesis, crystal structure analysis, spectral IR, UV–Vis, NMR assessments, electronic and nonlinear optical properties of potent quinoline based derivatives: Interplay of experimental and DFT study. *J. Saudi Chem. Soc.*, 23: 546-560.
- K'tir, H., Amira, A., Benzaid, C., Aouf, Z., Benharoun, S., Chemam, Y., Zerrouki, R. and Aouf, N.-E. 2022. Synthesis, bioinformatics and biological evaluation of novel α -aminophosphonates as antibacterial agents: DFT, molecular docking and ADME/T studies. *J. Mol. Struct.*, 1250: 131635.

- Kumar, S. N., Nambisan, B., Sundaresan, A., Mohandas, C. and Anto, R. J. 2014. Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *Ann. Microbiol.*, 64: 209-218.
- Kumar, J., Jyoti Sarma, M., Phukan, P. and Kumar Das, D. 2015. A new simple Schiff base fluorescence “on” sensor for Al^{3+} and its living cell imaging. *Dalton Trans.*, 44: 4576-4581.
- Lee, C., Yang, W. and Parr, R. G. 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical review. B*, 37: 785-789.
- Lengauer, T. and Rarey, M. 1996. Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 6: 402-406.
- Li, Y.-Y., Yang, Y.-X., Hong, S.-S., Liu, Y., Yang, Z., Zhao, B.-Y., Su, J.-P. and Wang, L. 2021. An electrochemical sensor based on redox-active schiff base polymers for simultaneous sensing of glucose and ph. *Chinese J. Anal. Chem.*, 49: e21118-e21125.
- Litim, B., Cheraïet, Z., Meliani, S., Djahoudi, A. and Boukhari, A. 2022. Synthesis and potent antimicrobial activity of novel coumarylthiazole α -aminophosphonates derivatives. *Mol. Divers.*, 26: 1161-1174.
- Liu, X., Manzur, C., Novoa, N., Celedón, S., Carrillo, D. and Hamon, J. R. 2018. Multidentate unsymmetrically-substituted Schiff bases and their metal complexes: Synthesis, functional materials properties, and applications to catalysis. *Coord. Chem. Rev.*, 357: 144-172.
- Lockridge, O. 2015. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol. Ther.*, 148: 34-46.
- Lolak, N., Boga, M., Sonmez, G.D., Tuneg, M., Doğan, A., and Akocak, S. 2022. *In silico* studies and dna cleavage, antioxidant, acetylcholinesterase, and butyrylcholinesterase activity evaluation of bis-histamine schiff bases and bis-spinaceamine substituted derivatives. *Pharm. Chem. J.*, 55: 1338–1344.
- Lu, T. and Chen, F. 2012. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comput. Chem.*, 33: 580-592.

- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 8: 39–45.
- Mane, V. A., Palande, S. V. and Swamy, D. K. 2021. *In Vitro* Antimicrobial activity and plant growth activity study of schiff base ligand (E)-2,4-Diromo-6-[[2-(2-Methoxyphenoxy) Ethyl] Iminomethyl] phenol and their complexes with transition metals, *J. Adv. Sci. Res.*, 12: 271-282.
- Marchán-García, J., Buxaderas, E., Stratico, D. N., Richmond, V., Cavallaro, V., Murray, A. P., Radivoy, G. and Moglie, Y. 2024. Green approach to the synthesis of α -aminophosphonate-tetrahydroisoquinoline hybrids and their anti-cholinesterase activity. *Bioorg. Chem.*, 143: 107008.
- Moharram, H. A., Youssef, M. M. 2014. Methods for determining the antioxidant activity: A review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11: 31-42.
- Momani, W. M. A., Taha, Z. A., Ajlouni, A. M., Shaqra, Q. M. A. and Zouby, M. A. 2013. A study of *in vitro* antibacterial activity of lanthanides complexes with a tetradentate Schiff base ligand. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 3: 367-370.
- Moonen, K., Laureyn, I. and Stevens, C. V. 2004. Synthetic methods for azaheterocyclic phosphonates and their biological activity. *Chem. Rev.*, 104: 6177-6215.
- Moț, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R. and Sârbu, C. 2011. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV–vis spectroscopic data. *J. Food Compos. Anal.*, 24: 516-522.
- Nachon, F., Carletti, E., Ronco, C., Trovaslet, M., Nicolet, Y., Jean, L. and Renard, P.-Y. 2013. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochem. J.*, 453: 393-399.
- Nasli-Esfahani, E., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Rezaei, S., Sarrafi, Y., Sharafi, Z., Samadi, N., Faramarzi, M. A., Bandarian, F., Hamedifar, H., Larijani, B., Hajimiri, M. and Mahdavi, M. 2019. A new series of Schiff base derivatives

- bearing 1,2,3-triazole: Design, synthesis, molecular docking, and α -glucosidase inhibition. *Arch. Pharm.*, 352: 1900034.
- Naydenova, E. D., Todorov, P. T., Mateeva, P. I., Zamfirova, R. N., Pavlov, N. D. and Todorov, S. B. 2010. Synthesis and biological activity of novel small peptides with aminophosphonates moiety as NOP receptor ligands. *Amino Acids*, 39: 1537-1543.
- Opitz, S. E. W., Smrke, S., Goodman, B. A. and Yeretizian, C. 2014. Processing and Impact on Antioxidants in Beverages, In: *Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee: A Validated Platform Composed of Three Complementary Antioxidant Assays*. Preedy, V. (eds), Academic Press, pp. 253-264, San Diego.
- Pham, T. N., Cazier, E. A., Gormally, E. and Lawrence, P. 2024. Valorization of biomass polyphenols as potential tyrosinase inhibitors. *Drug Discov. Today*, 29: 103843.
- Pistrosch, F., Schaper, F., Passauer, J., Koehler, C., Bornstein, S. R. and Hanefeld, M. 2009. Effects of the Alpha Glucosidase Inhibitor Acarbose on Endothelial Function after a Mixed Meal in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Horm. Metab. Res.*, 41: 104-108.
- Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3396-3402.
- Rudrapal, M., Rakshit, G., Singh, R. P., Garse, S., Khan, J., Chakraborty, S. 2024. Dietary polyphenols: review on chemistry/sources, bioavailability/metabolism, antioxidant effects, and their role in disease management. *Antioxidants*. 13: 429.
- Qi, L., Li, M.-C., Bai, J.-C., Ren, Y.-H. and Ma, H.-X. 2021. *In vitro* antifungal activities, molecular docking, and DFT studies of 4-amine-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 40: 127902.
- Reddy, N. B., Sundar, C. S., Krishna, B. S., Santhisudha, S., Sreelakshmi, P., Nayak, S. K. and Suresh Reddy, C. 2017. Cellulose-SO₃H catalyzed synthesis of bis(α -aminophosphonates) and their antioxidant activity. *Org. Commun.*, 10: 46-55.
- Refat, M. S., Saad, H. A., Gobouri, A. A., Alsawat, M., Adam, A. M. A. and El-Megharbel, S. M. 2022. Charge transfer complexation between some transition

- metal ions with azo Schiff base donor as a smart precursor for synthesis of nano oxides: An adsorption efficiency for treatment of Congo red dye in wastewater. *J. Mol. Liq.*, 345: 117140.
- Ren, Z. L., Zhang, J., Li, H. D., Chu, M. J., Zhang, L. S., Yao, X. K., Xia, Y., Lv, X. H., & Cao, H. Q. (2016). Design, synthesis and biological evaluation of α -aminophosphonate derivatives containing a pyrazole moiety. *Chem. Pharm. Bull.*, 64: 1755–1762.
- Roger Bullock & Roger Lane. 2007. Executive Dyscontrol in Dementia, with Emphasis on Subcortical Pathology and the Role of Butyrylcholinesterase. *Curr. Alzheimer Res.*, 4: 277-293.
- Rubio, C. P., Hernández-Ruiz, J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A. and Ceron, J. J. 2016. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC Vet. Res.*, 12: 166.
- Salihović, M., Pazalja, M., Špirtović Halilović, S., Veljović, E., Mahmutović-Dizdarević, I., Roca, S., Novaković, I. and Trifunović, S. 2021. Synthesis, characterization, antimicrobial activity and DFT study of some novel Schiff bases. *J. of Mol. Struct.*, 1241: 130670.
- Salimath, S. V., Pathak, M. 2024. Copper(II) complexes incorporated with 2,2-bipyridyl and 2,2'-(((1E,1'E)-1,4-phenylenebis(methanylylidene))bis(azanylylidene)) diphenol derivatives: *In-vitro* interaction with DNA/BSA, DFT, molecular docking and cytotoxicity. *Inorg. Chem. Commun.*, 162: 112226.
- Salim Meeran, I., William Raja, T., Azger Dusthakeer, V. N., Naseer Ali, M. M., Syed Tajudeen, S. and Shabeer, T. K. 2022. An insight into antimycobacterial and antioxidant potentials of INH-Schiff base complexes and *in silico* targeting of MtKasB receptor of M. tuberculosis. *New J. Chem.*, 46: 4620-4633.
- Santos, J. S., Alvarenga Brizola, V. R. and Granato, D. 2017. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. *Food Chem.*, 214: 515-522.
- Sarikurkcü, C., Kirkan, B., Ozer, M. S., Ceylan, O., Atilgan, N., Cengiz, M. and Tepe, B. 2018. Chemical characterization and biological activity of *Onosma gigantea* extracts. *Ind. Crops. Prod.*, 115: 323-329.

- Scarpa, E. S., Antonelli, A., Balercia, G., Sabatelli, S., Maggi, F., Caprioli, G., Giacchetti, G., Micucci, M. 2024. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, and pro-osteogenic activities of polyphenols for the treatment of two different chronic diseases: type 2 diabetes mellitus and osteoporosis. *Biomolecules*. 14: 836.
- Smyrska-Wieleba, N. and Mroczek, T. 2023. Natural Inhibitors of Cholinesterases: Chemistry, Structure–Activity and Methods of Their Analysis. *Int. J. Mol. Sci.*, 24: 2722.
- Sobati, M., Abdoli, M., Bonardi, A., Gratteri, P., Supuran, C. T. and Žalubovskis, R. 2023. Inhibition Profiles of Some Novel Sulfonamide-Incorporated α -Aminophosphonates on Human Carbonic Anhydrases. *ACS Med. Chem. Lett.*, 14: 1067-1072.
- Subramanyam, CH., Kiran Kumar, K., Venkata Ramana, K., Gladis Raja Malar, C., Mohan, S. and Nagalakshmi, V. 2023. Ultrasound mediated nano ZnO catalyzed synthesis of new α -aminophosphonates as potential anti-diabetic agents, an *in silico* ADMET, molecular docking study, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity. *Synth. Commun.*, 53: 2041-2060.
- Supuran, C. T. 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7: 168-181.
- Supuran, C.T. 2018. Carbonic anhydrases and metabolism. *Metabolites*, 8: 25.
- Taha, M., Gilani, S. J., Kazmi, I., Rahim, F., Adalat, B., Ullah, H., Nawaz, F., Wadood, A., Ali, Z., Shah, S. A. A. and Khan, K. M. 2024. Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of indazole based schiff base analogues as new anti-diabetic inhibitors. *J. Mol. Struct.*, 1300: 137189.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W. P., & Sulaiman Rahman, H. 2018. Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Front. Pharmacol.*, 9: 1162.
- Tang, W. and Zhang, X. 2003. New Chiral Phosphorus Ligands for Enantioselective Hydrogenation. *Chem. Rev.*, 103: 3029-3070.
- Thomsen, R. and Christensen, M. H. 2006. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49: 3315-3321.

- Ullah, H., Uddin, I., Khan, F., Hussain, R. and Khan, S. 2023. Synthesis, *in vitro* α -glucosidase, urease activities and molecular docking study of benzoxazole bearing Schiff base derivatives. *Chem. Data Coll.*, 46: 101054.
- Uparkar, J.J., Dhavan, P.P., Jadhav, B.L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of furan based α -aminophosphonate derivatives as anti-Alzheimer agent. *J. Iran Chem. Soc.*, 19:3103–3116.
- Upendranath, K., Venkatesh, T., Arthoba Nayaka, Y., Shashank, M. and Nagaraju, G. 2022. Optoelectronic, DFT and current-voltage performance of new Schiff base 6-nitro-benzimidazole derivatives. *Inorg. Chem. Commun.*, 139: 109354.
- Verpoorte, J. A., Mehta, S. and Edsall, J. T. 1967. Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242: 4221-4229.
- Voet, D. and Voet, J. G. 2011. *Biochemistry*, 4th Edition. Wiley & Sons, 1515 page, New Jersey.
- Wang, S., Xie, J., Pei, J. and Lai, L. 2023. CavityPlus 2022 Update: An Integrated Platform for Comprehensive Protein Cavity Detection and Property Analyses with User-friendly Tools and Cavity Databases. *J. Mol. Biol.*, 435: 168141.
- Yernale, N. G. and Bennikallu Hire Mathada, M. 2014. Synthesis, characterization, antimicrobial, DNA cleavage, and *in vitro* cytotoxic studies of some metal complexes of schiff base ligand derived from thiazole and quinoline moiety. *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2014: 314963.
- Yi, X., Zhu, Q. X., Wu, X. L., Tan, T. T., and Jiang, X. J. 2022. Histone methylation and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2022: 6023710.
- Zareei, S., Ranjbar, S., Mohammadi, M., Ghasemi, Y., Golestanian, S., Avizheh, L., Moazzam, A., Larijani, B., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Tarahomi, M. M., Mahdavi, M., Sadeghian, N. and Taslimi, P. 2023. Discovery of novel 4,5-diphenyl-imidazol- α -aminophosphonate hybrids as promising anti-diabetic agents: Design, synthesis, *in vitro*, and *in silico* enzymatic studies. *Bioorg. Chem.*, 141: 106846.
- Zhang, M., Zhang, R., Zhao, X., Ma, Z., Xin, J., Xu, Z. and Guo, D. 2024. The role of oxidative stress in the pathogenesis of ocular diseases: an overview. *Mol. Biol. Rep.*, 51: 454.

- Zhao, D. and Wang, R. 2012. Recent developments in metal catalyzed asymmetric addition of phosphorus nucleophiles. *Chem. Soc. Rev.*, 41: 2095-2108.
- Zhao, Z.-G., Kodaira, T., Nagai, N., Hakuta, Y., K. Bando, K., Takashima, H. and Mizukami, F. 2012. Self-standing microporous films of arrayed alumina nanofibers including Schiff base molecules: effect of the environment around the molecules on their photo-luminescence. *J. Mater. Chem.*, 22: 9738-9744.



Akademik Aktiviteler

- **Makaleler:**

Tüfekçi, A. R., Karakoç, Ö. C., Derelli Tüfekçi, E., Kürşat, M., Portakal, P., Göçeri, A., Akşit, H., Ekinci, E., and Kazan, B. 2024. Chemical profile and insecticidal activity and enzyme activity potential of essential oil obtained from stem-leaf parts of endemic *Centaurea paphlagonica*. J. Essent. Oil-Bear. Plants.

Ermiş, B., Ekinci, E., and Bozkaya, U. 2021. State-of-the-art computations of vertical electron affinities with the extended koopmans' theorem integrated with the CCSD(T) method. J. Chem. Theory Comput., 17: 7648–7656.

- **Bildiriler:**

Atalay, A., Ekinci, E., and Çiftçi, H. 2023. Computational Investigation On The Complexes Between Aza-Cryptands And Transition Metals. In: 2nd International Karatekin Science and Technology Conference. Akın, M. B. And Yalçın, Z. (eds), Fulltext Proceeding Book., pp. 271-274, Çankırı.

Tüfekçi, A. R., Hameed, Z. A., Ekinci, E., and Adem, Ş. 2023. Molecular docking studies of Quercimetrin (Quercetin 7-O-D-glucoside) from *Centaurea paphlagonica* (Bornm.) Wagenitz. In: 6th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences. Doğan, M. (eds), Proceeding Book, pp. 1448-1461, Ankara.

- **Kitap Bölümü:**

Atalay, A., Ekinci, E., and Çiftçi, H. 2023. Computational investigation for lone-pair interactions with transition metals: the complexes formed by Cr⁺, Mn⁺, Fe⁺, Co⁺, Ni⁺ Cu⁺ and Zn⁺ binding with Aza-Cryptands. In: Chapter III. Tüzün, B. (eds), Innovations in Nanomaterial Synthesis and Applications: from Heavy Metal Removal to Solid Oxide Fuel Cells and Beyond, pp. 37-47, Ankara.

- **Projeler:**

Density-Fitted Coupled-Cluster Methods with Local Correlation Methods and Energy Based Fragmentation Approaches: Coupled-Cluster Theory Meets Macromolecules. TÜBİTAK (2247-B). 2020-2022. (Proje No: 119C023)

α -Aminofosfonat Bileşiklerinin ve Schiff Bazlarının Bazı Biyoaktif Özelliklerinin Araştırılması. Araştırmacı. Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi. 2023-2024. (Proje No: FF081123D05).