



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**1,2,3-TRIAZOL BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU, ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİ VE BAZI METABOLİK
ENZİMLERE KARŞI *IN VITRO* İNHİBİSYON
ETKİLERİ**

Serap KIZILKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Eylül-2022
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**1,2,3-TRIAZOL BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU, ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİ VE BAZI METABOLİK
ENZİMLERE KARŞI *IN VITRO* İNHİBİSYON
ETKİLERİ**

Serap KIZILKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ercan BURSAL

Eylül-2022
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL ve ONAYI

Serap KIZILKAYA tarafından hazırlanan “**1,2,3-triazol bileşiklerinin sentezi, karakterizasyonu, antioksidan aktiviteleri ve bazı metabolik enzimlere karşı *in vitro* inhibisyon etkileri**” adlı tez çalışması 19/08/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Doç. Dr. Kenan BULDURUN
Muş Alparslan Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu,
Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı

.....

Danışman

Prof. Dr. Ercan BURSAL
Muş Alparslan Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Zahrittin
KAZANCIOĞLU
Kilis 7 Aralık Üniversitesi,
Yusuf Şerefoğlu Sağlık Bilimleri Fakültesi,
Hemşirelik

.....

Yukarıdaki sonuç;
Enstitü Yönetim Kurulu/...../..... Tarih ve/..... nolu kararı
ile onaylanmıştır.

.....

FBE Müdürü

Bu tez çalışması MAUN BAP tarafından BAP-20-SYO-4902-02 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Serap KIZILKAYA
19/08/2022

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

1,2,3-TRIAZOL BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU, ANTIOKSIDAN AKTİVİTELERİ VE BAZI METABOLİK ENZİMLERE KARŞI *IN VITRO* İNHİBİSYON ETKİLERİ

Serap KIZILKAYA

Muş Alparslan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ercan BURSAL

Sentetik organik kimyada yeni ilaç keşfi ve geliştirilmesindeki öneminden dolayı heterosiklik motiflerin sentezlenmesi ve türevlendirilmesi konusu bu bileşiklere olan ilgiyi her geçen gün artırmaktadır. 1,2,3-Triazol ve ftalimit halkalarının biyolojik önemi nedeniyle, araştırma ilginiz daha etkili yeni bir motif oluşturmak için her iki parçayı nasıl birleştireceğimiz olmuştur. Her iki birim de çok geniş biyolojik aktivite aralıklarına sahip olduğundan ve ilaçlardan biyokonjugasyon ile çok çeşitli biyolojik aktivite gösteren bileşikler hazırlamada ki yararları nedeniyle bu tez çalışmasında yeni hibrit 1,2,3-triazol ve ftalimit halkası içeren türevlerin sentezi hedeflenmiştir. Bu amaçla, çalışmanın ilk basamağında; öncelikle ftalimit (**1**) başlangıç bileşiğinden, anahtar bileşik **A3** literatürde bilinen bir yöntemle sentezlendi. **A3** bileşiğinin Cu^{+2} katalizöründe çeşitli azit türevleri (**A4**, **A5**, **A6**) ile 1,3-dipolar siklokatalizma tepkimesi gerçekleştirilerek literatürde olmayan hedef ürünler **T7**, **T8**, **T9** bileşikleri sentezlendi. Sentezlenen bu hedef ürünlerin (**T7**, **T8**, **T9**) yapıları $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRMS, FT-IR ve EN tayinleri ile karakterize edildi. Çalışmanın ikinci basamağında ise, sentezlenen yeni triazol bileşiklerinin (**T7**, **T8**, **T9**) tirozinaz, asetilkolinesteraz ve pankreatik lipaz enzimlerine karşı *in vitro* inhibisyon çalışmaları yapılarak bunlara ait IC_{50} değerleri ve potansiyel inhibitör etkileri belirlendi. Ayrıca, sentezlenen triazol bileşiklerinin (**T7**, **T8**, **T9**) antioksidan aktivitelerini belirlemek için ise ABTS⁺ katyon radikali giderme aktivitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, FRAP ve CUPRAC metotlarıyla indirgeme kapasitesi analiz metotları çalışıldı.

2022, 90 Sayfa

Anahtar Kelimeler: 1,2,3-Triazol, Antioksidan Aktivite, Asetilkolinesteraz, Enzim Aktivitesi, Ftalimit, Pankreatik Lipaz, Tirozinaz

ABSTRACT

MS THESIS

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, ANTIOXIDANT ACTIVITIES, AND *IN VITRO* INHIBITION EFFECTS OF 1,2,3-TRIAZOLE COMPOUNDS AGAINST SOME METABOLIC ENZYMES

Serap KIZILKAYA

Muş Alparslan University
Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Ercan BURSAL

Due to their importance in the discovery and development of new drugs in synthetic chemistry, the subject of synthesis and derivatization of heterocyclic motifs gains increasing interest day by day. Because of the biological importance of 1,2,3-triazole and phthalimide rings, our research interest has been how to combine both fragments to create a more effective new motif. Since both units have very wide biological activity ranges and their usefulness in preparing compounds with a wide variety of biological activity from drugs by bioconjugation, the synthesis of new hybrid 1,2,3 triazole and derivatives containing phthalimide ring was targeted in this thesis study. For this purpose, in the first step of the study, the key compound **A3** were synthesized by a method known in the literature from the starting compound phthalimide (**1**). By performing the 1,3-dipolar cycloaddition reaction of the **A3** compound with various azide derivatives (**A4**, **A5**, **A6**) under Cu⁺² catalysis, the target products **T7**, **T8**, **T9** compounds, which have not yet been reported in the literature, were synthesized. The structures of the target products (**T7**, **T8**, **T9**) were characterized by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HRMS, FT-IR and MP determinations. In the second step of the study, *in vitro* inhibition studies of the newly synthesized triazole compounds against tyrosinase, acetylcholinesterase and pancreatic lipase enzymes were performed by measuring their IC₅₀ values and potential inhibitory effects. Also, ABTS⁺ cation radical scavenging activity, DPPH free radical scavenging activity, reducing capacity according to FRAP and CUPRAC methods were studied to determine the antioxidant activities of the synthesized compounds (**T7**, **T8**, **T9**).

2022, 90 Pages

Keywords: 1,2,3-Triazole, Acetylcholinesterase, Antioxidant Activity, Enzyme Activity, Pancreatic Lipase, Phthalimide, Tyrosinase

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışma Muş Alparslan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP, Proje No: BAP-20-SYO-4902-02) tarafından desteklenmiş olup Sayın Prof. Dr. Ercan BURSAL danışmanlığında Muş Alparslan Üniversitesi TAPKOB Kimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince bilgi birikimiyle desteklerini ve tecrübelerini eksik etmeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ercan BURSAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Serap KIZILKAYA
MUŞ-2022



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. 1,2,3-Triazol Bileşiklerinin Genel Özellikleri.....	2
1.2. 1,2,3-Triazollerin Genel Sentez Yöntemleri	4
1.2.1. Huisgen 1,3-dipolar siklokatalıma reaksiyonu.....	4
1.2.2. Metal (Cu, Ru) katalizli 1,3-dipolar siklokatalıma reaksiyonu.....	5
1.2.3. Gerilim destekli azid alkin siklokatalıma reaksiyonu.....	6
1.2.4. 1,2,3-triazollerin metal içermeyen sentezi	6
1.3. Antioksidanlar	7
1.3.1. Enzimatik antioksidanlar.....	8
1.3.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar	9
1.4. Enzimler	11
1.4.1. Enzimlerin tarihçesi	12
1.4.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması	13
1.4.3. Enzim inhibisyonu	14
1.4.3.1. Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)	14
1.4.3.2. Yarışmasız inhibisyon tip I (nonkompetitif)	15
1.4.3.3. Yarışmasız inhibisyon tip II (unkompetitif).....	15
1.4.3.4. Geri dönüşümsüz inhibisyon	16
1.4.4. Tirozinaz enzimi	16
1.4.5. Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi	18
1.4.6. Pankreatik lipaz enzimi	21
1.4.6.1. Pankreatik lipaz inhibitörleri	22
1.5. Çalışmanın Amacı	23
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	25
2.1. Triazol Türevlerinin Biyolojik Aktivitelerine Dair Çalışmalar	25
2.1.1. Antifungal aktivite	25
2.1.2. Anti-inflamatuar aktivite	26
2.1.3. Antitüberküloz aktivite	27
2.1.4. Antikanser aktivite	28
2.1.5. Antiviral aktivite	32
2.1.6. Antimalaryal aktivite	34
2.1.7. Antimikrobiyal aktivite	34

2.2. 1,2,3-Triazolollerin Tirozinaz, Pankreatik Lipaz ve Asetilkolinesteraz Enzimlerine Karşı Etkileri	37
--	----

3. MATERYAL ve YÖNTEM.....41

3.1. Materyal	41
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	41
3.1.2. Kullanılan cihazlar	42
3.2. Çözeltilerin Hazırlanması.....	42
3.2.1. Tirozinaz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	42
3.2.2. Asetilkolinesteraz enzimi aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	42
3.2.3. Pankreatik lipaz enzimi aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	43
3.2.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltilerin hazırlanması.....	43
3.2.5. ABTS ⁺ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltilerin hazırlanması.....	43
3.2.6. Kuprak (CUPRAC) yöntemi indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler	43
3.2.7. Fe ³⁺ -Fe ²⁺ indirgeme (FRAP) kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler	44
3.3. Yöntem.....	44
3.3.1. Bileşiklerin sentez yöntemleri	44
3.3.1.1. 2-(pent-4-in-1-il)izoindolin-1,3-dion bileşiğinin (A3) sentezi	44
3.3.1.2. 1,2,3-Triazol türevlerinin sentezi	44
3.3.2. Enzim aktivite yöntemleri	45
3.3.2.1. Tirozinaz enzimi aktivite yöntemi	45
3.3.2.2. Asetilkolinesteraz enzimi aktivite yöntemi	45
3.3.2.3. Pankreatik lipaz enzimi aktivite yöntemi	46
3.3.3. Antioksidan tayinleri.....	46
3.3.3.1. DPPH serbest radikal giderme aktivite tayini	46
3.3.3.2. ABTS ⁺ katyon radikali giderme aktivitesi tayini.....	46
3.3.3.3. Fe ³⁺ -Fe ²⁺ indirgeme (FRAP) yöntemine göre indirgeme kapasitesi tayini	47
3.3.3.4. Kuprak (CUPRAC) metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini.....	47

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA.....48

4.1. Bileşiklerin Sentezi.....	48
4.1.1. 2-(pent-4-in-1-il)izoindolin-1,3-dion (A3) bileşiğinin sentezi	48
4.1.2. 2-(3-(1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)propil)izoindolin-1,3-dion (T7) bileşiğinin sentezi	48
4.1.3. 2-(3-(1-(2-metilbenzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)propil)izoindolin-1,3-dion (T8) bileşiğinin sentezi	49
4.1.4. 4-((4-(3-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)metil)benzonitril (T9) bileşiğinin sentezi.....	50
4.2. Sentezlenen Yeni 1,2,3-Triazol Türevlerinin Enzim Aktivite Tayinleri	51
4.2.1. Tirozinaz enziminin aktivite ölçümleri	51
4.2.2. Asetilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümleri.....	53
4.2.3. Pankreatik lipaz enziminin aktivite ölçümleri.....	55
4.3. 1,2,3-Triazol türevlerinin antioksidan aktivite tayinleri	56
4.3.1. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi.....	56
4.3.2. ABTS katyon radikali giderme aktivitesi tayini	58
4.3.3. FRAP yöntemine göre indirgeme kapasite tayini	59

4.3.4. Kuprak (CUPRAC) metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini	61
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	68
EKLER	Error! Bookmark not defined.
EK 1. ¹H-NMR e ¹³C-NMR Spektrumları	Error! Bookmark not defined.
EK 2. FT-IR Spektrumları.....	Error! Bookmark not defined.
EK 3. HR-ESI-MS Spektrumları.....	Error! Bookmark not defined.



SİMGELER ve KISALTMALAR

1,3-DPCA	:	1,3-Dipolar Siklokatılma
ABTS	:	2,2'-Azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit
BHT	:	Bütil Hidroksi Toluen
CAT	:	Katalaz
Cu-AAC	:	Bakır Katalizli-Azit-Alkin Siklokatılma
d	:	Dublet
DCM	:	Diklorometan
DMF	:	Dimetilformamid
DPPH	:	2,2-Difenil-1-pikril-hidrazil
E.N.	:	Erime Noktası
FDA	:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GSH-Px	:	Gulutasyon Peroksidaz
HRMS	:	Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektroskopisi
IR	:	İnfrared
m	:	Multiplet
NMR	:	Nükleer Manyetik Rezonans
o.s.	:	Oda Sıcaklığı
PUFA	:	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
Q	:	Kuartet
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
RuAAC	:	Rutenyum Katalizli-Azit-Alkin Siklokatılması
s	:	Singlet
SOD	:	Süperoksit dismutaz
SPAAC	:	Gerilim Destekli Azid Alkin Siklokatılma Reaksiyonu
TBHQ	:	<i>Tert</i> -Bütilhidrokinon
TBMP	:	<i>2-Tert</i> -Bütil-4-Metilfenol
TLC	:	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	:	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Triazolün izomerleri ve tautomerleri	1
Şekil 1.2. Biyolojik olarak aktif triazol bileşik örnekleri	2
Şekil 1.3. Bazı önemli 1,2,3-triazol türevleri.....	3
Şekil 1.4. 1,2,3-Triazolollerin genel sentez yöntemleri.....	4
Şekil 1.5. RuAAC ile 1,5-disübstitüe 1,2,3-triazolollerin sentezi	5
Şekil 1.6. 1,2,3-Triazol sentezinin regioselektivitesi	6
Şekil 1.7. Gerilim destekli azid alkin sikloklatılma reaksiyonu.....	6
Şekil 1.8. 1,2,3-triazolollerin L-prolin katalizli [3+2]-sikloklatılma reaksiyonu	7
Şekil 1.9. Bazı enzimatik olmayan antioksidanlar	11
Şekil 1.10. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif) gösterimi	15
Şekil 1.11. Yarışmasız inhibisyon Tip I (Nonkompetitif) gösterimi	15
Şekil 1.12. Yarışmasız inhibisyon Tip II (Unkompetitif) gösterimi.....	16
Şekil 1.13. İnsan tirozinaz enziminin (monomer) kristalografik yapısı (5M8L) PDB DOI: 10.2210/pdb5M8L/pdb.....	18
Şekil 1.14. Tirozinaz enziminin mekanizması.....	18
Şekil 1.15. Asetilkolinin AChE ile hidroliz reaksiyonu	19
Şekil 1.16. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan bazı kolinesteraz inhibitörleri.....	20
Şekil 1.17. Asetilkolinesteraz enziminin (monomer) kristalografik yapısı.....	20
Şekil 1.18. Orlistatin açık yapısı.....	22
Şekil 1.19. İnsan Pankreatik lipaz protein 1 ve 2'nin yapısı (pdb id: 2PPL ve 2PVS)	23
Şekil 1.20. Yeni 1,2,3-triazol bileşiklerinin sentez basamakları	24
Şekil 2.1. Antimikrobiyal ve antifungal bileşiklerin yapıları.....	25
Şekil 2.2. 3 Bileşiğinin yapısı.....	26
Şekil 2.3. 4 Bileşiğinin yapısı.....	26
Şekil 2.4. 5 ve 6 Bileşiklerinin yapıları.....	27
Şekil 2.5. <i>M. tuberculosis</i> 'e karşı aktivite gösteren 1,2,3-triazol (7) bileşiği.....	27
Şekil 2.6. 8 Bileşiğinin yapısı.....	28
Şekil 2.7. 9 ve 10 Bileşiklerinin yapısı.....	28
Şekil 2.8. 11 Bileşiğinin yapısı.....	28
Şekil 2.9. 12 Bileşiğinin yapısı.....	29
Şekil 2.10. 13 Bileşiğinin yapısı	29
Şekil 2.11. 14 Bileşiğinin yapısı	30
Şekil 2.12. 15 Bileşiğinin yapısı	30
Şekil 2.13. 16 Bileşiğinin yapısı	30
Şekil 2.14. 17 Bileşiğinin yapısı	31
Şekil 2.15. 18 ve 19 Bileşiklerinin yapısı.....	31
Şekil 2.16. 20 Serisinin yapıları.....	32

Şekil 2.17. 21 ve 22 Bileşiklerinin yapıları	32
Şekil 2.18. 23 Bileşiğinin yapısı	33
Şekil 2.19. 24 Bileşiğinin yapısı	33
Şekil 2.20. 25 Serisinin yapısı	33
Şekil 2.21. 26 Bileşiğinin yapısı	34
Şekil 2.22. 27 Bileşiğinin yapısı	34
Şekil 2.23. 28 ve 29 Bileşiklerinin yapısı	35
Şekil 2.24. 30 Bileşiğinin yapısı	35
Şekil 2.25. 31 Bileşiğinin yapısı	36
Şekil 2.26. 32 Bileşiğinin yapısı	36
Şekil 2.27. 33 Bileşiğinin yapısı	36
Şekil 2.28. 34 ve 35 Bileşiklerinin yapıları	37
Şekil 2.29. Pankreatik lipaz inhibitörü olan 1,2,3-triazoller	39
Şekil 3.1. A3 Bileşiğinin sentezi.....	44
Şekil 3.2. 1,2,3-Triazol türevlerinin sentezi	45
Şekil 4.1. Tirozinaz enzimi aktivitesinin T7, T8, T9 bileşikleri ile inhibisyonu	52
Şekil 4.2. Asetilkolinesteraz enziminin T7, T8, T9 bileşikleri ile inhibisyonu	54
Şekil 4.3. Pankreatik lipaz enzimi aktivitesinin T7, T8, T9 bileşikleri ile inhibisyonu	56
Şekil 4.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi grafiği.....	57
Şekil 4.5. ABTS katyon radikali giderme aktivitesi grafiği.....	59
Şekil 4.6. FRAP yöntemine göre indirgeme aktivitesi grafiği	60
Şekil 4.7. Kuprak (CUPRAC) metoduna göre indirgeme aktivitesi grafiği.....	61
Şekil 5.1. T7, T8, T9 Bileşiklerinin sentez basamakları	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

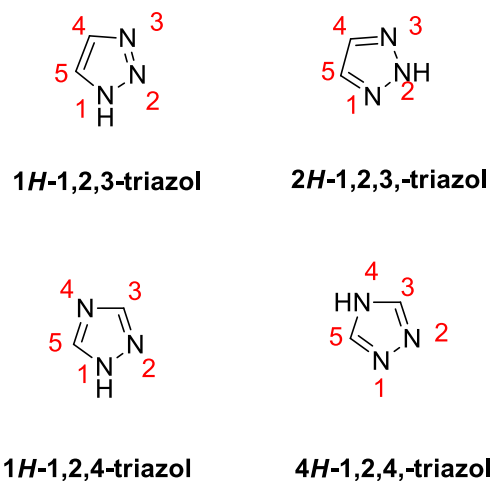
Çizelge 4.1. Tirozinaz enzim aktivite ölçümlerinde kullanılan reaktif ve miktarları	52
Çizelge 4.2. Tirozinaz Enzim inhibisyonunun IC ₅₀ değerleri	52
Çizelge 4.3. Asetilkolinesteraz enzim aktivite ölçümlerinde kullanılan reaktif ve miktarları	54
Çizelge 4.4. Asetilkolinesteraz Enzim inhibisyonunun IC ₅₀ değerleri	54
Çizelge 4.5. Pankreatik Lipaz enzim aktivite ölçümünde kullanılan reaktif ve miktarları	55
Çizelge 4.6. Pankreatik Lipaz Enzim inhibisyonunun IC ₅₀ değerleri	55
Çizelge 4.7. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi absorban değerleri	57
Çizelge 4.8. ABTS katyon radikali giderme aktivitesi tayini absorban değerleri	58
Çizelge 4.9. FRAP yöntemine göre indirgeme kapasite tayini absorban değerleri	60
Çizelge 4.10. Kuprak (CUPRAC) metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini absorban değerleri	61



1. GİRİŞ

Azot içeren heterosiklik bileşikler amino asitler, nükleotitler, biyojen aminler vb. gibi temel yapı taşlarının bir parçası oldukları için yaşam için vazgeçilmez öneme sahiptirler. Azot içeren heterosiklik bileşikler arasında ayrıcalıklı yapı motifleri olan triazoller kimya ve tıbbi kimya gibi alanlarda çok farklı amaçlar için kullanılabilirler. Bu beş üyeli heterohalkalı yapıyı ihtiva eden bileşiklerin sentezine yönelik çalışmalar her geçen gün daha da ilgi çekmektedir. Küçük ve basit triazol çekirdeği, antimikrobiyal, antitümör, antitüberküloz, antikonvülsan, antidepresan, antimalaryal ve antiinflamatuvar aktivitelere sahip birçok bileşikte bulunur. Triazoller çok çeşitli biyolojik aktiviteler sergiler ve trazodon (antidepresan ilaç), rizatriptan (antimigren ilaç), hekzakonazol (antifungal ilaç) ve alprazolam (hipnotik, yatıştırıcı ve sakinleştirici ilaç) gibi birçok güçlü, biyolojik olarak aktif bileşiğin yapısında yer alır. Günümüze kadar, triazol halkasının modifikasyonları geliştirilmiş, güçlü ve daha az toksisite ile oldukça etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Triazoller, iki karbon atomu ve üç azot atomu içeren aromatik beş üyeli heterosiklik bileşiklerdir. Triazol, $C_2H_3N_3$ moleküler formülüne sahiptir ve üç azot atomunun nispi pozisyonlarında farklılık gösteren iki izomeri vardır. Bunların her birinde, azota bağlı bir hidrojenin olduğu iki tautomeri de vardır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Triazolün izomerleri ve tautomerleri

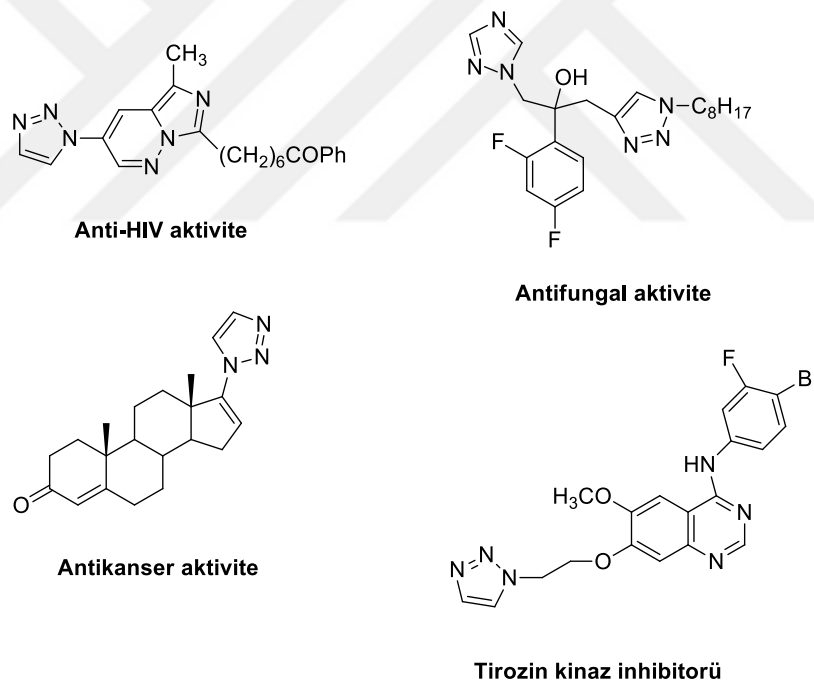
İki izomerden biri 1,2,3-triazol; renksiz, tatlımsı, higroskopik kristaller, erime noktası 24 °C, kaynama noktası 209 °C suda çözünen formlar oluştururken diğeri 1,2,4-

triazoller ise erime noktası 121 °C, kaynama noktası 260 °C ve suda çözümlü renksiz kristaller oluştururlar.

Doğada bulunmamasına rağmen 1,2,3-triazoller farmasötikler, organik sentez, polimer kimyası, supramoleküler kimya, biyokonjugasyon, kimyasal biyoloji, floresan görüntüleme, malzeme bilimi ve endüstride geniş bir uygulama alanına sahiptir (Dheer ve ark., 2017; Schulze ve ark., 2014; Liang ve ark., 2011; Ngo ve ark., 2016; Astruc ve ark., 2012; Wang ve ark., 2016).

1.1. 1,2,3-Triazol Bileşiklerinin Genel Özellikleri

1,2,3-Triazol bileşiklerinin oldukça geniş bir biyolojik aktivite aralığına sahip olması, bu bileşiklere olan ilgiyi her geçen gün artırmaktadır. 1,2,3-triazol birimi, antitümör, antimikrobiyal, anti HIV, antiviral ve antifungal gibi çeşitli biyolojik aktivite gösteren önemli heterosiklik bileşiklerdir (Zhang ve ark., 2014) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Biyolojik olarak aktif triazol bileşik örnekleri

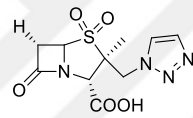
1,2,3-triazoller, yüksek kimyasal stabilite (yüksek sıcaklıkta bile oksitleyici ve indirgeyici koşulların yanısıra genellikle asidik veya bazik hidrolize karşı inert), aromatik karakter, güçlü dipol momenti (4.8-5.6 Debye) ve hidrojen bağlama yeteneği gibi çok sayıda faydalı özelliğe sahiptir (Meldal ve Tornøe 2008). Bu muhteşem

özellikler, süstitüe 1,2,3-triazol motifini yapısal olarak amid bağına benzeterek bir amid bağını taklit eder (amid bağı biyoizosteri).

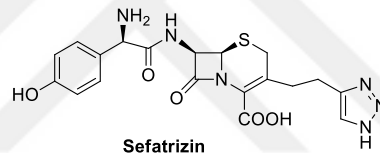
1,2,3-Triazoller;

- i. yükseltgenme ve indirgenmeye karşı kararlılık
- ii. asidik ve bazik hidrolize karşı kararlılık
- iii. hidrojen bağlanma etkileşimlerine katılabilme
- iv. π -istifleme etkileşimi ve dipol-dipol etkileşimleri gibi benzersiz özelliklere sahiptirler (Haider ve ark., 2014). (Kimyada, π istifleme (π - π istifleme olarak da adlandırılır), aromatik halkalar arasında π bağları içerdikleri için çekici, kovalent olmayan etkileşimleri ifade eder).

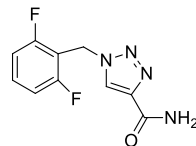
Antikonvülsan ilaç rufinamid, geniş spektrumlu sefalosporin antibiyotik sefatrizin, antikanser ilaç karboksiamidotriazol (CAI) ve β -laktam antibiyotik tazobaktam gibi 1,2,3-triazol çekirdeğe sahip birçok önde gelen tıbbi bileşik piyasada mevcuttur (Agalave ve ark., 2011) (Şekil 1.3).



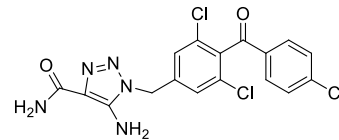
Tazobaktam
antibiyotik



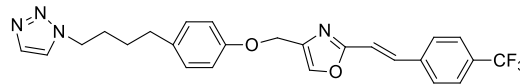
Sefatrizin
antibiyotik



Rufinamid
antikonvülsan



Karboksiamidotriazol (CAI)
kanser



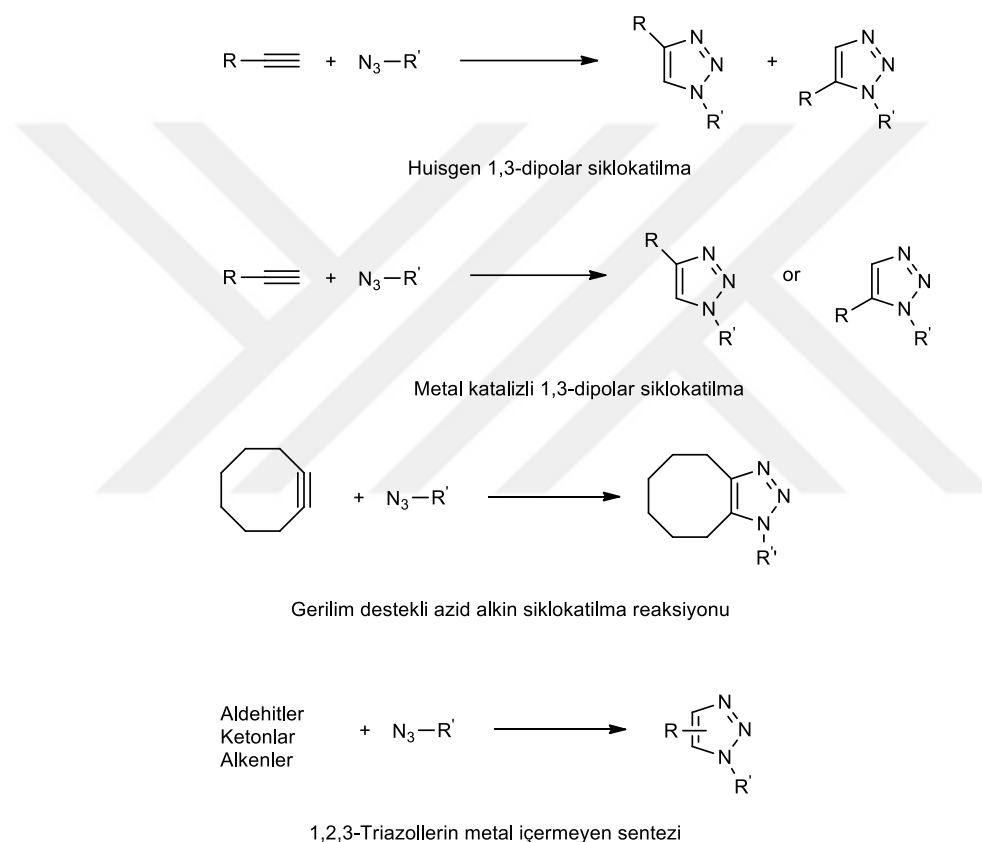
Mubritinib
meme kanseri

Şekil 1.3. Bazı önemli 1,2,3-triazol türevleri

Yeni ilaç keşfi ve geliştirilmesindeki öneminden dolayı, süstitüe-1,2,3-triazol biriminin sentezinde klasik veya alternatif reaksiyon yöntemleri kullanılarak metal katalizör içeren (Cu, Ru) veya metal katalizör içermeyen şartlarda çok sayıda yeni

sentez metotları geliştirilmiştir. Çok yönlü uygulamaları sayesinde 1,2,3-triazollerin sentezi kapsamlı bir araştırma konusu olmuştur. Bu önemli yapının hazırlanmasına yönelik sentetik metodolojiler genel olarak dört kategoriye ayrılabilir (**Şekil 1.4**) (Jalani ve ark., 2017):

- i. Huisgen 1,3-dipolar siklokatalıma reaksiyonu
- ii. Metal katalizli 1,3-dipolar siklokatalıma reaksiyonu (CuAAC, RuAAC)
- iii. Gerilim destekli azid alkin siklokatalıma reaksiyonu (SPAAC)
- iv. 1,2,3-Triazollerin metal içermeyen sentezi



Şekil 1.4. 1,2,3-Triazollerin genel sentez yöntemleri

1.2. 1,2,3-Triazollerin Genel Sentez Yöntemleri

1.2.1. Huisgen 1,3-dipolar siklokatalıma reaksiyonu

Huisgen 1960'larda triazollerin sentezini derinlemesine inceleyen ilk kişiydi (Huisgen 1963). Bir azit ve bir alkin arasında 1,3-dipolar siklokatalıma reaksiyonu ile 1,2,3-triazol sentezi Huisgen reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır (Huisgen 1984). Huisgen reaksiyonunda 1,4 ya da 1,5 disübstitüe 1,2,3-triazol regioizomerleri meydana

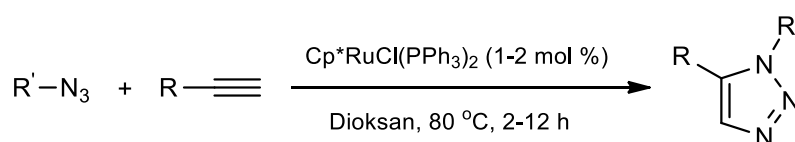
gelir. Huisgen'in 1,3-dipolar siklokatılma reaksiyonu, 1,2,3-triazollerin en basit ve atom açısından ekonomik bir sentezi olmasına rağmen yüksek reaksiyon sıcaklığı ve zayıf bölgesel seçicilik (1,4- ve 1,5-izomerlerin karışımları) bu yöntemi yetersiz kılar (Huisgen 1961).

1.2.2. Metal (Cu, Ru) katalizli 1,3-dipolar siklokatılma reaksiyonu

2001 yılında Sharpless ve grubu, değerli yeni bileşiklerin hızlı sentezi için bir dizi son derece güvenilir, pratik ve seçici reaksiyonlar için "klik kimya" terimini icat etmiştir. Klik reaksiyonları modüler, yüksek verimli, geniş kapsamlı, yalnızca zararsız yan ürünler üreten (kromatografi olmadan giderilebilen), stereospesifik, gerçekleştirilmesi kolay ve tehlikesiz çözücü gerektiren reaksiyonlardır (Sharpless ve ark., 2001).

2002'de Sharpless ve Meldal grupları bağımsız olarak literatürde klik kimyasının başlıca örneklerinden biri olarak tanımlanan Huisgen'in azid-alkin siklokatılmasının bakır katalizli (CuAAC reaksiyonu) bir türevini ortaya çıkardı (Sharpless ve ark., 2002; Meldal ve ark., 2002). CuAAC reaksiyonunun benzersiz avantajları; mükemmel substrat kapsamı, belirgin atom ekonomisi, iyi bölgesel seçicilik (sadece 1,4-izomer), yüksek ürün verimi ve hafif reaksiyon koşullarıdır (Wang ve ark., 2003; Wu ve ark., 2004; Chan ve ark., 2004; Himo ve ark., 2005).

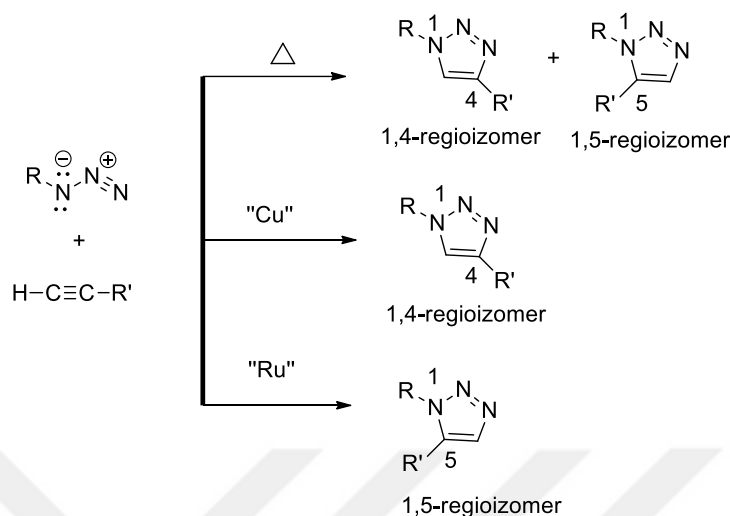
2005 yılında Fokin ve arkadaşları, rutenyum siklopentadienil kompleksleri (RuAAC) ile 1,5-disüstitüe 1,2,3-triazol sentezi için etkili bir yaklaşım geliştirdiler. İç alkinler de bu protokolda etkilidir ve tamamen süstitüe 1,2,3-triazoller sentezlenir (Zhang ve ark., 2005) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. RuAAC ile 1,5-disüstitüe 1,2,3-triazollerin sentezi

Özellikle ilaçlardan biyokonjugasyon ile çok çeşitli biyolojik aktivite gösteren bileşikler hazırlamada ki yararları nedeniyle; Huisgen'in siklokatılma reaksiyonunu temel alan klik kimyası son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Cu (I)'in yanı sıra Ru, Ni, Pt ve Pd gibi çeşitli geçiş metalleri de katalizör olarak kullanılmıştır. Kullanılan

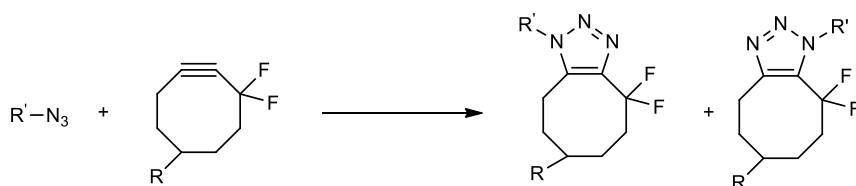
katalizörler reaksiyon hızını artırmanın yanında regioselektivite ve verimin artırılmasını da sağlamıştır (Zhang ve ark., 2005; Rasmussen ve ark., 2007) (**Şekil 1.6**).



Şekil 1.6. 1,2,3-Triazol sentezinin regioselektivitesi

1.2.3. Gerilim destekli azid alkin siklokatalıma reaksiyonu

Modern bilim ve teknolojide klik kimyasının ezici popüleritesine rağmen, metallerin kullanımı hücresel toksisite nedeniyle biyolojik sistemde ciddi endişe yaratmaktadır. Bertozzi ve çalışma arkadaşları, biyokonjugasyon için gerilim destekli azid-alkin sikloadisyon (SPAAC) reaksiyonunun ilginç bir protokolünü araştırdı. Bu reaksiyonun itici gücü, herhangi bir katalizör olmaksızın fizyolojik koşullar altında ilerleyen sikloalkinlerdeki büyük halka gerginliğinin serbest bırakılmasıydı (Codelli ve ark., 2008) (**Şekil 1.7**).

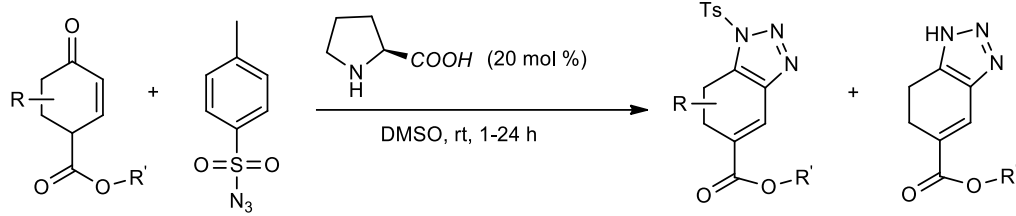


Şekil 1.7. Gerilim destekli azid alkin siklokatalıma reaksiyonu

1.2.4. 1,2,3-triazollerin metal içermeyen sentezi

Organokatalitik reaksiyonlar, dipolarofiller olarak enaminler, enolatlar kullanılarak 1,2,3-triazollerin sentezinde büyük ilgi görmüştür. Ayrıca aktifleştirilmiş

alkenler, triazol oluşumu için faydalı bir substrat olarak belirlenmiştir. Ramachary ve arkadaşları 1,2,3-triazollerin L-prolin katalizli sentezini bir enamin aracılı [3+2]-siklokatma reaksiyonu yoluyla geliştirmiştir (Ramachary ve ark., 2008) (**Şekil 1.8**).



Şekil 1.8. 1,2,3-triazollerin L-prolin katalizli [3+2]-siklokatma reaksiyonu

1.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin oluşmasını veya bunların ortaya çıkardığı toksik etkilerinin giderilmesini, serbest radikallerin yakalanmasını ve onların etkisiz hale getirmesini sağlayan maddelerdir (Elliot 1999). Antioksidanlar biyoanalitik kimyagerler, doktorlar, diyetisyenler gibi farklı disiplinlerde çalışanlar ile tüketiciler için ortak bir ilgi alanıdır. Antioksidan bileşikler genellikle elektron veya H transferi yoluyla oksidan türlerini azaltma yeteneğine sahiptirler. Oksidasyonu inhibe ederek gıdaların bozulmaya karşı korunmasına hizmet ederler (Shahidi ve ark., 2015). Antioksidanların gıdaların bozulmalarını önlemek ve ömrünü uzatmak için kullanılması eski zamanlara kadar dayanmaktadır (Gutteridge ve ark., 2018).

Vücutta üretilen serbest radikallerin lipidler, proteinler ve DNA gibi biyomakromoleküller üzerinde oksidatif hasara neden olabileceği düşünüldüğünde, reaktif türlerini temizleyerek bu hasarı geciktiren veya önleyen antioksidanların önemi göz ardı edilemez. Antioksidanlar, üretilen radikal türlerin tipine ve korunan hedef molekülün tipine bağlı olarak farklı işlevlere sahip olabilir (Halliwell 1995). Antioksidanlar, fazla reaktif türü dengeleyerek dejeneratif hastalık gelişme riskini azaltabildiklerinden, insan sağlığı için hayati önem taşırlar (Shahidi 2015). Ayrıca vücuttaki oksidanlar çeşitli hastalık durumlarında artabileceğinden eksojen kaynaklardan antioksidan alımı çok önemlidir. Bazı antioksidanlar vücutta doğal olarak sentezlenebilirken, bazıları beslenme yoluyla alınır. Çeşitli antioksidan sınıfları arasında enzimatik antioksidanlar; Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hidrofilik antioksidanlar; ürat, askorbat, glutasyon, flavonoidler ve lipofilik antioksidanlar; tokoferoller, karotenoidler ve ubiquinol yer almaktadır

(Ratnam ve ark., 2006). Sağlığa yararlı etkilerinin yanı sıra gıdalarda, gıda takviyelerinde ve ilaçlarda bulunan antioksidanlar raf ömrünü uzatır.

Antioksidanlar, etki mekanizmalarına bağlı olarak birincil veya ikincil antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir. Birincil antioksidanlar radikal türleri H atomu veya elektron transferi yoluyla temizlerken, ikincil antioksidanlar prooksidan katalizörleri etkisiz hale getirir. Sentetik antioksidanlar birincil antioksidanlar olarak bilinmesine rağmen, konsantrasyonlarına bağlı olarak toksik ve kanserojen olabilecekleri bildirilmiştir (Shahidi 2015).

Antioksidanlar ayrıca savunma mekanizmalarına göre (i) önleyici, (ii) radikal süpürücü ve (iii) enzim tamircisi olmak üzere üç alt gruba ayrılır. Bitki bazlı antioksidanlar genellikle hidrofildir ancak tokoferoller, K vitamini ve karotenoidler hidrofobiktir. Ürik asit ve askorbik asit suda çözünür antioksidanlardır (Haida ve Hakiman 2019). Fenolik antioksidanların eşlenik baz (tuz) formu, sulu fazda ana serbest asitten (asit formunun pK_a 'nın üzerindeki pH'ta) daha fazla çözünür.

1.3.1. Enzimatik antioksidanlar

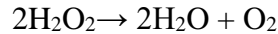
Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) en iyi bilinen antioksidan enzimleridir. ROS için yüksek afiniteye sahip olduklarından oksidatif stres durumunda daha etkili koruma sağlarlar (Ratnam ve ark., 2006).

Koenzim Q10 yağda çözünen bir antioksidandır ve radikal süpürücü etkisinin yanı sıra çeşitli A (retinol), C (askorbik asit) ve E vitaminlerinin yenilenmesinde ve lipidler, DNA ve proteinler gibi biyomakromoleküllerin bozunmasının engellenmesi gibi metabolik olaylarda da rol oynar (Houston 2005).

Bir metalloenzim olan SOD, tüm hücre altı bölümlerinde bulunan en etkili enzimatik antioksidanlardan biridir ve yüksek miktarlardaki ROS'un toksik etkilerine karşı koruyucu bir ajan olarak görev yapar (Gill ve Tuteja 2010). SOD, süperoksitin oksijen ve hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eder. İnsan vücudunda metal kofaktörlerine göre üç tip SOD enzimi: sitozolik CuZn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve Fe-SOD bulunmaktadır (Ratnam ve ark., 2006; Gill ve Tuteja 2010). Hidroksil radikallerinin geçiş metali katalizli oluşumunu önlemeye yardımcı olur (Gill ve Tuteja 2010).

Katalazlar, tetramerik hem grubuna sahip enzimlerdir ve çeşitli katabolik olaylarda yer alan oksidazlar tarafından peroksizomlarda üretilen H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda yer alırlar (Gill ve Tuteja 2010). Hidrojen peroksidin toksik

olmayan su ve oksijen ürünlerine ayrışma reaksiyonunu katalize eder (Chelikani ve ark., 2004).



Dakikada yaklaşık 6 milyon H_2O_2 molekülünü parçalayabilen bu enzim çok yüksek turnover oranına sahiptir (Gill ve Tuteja 2010). Ek olarak, CAT'ın peroksidatif reaksiyon yoluyla bazı toksik bileşikler üzerinde de etkili olduğu bildirilmiştir (Ratnam ve ark., 2006). Katalazlar (hidroperoksidazlar) bugüne kadar kapsamlı olarak çalışılmıştır, monofonksiyonel katalazlar, bifonksiyonel katalazlar ve manganez içeren 300'den fazla tip katalaz bulunmaktadır (Chelikani ve ark., 2004).

Öte yandan, farklı oksidasyon durumlarındaki Fe, Cu ve Mn gibi geçiş metalleri hem prooksidan hem de antioksidan olarak davranabilir. Bu metaller elektronlarını radikaller oluşturmak için transfer edebilir ve oksidatif strese neden olabilir. Aynı zamanda bu metaller antioksidan enzimlerinin aktif redoks merkezlerini oluşturdukları için biyolojik antioksidan savunma sisteminde önemli rol oynarlar. Süperoksit dismutazdaki Cu, Zn ve Mn metalloenzimlerin aktif merkezleri olarak süperoksit anyonunu hidrojen peroksite dönüştürürken, katalazdaki Fe hidrojen peroksiti suya ayrıştırır.

1.3.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

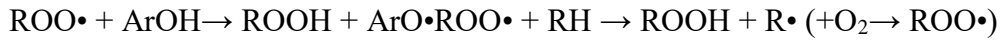
E vitamini, karotenoidler, polifenoller ve askorbik asit önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip enzimatik olmayan antioksidanlardır ve vücutta sentezlenemedikleri için beslenme yoluyla alınmaları gerekir. E vitamini, dört farklı tokoferol ve dört farklı tokotrienol olmak üzere sekiz formda bulunur, esas olarak kullanılan şekli α -tokoferoldür.

Koenzim Q10 (CoQ10) veya ubiquinon, benzokinon halkasının bir izoprenoid zinciri ile konjugasyonu ile sentezlenir ve biyolojik sistemde bulunur, ancak vücutta ATP üretimi yoluyla daha fazla enerji vermek için diyetle desteklenebilir.

Beslenme ve diyet, antioksidan savunma mekanizmasının önemli bir parçasıdır (Ratnam ve ark., 2006). Glutatyon, ürik asit ve bilirubin de insan sıvılarında bulunan küçük moleküler kütleli antioksidanlardır (Byers ve Perry 1992).

Vitamin C ve E, β -karoten (aslında bir provitamin A karotenoid) ile birlikte antioksidan vitaminleri olarak bilinir ve oksidatif hasarın neden olduğu bazı hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynar (McCall ve Frei 1999).

Bütil hidroksi anisol (BHA), bütil hidroksi toluen (BHT), *tert*-bütil hidrokinon (TBHQ), *2-tert*-bütil-4-metilfenol (TBMP) gibi bazı fenolik bileşikler, gıda katkı maddesi olarak kullanılan sentetik antioksidanlar olarak adlandırılırlar. Bu sentetik antioksidanlar, reaksiyon denklemleriyle gösterildiği gibi, lipid peroksidasyonunda yer alan radikal zincir reaksiyonunu önlemek için hidrojen atomlarını lipid radikallerine aktarır.



Radikal oluşumunu ve lipid oksidasyonunu önleyen BHA, kuru tahıllarda, karışımlarda veya tatlılarda ve özellikle kızarmış ürünlerde koruyucu olarak kullanılan, ısıya dayanıklı sentetik bir antioksidandır. Yüksek dozlarda alındığında tümör başlatıcı olabileceği bildirilmiştir.

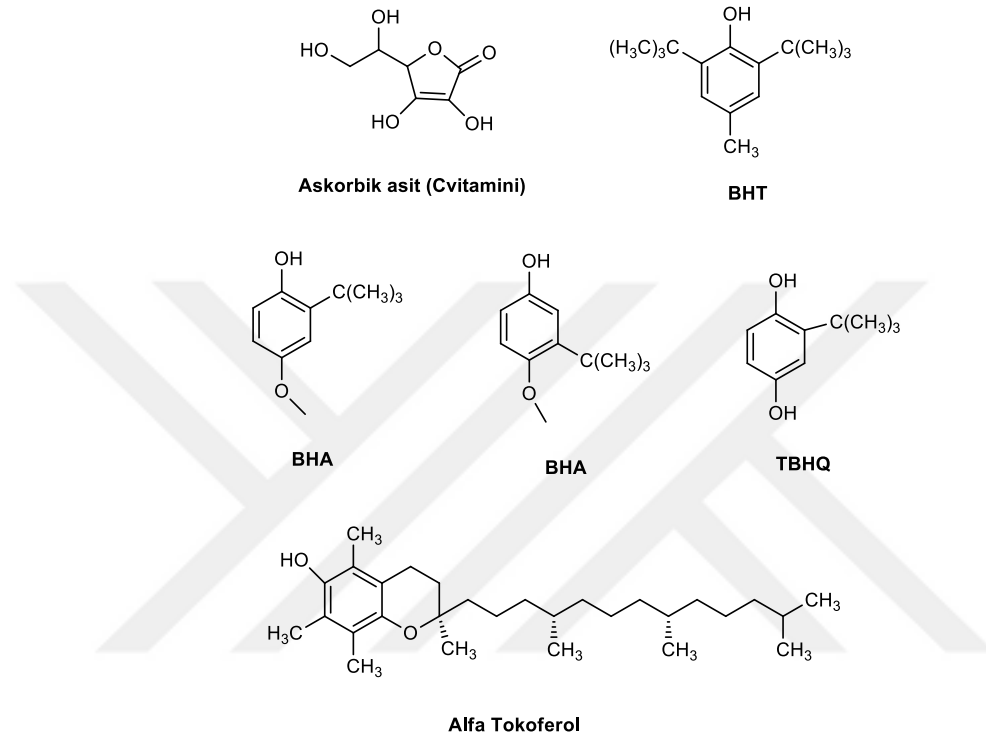
Yüksek konsantrasyonlarda, C ve E vitaminleri prooksidanlar olarak hareket edebilir (Hamre ve ark., 2004). α , β , γ ve δ -tokoferoller ve α , β , γ ve δ -tokotrienoller olmak üzere toplam 8 çeşit E vitamini mevcuttur. Bunlar arasında α -tokoferol en fazla etkili olanıdır. Bunun nedeni yapısındaki 6 numaralı karbona bağlı -OH grubudur (Rizvi ve ark., 2014).

Kromanol halkasındaki -OH grubunun H atomu, delokalize ve stabilize bir eşleşmemiş elektrona yol açan bir serbest radikale verilebilir; ortaya çıkan E vitamini radikali, lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu sona erdirmek için kinetik olarak inerttir (Rungratanawanich ve ark., 2018).

Vitamin E, lipid peroksid radikallerine karşı reaksiyon yeteneği sayesinde yağda çözünen ve zincir kıran bir antioksidandır ve bu radikalın yeni bir PUFA (çoklu doymamış yağ asidi) ile reaksiyona girmesini engeller. Lipid peroksidasyonuna karşı savunmada yer alan E vitamini radikali, su-lipid ara yüzünde C vitamini tarafından E vitaminine dönüştürülerek (Hamre ve ark., 2004), uygun redoks potansiyelleri yoluyla C vitamini tarafından E vitamininin yenilenmesini sağlar. E vitamininin bir diğer önemli rolü de midede *N*-nitrozo bileşiklerinin oluşumunu engelleyerek çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etki göstermesidir. Böylece E vitamini hem doğrudan bir radikal süpürücü olarak hem de SOD, CAT, GPx gibi çeşitli enzimleri düzenleyerek bir antioksidan görevi görebilir (Vertuani ve ark., 2004).

Askorbik asit, bitkilerde yaygın olarak bulunan suda çözünür bir antioksidandır; sulu ortamda oldukça etkili bir radikal süpürücü ve indirgeyici ajandır (Hamre ve ark., 2004). C vitamininin önemli görevlerinden biri de midede *N*-nitrozo bileşiklerinin oluşumunu engellemek ve kolajen oluşumunu desteklemektir. Bu nedenle kanser başta

olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etkisi vardır (Byers ve Perry 1992). C vitamini ayrıca lipid peroksidasyonunda önemli bir rol oynayan α -tokoferolün doğrudan ROS süpürücüsü ve geri dönüştürücüsü olarak da görev yapabilir. Ayrıca kan-beyin bariyerini geçemeyen ilaçların taşınmasındaki rolü nedeniyle nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde de önemlidir (Vertuani ve ark., 2004).



Şekil 1.9. Bazı enzimatik olmayan antioksidanlar

1.4. Enzimler

Enzimler herhangi bir değişikliğe maruz kalmadan canlı hücrelerde meydana gelen kimyasal reaksiyonların hızını artıran protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Enzim katalizli reaksiyonların reaktanlarına substrat denilmektedir. Her enzim, belirli bir substrat ya da substratlar için oldukça spesifiktir. Bütün enzimler protein yapısındadır. Bununla birlikte, protein olmayan kofaktör adı verilen bir bileşen olmadan, birçok enzim proteini katalitik olarak aktif değildir. Apoenzim, enzimlerin inaktif protein bileşenlerine, aktif enzime (kofaktör dahil) ise holoenzim denir. Kofaktör, koenzim olarak organik bir bileşik olabileceği gibi bir metal iyonu da olabilir. Bazı enzimler, kofaktörleri diğerlerinden daha sıkı bağlar. Bir kofaktör, enzime zarar vermeden ayrılması zor olacak kadar sıkı bağlandığında, bazen prostetik grup olarak

adlandırılır (Palmer ve Bonner 2011). Biyolojik ve kimyasal reaksiyonlarda verimliliği ve hızı artırmaları, substratlarına spesifik olmaları, yüksek saflıkları, çevreye zararsız olmaları ve ılıman reaksiyon koşullarında bile oldukça aktif olmaları gibi eşsiz özelliklerinden dolayı enzimlerin oldukça geniş uygulama alanları mevcuttur (Homaei ve ark., 2013; Illanes ve ark., 2012; Pera ve ark., 2015). Enzimlerin benzersiz özelliklerine rağmen karmaşık yapılarından dolayı üretim ve saflaştırma maliyetlerinin yüksek olması, doğal olmayan veya ekstrem koşullarda düşük dayanıklılık ve aktiviteye sahip olmaları, yüksek substrat ve/veya ürün konsantrasyonlarında kolayca deaktive olmaları gibi dezavantajları da kullanımlarını kısıtlayabilmektedir (Cacicedo ve ark., 2019; Moehlenbrock ve Minteer, 2017).

1.4.1. Enzimlerin tarihçesi

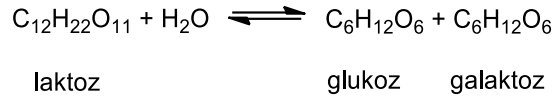
On dokuzuncu yüzyıla kadar sütün ekşimesi ve şekerin alkole fermantasyonu gibi süreçlerin ancak canlı bir organizmanın etkisi ile gerçekleşebileceği düşünülüyordu. 1833'te, şekeri parçalayan aktif madde kısmen izole edildi ve diastaz (şimdi amilaz olarak biliniyor) adı verildi. Kısa bir süre sonra, mide suyundan diyet proteinini sindiren bir madde çıkarıldı ve pepsin adı verildi. Bu ve diğer aktif müstahzarlara fermentler genel adı verildi.

Justus von Liebig, bu mayaların canlı hücrelerden elde edilen cansız malzemeler olabileceğini fark etti, ancak Louis Pasteur ve diğerleri, yine de mayaların canlı malzeme içermesi gerektiğini savundu. Bu anlaşmazlık devam ederken, maya terimi yavaş yavaş enzim adı ile değiştirildi. Bu ilk olarak 1878'de Wilhelm Kfthne tarafından önerildi (Yunanca, enzime 'maya' anlamına gelir). Eduard ve Hans Buchner kardeşler, 1897'de, bir maya hücresi özütü eklendiğinde şeker fermantasyonunun gerçekleşebileceğini gösterdiler (Palmer ve Bonner 2011).

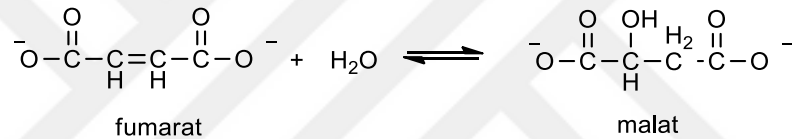
Canlı hücre olmamasına rağmen 1926'da James Sumner, bakla ekstraktlarından üreazı kristallendirdi ve sonraki birkaç yıl içinde birçok başka enzim saflaştırıldı ve kristalleştirildi. Saf enzimler elde edildikten sonra yapıları ve özellikleri belirlenebilir. Günümüzde enzimler hala akademik araştırmalar için de önemli bir konu oluşturmaktadır. Hastanelerde tanıya yardımcı olarak araştırılırlar ve eylem özgüllükleri nedeniyle analitik reaktifler olarak büyük değere sahiptirler. Enzimler, tarihin başlangıcından beri kullanılan birçok işlemi sürdürerek ve genişleterek endüstride hala yaygın olarak kullanılmaktadır (Palmer ve Bonner 2011).

1.4.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimlere '-az' ile biten isimler verme konusunda geçmişten gelen bir gelenek vardır. Bunun tek büyük istisnası, proteolitik enzimlerdir, yani isimleri genellikle '-in' ile biten proteinlerin parçalanmasında rol oynayanlardır, örn. tripsin. Enzimlerin isimleri genellikle ilgili substratı gösterir laktaz, disakkarit laktozun bileşen monosakkaritler, glukoz ve galaktoza hidrolizini katalize eder:



Laktaz adı, kullanışsız, ancak daha kesin olan laktozazın bir daralmasıdır. İlki kulağa daha hoş geldiği için kullanılır. Bu enzim veya diğer pek çok enzim adına katalize edilen reaksiyonun türünü gösteren hiçbir şey yoktur. Örneğin fumaraz, laktaza benzer şekilde hidrolitik bir reaksiyonu katalize ettiği varsayılabilir, ancak aslında fumaratı malat oluşturmak için hidratlar:



Diğer enzimlerin adları, örn. transkarboksilaz, substratları (transkarboksilaz durumunda metilmalonil-CoA ve piruvat olan) belirtmeden reaksiyonun doğasını belirtir. Katalaz gibi bazı isimler ne substratı ne de reaksiyonu gösterir (katalaz hidrojen peroksidin ayrışmasına aracılık eder).

Enzim Komisyonu, katalize edilen toplam reaksiyon temelinde enzimleri altı ana sınıfa ayırdı. Her enzime, noktalarla ayrılmış dört elementten oluşan bir kod numarası verildi. İlk basamak, enzimin ana sınıflardan hangisine ait olduğunu gösterir:

İlk Basamak	Enzim Sınıfı	Katalizlenen Reaksiyon Tipi
1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon/Redüksiyon reaksiyonları: Substratlar arasında yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlere oksidoredüktazlar denilmektedir. Bu gruba örnek olarak dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar ve peroksidazlar gibi enzimler örnek verilebilir. Bu grupların koenzimleri ise FADH ₂ , NADH ve NADPH'tır.
2	Transferaz	İki molekül arasında bir atom veya grubun transferi (diğer sınıflardaki reaksiyonlar hariç): Substratların arasında Hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlere transferazlar denir. Bu enzimlerin transfer ettiği gruplara fosfat, aldehit, keton grupları örnek olarak verilebilir.
3	Hidrolaz	Hidroliz reaksiyonları: Eter, ester, glikozid, peptid ve anhidrit gibi bağların yanı sıra C-X, P-N gibi bağlara su molekülünün katılması ile hidrolizi katalizleyen enzim grubudur. Esteraz, lipaz, glikozidaz, fosfataz, proteinaz ve bütün nükleaz enzimleri bu gruba girer.

4	Liyaz	Substrattan bir grubun çıkarılması (hidroliz ile değil): Oksidasyondan ve hidrolizden farklı bir mekanizma ile komşu karbonlardan grupların uzaklaştırılması ile çift bağ oluşturan veya çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlere liyazlar denir. Bu grubun enzimleri hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonlarını katalizlerler.
5	İzomerazlar	İzomerizasyon reaksiyonları: Yapısal, optik veya geometrik izomerlerin birbirine dönüşümlerini katalizleyen enzimlere izomerazlar denilmektedir. Epimerazlar, mutazlar ve rasemazlar bu grupta bulunan enzimlerdir.
6	Ligazlar	Bir nükleosit trifosfatta pirofosfat bağının parçalanmasıyla birleşen iki molekülün sentetik birleşmesi: İki molekülün sentetik birleşmesi, bir nükleozid trifosfatta pirofosfat bağının parçalanması ile birleştiğinde yüksek enerjili fosfatlı molekülden fosfat bağlarının koparılması ile açığa çıkan enerji kullanılarak her iki molekülün C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bağlanması reaksiyonlarının katalizini gerçekleştiren enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

1.4.3. Enzim inhibisyonu

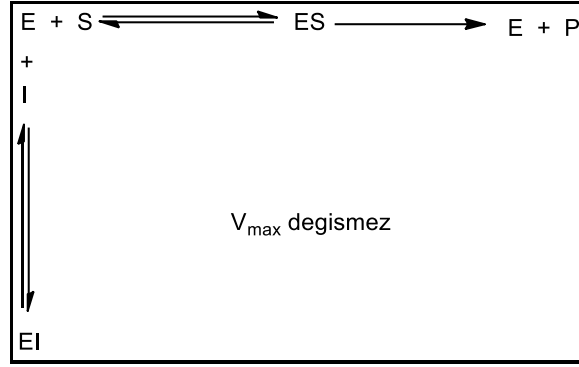
Enzim inhibisyonu, enzim aktivitesinin *in vitro* veya *in vivo* olarak bazı bileşiklerin etkisiyle azalması ya da yok olmasıdır. İnhibisyona sebep olan küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlar inhibitör olarak adlandırılır. İlaçlar ve toksik maddeler de inhibitör gibi davranarak enzimleri inhibe edebilirler. Biyokimyacılar için enzim inhibisyonu, enzim etki mekanizmaları ile metabolik yolların aydınlatılması oldukça elzemdir (Keha ve Küfrevioğlu 2020). Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz inhibisyon olarak iki büyük sınıfta incelenir. Geri dönüşümlü inhibisyonda, inhibitör ortamdaki uzaklaştırıldığında enzim aktivitesini tekrar kazanmaktadır.

Üç tip geri dönüşümlü inhibisyon vardır;

- i. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif)
- ii. Yarışmasız inhibisyon Tip I (Nonkompetitif)
- iii. Yarışmasız inhibisyon Tip II (Unkompetitif)

1.4.3.1. Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)

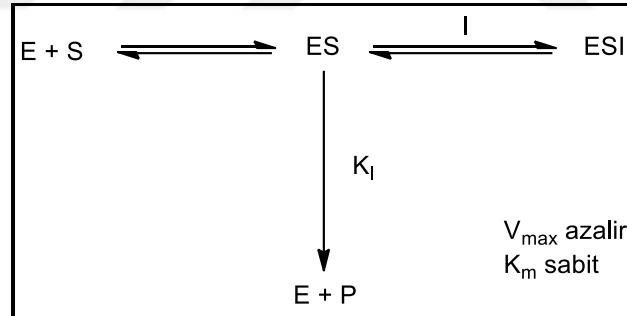
Yarışmalı inhibisyonda, yapı olarak substrata benzeyen inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanabilmek için substrat ile yarış halinde olmasına rağmen enzim tarafından ürüne dönüştürülemezler. Yarışmalı inhibisyonda substratın konsantrasyonunu artırarak inhibitörün etkisini ortadan kaldırmamız mümkündür. Enzimin V_{max} değeri değişmez (Gürdol 2015; Keha ve Küfrevioğlu 2020) (**Şekil 1.10**).



Şekil 1.10. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif) gösterimi

1.4.3.2. Yarışmasız inhibisyon tip I (nonkompetitif)

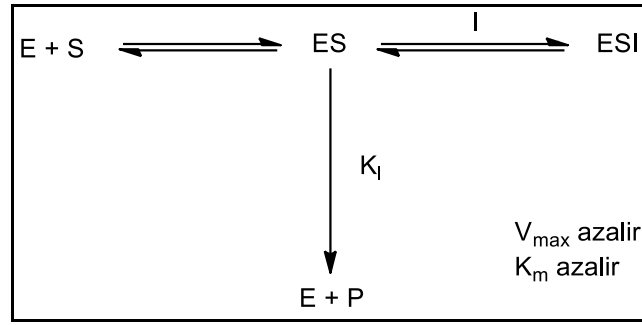
Nonkompetitif inhibisyonda inhibitör substrat ile yapısal bir benzerlik göstermediği için enzimin aktif bölgesine değil enzimin farklı bir bölgesine bağlanır. Bu nedenle substratın konsantrasyonunda ki değişiklikler inhibisyonu etkilemez. Yarışmasız inhibisyonda inhibitör etkisini, turnover sayısını düşürerek gösterir ve enzimin V_{max} değeri azalır, K_m değeri ise değişmez ve sabit kalır (Gürdol 2015; Keha ve Küfrevioğlu 2020) (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Yarışmasız inhibisyon Tip I (Nonkompetitif) gösterimi

1.4.3.3. Yarışmasız inhibisyon tip II (unkompetitif)

Yarı yarışmalı (Unkompetitif) inhibisyonda inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak yerine enzim-substrat kompleksine bağlanmaktadır. Substratın konsantrasyonu arttırılırsa inhibisyonun artacağı bilinmektedir. Bu inhibisyon türünde tek substratlı reaksiyon yerine çift substratlı reaksiyonlar yaygındır. Bu inhibisyonda ortamdan ES kompleksi uzaklaştığı için K_m azalır ve ESI kompleksinin miktarı arttığı içinde V_{max} azalır (Keha ve Küfrevioğlu 2020) (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Yarışmasız inhibisyon Tip II (Unkompetitif) gösterimi

1.4.3.4. Geri dönüşümsüz inhibisyon

Bu inhibisyon türünde inhibitörler enzime kovalent olarak bağlanabilmenin yanı sıra enzimin aktifliğinin devam edebilmesi için gerekli olan grupları bozabilir ya da bu grupla kovalent olmayan bağlarla yapı oluşturabilirler. Geri dönüşümsüz inhibitörlerin özel bir sınıfı vardır ve bunlara intihar inaktifleştiricileri denilmektedir. Bu moleküller enzime bağlanıncaya kadar aktif olmayıp bağlandıktan sonra enzimin birkaç basamağında çalışır fakat ürüne dönüşmek yerine enzimi geri dönüşümsüz olarak inaktif duruma getirir. Bu bileşikler normal olarak enzim mekanizmasını kullanarak enzimi inaktif duruma getirdikleri için mekanizmaya bağlı inaktifleştiriciler olarak bilinmektedirler. İntihar inaktifleştiriciler akıllı ilaç üretiminde ve bu ilaçların yan etkilerinin giderilmesinde oldukça önemlidir (Nelson ve Cox 2013).

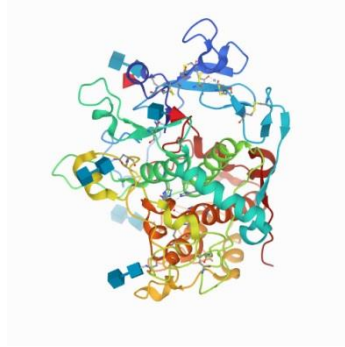
1.4.4. Tirozinaz enzimi

Tirozinaz (TYR, EC 1.14.18.1), Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda rol oynayan ayrıca kozmetik ve gıda endüstrileri için önemli olan melanin-esmerleşme reaksiyonlarına neden olan memelilerde, bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde bulunan, melanogenezde hız sınırlayıcı bir enzimdir. Memeli tirozinaz ailesine ait olan insan tirozinazı (*h TYR*), tip 3 bakır içeren bir metalloenzim ve 529 aminoasitten oluşan bir glikoproteindir. Aktif bölgesinde, manyetik olarak bağlı iki bakır iyonu (Cu_a ve Cu_b), *met* durumunda bir hidrokso ligandı ile bağlanır ve altı histidin ile koordine edilir (Olivares ve Solano 2009). *h TYR*'nin birincil işlevi, monofenolaz olarak davranarak L-tirozini L-DOPA'ya oksitlemek ve ardından bir difenolaz olarak davranarak L-DOPA'yı dopakinona dönüştürmektir (Fogal ve ark., 2015). Bu çift oksidasyon işlemi melanin oluşumuna yol açar. Diğer iki enzim olan tirozinazla ilgili proteinler 1 ve 2'nin (*h TYRP1* ve *h TYRP2*) de melanin üretimine katıldığı

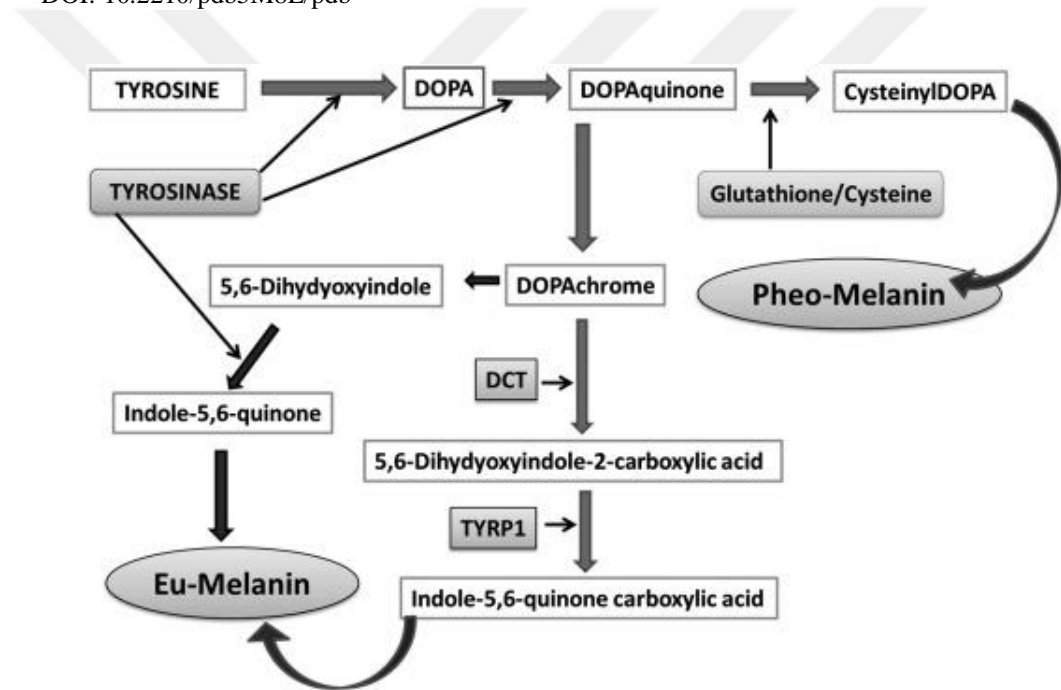
bilinmektedir. Melanogenezin son ürünleri eumelanin (koyu kahverengiden siyaha bir pigment) ve feomelanindir (sarı/kırmızı bir pigment) (Ito 2003). Melanogenez, deride, saç köklerinde ve gözlerde bulunan özel bir dendritik hücre türü olan melanositlerde meydana gelir. Hücre altı düzeyde, melaninler melanozomlarda depolanır ve önemli ölçüde cildi UV radyasyonuna ve serbest radikallere karşı korur. Bununla birlikte, anormal melanin üretimleri, melazma, lentigo, konjenital melanositik nevüs, erythromelanosus follicularis faciei ve colli, post-inflamatuvar hiperpigmentasyon ve eritema diskromicum perstans gibi patolojik durumlara neden olabilir (Maymone ve ark., 2017). Çünkü *h* TYR, melanogenezin ilk iki adımını katalize eder, melanin üretimini bastırmak veya azaltmak için yapılan çabaların çoğu, etkili TYR inhibitörlerinin geliştirilmesine yöneliktir. Bu stratejinin etkili olduğu ve TYR inhibisyonu ile üretilen melanin seviyeleri arasında güçlü bir korelasyon olduğu kanıtlanmıştır (Roulier ve ark., 2020). Bu nedenle *h* TYR, melanogenezi azaltmak için çekici bir hedef olarak kabul edilir, ancak *h* TYR'nin yüksek fiyatı ve stabil formlarda üretimleriyle ilgili zorluklar nedeniyle nadiren kullanılır (Roulier ve ark., 2020). Potansiyel tirozinaz inhibitörlerinin TYR inhibitör aktivitesini test etmek için, mantar (*Agaricus bisporus*) tirozinaz (*ab* TYR), ulaşılabilirliği, düşük maliyeti ve güvenilir sonuçları nedeniyle bir çalışma modeli olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Mantar tirozinazlar nötr veya hafif asidik pH değerlerinde optimum aktivite gösterirler.

Kojik asit (Gonçalez ve ark., 2013), hidrokinon, monobenzil hidrokinon, arbutin (Heilgemeir ve Balda 1981; Kumar ve ark., 2013), salisilhidroksamik asit (Breathnach ve ark., 1989), azelaik asit (Garcia-Lopez 1989), rusinol (Khemis ve ark., 2007), fenilettil resorsinol (Köpke ve ark., 2019), tiazolil resorsinoller (Mann ve ark., 2018) ve kortikosteroidler (Breathnach ve ark., 1989; Garcia-Lopez 1989) gibi binlerce TYR inhibitörü (Ashraf ve ark., 2015; Ashraf ve ark., 2017; Rafiq ve ark., 2019; Nazir ve ark., 2020; Nazir ve ark., 2021) bildirilmiştir. Bu inhibitörler hücre bazlı tahlillerde mükemmel anti-melanojenik etkiler göstermiştir (Chang ve ark., 2009; Yun ve ark., 2015; Do Hyun Kim ve ark., 2017; Pillaiyar ve ark., 2018; Kim ve ark., 2018; Jung ve ark., 2018). Bununla birlikte, bu inhibitörlerin birçoğunun, hayvan ve insan modellerinde deri kanseri, geri dönüşü olmayan depigmentasyon ve dermatit gibi ciddi yan etkileri olduğu da bildirilmiştir (Halaouli ve ark., 2006). Hidrokinon ve kojik asit kanserojen (Oba 2013), nefrotoksik (Boatman ve ark., 1996) ve genotoksik (Barneda-Zahonero ve ark., 2012) etkiler nedeniyle çoğu ülkede yasaklanmıştır. Arbutin (doğal bir tirozinaz inhibitörü) daha az yan etkiye sahiptir ancak stabilite sorunları vardır,

örneğin 20 °C'de ve cilt mikroflorasında termodegradasyon ile hidrokinon ve D-glukoza hidrolize edilir (Coiffard ve ark., 1999; Bang ve ark., 2008).



Şekil 1.13. İnsan tirozinaz enziminin (monomer) kristalografik yapısı (5M8L) PDB
DOI: 10.2210/pdb5M8L/pdb

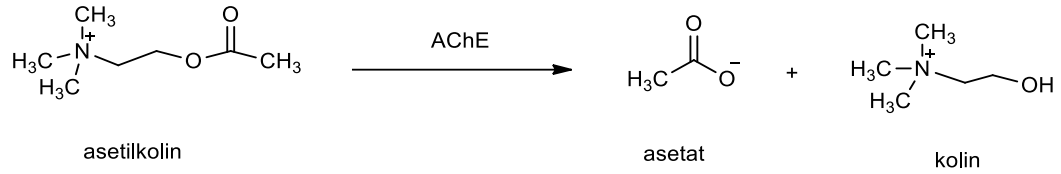


Şekil 1.14. Tirozinaz enziminin mekanizması

1.4.5. Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi

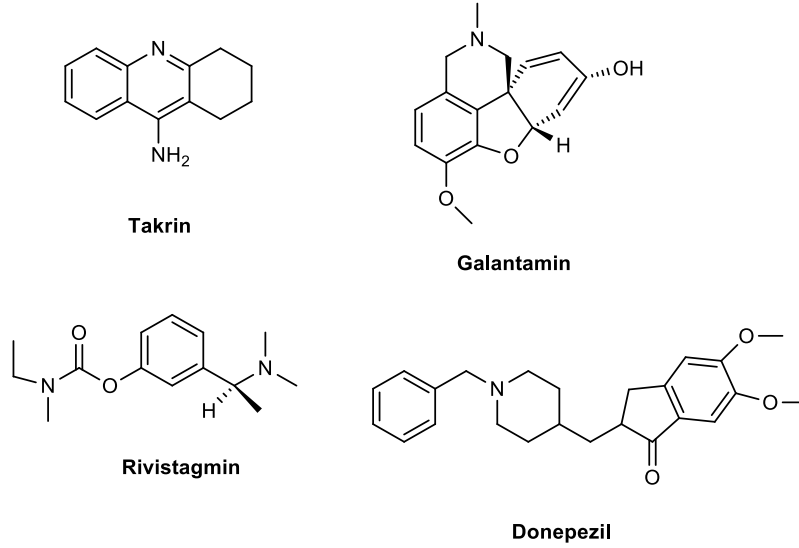
Asetilkolinesteraz enzimi (AChE; EC 3.1.1.7), sağlıklı insan beyinde vücudun geri kalan dokularından çok daha yüksek oranlarda bulunan nörotransmitter bir molekül olan asetilkolini hidrolize eden bir enzimdir. Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığına, AChE aktivitesine sahip bir amiloid proteinin oluşumu neden olmaktadır. Alzheimer tanısının konulmasında rol oynayan en etkili bulgu nörotransmitter asetilkolin ile ilgili bir madde olan kolinerjik kayıptır. AChE inhibisyonu

ile bu tarz hastalıkların tedavisi, kullanılan yaygın yöntemler arasındadır (Lolak ve ark., 2020). Asetilkolin, organizmada kolinerjik nöronlar ve sapslarda, nöromüsküler kavşakta, eritrositlerde, akciğer, dalak, beynin gri maddesinde bulunan enzimin en önemli substratıdır ve bunu hızla hidroliz eder. Bunun yanı sıra AChE kolin esterlerini de substrat olarak kullanılabilir (Rosenberry 1975; Harel ve ark., 1996).



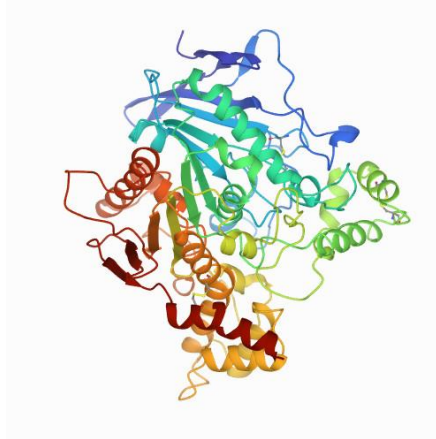
Şekil 1.15. Asetilkolinin AChE ile hidroliz reaksiyonu

AChE enzimlerini inhibe edebilen ilaçlar kolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesterazlar olarak adlandırılırlar. Santral ve periferik kolinerjik fonksiyonu güçlendiren kolinesteraz inhibitörleri (asetilkolinesterazlar) asetilkolinesterazın yıkımını inhibe ederler. II. Dünya Savaşından önce tersinir kolinesteraz inhibitörleri biliniyorken savaş esnasında çok daha uzun süreler etki gösterebilen aynı zamanda oldukça toksik etkili bileşikler olan tersinmez inhibitörler de geliştirilmiştir. Organofosfatlı pestisitler asetilkolinesterazların önemli inhibitörleri olarak bilinmektedir. Bu pestisitler enzimi inhibe ederek merkezi sinir sistemini ve çevresel sinir sistemini etkilemektedirler. Asetilkolinesterazın biyotemizleyici olarak kullanımı organofosfatların sebep olduğu çeşitli zehirlenmelerin tedavisinde kullanılabilen yeni bir yöntemdir. Bu biyotemizleyicilerin ilaç olarak kullanılabilmesi için yeterli düzeylerde elde edilebilmeli, yüksek transformasyon sayısına sahip olmalı, dolaşım sırasında daha uzun yarı ömre sahip olmalı ve immuno uygunluk göstermesi sahip olması gereken özelliklerdir (Targiani ve ark., 2010).



Şekil 1.16. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan bazı kolinesteraz inhibitörleri

Klinik olarak Myastenia Gravis (MG), glokom, Alzheimer Hastalığı gibi oldukça geniş aralıklarda ve çok çeşitli hastalıklarda kolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır. İlk zamanlarda Alzheimer hastalığının tedavisi için takrin kullanılmışken sonraki zamanlarda donepezil, rivastigmin ve galantamin kullanılmıştır. Asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesterazın (BChE) her ikisini de takrin ve rivastigmin inhibe ederken, donepezil ve galantamin sadece asetilkolinesterazı (AChE) inhibe etmektedir.



Şekil 1.17. Asetilkolinesteraz enziminin (monomer) kristalografik yapısı

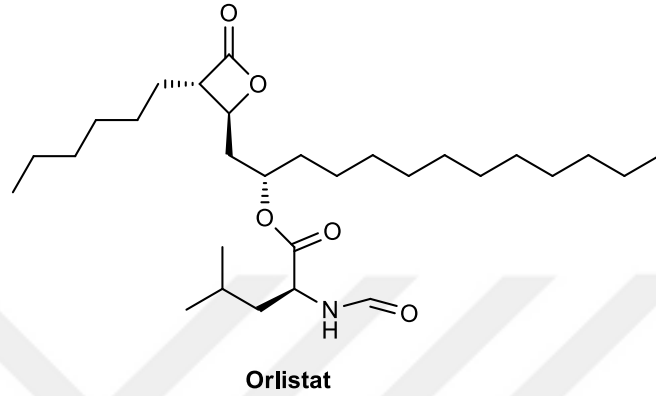
1.4.6. Pankreatik lipaz enzimi

İnsan pankreas lipazı (trیاçilgliserol açıl hidrolaz EC 3.1.1.3), karboksil esteraz ile ilgili insan lipaz ailesinin en çok çalışılan üyesidir. Safılaştırılmış insan pankreas lipazı, moleküler ağırlığı 46.000 Da olan 449 amino asitten oluşan doğal bir glikoproteindir. Pankreatik lipaz, diyet yağlarının sindirimi ve emilimi için kritik öneme sahiptir. Pankreatik lipaz genellikle pankreas tarafından salgılanır ve yağın, kolesterol esterlerinin ve yağda çözünen vitaminlerin hidrolizine ve sindirimine katılmak için duodenuma aktarılır (Carrière ve ark., 1994). Lipaz türü bir enzim olan pankreatik lipaz trigliserit moleküllerini hidroliz eden, kolipaz ve safra asitlerini ise kofaktör olarak kullanan bir enzimdir. Hidroliz sonucu monoaçilgliserol ve yağ asitleri açığa çıkar. İnce bağırsaklarda emilen trigliserit hidroliz ürünleri (monoaçilgliserol ve yağ asitleri), epitel hücrelerde başka enzimler tarafından vücuda dağıtılmak üzere, yeniden trigliserite dönüştürülerek şilomikronlar içinde lenf sistemine salgılanır. En iyi etkiyi nötr pH'da gösterir. Pankreatik lipaz, salgılandığı haliyle aktiftir. Pankreas tarafından salgılanan en bol lipolitik enzimler, pankreas trigliserit lipazı (PTL veya PNLIP) ve aile üyeleri, pankreas lipazı ile ilgili protein 1 (pancreatic lipase-related protein) (PNLIPRP1 veya PLRP1) ve pankreas lipazı ile ilgili protein 2'dir (PNLIPRP2 veya PLRP2). Ailenin diğer üyelerinden farklı olarak, PNLIPRP2, özellikle yeni doğanlar için lipid sindiriminde temel bir rol oynar. Pek çok deneysel veriyle onaylanan PNLIPRP2 mRNA deneysel sonuçları PNLIPRP2'nin emziren memelilerde süt yağı sindiriminde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Li ve ark., 2007; Andersson ve ark., 2011).

PNLIPRP2 eksikliği olan emen farelerin steatore (yağlı dışkı) ve yağ emilim bozukluğuna sahip olduğu ve dışkıdaki sindirilmemiş ve kısmen sindirilmemiş trigliseritlerin önemli ölçüde arttığı ve buna kilo alma eğrisinde önemli bir düşüş eşlik ettiği bulundu (D'Agostino ve ark., 2004; Huggins ve ark., 2003; De Caro ve ark., 2004; Gilham ve ark., 2007; D'Agostino ve ark., 2011). PNLIPRP2 sadece pankreastan değil, belirli koşullar altında sitotoksik T lenfositler (CTL) gibi çeşitli doku ve hücre tiplerinden de salgılanır. Bazı sitotoksik T-hücresi aracılı liziz tiplerinde yardımcı bir rol oynayabilir (Alves ve ark., 2009).

Pankreatik lipaz enziminin diyet yağının metabolizmasında önemli bir rol oynadığı ve ince bağırsaktan emilimini engellediği çok açıktır. Vücutta beyaz yağ dokusu olarak depolanan fazla yağlar obeziteye neden olur. Bu enzimin inhibitörleri,

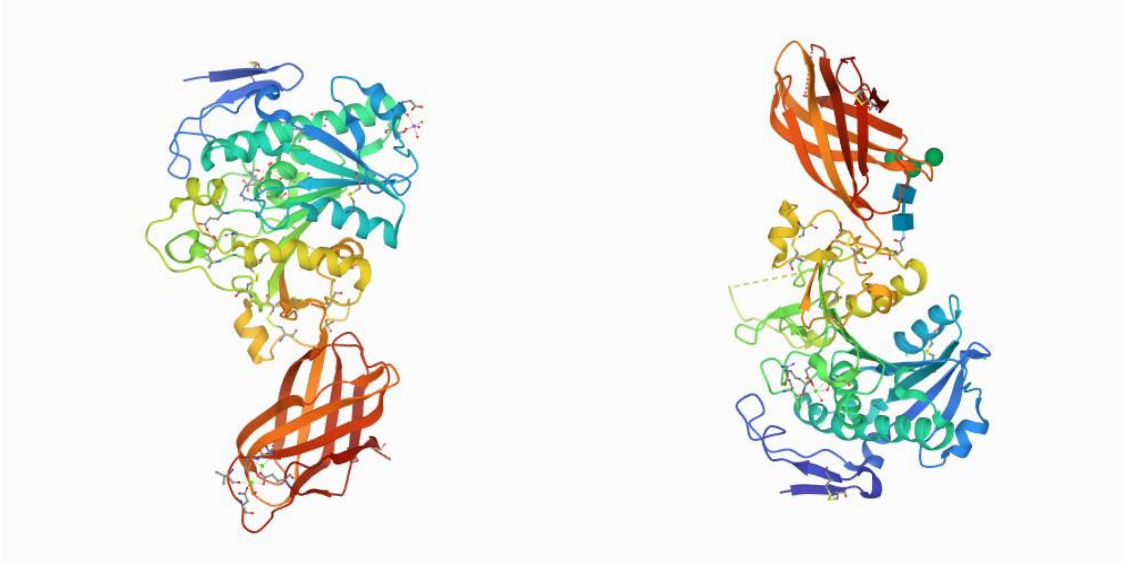
obezitenin temel nedenini doğrudan etkiler. Bu nedenle, obezite ve ilgili hastalıkların yönetimi için iyi bilinen bir hedefdir. Bu enzimin inhibisyonu, küresel olarak araştırmacıları cezbetmektedir, çünkü Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onay almış piyasada tek anti-obezite ilacı (orlistat) bir pankreatik lipaz inhibitörüdür (Heck ve ark., 2000).



Şekil 1.18. Orlistatın açık yapısı

1.4.6.1. Pankreatik lipaz inhibitörleri

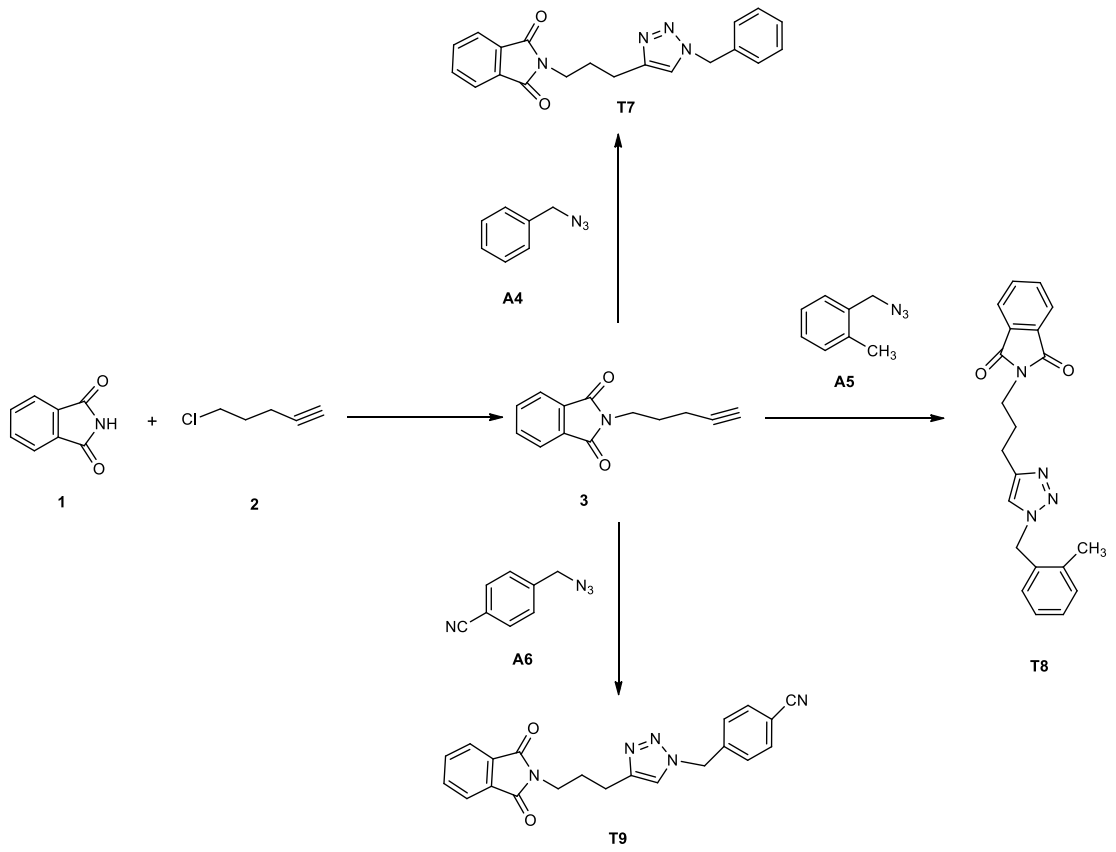
Pankreatik lipaz inhibitörleriyle ilgili incelemeler ya doğal pankreas lipaz inhibitörleriyle ya da pankreas lipaz inhibitörlerinin keşfinde kullanılan yaklaşımlarla ilgilidir (Birari ve ark., 2007; Buchholz ve Melzig 2015; Liu ve ark., 2020; Almasri 2020). Hepsi doğal pankreatik lipaz inhibitörlerinin bileşenlerini polifenoller, saponinler, alkaloidler, triterpenler ve flavonoidler vb. olarak sınıflandırdılar. Ancak, sentetik pankreatik lipaz inhibitörleri ve bunların detaylı yapı aktivite ilişkisi (SAR) çalışmaları ile inhibitörlerin bağlanma modları hakkında bir yayın bulunmamaktadır. Bitki özü ve mikrobiyal ürünler gibi doğal kaynaklardan sayısız pankreatik lipaz inhibitörü taranmıştır. Orlistat, pankreatik lipaz enziminin geri dönüşümsüz bir inhibitörü olan mikrobiyal (*Streptomyces toxytricini*) lipstatinden geliştirilmiştir (Weibel ve ark., 1987; Hochuli ve ark., 1987). Pankreatik lipazın obezite tedavisinde kullanılan inhibitörü orlistat adlı bir ilaçtır. Orlistat etken maddesi trigliseritlerin sindirimini engelleyerek vücudun besinsel yağ alımını durdurur.



Şekil 1.19. İnsan Pankreatik lipaz protein 1 ve 2'nin yapısı (pdb id: 2PPL ve 2PVS)

1.5. Çalışmanın Amacı

Heterosiklik biyoaktif bileşiklerin önemli bir özelliği başta N, S ve O olmak üzere çeşitli heteroatomlar içermeleridir. Bu heteroatomlar hedef iskeletin aktivitesini, bileşiklerin aktivitesini (veya toksikolojisini), hedef ilaçlar ve farklı hedef inhibitörler arasındaki etkileşimleri ve ayrıca metabolizma ve farmakokinetiği etkileyebilirler. 1,2,3-Triazol iskelesinin, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, sitotoksikite, antitümör, antiviral, antimikobakteriyel, antifungal, antioksidan aktivite gibi çok çeşitli ve geniş spektrumda ki özelliklerinden esinlenerek, yüksek lisans tez çalışması olarak sunulan bu çalışmanın birinci basamağında potansiyel biyolojik aktif yeni ftalimit ve 1,2,3-triazol hibrit türevlerinin sentezi çalışmanın ikinci basamağında ise; nihai ürünlerin tirozinaz, asetilkolinesteraz ve pankreatik lipaz enzimlerinin *in vitro* inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilerek IC₅₀ değerleri hesaplanması, antioksidan etkilerinin incelenmesi ve değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Daha güvenli, daha güçlü ve kararlı tirozinaz, asetilkolinesteraz ve pankreatik lipaz inhibitörlerinin belirlenmesine yönelik araştırma çalışmaları hedeflenmektedir. Nihai ürünlerin farmasötik uygulamalar başta olmak üzere birçok alanda yeni çalışmalara öncülük etmesi beklenmektedir.



Şekil 1.20. Yeni 1,2,3-triazol bileşiklerinin sentez basamakları

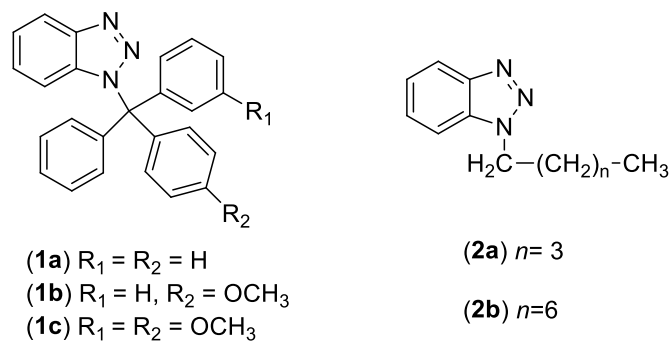
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Triazol Türevlerinin Biyolojik Aktivitelerine Dair Çalışmalar

1,2,3-Triazol, biyolojik olarak aktif birçok bileşikte bulunabilen yaygın bir birimdir (Dalvie ve ark., 2002; Agalave ve ark., 2011; Boechat ve ark., 2011; Haider ve ark., 2014). 1,2,3-Triazol türevlerinin antiviral (He ve ark., 2014), antiepileptik (Ulloora ve ark., 2013), antibakteriyel, antifungal (Kaushik ve ark., 2014), antiprotozoal (Durust ve ark., 2012), antioksidan (Mady ve ark., 2014), enflamatuvar (Abuo Rahma ve ark., 2014), ve antikanser (Wenjuan ve ark., 2013) aktiviteleri dahil olmak üzere geniş bir farmakolojik aktivite spektrumuna sahip olduğu bildirilmiştir. 1,2,3-triazoller metabolik bozunmaya karşı kararludur ve kolayca biyomoleküler hedeflerin bağlanmasını destekleyen çözünürlüğü artırabilen hidrojen bağı oluştururlar. Benzersiz özellikleri nedeniyle 1,2,3-triazoller ilaç keşfinde ilgi çekici yapılardır (Pedersen ve ark., 2011).

2.1.1. Antifungal aktivite

Krzysztof ve arkadaşları antimikrobiyal ve antifungal aktiviteler için taranan bir dizi (**1a**, **1b**, **1c**) 1,2,3-triazol bileşiği ve türevlerini sentezlemiştir. **2a** ve **2b** bileşiklerini mikonazole kıyasla daha iyi antifungal aktivite göstermiştir (Sztanke ve ark., 2008) (Şekil 2.1).

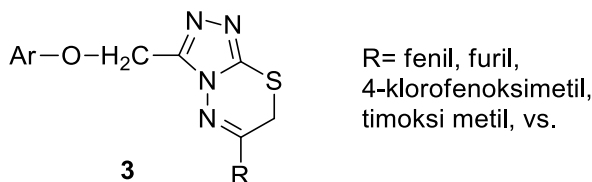


Şekil 2.1. Antimikrobiyal ve antifungal bileşiklerin yapıları

Rezaei ve arkadaşları (2009), sitokrom P450 14a-demetilazın (14_{DM}) inhibitörleri olarak yeni bir benzotriazol **1a**, **1b**, **1c** ve **2a**, **2b** serisinin sentezini ve değerlendirmesini tarif etmişlerdir. Bileşikler, sanal bir kütüphane oluşturularak ve enzim aktif bölgesine yerleştirilerek tasarlanmıştır. **1a**, **1b** ve **1c** analogları düşük antifungal aktiviteye sahipti. Aktivite, benzotriazol birimi (**1b** ve **1c** bileşikleri) ile

sübstitüe bir metoksi grubunun varlığıyla azaltılmıştır. Bileşik **2a**, test edilen mantarlar üzerinde güçlü inhibe edici etkiye sahiptir (Şekil 2.1).

Kalluraya ve arkadaşları (1996) **3** bileşiğini sentezledi. Daha sonra bazı N köprülü heterosikliklerin sentezinde kullanıldı, antibakteriyel ve antifungal aktiviteler açısından incelendi (Şekil 2.2).

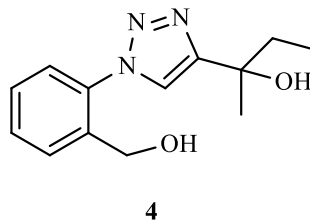


Şekil 2.2. **3** Bileşiğinin yapısı

2.1.2. Anti-inflamatuar aktivite

Enflamasyon, zara bağlı fosfolipidlerin araşidonik asit (AA) saldığı, ardından sikloksijenaz (COX) ve 5-lipoksijenaz (5-LOX) yollarını kullanan biyotransformasyon süreçleri tarafından takip edilen vücut dokularının karmaşık biyolojik bir sürecidir. İndometasin, ibuprofen ve naproksen gibi çeşitli steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID'ler), sikloksijenazı engelleyerek araşidonik asit metabolizmasını bloke eder. Bununla birlikte, bu ilaçlarla ilişkili yan etkiler, tıbbi kimyagerleri alternatif yapı iskeleleri geliştirmeye yönelmiştir.

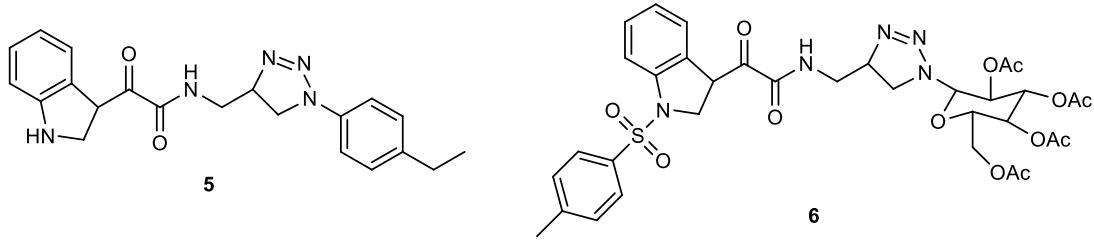
Jung grubu, bir seri fenil-1*H*-1,2,3-triazol türevi sentezledi ve biyolojik aktivitelerini inceledi. 25 mg/kg'lık aynı dozda, bileşik **4**, mevcut anti-inflamatuar ilaç diklofenaktan daha iyi etkiler gösterdi (Jung ve ark., 2015).



Şekil 2.3. **4** Bileşiğinin yapısı

Yar ve arkadaşları, klik kimyası yaklaşımını kullanarak *in vivo* anti-inflamatuar aktivite için 1,2,3-triazole bağlı indol-3-glioksamid türevlerini sentezlemişlerdir. İki bileşik **5** ve **6**, sırasıyla 0.058 ve 0.046'lık iyi COX-2 seçicilik indeksi (COX-2/COX-1)

ile mükemmel COX-2 (IC_{50} 0:12 μ M) inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir (Yar ve ark., 2018) (Şekil 2.4).

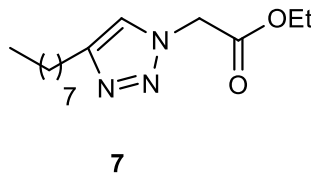


Şekil 2.4. 5 ve 6 Bileşiklerinin yapıları

2.1.3. Antitüberküloz aktivite

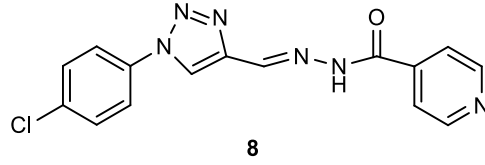
Mycobacterium tuberculosis'in neden olduğu bulaşıcı hastalıklardan biri olan tüberküloz (TB), dünya çapında halk sağlığı için ciddi bir risk olmaya devam etmektedir. Genel olarak, doğrudan gözlemlenen terapi stratejisi (DOTS), tüberküloz tedavisidir ancak çoklu ilaca dirençli TB'nin (MDR-TB) ve geniş ölçüde ilaca dirençli TB'nin (XDR-TB) ortaya çıkması zorluklar yaratmıştır. Bu nedenle, etkili TBC karşıtı ilaç adaylarının belirlenmesi büyük ilgi görmüştür.

Labadie ve arkadaşları, 1,2,3-triazol türevlerini sentezlemek için klik kimyasını kullandılar ve bunları *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium avium*'a karşı taramışlardır. Biyolojik tarama sonucu triazol **7** *M. tuberculosis*'e karşı standart ilaca göre daha önemli aktivite göstermiştir (Labadei ve ark., 2011) (Şekil 2.5).



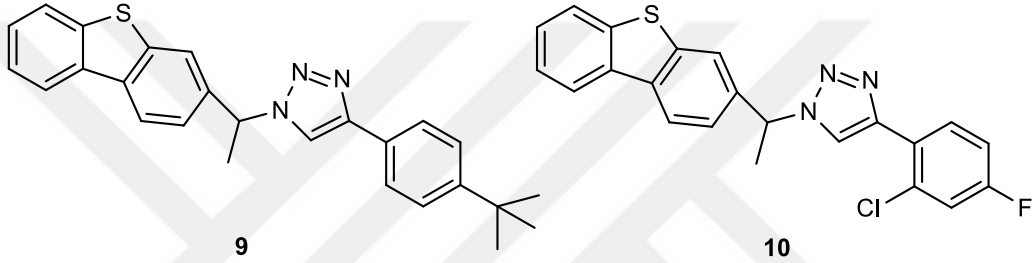
Şekil 2.5. *M. tuberculosis*'e karşı aktivite gösteren 1,2,3-triazol (7) bileşiği

İzoniazid türevleri, (E)-*N*'-[(1-aril)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metilen] izonikotinoil hidrazidler, **8**, minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değeri 0:62 μ g/mL olan önemli aktivite göstermiştir (Boechat ve ark., 2011).



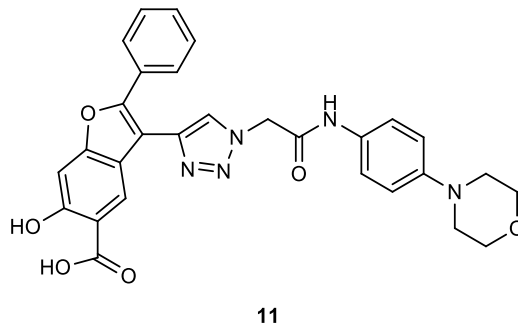
Şekil 2.6. 8 Bileşiğinin yapısı

Kantevari grubu, dibenzo[b,d]tiyofen bazlı *Mycobacterium tuberculosis* inhibitörlerinin sentezi için moleküler hibridizasyon yaklaşımı tanımladı. *M. tuberculosis* suşu H37Rv'ye karşı *in vitro* aktiviteleri en güçlü bileşikler **9** ve **10**, MIC= 0:78 µg/mL olarak bildirildi (Patpi ve ark., 2012) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. 9 ve 10 Bileşiklerinin yapısı

Zhang ve arkadaşları klik kimya stratejisi kullanarak sentezlenmiş triazol bazlı benzofuran salisilik asit türevi bileşik 16'nın etkili hücresel aktiviteye sahip güçlü bir anti-TB terapötik olduğunu bulmuşlardır (Zhou ve ark., 2010) (Şekil 2.8).



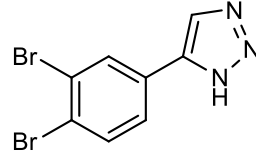
Şekil 2.8. 11 Bileşiğinin yapısı

2.1.4. Antikanser aktivite

Kanser önemli bir halk sağlığı sorunudur ve dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Taksol, vinkristin, vinblastin, kamptotesin türevleri, topotekan dahil

olmak üzere çok sayıda antikanser ajanın mevcut olmasına rağmen, farklı etki biçimlerine sahip yeni bileşiklerin araştırılması önemli ilgi görmüştür.

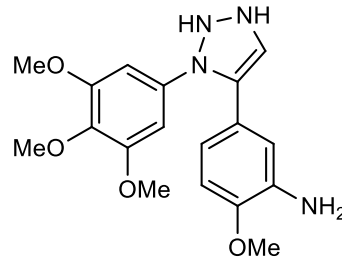
Kallander ve grubu insan metiyonin aminopeptidaz tip 2 (hMetAP2) inhibitörleri olarak 4-aril-1,2,3-triazol **12** bileşiğini bildirdi. Bu moleküllerin antikanser aktivitesi, enzimin aktif bölgesine bağlanmaya aktif olarak katkıda bulunan triazol parçasının N1 ve N2 azot atomlarından kaynaklanmaktadır (Kallander ve ark., 2005) (**Şekil 2.9**).



12

Şekil 2.9. **12** Bileşiğinin yapısı

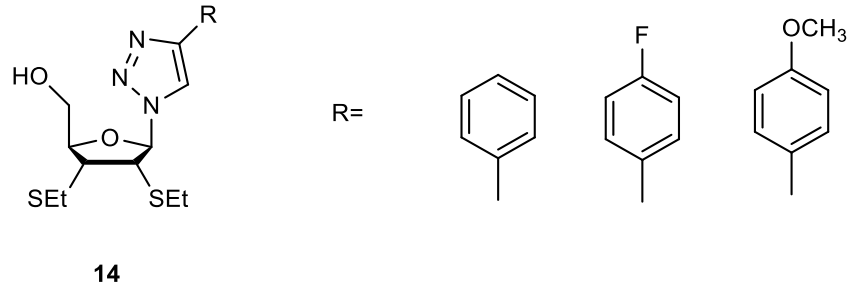
Odlo ve çalışma arkadaşları (2008), combretastatin A-4'ün bir dizi cis 1,5-disubstitüe 1,2,3-triazol analoglarını açıkladılar. Triazol türevlerinden biri **13**, nanomolar aralığında IC₅₀ değerleri ile çeşitli kanser hücre hatlarına karşı etkili sitotoksik aktivite gösterdi. Moleküler yerleştirme (docking) çalışması, triazol parçasının, çok sayıda amino asitle H bağı yoluyla β -tubulin ile etkileşime girdiğini göstermektedir.



13

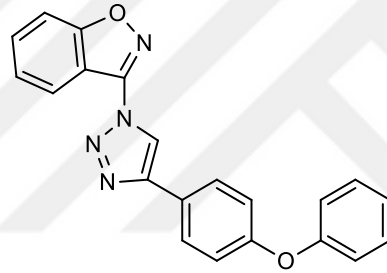
Şekil 2.10. **13** Bileşiğinin yapısı

Triazol ile modifiye edilmiş 20,30-dideoksi-20,30 dietantioribonükleozidler **14** serisi, kontrol ilacı floksuridin ile karşılaştırıldığında HepG2, A549 ve Hela hücre hatlarına karşı önemli ölçüde daha iyi antitümör aktivite ve HepG2, LAC ve Hela hücre hatlarına karşı daha yüksek sitotoksikite sergilemiştir (Yu ve ark., 2010) (**Şekil 2.11**).



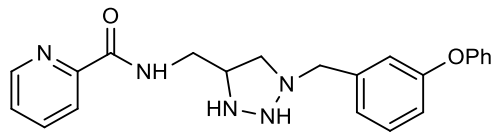
Şekil 2.11. 14 Bileşiğinin yapısı

Rangappa ve arkadaşları, 1,2,3-triazole bağlı bir dizi 1,2-benzisoksazol **15** hazırladılar ve insan akut miyeloid lösemi (AML) hücrelerine karşı kayda değer antiproliferatif etkisini belirlediler. MTT testi kullanılarak, 3-(4-(4-fenoksifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1 il benzo[d]izoksazolün MV4-11 hücrelerine karşı 2 μ M IC_{50} değeri ile en güçlü antiproliferatif ajan olduğu bulundu (2015) (**Şekil 2.12**).



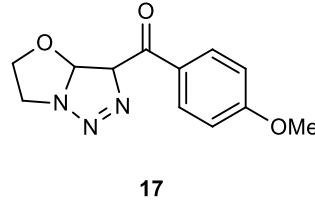
Şekil 2.12. 15 Bileşiğinin yapısı

Miller ve grubu (2010), klik kimyası yaklaşımını kullanarak bir dizi N-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il) metil) arilamid sentezini gerçekleştirdi ve bunların çoğalma antiproliferative önleyici aktivitelerini inceledi. Bileşik **16**'dan biri, MCF-7 insan meme tümör hücrelerine karşı 46 nM'lik bir IC_{50} sergiledi (**Şekil 2.13**).



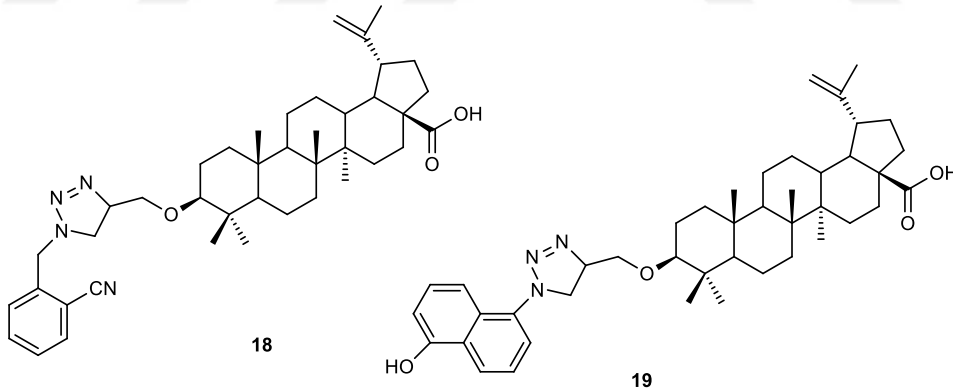
Şekil 2.13. 16 Bileşiğinin yapısı

Lin ve arkadaşları (2010), bir dizi heterosiklik ile kaynaşmış 1,2,3-triazol sentezlediler ve sitotoksik aktivitelerini değerlendirdiler. A431 ve K562 insan tümör hücre hatlarına karşı 1.9 µg/mL'den düşük IC₅₀ değerleri ile 4-metoksifenil süstitüe 1,3-okzazoheterosiklik kaynaşmış 1,2,3-triazol **17**'nin en güçlü türev olduğu bulunmuştur (Şekil 2.14).



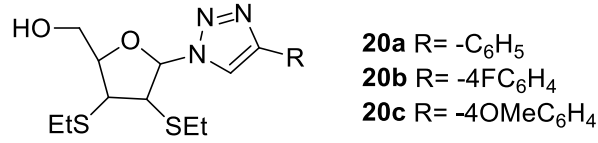
Şekil 2.14. **17** Bileşiğinin yapısı

Betulinik asidin 1,2,3-triazol türevleri Koul ve arkadaşları tarafından sentezlendi ve dokuz insan kanser hücre hattına karşı sitotoksik aktiviteleri değerlendirildi. İki molekül **18** ve **19**, lösemi hücre hattı HL-60'a (betulinik asitten 5-7 kat daha yüksek potensiyel) karşı dikkate değer IC₅₀ değerleri (sırasıyla 2.5 ve 3.5 µM) sergiledi (Majeed ve ark.; 2013) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. **18** ve **19** Bileşiklerinin yapısı

Bir dizi yeni 2',3'-dideoksi-2',3'-dierandioribo nükleosid bir triazol halkası **20** olarak modifiye edilerek antikanser aktiviteleri rapor edildi. Triazol halkalı nükleosidler, örn. **20a**, **20b** ve **20c**, geniş bir tümör hücre dizisi yelpazesine yönelik aktiviteyi önemli ölçüde artırmıştır (Yu ve ark., 2010) (Şekil 2.16).



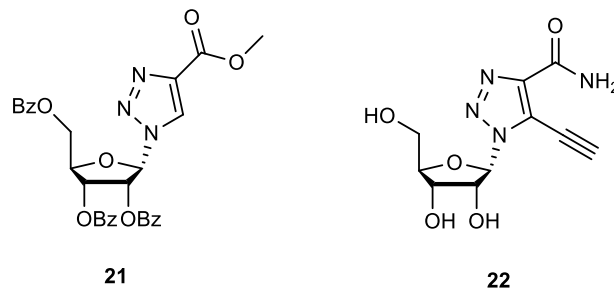
Şekil 2.16. 20 Serisinin yapıları

2.1.5. Antiviral aktivite

Virial hastalıklara, bir organizmanın vücudunu enfekte eden virüsler neden olur. Virial enfeksiyonların tedavisinde aşılarda ve antiviral ilaçlar kullanıldığında, yeni virüslerin ortaya çıkması tüm dünyada sağlık açısından risk oluşturmaktadır. Bu nedenle alternatif antiviral ajanların geliştirilmesi önemli bir ilgi konusudur.

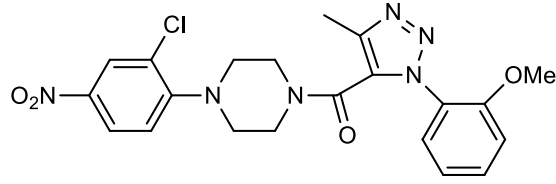
Boechat ve çalışma arkadaşları 1,2,3-triazol nükleozid ribavirin analoglarının sentezini bildirdiler ve antiviral aktivitelerini incelediler. Sentezlenen bileşik **21**, Influenza A ve insan immün yetmezlik virüsü tip 1'den (HIV-1 RT) ters transkriptaz (RT) için IC₅₀ değerleri sırasıyla 14 ve 3.8 µM ile güçlü aktivite sergiledi (Maria ve ark., 2014).

Ribavirin analogları (4,5-disübstitüe 1,2,3-triazol nükleozidleri) Zeidler ve arkadaşları tarafından sentezlendi ve biyolojik aktiviteleri tarandı. 5-etinil nükleozid **22**, influenza A (H1N1, H3N2 ve H5N1), influenza B, kızamık ve respiratuar sinsityal virüslere karşı etkili virüs önleyici aktivite sergiledi (Krajczyk ve ark., 2014) (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. 21 ve 22 Bileşiklerinin yapıları

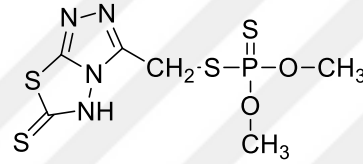
Ding grubu (2012), virüs nükleoproteinini hedef aldı ve anti-grip ilacı gelişimi için 1,2,3-triazol-4-karboksamid türevlerini sentezledi. Bileşik **23**, 0.5 ila 4.6 µM arasında değişen IC₅₀ değerleri ile çeşitli H3N2 ve H1N1 influenza A virüs suşlarının replikasyonunu inhibe etti (Şekil 2.18).



23

Şekil 2.18. 23 Bileşiğinin yapısı

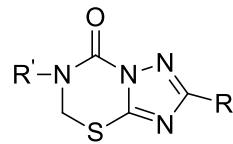
Chande ve Jagtap (1997) süstitüe S-triazol ve kaynaşmış halka heterosiklikleri içeren organofosfor bileşiklerini **24** sentezlediler ve böcek öldürücü aktivite açısından taradılar. Önemli aktiviteye sahip birkaç bileşik bildirilmiştir (Şekil 2.19).



24

Şekil 2.19. 24 Bileşiğinin yapısı

Liu ve arkadaşları (2000) flor içeren, bir grup yoğunlaştırılmış triazoletiadiazinon türevini **25** sentezlemiş ve bunları fungusidal ve insektisidal aktiviteler açısından değerlendirmişlerdir. Bileşik **25**, ev sivrisinek larvalarına (*Cluex pipiens molestus* Forskae) karşı 300 g L⁻¹'de % 90 insektisidal aktivite göstermiştir (Şekil 2.20).



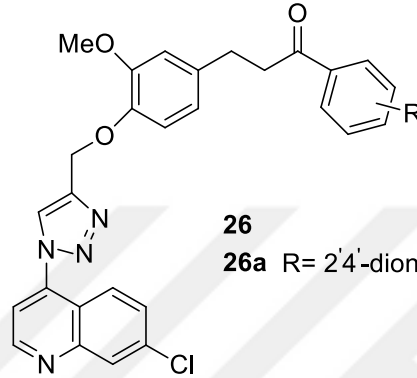
25 (a-h)

- 25a** R= 2-FC₆H₄; R'⁼ C₂H₅
25b R= 3-FC₆H₄; R'⁼ C₂H₅
25c R= 4-FC₆H₄; R'⁼ C₂H₅
25d R= 2,4-di-Cl-5-F-C₆H₂; R'⁼ C₂H₅
25e R= 2-FC₆H₄; R'⁼ C₆H₅
25f R= 3-FC₆H₄; R'⁼ C₆H₅
25g R= 4-FC₆H₄; R'⁼ C₆H₅
25h R= 2,4-di-Cl-5-F-C₆H₂; R'⁼ C₆H₅

Şekil 2.20. 25 Serisinin yapısı

2.1.6. Antimalaryal aktivite

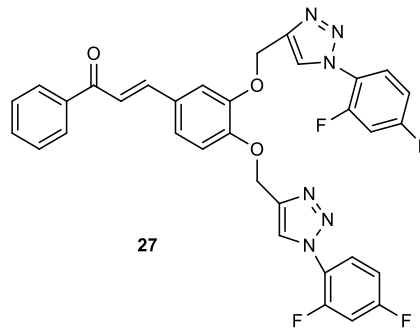
Bir dizi triazole bağı kalkon ve dienon hibrid bileşiği **26** sentezlendi ve *in vitro* antimalaryal aktiviteleri açısından değerlendirildi (Guantai ve ark., 2010). Birkaç kalkonklorokinolin hibrid bileşiğinin aktif olduğu 3-{4-[1-(7-kloro-kinolin-4-il)-1*H*-[1,2,3] triazol-4-il-metoksi]-3-metoksifenil}-1-(2,4-dimetoksifenil)-propenon **26a** *Plasmodium falciparum*'un D10, Dd2 ve W2 suşlarına karşı en aktif olanıydı (Şekil 2.21).



Şekil 2.21. 26 Bileşiğinin yapısı

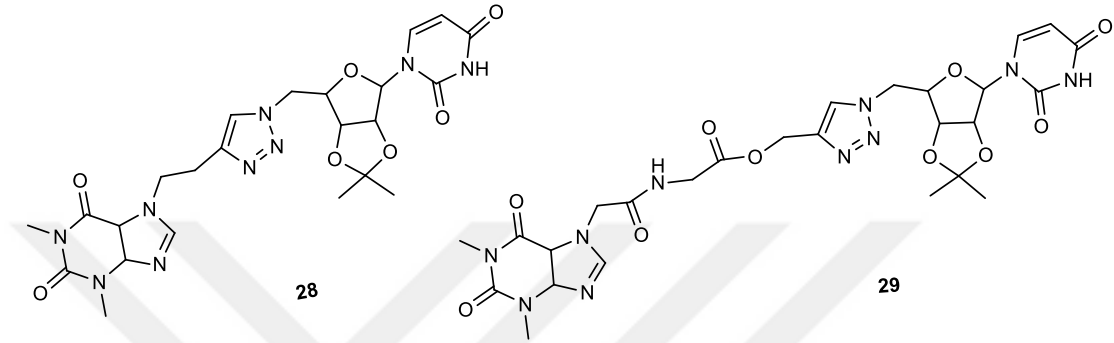
2.1.7. Antimikrobiyal aktivite

Mantar ve bakteriyel enfeksiyonlar, insan ve hayvanların yaşamı için ciddi endişeler yaratır. Mevcut ilaçların etkisizliği ve artan dirençli suşlar, yeni antimikrobiyal ajan sınıflarına önemli ilgi gösterilmesini gerektirmektedir. Agarwal ve arkadaşları, klik kimyası ile kalkonların ve flavonların 1,2,3-triazol türevlerini sentezlediler ve bunların antimikrobiyal ve antiplazmodiyal aktivitelerini taradılar. **27**'yi içeren birkaç bileşik umut verici antifungal ve antibakteriyel aktivite gösterdi (Kant ve ark., 2016) (Şekil 2.22).



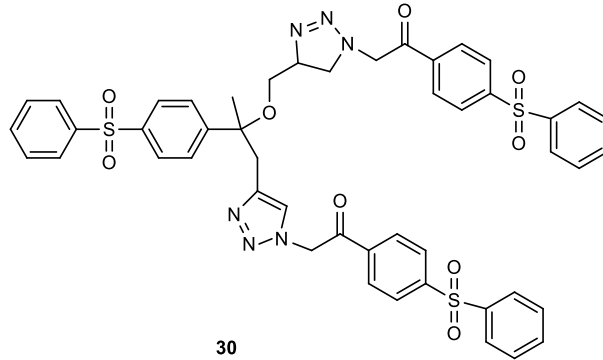
Şekil 2.22. 27 Bileşiğinin yapısı

Murugulla grubu, 1,2,3-triazollerini içeren teofilinin, (theophylline) varyant nükleozit türevleri ile antimikrobiyal aktivitesini inceledi. Bileşik **28**'in, 0.0156, 0.03125, 0.0625 mg/mL MIC değerleri ile üç bakteri suşu *B. cereus*, *Escherichia coli* ve *P. aureoginosa*'ya karşı güçlü ve etkili olduğu gösterildi. MIC değerleri 0.03125, 0.0156, 0.0625 mg/mL olan bileşik **29**'un sırasıyla *S. aureus*, *B. cereus* ve *Escherichia coli*'ye karşı etkili olduğu bulunmuştur (Ruddarraju ve ark.; 2016) (**Şekil 2.23**).



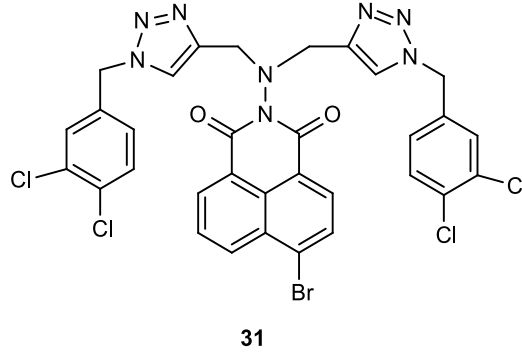
Şekil 2.23. **28** ve **29** Bileşiklerinin yapısı

Yeni 1,2,3-triazoller içeren diaril sülfon, Jørgensen ve çalışma arkadaşları tarafından sentezlendi ve biyolojik değerlendirmeleri de yapıldı. Bileşik **30**'un, 25 µg/mL'de MIC değeri olan en güçlü antifungal ajanlar olduğu bulundu (Mady ve ark.; 2014) (**Şekil 2.24**).



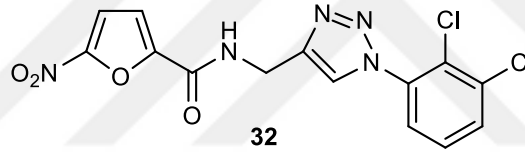
Şekil 2.24. **30** Bileşiğinin yapısı

Zhou ve arkadaşları potansiyel antimikrobiyal aktivite için bir dizi 1,2,3-triazol türevli naftalimid bildirdi. Biyoaktif tahlil, **31**'in mevcut ilaçlardan Norfloxacin ve Chloromycin'den daha iyi anti-*Escherichia coli* aktivitesi gösterdiğini ortaya koydu (Peng ve ark.; 2014) (**Şekil 2.25**).



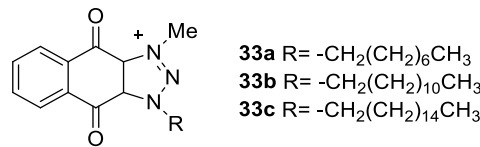
Şekil 2.25. 31 Bileşiminin yapısı

5-nitrofuran-triazol türevi Kamal ve grubu tarafından hazırlandı ve biyolojik aktivitesi incelendi. Diğer bileşikler arasında **32**, *C. albicans* ve *C. parapsilosis*'e karşı standart mikonazole (MIC= 7.8 µg/mL) ile karşılaştırıldığında umut verici antibakteriyel aktivite (farklı bakteri suşlarına karşı MIC= 1.9 µg/mL) ve antifungal aktivite (MIC= 3.9 µg/mL) sergiledi (Kamal ve ark., 2015) (Şekil 2.26).



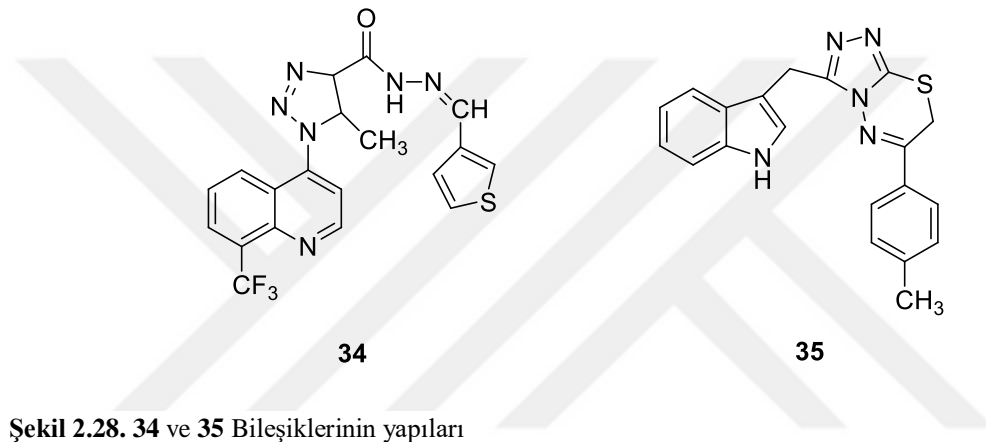
Şekil 2.26. 32 Bileşiminin yapısı

Yeni bir katyonik antrakinon sınıfı benzerleri **33** sentezlenmiştir (Zhang ve ark., 2011). Bunlar arasında **33a**, yüksek aktivite (MIC <1 µg/mL) ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) dahil olmak üzere Gram pozitif patojenlere karşı seçicilik yaparken Gram negatif bakterilere karşı mütevazı aktivite gösterdi. **33b** ve **33c** bileşikleri, ticari olarak temin edilebilen diğer katyonik antiseptik kimyasallarla karşılaştırılabilen MRSA ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE) dahil olmak üzere geniş antibakteriyel aktivite sergiler (Şekil 2.27).



Şekil 2.27. 33 Bileşiminin yapısı

Holla ve arkadaşları (2005) N-[1-arilmetilen]-1-[8-(triflorometil)kinolin-4-il]-5-metil-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbonhidrazidler ve 1-aril-4-{1-[8-(triflorometil)kinolin-4-il]-5-metil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}prop-2-en-1-triazol ve kinolin birimleri içeren bir dizi Schiff bazı sentezini gerçekleştirdi. Bileşikler, *E. coli*, *Psuedomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus fumigatları*, *Candida albicans*, *Penicillium marneffe* ve *Trichophyton mentagrofıterine* karşı antimikrobiyal aktiviteleri açısından tarandı. En aktif bileşik **34**, standardinkine neredeyse eşit olan tüm bakteriyel ve fungal suşlara karşı maksimum antimikrobiyal aktivite sergiledi (**Şekil 2.28**).



Şekil 2.28. 34 ve 35 Bileşiklerinin yapıları

2.2. 1,2,3-Triazollerin Tirozinaz, Pankreatik Lipaz ve Asetilkolinesteraz Enzimlerine Karşı Etkileri

Enzimler, protein olarak da bilinen bir peptit bağı ile birleştirilen uzun bir amino asit zincirinden oluşan katalizörlerdir. Bunlar, substratın spesifik bölgesine bağlanarak herhangi bir reaksiyonu aktive etmek için kullanılır. Enzimler, hareketlerinde özeldir ve aktiviteleri, substratın konsantrasyonuna, sıcaklık ve pH gibi diğer fiziksel koşullara bağlıdır. Bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi çok çeşitli kaynaklardan elde edilebilen enzimler santrifüj ve diğer damıtma yöntemleri kullanılarak saflaştırılabilirler, oysa mikrobiyal enzimler, geniş sıcaklık ve pH aralıkları nedeniyle bitki ve hayvanlardan elde edilenlerden daha fazla uygulama bulurlar. Enzim Komisyonu ile enzimler sınıflandırılarak farklı EC kodları ile isimlendirmeler yapılır. Bu komisyon tarafından enzimler yapılarına, işlevlerine ve reaksiyonlarının doğasına göre sınıflandırılır. Enzimler birçok sağlık sorununun çözümünde faydalı olmakla birlikte insan beslenmesindeki eksikliklerin giderilmesinde de kullanılmaktadır. Ayrıca enzimler, gıda

endüstrisi, ilaç endüstrisi, tekstil endüstrisi, polimer endüstrisi ve kağıt endüstrisi dahil olmak üzere birçok endüstride bileşiklerin, ürünlerin imalatında veya birçok biyolojik ve kimyasal reaksiyonu hızlandırmak için kullanılmaktadır.

Tirozinaz, melanin biyosentezinde ve pigmentasyonda fonksiyon gören, Cu içeren glikoprotein yapısında olan tirozinden dopa sentezini katalizleyen bir enzimdir. Gıda, farmakoloji, kozmetik ve çevre alanlarında kullanımları vardır. Çevresel etkenler ve yaşlılık neticesinde oluşan derideki pigmentasyon problemlerinin çözümü için tirozinaz enzimi inhibitörlerinin tespiti araştırmaları son yıllarda gittikçe önem kazanmıştır. Tirozinaz enzimi inhibisyon çalışmaları için farklı triazol ile ilgili çalışmalar çok ilgi çekmekte ve önem kazanmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, yeni sentezlenen benzimidazol-1,2,3-triazol molekül serisinin mantar tirozinaz enzim inhibisyon etkisi araştırılmış ve referans ilaç olan kojik asite eşdeğer IC_{50} değerine sahip olduğu rapor edilmiştir (Mahdavi ve ark., 2018). Benzer şekilde triazol Schiff baz türevlerinin tirozinaz enzimini kuvvetli bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (Yu ve ark., 2015).

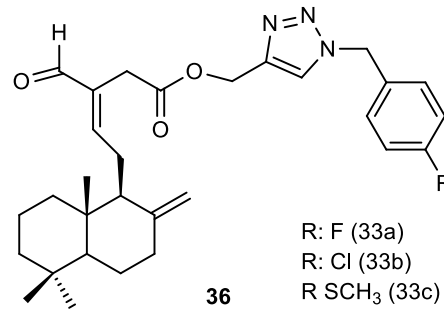
Tehrani ve grubu tarafından 2019 yılında triazolil-izoindolin-1,3-dion türevleri sentezlendi ve karakterize edildi. Bileşikler, tirozinaz inhibitör aktiviteleri açısından değerlendirildi. Elde edilen verilere göre, 2-bromofenil ve 2-nitrofenil kısımları içeren bileşikler, sırasıyla 26.55 ± 2.31 ve 26.20 ± 1.55 μM IC_{50} değerleri ile tirozinaza karşı en güçlü bileşikler olduğu rapor edilmiştir.

Ashooriha ve arkadaşları (2019) yeni güçlü tirozinaz inhibitörleri bulmak amacıyla, ariloksimetil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il parçası taşıyan kojik asit türevlerini tasarladı ve klik reaksiyonu yoluyla sentezledi. Tasarlanan molekülün ariloksi kısmı, moleküler optimizasyon ve yapı-aktivite ilişkileri çalışması için değiştirildi. Tüm bileşikler, referans ilaç kojik asitten 0.06-6.80 μM aralığında IC_{50} değerleri ile çok güçlü anti-tirozinaz aktivitesi gösterdi. Sonuç olarak Naftiloksi analoglarının kojik asitten 31-155 kat daha güçlü olduğu bulundu.

Obezite beslenme ve sosyal yaşam sorunları sebebiyle son yıllarda insidansı ivmeli bir şekilde yükselen küresel ortak bir sağlık problemi haline gelmiştir. Obezite durumu dislipidemi sonucunda koroner kalp hastalıkları, alkol kaynaklı olmayan karaciğer yağlanması, hipertansiyon ve Diabetes mellitus gibi metabolik hastalıkların en önemli sebeplerinden sayılmaktadır. Pankreatik lipaz enzimi ince bağırsakta lipidleri parçalayarak şilomikronlar olarak emilimini sağlarlar. Bu sebeple pankreatik lipaz inhibitörlerinin obezite ile mücadele etmede katkıları oldukları düşünülmektedir.

Pankreatik lipaz enzimi üzerine de farklı triazol türevlerinin inhibitör etkileri literatürde geniş bir şekilde bulunmaktadır. Literatürde 1,2,4-triazol bileşikleri ve türevlerinin pankreatik lipaz enzimi üzerine inhibitör etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma vardır (Menteşe ve ark., 2013; Bekircan ve ark., 2014; 2015; Kahveci ve ark., 2015). 1,2,3-Triazollerin pankreatik lipaz inhibitörü olarak araştırıldığı yayın sayısı çok azdır. Bu kapsamdaki bir çalışmada bir grup benzimidazol ve bisbenzimidazol sentezlenmiş ve pankreatik lipaz enzimini kuvvetli inhibe ettiği moleküller rapor edilmiştir (Menteşe ve ark., 2018).

Bir dizi geleneksel bitki, lipaz inhibe edici aktiviteler gösterdi. Bu ilhamla Jalaja ve arkadaşları (2018) Curcuma amada'dan (E)-Labda-8(17),12 dien-15,16-dial izole ettiler ve doğal kaynaklı bir diterpenoid olan labdan ekli yeni triazol analoglarını sentezlediler ve bunları pankreas lipaz enzimine karşı taradılar. *In vitro* inhibitör çalışmalarda, benzil azid süstitüe bileşiklerin iyi ile orta düzeyde lipaz inhibitörleri olduğu, buna karşın fenasil azidlerin süstitütüe edildiği hibritlerin çoğunun inaktif olduğu bulunmuştur. Para süstitüe floro (33a), kloro (33b) ve tiyometil (33c) benzen içeren bileşikler, sırasıyla 1.1 ± 0.53 , 1.25 ± 0.78 ve 1.65 ± 0.93 μM IC_{50} değerine sahip güçlü lipaz inhibitörleridir. Bununla birlikte, triazol hibritlerine sahip süstitüe olmayan, orto- ve meta-süstitüe benzil azid orta derecede aktivite göstermiştir.



Şekil 2.29. Pankreatik lipaz inhibitörü olan 1,2,3-triazoller

Asetilkolinesteraz enzimi, merkezi ve periferal sinir sistemi, kolinerjik ve adrenerjik sistem (parasempatik ve sempatik), sinir ve kas dokularında, eritrositlerde ve plasental dokularda bulunmaktadır. Asetilkolinesteraz sinaptik boşluklarda bulunan asetilkolini, asetat ve kolin bileşiklerine dönüştüren bir enzimdir. Alzhemier's hastalığının tedavisinde asetilkolin esteraz enzimi inhibitörlerinin tespiti araştırmaları son yıllarda gittikçe önem kazanmıştır.

Asetilkolinesteraz enzimi inhibisyon araştırmaları için de farklı triazoller ile ilgili çalışmalar çok ilgi çekmekte ve önem kazanmaktadır. Alzheimer's hastalığı tedavisinde kullanılan Asetilkolinesteraz enzimi inhibisyonu için bir seri triazol sentezlenmiş ve önemli inhibisyon miktarları belirtilmiştir (Xu ve ark., 2019). Diğer bir çalışmada da Alzheimer's hastalığı tedavisinde kullanılan asetilkolinesteraz enzimi inhibisyonu için takrin-kumarin bağlı bir seri 1,2,3-triazol türevleri sentezlenmiş ve enzim inhibisyon değerleri belirlenmiştir (Najafi ve ark., 2017).

Anjaneyulu ve arkadaşları tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada yeni bir dizi fosforil/tiofosforil glukosil-1,2,3-triazol türevleri sentezlenmiş ve AChE aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlar 1,2,3-triazol bileşiklerinin AChE inhibitörü olabileceklerini göstermiştir (Anjaneyulu ve ark. 2021).

Najafi ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir başka çalışmada ise takrin-1,2,3-triazol türevleri sentezlenmiş AChE ve BChE aktivitesi araştırılmıştır. Bazı takrin-1,2,3-triazol türevlerinin oldukça yüksek anti-AChE ve anti-BChE aktivitesi gösterdikleri rapor edilmiştir (Najafi ve ark. 2017).

Samaneşadat Hosseini (2022) ve grubu tarafından yeni aril triazol asetamid türevlerine konjuge 4-naftokinon sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin Anti-ChE aktiviteleri incelenmiştir. Sentezlenen türevler arasında orto-klor parçası taşıyan bileşik en güçlü inhibitör olduğu deneysel sonuçlar ile kanıtlanmıştır (Samaneşadat Hosseini ve ark., 2022).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Triazol iskelet yapısı içeren moleküller, tıbbi ve biyolojik açıdan ilgi çeken önemli yapı taşları olan kimya ve farmasötik kimya gibi alanlarda çok farklı amaçlar için kullanılan organik bileşiklerdir. Yeni 1,2,3-triazol bileşiklerinin sentezi ile ilgili araştırmalar her geçen gün artarak devam etmektedir. 1,2,3-Triazol bileşiklerinin göstermiş olduğu biyolojik aktivitelerden yola çıkarak, 1,2,3-triazol iskelet yapısını içeren yeni bileşiklerin sentezi amaçlandı. Yüksek lisans tez çalışmaları üç basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamak 1,2,3-triazol iskelet yapısı içeren yeni hibrit moleküllerin sentezi, çalışmanın ikinci basamağında; yeni sentetik bileşiklerin inhibisyon çalışmaları tirozinaz, asetilkolinesteraz ve pankreatik lipaz enzimleri ile *in vitro* gerçekleştirilerek, bunlara ait IC₅₀ değerleri hesaplandı ve potansiyel inhibitör etkileri belirlendi. Üçüncü basamakta ise sentezlenen yeni 1,2,3-triazol bileşiklerinin antioksidan aktivitelerini belirlemek için ABTS ve DPPH·radikal giderme metotları ile FRAP ve CUPRAC indirgeme kapasitesi tayini metotları ayrı ayrı çalışılmıştır. Bu doğrultuda, uygulanması kolay olan, daha ucuz ve daha yüksek verimli sentezlere imkan sağlayacak özgün sentez yaparak enzim inhibisyonu ve antioksidan aktivite gibi biyolojik aktivite çalışmaları yapmayı hedefledik.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasal maddelerin saflık dereceleri oldukça yüksek olup herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanılmıştır. Silikajel 60 HF₂₅₄₊₃₆₆ (preperatif) (Merck) ince tabaka kromatografisi (İTK) için, silikajel 60 (70-230 mesh ASTM) (Merck) kolon kromatografisi için kullanıldı. Ftalimit (Merck), azidometil benzonitril (Sigma), benzil azit (Sigma), 1-azidometil-2-metil benzen (Sigma), lipaz (domuz pankreasından) (Merck), asetilkolinesteraz (Sigma), tirozinaz (Sigma), 4-nitrofenil bütirat (Chempur), sodyum L-askorbat (Sigma), KH₂PO₄ (Sigma), L-tirozin (Merck), Trisma (Merck), Asetilkolin iyodat (Merck), 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit (Sigma), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma), 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (Sigma), potasyum persülfat (Sigma), CuCl₂ (Sigma), neokuprin (Sigma), K₃Fe(CN)₆ (Sigma) Trikloroasetik asit (Sigma), FeCl₃ reaktifleri ile aseton (Merck), metanol (Merck), dikloro metan (DCM) (Honeywell), etilasetat

(Honeywell), hekzan (Honeywell), dimetil formamit (DMF) (Honeywell) çözücülerini kullandı.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- NMR analizleri Bruker Biospin Avance III 400 MHz NMR Spektrometresi,
- Kütle analizleri Agilent LC/MS-TOF Spektrometresi,
- IR spektrumları Perkin Elmer Precisely Spectrum One FT-IR Spektroskopisi,
- Enzim Aktivasyonu Shimadzu UV-1601 Spektrofotometre
- Kurutma işleminde Nüve EN 018 etüv
- Karıştırma ve ısıtma işlemlerinde Heidolph magnetik ısıtıcılı karıştırıcı,
- Çözücülerin uzaklaştırılması işlemlerinde, Heidolph rotary evaporatör,
- Rad-wag marka analitik hasas terazi,
- Thermo Scientific erime noktası ölçüm cihazı,
- Reaksiyonların ince tabaka kromatografisi ile takibi için CAMAG marka UV-lamba

3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Tirozinaz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tamponu (0.1 M, pH: 6,80); 1.36 g KH_2PO_4 bir miktar saf suda çözüldü ve pH: 6,80'e ayarlandıktan sonra saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. *L*-tirozin çözeltisi (10mg/mL); 10 mg *L*-tirozin 10 mL fosfat tamponunda (0.1M, pH: 6,80) çözüldü.

3.2.2. Asetilkolinesteraz enzimi aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. Tris-HCl tamponu (1 M pH:8,0); 30,27 g Tris ile 0,370 g EDTA tartıldı ve 200 mL destile suda çözüldü. pH: 8,0'a (0,1 M HCl ile) ayarlanarak hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
2. Asetilkolin İyodat çözeltisi (10 mM'lık); 0,145 g Asetilkolin iyodat 50 mL saf suda çözüldü.

3. DTNB (Ellman's Reagent) (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoik asit) çözeltisi (10 mM'lık); 0,01 g DTNB ve 0,5 g sodyum sitrat tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

3.2.3. Pankreatik lipaz enzimi aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. 4-Nitrofenil bütirat (10mM); 17,5 µl 4-Nitrofenil bütirat 10 mL asetonitrilde çözüldü. Her ölçümden önce taze olarak hazırlandı.

2. Tris-HCl tamponu (0,05 M, pH=8,0); 1,5 g Tris tartıldı ve 200 mL saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 0,1 M HCl ile pH:8,0'a ayarlandı ve hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

3. Pankreatik lipaz; Enzim 5 mg/mL olacak şekilde 0,05 mM Tris-HCl, pH:8,0 tamponunda çözüldü. Çözülen enzim 4000 rpm'de 10 dk. santrüfuj edilerek süpernatant kullanıldı.

3.2.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltilerin hazırlanması

1. DPPH-çözeltisi; Serbest radikal olarak 1 mM DPPH çözeltisi için alüminyum folyo ile kaplanmış bir beher içerisinde 19 mg DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) 50 mL etanolde tamamen çözününceye kadar magnetik karıştırıcı ile karanlık ortamda yaklaşık 12 saat boyunca karıştırıldı.

3.2.5. ABTS⁺ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltilerin hazırlanması

1. ABTS (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) çözeltisi (1 mM); 54 mg 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit üzerine 100 mL saf su eklendi ve 6 saat karanlık ortamda manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözülmesi sağlandı.

2. Potasyum persülfat çözeltisi (2,45 mM); 66,25 mg K₂O₈S₂ (potasyum persülfat) 0,1 M fosfat tamponunda (pH= 7,40) bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.2.6. Kuprak (CUPRAC) yöntemi indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. CuCl₂ çözeltisi (0,01 M); 85 mg CuCl₂ maddesi 50 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

2. Neokuprin çözeltisi (7,5 mM); 78 mg neokuprin 50 mL etanolde çözüldü.

3.2.7. Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme (FRAP) kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

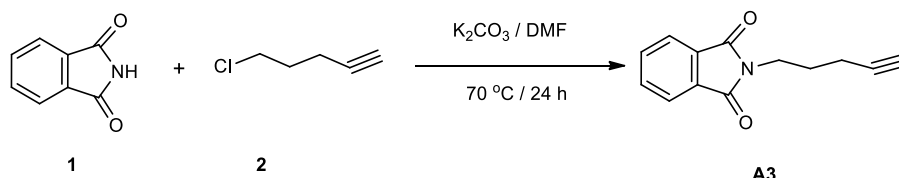
1. K₃Fe(CN)₆ çözeltisi (% 1); 1 g K₃Fe(CN)₆ 99 mL saf suda çözülerek hazırlandı.
2. TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisi (%10); 5 g TCA 45 mL saf suda çözülerek hazırlandı.
3. FeCl₃ çözeltisi (%0,1); 0,1 g FeCl₃ saf suda çözülerek çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

3.3. Yöntem

3.3.1. Bileşiklerin sentez yöntemleri

3.3.1.1. 2-(pent-4-in-1-il)izoindolin-1,3-dion bileşiğinin (A3) sentezi

Çalışmanın ilk basamağında tez kapsamında hedeflenen yeni sentetik ürünlerin ana iskeletini oluşturan anahtar bileşik 2-(pent-4-in-1-il)izoindolin-1,3-dion bileşiği (A3), 5-kloro-1-pentinin (2) ftalimid ile 70 °C'de K₂CO₃/DMF karışımı içinde 24 saat boyunca geri soğutucu altında literatürde bilinen bir yöntemle sentezlendi (Yu ve ark., 2009) (Şekil 3.1).

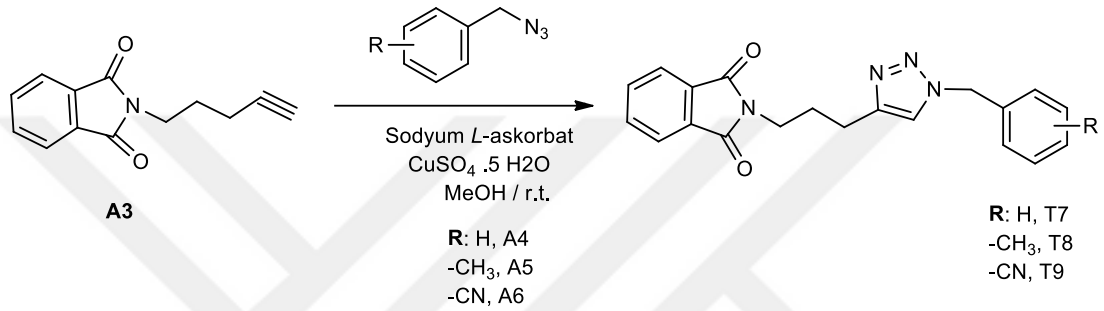


Şekil 3.1. A3 Bileşiğinin sentezi

3.3.1.2. 1,2,3-Triazol türevlerinin sentezi

1,2,3-Triazol ve ftalimit halkalarının biyolojik önemi nedeniyle, araştırma ilimiz biyolojik olarak daha etkili yeni bir motif oluşturmak için her iki parçayı nasıl birleştireceğimiz olmuştur. Her iki birim de çok geniş bir biyolojik aktivite aralığına sahip olduğundan ve ilaçlardan biyokonjugasyon ile çok çeşitli biyolojik aktivite gösteren bileşiklerin sentezlerinde kullanılmaları nedeniyle, bu çeşitli ve heyecan verici özelliklerinden esinlenerek, yeni hibrit 1,2,3-triazol ve ftalimit halkası içeren türevlerin (T7, T8, T9) sentezleri gerçekleştirilmiştir. Worell ve arkadaşlarının 2013 yılında

azitlerden 1,2,3-triazol sentezi için önerdikleri prosedür modifiye edilerek **A3** bileşiğinin Cu^{+2} katalizörlüğünde çeşitli azit türevleri (**A4**, **A5**, **A6**) ile 1,3-dipolar sikloadisyon tepkimesi gerçekleştirilerek literatürde olmayan, hedef ürünler olan yeni **T7**, **T8** ve **T9** bileşikler sentezlenmiştir. Böylece, yeni sentetik 1,2,3-triazol türevleri (**T7**, **T8**, **T9**) elde edilmiştir. Hedef ürünlerin (**T7**, **T8**, **T9**) yapıları $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRMS, IR ve EN tayinleri yardımıyla karakterize edilmiştir. Hedef ürünlerin farmasötik uygulamalar başta olmak üzere birçok alanda yeni çalışmalara öncülük etmesi beklenmektedir (**Şekil 3.2**).



Şekil 3.2. 1,2,3-Triazol türevlerinin sentezi

3.3.2. Enzim aktivite yöntemleri

3.3.2.1. Tiroinaz enzimi aktivite yöntemi

Sentezlenen 1,2,3-Triazol bileşiklerinin tirozinaz enzimi üzerinde monofenolaz aktivitesine bağlı inhibisyonu spektrofotometrik olarak 490 nm’de absorbans vermesi esasına dayanmaktadır. Absorbans ölçümleri çoklu okuyucuda (multiplate reader) 96 kuyucuklu plateler kullanılarak yapıldı (Zheng, 2008).

3.3.2.2. Asetilkolinesteraz enzimi aktivite yöntemi

Asetilkolinesteraz enzimi asetilkolinin hidrolizini katalizleyerek asetilkolinin tiyokolun ve asetata dönüşmesini sağlayan bir enzim olarak bilinmektedir. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan DTNB ise tiyokolun ile reaksiyonu sonucunda 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşmaktadır. 412 nm’de oluşan sarı renkli bileşiğin renk şiddeti ölçüldü (Ellman ve ark., 1961).

3.3.2.3. Pankreatik lipaz enzimi aktivite tönemi

Pankreatik lipaz enzim aktivite ölçümü para-nitro fenil bütiratın lipaz enzimiyle parçalanma ürünü olan p-nitro fenolün spektrofotometrik olarak 405 nm'de absorbans vermesi esasına dayanmaktadır. Absorbans ölçümleri 96 kuyucuklu plateler kullanılarak multiplate reader da yapıldı (Sridhar, 2020).

3.3.3. Antioksidan tayinleri

Antioksidan metotlarında kullanılmak üzere hazırlanan 1,2,3-triazol numuneleri 10 mg/mL olarak hazırlandı. Antioksidan tayini yöntemlerinde BHT, C vitamini, E vitamini ve pirogallol standart maddeler kullanıldı ve numunelerin antioksidan aktiviteleri bu standartlar ile karşılaştırmalı olarak belirlendi.

3.3.3.1. DPPH serbest radikal giderme aktivite tayini

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikalinin kullanıldığı bu yöntem maddelerin radikal giderme aktivitelerini ölçmede kullanılan en yaygın ve en genel yöntemlerden biridir. Blois metodunun (Blois, 1958) güncellenmiş bir versiyonu DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayininde kullanılmıştır (Bursal ve ark., 2019). DPPH radikali organik yapılı 517 nm'de absorbans verebilen mor renkli radikaldır ve antioksidan bileşikler ile reaksiyona girerek, radikal olmayan DPPH-H'a dönüşmektedir. DPPH-H, 517 nm'de absorbans vermediği için azalan absorbans miktarından serbest radikal giderme aktivitesi ve antioksidan aktivite hesaplanmıştır. Bu yöntemde DPPH radikali ile muhtemel antioksidan özelliği olan 1,2,3-triazol türevleri ile reaksiyona girmesi sağlanır. Reaksiyon sonucu meydana gelen sarı rengin nedeni DPPH radikallerini antioksidan maddelerin sarı renkli difenil pikril hidrazin'e indirgemeleridir. Yapılan bu çalışma sonucu 517 nm'de azalan absorbans değeri reaksiyondan arta kalan DPPH (radikal) çözeltisinin miktarını vermekte ve bu değer de serbest radikal giderme aktivitesi olarak tanımlanmaktadır (Bursal ve ark., 2019b).

3.3.3.2. ABTS⁺ katyon radikali giderme aktivitesi tayini

ABTS (2,2-azino-bis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) radikal giderme aktivitesi Aras ve grubunun bir çalışmasına göre belirlenmiştir (Aras ve ark., 2016). 734 nm'de absorbans veren ABTS katyon radikali renkli organik bir bileşiktir. Antioksidan maddeler ile reaksiyona giren ABTS radikali, bir elektron aktararak radikal olmayan

ABTS'ye dönüşür. Reaksiyon sonucu bu dalga boyundaki absorbansın azalması antioksidan aktivitenin hesaplanmasında kullanılmaktadır.

3.3.3.3. Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme (FRAP) yöntemine göre indirgeme kapasitesi tayini

Numunelerin ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kapasitesi FRAP yöntemine göre tayin edilmiştir. İndirgeme kuvveti tayini literatürde mevcut olan bir çalışmaya göre belirlenmiştir (Bingöl and Bursal 2018). Bunun için sentezlenecek 1,2,3-triazol türevi maddelerinin 1 mg/mL konsantrasyonundaki çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltiden farklı derişimlerde (10, 20 ve 30 µg/mL) miktarlar deney tüplerine aktarıldı, son hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. Daha sonra deney tüplerine ayrı ayrı 2.5 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH 6,60) ve 1 mL %1'lik potasyum ferrisiyanür [K₃Fe(CN)₆] çözeltileri eklenerek karışım 50 °C'de 20 dk. inkübe edildi. İnkübasyondan sonra deney tüplerine (reaksiyon karışımına) 1 mL %10'luk triklorasetik asit (TCA) ve %0.1'lik 0.25 mL FeCl₃ ilave edilerek absorbanslar 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak saf su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine saf su kullanıldı.

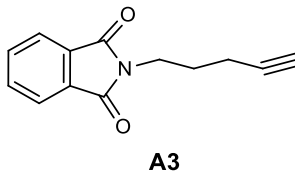
3.3.3.4. Kuprak (CUPRAC) metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini

Apak ve arkadaşlarının (2008) literatüre kazandırmış olduğu Kuprak (CUPRAC) metoduna göre Kuprik iyonu (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi tayinleri yapılmıştır. Bunun için deney tüplerine sırasıyla 0.01 M'lık 0.25 mL CuCl₂ çözeltisi, 0.25 mL 7.5x10⁻³ M neokuprin çözeltisi ve 0.25 mL 1 M amonyum asetat tamponu eklendi. Çözeltiler çalkalanıp farklı derişimlerde (10-30 µg/mL) numune ve standartlar ilave edildi. Son hacimler saf su ile 2 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 30 dk. inkübasyon sonrası 450 nm'de absorbans değerleri kaydedildi. Artan absorbans değerleri reaksiyon karışımının artan kuprik iyon (Cu²⁺) indirgeme kapasitesini göstermiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

4.1. Bileşiklerin Sentezi

4.1.1. 2-(pent-4-in-1-il)izoindolin-1,3-dion (A3) bileşiğinin sentezi



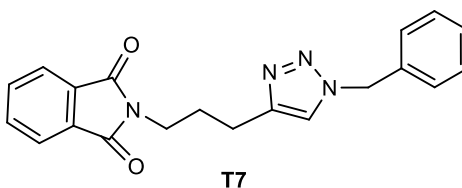
N-(4-Pentini)ftalimid (A3) bileşiği 2009 yılında Yu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın, çeşitli denemeler sonucunda modifiye edilerek; ftalimid (0,883 g, 6 mmol) ve K₂CO₃ (0,513 g, 5 mmol) DMF ortamında 6 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon ortamına 5-kloro-1-pentin (0,513 g, 5 mmol) ilave edilerek 70 °C de 24 saat geri soğutucu (refluks) altında ısıtıldı. TLC (İTK) ile kontrol edilen reaksiyon tamamlandıktan sonra oda sıcaklığına soğutuldu. Çözeltiye 25 mL H₂O eklendi, Et₂O (20 mL×3) ile ekstrakte edilen karışımın organik fazı susuz Na₂SO₄ ile kurutuldu, süzülde ve çözücüsü rotary evaporatörde uzaklaştırılarak elde edilen ham ürün EtOH de kristallendirilerek beyaz renkte kristal olarak elde edildi. Verim % 70, **E.N:** 89-90 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.86-7.84 (m, 2H), 7.74-7.71 (m, 2H), 3.80 (t, J=6.9Hz, 2H), 2.28 (td, J=6.9, 2.44 Hz, 2H), 1,97-1,90 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm) δ 168.42, 134.01, 132.15, 123.30, 83.06, 69.11, 37.20, 27.33, 16.34.

IR (KBr, cm⁻¹): 3265.44, 1761.69, 1695.03, 1466.02, 1438.51, 1396.42, 1354.44, 1324.43, 1270.14, 1120.75.

4.1.2. 2-(3-(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)propil)izoindolin-1,3-dion (T7) bileşiğinin sentezi



50 mL'lik cam balonda 2-(pent-4-in-1-il)izoindolin-1,3-dion bileşiği (**A3**) (1.0 mmol) 25 mL metanolde çözüldü. Çözeltiye sırayla sodyum *L*-askorbat (1.0 mmol) ve bakır(II) asetat (0.2 mmol)'ın sulu çözeltileri ve (azidometil)benzen (**A4**) bileşiği (1.5 mmol) ilave edilerek 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı, reaksiyon takibi TLC ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışımın üzerine 50 mL CH₂Cl₂ ilave edilerek (2x20 mL) ekstrakte edildi. Organik faz Na₂SO₄ (susuz) ile kurutulurak çözücüsü rotary evaporatörde uzaklaştırıldı. Ham ürün kolon kromatografisi ile (50 cm x 1 cm) EtOAc/n-Hekzan (% 20) çözücü sisteminde saflaştırıldı. 2-(3-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propil)izoindolin-1,3-dion (**T7**) %90 verimle beyaz renkli katı olarak elde edildi. **E.N**: 106-107 °C

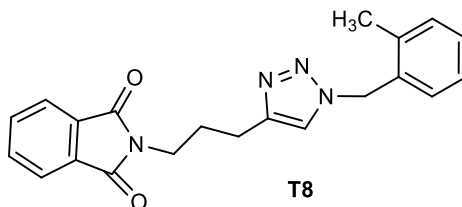
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 7.85 (dd, *J* = 5.5, 3.1 Hz, 2H), 7.73 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2H), 7.43–7.31 (m, 4H), 7.31–7.24 (m, 2H), 5.51 (s, 2H), 3.75 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.07 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, CHCl₃, ppm) δ 168.14, 147.03, 134.64, 133.72, 131.77, 128.79, 128.34, 127.68, 122.93, 120.80, 53.74, 36.99, 27.92, 22.80.

IR (KBr, cm⁻¹): 1770.27, 1697.22, 1496.47, 1438.20, 1397.17, 1366.66, 1333.37, 1218.19, 1187.77, 1103.35.

HR-ESI-MS (C₂₀H₁₈N₄O₂): *m/z* Bulunan: 347.1554 [*M* + H]⁺ (Hesaplanan: 347.1508 [*M* + H]⁺).

4.1.3. 2-(3-(1-(2-metilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propil)izoindolin-1,3-dion (**T8**) bileşiğinin sentezi



50 mL lik cam balonda 2-(pent-4-in-1-il)izoindolin-1,3-dion bileşiği (**A3**) (1.0 mmol) 25 mL metanolde çözüldü. Çözeltiye sırayla sodyum *L*-askorbat (1.0 mmol) ve bakır(II) asetat (0.2 mmol)'ın sulu çözeltileri ve 1-(azidometil)-2-metilbenzen (**A5**) bileşiği (1.5 mmol) eklendi. Karışım 24 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik

karıştırıcı ile karıştırıldı, reaksiyon takibi TLC ile yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımına 50 mL CH₂Cl₂ ilave edilerek (2x20 mL) ekstrakte edildi. Organik faz Na₂SO₄ ile kurutulup, çözücüsü rotary evaporatörde uzaklaştırıldı. Ham ürün kolon kromatografisi ile (50 cm x 1 cm) EtOAc/n-Hekzan (% 20) çözücü sisteminde saflaştırıldı. 2-(3-(1-(2-metilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propil)izoinolin-1,3-dion (**T8**) %88 verimle beyaz katı olarak elde edildi. **E.N**: 119-120 °C

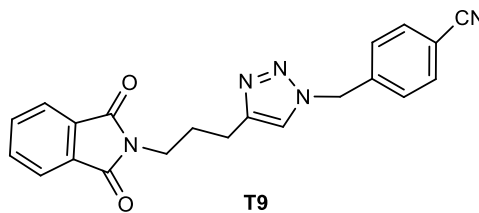
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 7.85 (dd, *J* = 5.5, 3.1 Hz, 2H), 7.73 (dd, *J* = 5.4, 3.0 Hz, 2H), 7.34–7.19 (m, 4H), 7.14 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 3.75 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.12–2.00 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm) δ 168.40, 147.09, 136.84, 133.98, 132.76, 132.05, 130.97, 129.24, 128.99, 126.63, 123.21, 120.86, 52.23, 37.30, 28.24, 23.11, 19.00.

IR (KBr, cm⁻¹): 1762.56, 1700.99, 1445.93, 1394.98, 1353.95, 1310.36, 1202.93, 1098.58.

HR-ESI-MS (C₂₁H₂₀N₄O₂): *m/z* Bulunan: 361.1712 [*M* + H]⁺ (Hesaplanan: 361.1665 [*M* + H]⁺).

4.1.4. 4-((4-(3-(1,3-dioksoizoinolin-2-il)propil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzonitril (**T9**) bileşiğinin sentezi



50 mL lik cam balonda 2-(pent-4-in-1-il)izoinolin-1,3-dion bileşiği (**A3**) (1.0 mmol) 25 mL metanolde çözüldü. Çözeltiye sırayla sodyum *L*-askorbat (1.0 mmol) ve bakır(II) asetat (0.2 mmol)'ın sulu çözeltileri ve 4-(azidometil)benzonitril (**A6**) bileşiği (1.5 mmol) eklendi. Reaksiyon karışımı 24 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı, reaksiyon takibi TLC ile yapıldı. Bu süre sonunda reaksiyon tamamlanınca karışıma 50 mL CH₂Cl₂ ilave edilerek (2x20 mL) ekstrakte edildi. Organik faz Na₂SO₄ (susuz) üzerinden kurutulup, çözücüsü rotary evaporatörde

uzaklaştırıldı. Ham ürün kolon kromatografisi ile (50 cm x 1 cm) EtOAc/n-Hekzan (% 20) çözücü sisteminde saflaştırıldı. 4-((4-(3-(1,3-dioiksoizindolin-2-il) propil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) metil) benzonitril (**T9**) %75 verimle beyaz katı olarak elde edildi. **E.N:** 117-118 °C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 7.86 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2H), 7.75 (dd, *J* = 5.5, 3.1 Hz, 2H), 7.72–7.66 (m, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.60 (s, 2H), 3.75 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.80 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm) δ 168.46, 140.16, 134.06, 132.88, 132.02, 128.28, 123.26, 118.25, 112.62, 53.34, 37.09, 28.03, 22.92.

IR (KBr, cm⁻¹): 2233.50, 1760.63, 1695.42, 1435.01, 1397.14, 1359.97, 1327.85, 1238.85, 1212.61, 1115.26, 1052.61, 1021.57.

HR-ESI-MS (C₂₁H₁₇N₅O₂): *m/z* Bulunan: 372.1523 [*M* + H]⁺ (Hesaplanan: 372.1461[*M* + H]⁺).

4.2. Sentezlenen Yeni 1,2,3-Triazol Türevlerinin Enzim Aktivite Tayinleri

4.2.1. Tirozinaz enziminin aktivite ölçümleri

Tirozinaz enzim inhibisyon çalışmaları için numuneler (10 mg/mL) konsantrasyonlarında hazırlanmak üzere 10 mg numune tartılarak 10 mL etanolde çözüldü. Çalışmalarda inhibitörsüz enzimin aktivitesi kontrol olarak kabul edildi. Enzim aktivitesini inhibe eden ayrı ayrı 5 farklı derişimde denemeler yapıldı. Eklenen inhibitör miktarında fosfat tamponu (0.1 M, pH: 6,80) hacminden azaltıldı. Bu amaçla monofenolaz aktivitesi için farklı derişimlerde örnekler alınarak (5-25 µl), L-tirozin (10 mg/mL) ve potasyum fosfat tamponu (0,1 M, pH 6,80) deney tüplerine aktararak karıştırılmış ardından karanlıkta 10 dk. 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 50 U/g mantar tirozinaz enzimi ilave edilerek mikroplate okuyucuda 490 nm’de absorbanlar ölçülmüştür. Absorbans ölçümlerine 1 dakikada bir olacak şekilde 5 dakika boyunca devam edilmiştir. Plate içeriğinde kullanılan reaktifler ve kullanılan miktarları **Çizelge 4.1**’de verilmiştir. Enzim aktivitesini %50 azaltan değerin altında ve üstünde derişimlerde ölçümler alınarak Aktivite %-[konsantrasyon (µM)] grafiğı çizildi. Grafik eğrilerinden IC₅₀ değeri (enzim aktivitesini %50 inhibe eden değeri) hesaplandı (Zheng, 2008).

$$\text{Tirozinaz inhibisyonu (\%)} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100 \quad (4.1)$$

Çizelge 4.1. Tirozinaz enzim aktivite ölçümlerinde kullanılan reaktif ve miktarları

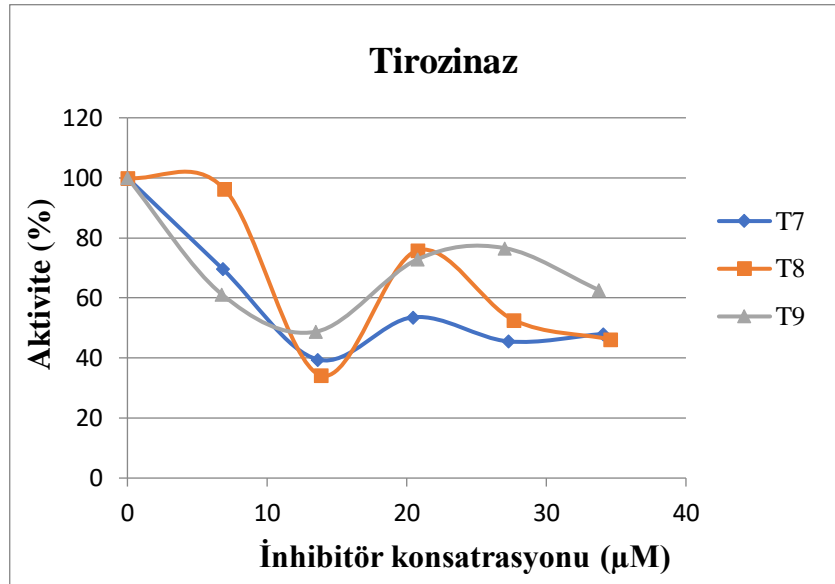
Reaktant	Pipetleme miktarı (µL)
Fosfat Tamponu (0,1M, pH: 6,8)	140-115
L-tirozin	40
Enzim (10 mg/mL)	20
Numune	0-25
Toplam	200

Tirozinaz enzim çalışması sonuçlarına göre konsantrasyon değişken parametresine bağlı olarak aktivite sonuçları (%) grafik olarak **Şekil 4.1.**'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Tirozinaz enzim inhibisyonunun IC₅₀ değerleri

Bileşik	IC ₅₀ (µM)
T7	24,1
T8	29,2
T9	37
Kojik Asit	19,2

*Kojik asit IC₅₀ (µM) değeri Korkmaz ve Bursal (2022)'ın çalışmasından referans alınmıştır.



Şekil 4.1. Tirozinaz enzimi aktivitesinin T7, T8, T9 bileşikleri ile inhibisyonu

Sentezlenen bileşiklerin tirozinaz enzimi üzerine etkilerinin incelendiği çalışma sonuçları IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre sırasıyla IC₅₀ değerleri **T7** için **24,1** µM, **T8** için **29,2** µM ve **T9** için **37** µM olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçların standart **kojik asit** IC₅₀=**19,2** µM ile karşılaştırmaları yapıldığında, IC₅₀ değerlerinin kojik aside göre daha yüksek yani daha az inhibisyon etkilerinin oldukları bulunmuştur. Hesaplanan IC₅₀ değerleri bu bileşiklerin tirozinaz enzimine karşı orta düzeyde inhibitör etki gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. **T7**, **T8** ve **T9** bileşikleri arasında **T7** bileşiğinin IC₅₀ değerinin daha düşük olduğu yani **T8** ve **T9** bileşiklerine göre daha iyi inhibisyon etki gösterdiği anlaşılmaktadır.

4.2.2. Asetilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümleri

Asetilkolinesteraz enzim inhibisyon çalışmaları için numuneler 10 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanmak üzere 10 mg numune tartılarak 10 mL etanolde çözüldü. Çalışmalarda inhibitörsüz enzim aktivitesi kontrol olarak kabul edildi. Enzim aktivitesini inhibe eden ayrı ayrı 5 farklı konsantrasyonda denemeler yapıldı. Eklenen inhibitör miktarı saf su hacminden azaltıldı. Plate içeriğinde kullanılan reaktifler (Tris-HCl Tamponu (1 M'lık, pH 8), Asetilkolin iyodat (10 mM'lık), DTNB (10 mM'lık), Enzim (10 mg/mL), distile su ve numune) ve kullanılan miktarları **Çizelge 4.3**'de verilmiştir. Absorbans ölçümleri 96 kuyucuklu plateler kullanılarak multiplate readerda (Shimadzu UV-1601 spektrofotometre) yapıldı. Absorbans ölçümleri her 1 dakikada bir olacak şekilde 5 dakika boyunca devam edilerek absorbansları ölçülüp kaydedildi. Enzim aktivitesini %50 azaltan değer in altında ve üstünde derişimlerde ölçümler alındı. Aktivite %- [numune konsantrasyonu (µM)] grafiği çizildi. Grafik eğrilerinden IC₅₀ değerleri (enzim aktivitesini %50 inhibe eden değer) hesaplandı.

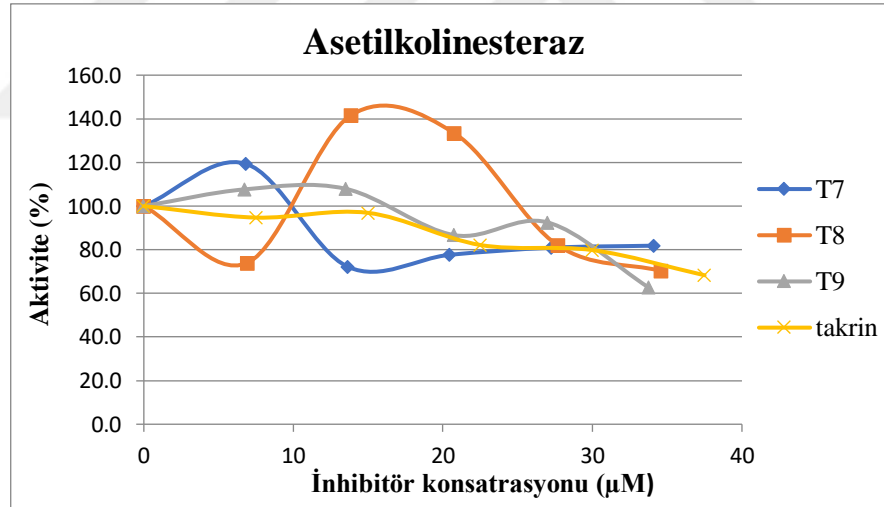
$$\text{Asetilkolinesteraz inhibisyonu (\%)} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100 \quad (4.2)$$

Çizelge 4.3. Asetilkolinesteraz enzim aktivite ölçümlerinde kullanılan reaktif ve miktarları

Reaktant	Pipetleme miktarı (µL)
Tris-HCl Tamponu (1 M'lık, pH 8)	30
Asetilkolin iyodat (10 mM'lık)	10
DTNB (10 mM'lık):	10
Enzim (10 mg/mL)	10
Distile su	140-115
Numune	5-25
Toplam	200

Çizelge 4.4. Asetilkolinesteraz enzim inhibisyonunun IC₅₀ değerleri

Bileşik	IC ₅₀ (µM)
T7	63,1
T8	108,5
T9	57
Takrin	62,6



Şekil 4.2. Asetilkolinesteraz enziminin T7, T8, T9 bileşikleri ile inhibisyonu

Sentezlenen bileşiklerin asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin incelendiği çalışma sonuçları IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre sırasıyla IC₅₀ değerleri T7 için 63,1 µM, T8 için 108,5 µM ve T9 için 57 µM takrin için 62,6 µM olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar takrin ile karşılaştırıldığında, T7 bileşiğinin IC₅₀ değerinin takrine yakın olduğu, yani güçlü bir inhibitör olduğu, T9 bileşiğinin IC₅₀ değerinin takrine göre daha düşük yani daha fazla inhibisyon etkisinin olduğu, T8

bileşiminin ise takrine göre daha yüksek yani daha az inhibisyon etkisinin olduğu görülmektedir. **T7** ve **T9** bileşiklerinin asetilkolinesteraz enzimine karşı iyi düzeyde güçlü inhibitör etkisi gösterdiği fakat **T8** bileşiminin daha düşük düzeyde inhibisyon etkisinin olduğu şeklinde yorumlanabilir.

4.2.3. Pankreatik lipaz enziminin aktivite ölçümleri

Pankreatik lipaz enzim inhibisyon çalışmaları için numuneler (1 mg/mL) konsantrasyonlarında hazırlanmak üzere 10 mg numune tartılarak 10 mL etanolde çözüldü. Çalışmalarda inhibitörsüz enzim aktivitesi kontrol olarak kabul edildi. Enzim aktivitesini inhibe eden ayrı ayrı 10 farklı derişimde ölçümler alındı. Eklenen inhibitör miktarı tris-HCl tampon hacminden azaltıldı. Plate içeriğinde kullanılan reaktifler ve miktarları **Çizelge 4.5**'de verilmiştir. Enzim aktivitesini %50 azaltan değer altında ve üstünde ki derişimlerde ölçümler alınarak Aktivite %- [numune konsantrasyonu (μM)] grafiği çizildi. Grafik eğrilerinden IC_{50} değerleri (enzim aktivitesini %50 inhibe eden değer) hesaplandı (Sridhar, 2020).

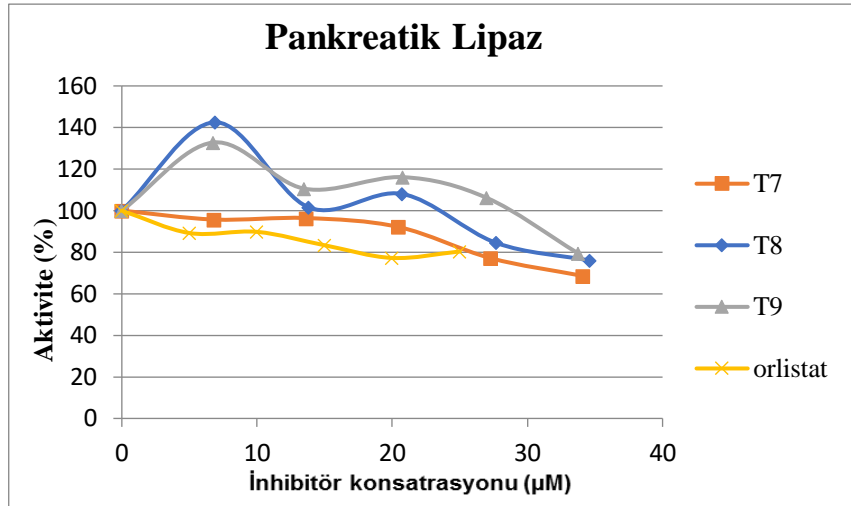
$$\text{Pankreatik lipaz inhibisyonu (\%)} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100 \quad (4.3)$$

Çizelge 4.5. Pankreatik Lipaz enzim aktivite ölçümünde kullanılan reaktif ve miktarları

Reaktant	Pipetleme miktarı (μL)
20 mM Tris-HCl, pH:8,0	160-135
4-Nitrofenil bütirat	20
Enzim (10 mg/mL)	20
Numune	5-25
Toplam	200

Çizelge 4.6. Pankreatik lipaz enzim inhibisyonunun IC_{50} değerleri

Bileşik	IC_{50} (μM)
T7	59,8
T8	61,2
T9	94,6
Orlistat	58



Şekil 4.3. Pankreatik lipaz enzimi aktivitesinin **T7**, **T8**, **T9** bileşikleri ile inhibisyonu

Sentezlenen bileşiklerin pankreatik lipaz enzimi üzerine etkilerinin incelendiği çalışma sonuçları IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre sırasıyla IC_{50} değerleri **T7** için $59,8 \mu\text{M}$, **T8** için $61,2 \mu\text{M}$ ve **T9** için $94,6 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçların standart orlistat $IC_{50}=58 \mu\text{M}$ ile karşılaştırıldığında, **T7** ve **T8** bileşiklerinin IC_{50} değerinin orlistat IC_{50} değerine çok yakın değerler olduğu pankreatik lipaz enzimine karşı iyi düzeyde güçlü birer inhibitör olabileceği görülmektedir. **T9** bileşiğinin IC_{50} değerlerinin orlistata göre daha yüksek yani daha az inhibisyon etkilerinin olduğu ve pankreatik lipaz enzimine karşı orta düzeyde inhibitör etki gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. **T7**, **T8** ve **T9** bileşikleri arasında **T7** bileşiğinin IC_{50} değerinin daha düşük olduğu yani **T8** ve **T9** bileşiklerine göre daha iyi inhibisyon etki gösterdiği anlaşılmaktadır.

4.3. 1,2,3-Triazol türevlerinin antioksidan aktivite tayinleri

Bu çalışmada sentezi gerçekleştirilen yeni 1,2,3-triazol türevlerinin antioksidan aktivite tayinlerinin belirlenmesinde uygulanan metotlar numuneler ile standart antioksidan BHT, C vitamini (askorbik asit), E vitamini (α - tokoferol) ve pirogallol ile karşılaştırılarak gerçekleştirildi.

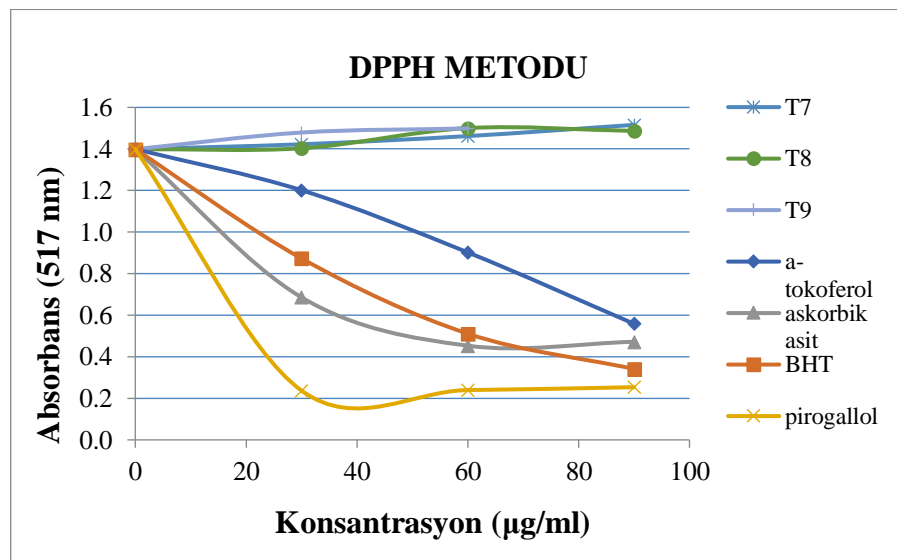
4.3.1. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi

Numunelerin serbest radikal giderme aktivitesi DPPH yönteminin geliştirilmiş yeni bir formuna göre gerçekleştirildi. Serbest radikal olarak DPPH'ın 0.1 mM 'lık çözeltisi kullanıldı. Bunun için 38 mg DPPH 100 mL etanolde yaklaşık 12 saat boyunca

manyetik karıştırıcı ile tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Sentezlenen triazol türevlerinin 1 mg/mL konsantrasyonunda ki çözeltileri hazırlandı. Mikroplate kuyucuklarına sırasıyla değişik konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sentezlenen numune çözeltileri ve standart olarak kullanılan antioksidan çözeltileri (BHT, askorbik asit, α -tokoferol, pirogallol) ile DPPH çözeltilisinden 50 µL ilave edildi. Toplam hacimleri etanol ile 200 µL olacak şekilde tamamlandı. Karanlıkta 30 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra UV-Vis spektrofotometre ile 517 nm'de absorbanslar ölçüldü. 150 µL etanol ve 50 µL DPPH radikali çözeltisi kontrol olarak kullanıldı. Kontrol absorbansının (1.500-2.000) ayarlanması için etanol ile seyreltilme yapılarak ve etanol ile DPPH radikali oranı revize edildi. Elde edilen absorbans sonuçları kullanılarak yüzde DPPH serbest radikali giderme aktivitesi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı (Bursal ve ark., 2019a).

Çizelge 4.7. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi absorbans değerleri

	0	30 µL	60 µL	90 µL
BHT	1,399	0,873	0,511	0,341
Askorbik asit	1,399	0,686	0,453	0,472
Tokoferol	1,399	1,201	0,902	0,559
Pirogallol	1,399	0,237	0,240	0,253
T7	1,399	1,423	1,462	1,516
T8	1,399	1,403	1,501	1,487
T9	1,399	1,479	1,499	1,477



Şekil 4.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi grafiği

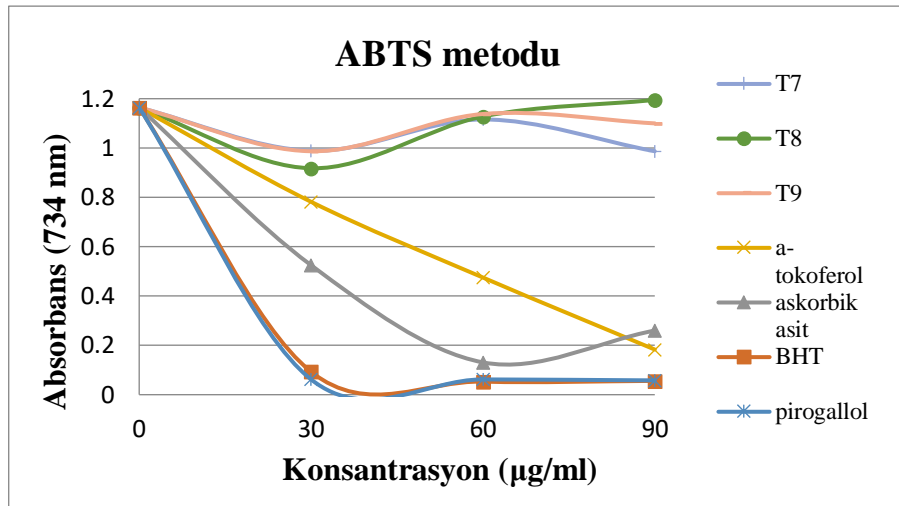
DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Absorbans (517 nm)-Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) grafiğine göre; DPPH-H, 517 nm'de absorbans vermediği için azalan absorbans miktarından serbest radikal giderme aktivitesi ve antioksidan aktivite belirlenir. Sentezlenen **T7**, **T8** ve **T9** bileşiklerinin aktivitesi, α -tokoferol, BHT, C vitamini ve pirogallol standartlarının DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi ile karşılaştırıldığında standart maddelerin absorbans değerleri, artan konsantrasyon ile azalmıştır. Absorbans değerlerindeki azalma yani antioksidan etki sırasıyla pirogallol, C vitamini, BHT ve α -tokoferol'dür. En yüksek antioksidan etki pirogallol göstermiştir. **T7**, **T8** ve **T9** bileşiklerinin absorbans değerleri ise artan konsantrasyonlar için artış göstermiştir. Bu durumda sentezi gerçekleştirilen yeni 1,2,3-triazol bileşiklerinin antioksidan özelliklerinin çok az olduğu anlaşılmaktadır.

4.3.2. ABTS katyon radikali giderme aktivitesi tayini

ABTS yönteminde ilk olarak ABTS radikalleri oluşturuldu. Bunun için ise karanlık bir ortamda, 1:1 oranında 2,45 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (potasyum persülfat) ve 2 mM ABTS çözeltileri 6 saat magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Hazırlanan bu radikalik çözeltilerin kontrol numunesinin 734 nm'de $1,0 \pm 0,2$ absorbans değerine ulaşıldı. Mikroplate kuyucuklarına farklı derişimlerde (10, 20 ve 30 $\mu\text{g/mL}$) 1,2,3-triazol numunelerinin ve standart olarak kullanılacak antioksidanların (BHT, askorbik asit, α -tokoferol, pirogallol) üzerine 50 μL ABTS radikal çözeltilisi ve distile su eklenerek son hacim 200 μL 'ye tamamlandı. 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sonunda numunelerin 734 nm'deki absorbansları kaydedildi. Kontrol olarak da 150 μL etil alkol üzerine 50 μL ABTS radikali kullanıldı (Bursal ve ark., 2016b). Elde edilen absorbans sonuçları kullanılarak yüzde ABTS katyon radikali giderme aktivitesi ve IC_{50} değerleri hesaplandı.

Çizelge 4.8. ABTS katyon radikali giderme aktivitesi tayini absorbans değerleri

	0	30	60	90
BHT	1,164	0,093	0,053	0,056
Askorbik asit	1,164	0,525	0,131	0,260
Tokoferol	1,164	0,782	0,475	0,183
Pirogallol	1,164	0,062	0,062	0,058
T7	1,164	0,989	1,116	0,987
T8	1,164	0,918	1,128	1,195
T9	1,164	0,987	1,138	1,100



Şekil 4.5. ABTS katyon radikali giderme aktivitesi grafiği

Antioksidan maddeler ile reaksiyona giren ABTS radikali, bir elektron aktararak radikal olmayan ABTS'ye dönüşür. Reaksiyon sonucu bu dalga boyundaki absorbansın azalması antioksidan aktivitenin hesaplanmasında kullanılmaktadır.

ABTS katyon radikali giderme aktivitesi Absorbans (734 nm)-Konsantrasyon (µg/ml) grafiğine göre; azalan absorbans miktarından serbest radikal giderme aktivitesi ve antioksidan aktivite belirlenir. Sentezlenen **T7**, **T8** ve **T9** bileşiklerinin aktivitesi, α-tokoferol, BHT, C vitamini ve pirogallol standartlarının ABTS katyon radikali giderme aktivitesi ile karşılaştırıldığında standart maddelerin absorbans değerleri, artan konsantrasyon ile azalmıştır. Absorbans değerlerindeki azalma yani antioksidan etki sırasıyla pirogallol, BHT, C vitamini ve α-tokoferol'dür. En yüksek antioksidan etki pirogallol ve BHT göstermiştir. **T7**, **T8** ve **T9** bileşiklerinin absorbans değerleri ise artan konsantrasyonlar için artış göstermiştir. Yalnız 30 µg/ml konsantrasyonda bir miktar azalma gözlemlenmiştir. Bu durumda sentezi gerçekleştirilen yeni 1,2,3-triazol bileşiklerinin iyi antioksidan özelliklerinin olmadığı anlaşılmaktadır.

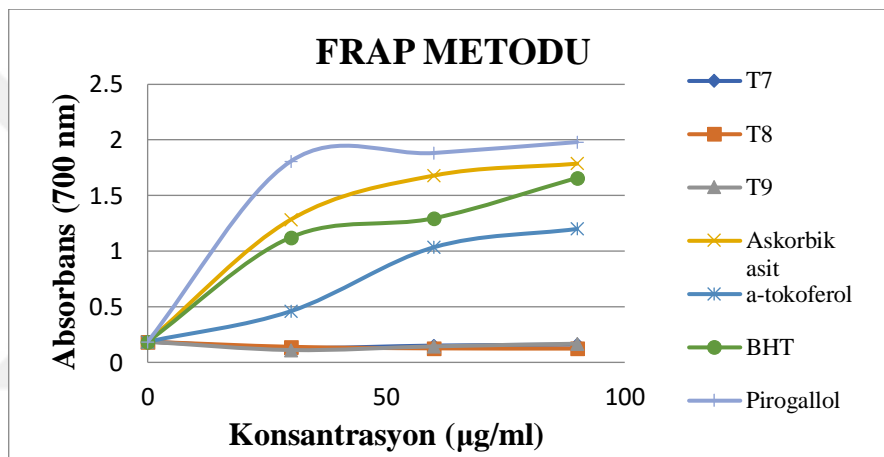
4.3.3. FRAP yöntemine göre indirgeme kapasite tayini

Numunelerin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvveti FRAP yöntemiyle tayin edildi. Bu yöntem için farklı konsantrasyonlarda ki (10, 20 ve 30 µg/mL) numuneler mikroplate kuyucuklarına eklendi, ayrı ayrı olarak 25 µL fosfat tamponu (0,2 M; pH 6,6) ve 25 µL %1'lik potasyum ferrisiyanür çözeltisi eklenerek 50 °C'de 20 dk. inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra 25 µL %10'luk triklorasetik asit (TCA) eklendi.

Daha sonra 6.5 μL FeCl_3 (%0.1'lik) ilave edildi. Distile su ile son hacim 200 μL ye tamamlanarak UV-Vis spektrofotometrede 700 nm'de absorpsanlar ölçüldü.

Çizelge 4.9. FRAP yöntemine göre indirgeme kapasite tayini absorpsan değerleri

	0	30	60	90
BHT	0,186	1,124	1,296	1,659
Askorbik asit	0,186	1,284	1,680	1,787
Tokoferol	0,186	0,460	1,035	1,200
Pyrogallol	0,186	1,808	1,883	1,981
T7	0,186	0,131	0,151	0,160
T8	0,186	0,140	0,126	0,124
T9	0,186	0,111	0,144	0,168



Şekil 4.6. FRAP yöntemine göre indirgeme aktivitesi grafiği

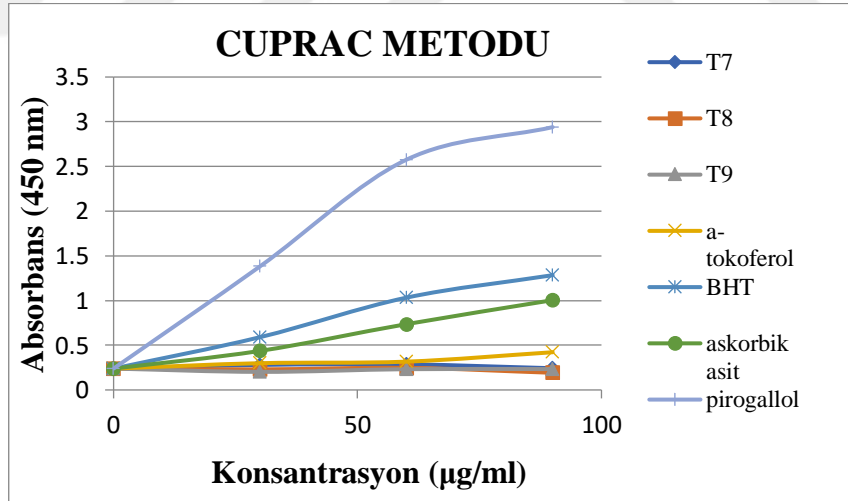
FRAP yöntemine göre indirgeme aktivitesi Absorbans (700 nm)-Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) grafiğine göre; artan absorpsan miktarından serbest radikal giderme aktivitesi ve antioksidan aktivite belirlenir. Sentezlenen **T7**, **T8** ve **T9** bileşiklerinin aktivitesi, α -tokoferol, BHT, C vitamini ve pirogallol standartlarının FRAP yöntemine göre indirgeme aktivitesi ile karşılaştırıldığında standart maddelerin absorpsan değerleri, artan konsantrasyon ile artmıştır. Absorbans değerlerindeki artma yani antioksidan etki sırasıyla pirogallol, C vitamini, BHT ve α -tokoferol'dür. En yüksek antioksidan etki pirogallol göstermiştir. **T7**, **T8** ve **T9** bileşiklerinin absorpsan değerleri ise artan konsantrasyonlar için hemen hemen sabit kalmış kayda değer bir artış göstermemiştir. Bu durumda sentezi gerçekleştirilen yeni 1,2,3-triazol bileşiklerinin FRAP yöntemine göre antioksidan özelliklerinin olmadığı ya da çok düşük olduğu şeklinde yorumlanabilir.

4.3.4. Kuprak (CUPRAC) metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini

Numunelerin kuprik iyonu (Cu^{2+}) indirgeme kapasiteleri CUPRAC metodu kullanılarak hesaplandı. Bunun için mikrolate kuyucuklarının her birine sırayla 50 μL , 0,01 M'lık CuCl_2 , 50 μL , 7,5 mM neokuprin çözeltileri ve 50 μL 1 M potasyum asetat tamponundan ilave edildi. Daha sonra, farklı konsantrasyonlarda (30-90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1,2,3-triazol numuneleri ile standart maddeler eklendi. Saf su ile 200 μL 'ye tamamlanan çözeltilerin 30 dk. inkübasyon işleminden sonra UV-Vis spektrofotometrede 450 nm'de absorbansları okunarak kaydedildi (Apak ve ark., 2007).

Çizelge 4.10. Kuprak (CUPRAC) metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini absorbans değerleri

	0	30	60	90
BHT	0,239	0,590	1,032	1,284
Askorbik asit	0,239	0,437	0,736	1,004
α-Tokoferol	0,239	0,299	0,317	0,422
Pirogallol	0,239	1,382	2,575	2,940
T7	0,239	0,280	0,286	0,243
T8	0,239	0,230	0,247	0,192
T9	0,239	0,202	0,232	0,233



Şekil 4.7. Kuprak (CUPRAC) metoduna göre indirgeme aktivitesi grafiği

Artan absorbans değerleri reaksiyon karışımının artan kuprik iyon (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesini göstermiştir. CUPRAC metodu indirgeme aktivitesi Absorbans (450 nm)-Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{ml}$) grafiğine göre; artan absorbans miktarından serbest radikal giderme aktivitesi ve antioksidan aktivite belirlenir. Sentezlenen **T7**, **T8** ve **T9** bileşiklerinin aktivitesi, α -tokoferol, BHT, C vitamini ve pirogallol standartlarının

CUPRAC metoduna göre indirgeme aktivitesi ile karşılaştırıldığında standart maddelerin absorbans değerleri, artan konsantrasyon ile artmıştır. Absorbans değerlerindeki artma yani antioksidan etki sırasıyla pirogallol, BHT, C vitamini ve α -tokoferol'dür. En yüksek antioksidan etki pirogallol ve BHT göstermiştir. **T7**, **T8** ve **T9** bileşiklerinin absorbans değerleri ise artan konsantrasyonlar için artış göstermemiş ya da çok küçük değerde artış göstermiştir. Bu durumda sentezi gerçekleştirilen yeni 1,2,3-triazol bileşiklerinin CUPRAC metodu için iyi düzeyde antioksidan özelliklerinin olmadığı anlaşılmaktadır.



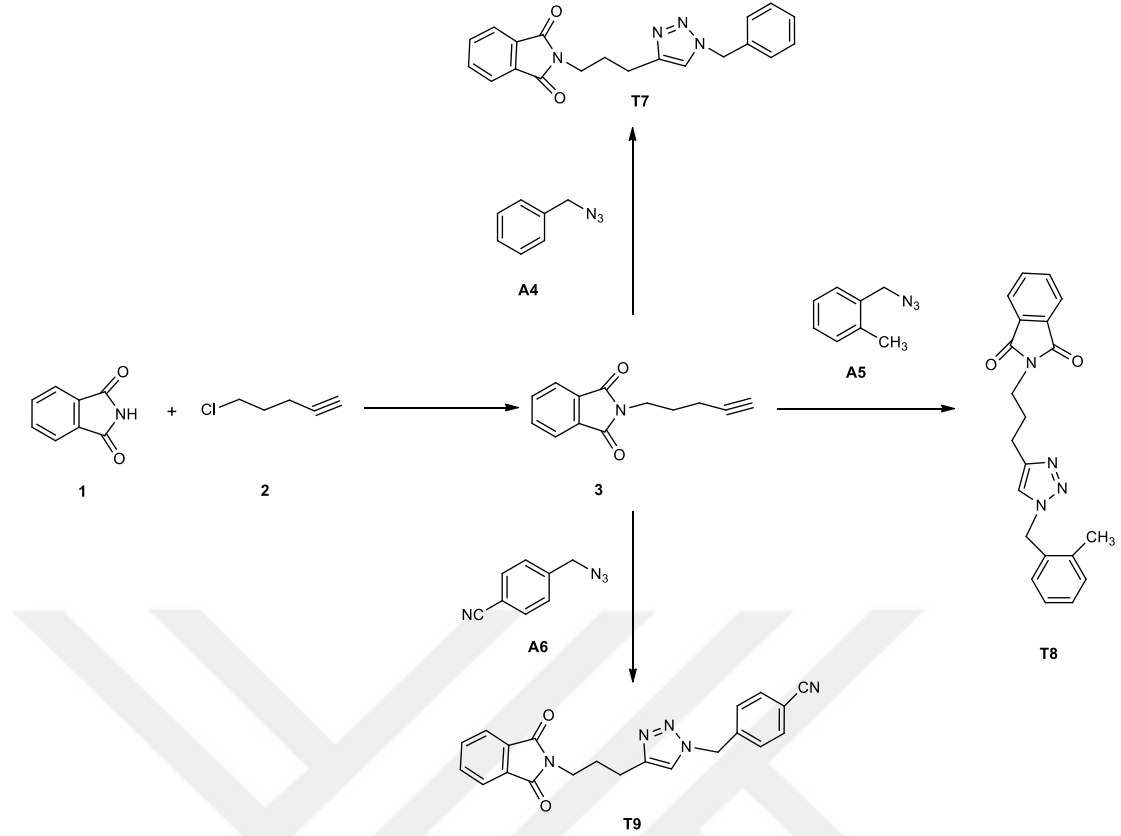
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1,2,3-triazol halkasının tıbbi kimyada ayrıcalıklı bir yapı iskelesi olduğu günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır. Bu umut verici heterosiklik bileşiklerin istisnai özellikleri, malzeme biliminden biyokonjugasyona kadar geniş uygulama yelpazesini kolaylaştırır. Yapılan yüksek lisans tez kapsamında, 1,2,3-triazol iskelet yapısı bulunan 1,4-disubstitüe yeni moleküller (**T7**, **T8**, **T9**) sentezlenerek yapıları aydınlatılmıştır. Ardından sentezleri gerçekleştirilen bu yeni bileşiklerin, tirozinaz, asetilkolinesteraz ve pankreatik lipaz enzim inhibisyon ve antioksidan çalışmaları yapılmış olup 1,2,3-triazol halkasının biyolojik aktivite etkileri incelenmiştir. 1,2,3-triazol halkalı bileşikler, alkin ile azid bileşiklerinin klik reaksiyonu sonucu elde edilerek yeni **T7**, **T8** ve **T9** bileşikleri sentezlenmiştir. Hedef ürünlerin sentez kademeleri; S_N^2 reaksiyonunun yanı sıra, Cu (II) katalizli 1,3-dipolar siklokatalıma (veya [2+3] siklokatalıma) reaksiyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Tez kapsamında **Şekil 5.1** genel şemada gösterilen çeşitli kimyasal dönüşümler ile 1,2,3-triazol halkası içeren (**T7**, **T8**, **T9**) 3 tane yeni bileşik sentezlenmiş olup yapıları FT-IR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR ve HR-ESI-MS spektroskopik yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. **T7** bileşiğinin 1H -NMR spektrumunda δ 7.85 (dd) ve 7.73 (dd) sinyalleri ftalimit halka protonlarına, δ 7.43-7.31 (m) benzen halka aromatik protonlarına, δ 5.51 (s) benzil grubu protonlarına, δ 3.75 (t) ftalimit N atomuna bağlı $-CH_2$ protonlarına, δ 2.77 (t) triazol halkasına bağlı $-CH_2$ protonlarına, δ 2.07 (t) ise propil zincirindeki 2. $-CH_2$ grubu protonlarına aittir. ^{13}C -NMR spektrumunda ise δ 168.14 ppm'de karbonil grubuna (C=O), δ 147.03-120.80 ppm aromatik halka karbonlarına ve triazol halka karbonlarına, δ 53.74 ppm benzil, δ 36.99, 27.92, 22.80 ppm'de ise propil karbonlarına ait pikler ile **T7** bileşiği karakterize edildi.

T8 bileşiğinin 1H -NMR spektrumunda δ 7.85 ve 7.73 (dd) sinyalleri ftalimit halka aromatik protonlarına, δ 7.34-7.19 (m) pikleri benzen halka aromatik protonlarına, δ 5.51 (s) benzil grubu protonlarına, δ 3.75 (t) ftalimit N atomuna bağlı $-CH_2$ protonlarına, δ 2.76 (t) triazol halkasına bağlı $-CH_2$ protonlarına, δ 2.29 (s) metil protonlarına, δ 2.12–2.00 (m) ise propil zincirindeki 2. CH_2 grubu protonlarına aittir. ^{13}C -NMR spektrumunda ise δ 168.40 ppm'de karbonil grubu (C=O), δ 147.03-120.86 ppm ppm'de aromatik halka karbonları ve triazol halka karbonları, δ 52.23 ppm benzil, δ 37.30, 28.24, 23.11 ppm'de propil karbonları ve δ 19.00 ppm'de ise metil karbonuna ait sinyaller ile **T8** bileşiği karakterize edildi.

T9 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda δ 7.86 ve 7.75 (dd) pikleri ftalimit halka aromatik protonlarına, δ 7.72–7.35 (m) pikleri benzen halka aromatik protonlarına, δ 5.60 (s) benzil grubu protonlarına, δ 3.75 (t) ftalimit N atomuna bağlı $-\text{CH}_2$ protonlarına, δ 2.80 (t) triazol halkasına bağlı $-\text{CH}_2$ protonlarına, δ 2.10 (t) ise propil zincirindeki 2. $-\text{CH}_2$ grubu protonlarına aittir. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda ise δ 168.46 ppm'de karbonil grubu ($\text{C}=\text{O}$), δ 140.16-123.26 ppm'de aromatik halka karbonları ve triazol halka karbonları, δ 118.25 ppm'de $-\text{C}\equiv\text{N}$ karbonu, δ 53.34 ppm benzil, δ 37.09, 28.03, 22.92 ppm'de ise propil karbonlarına ait sinyallerin gözlenmesi bu bileşikler için önerilen yapıları doğrulamaktadır.

Sentezlenen bileşiklerin FT-IR spektrumları incelendiğinde önerilen yapılara ait karakteristik bantların gözlenmesi bileşiklerin yapı karakterizasyonunu desteklemektedir. **T7** bileşiğinin karbonil grubuna ($-\text{C}=\text{O}$) ait titreşim bantları 1697.22 cm^{-1} , triazol halkasındaki ($-\text{N}=\text{N}-$) grubu titreşim bandı 1438.20 cm^{-1} 'de, 1397.17 cm^{-1} 'de ki titreşim bantları ise triazol halkasındaki ($-\text{C}-\text{N}$) grubuna ait titreşim bantlarıdır. **T8** bileşiğinin karbonil grubuna ($-\text{C}=\text{O}$) ait titreşim bantları 1700.99 cm^{-1} , triazol halkasındaki ($-\text{N}=\text{N}-$) grubu titreşim bandı 1445.93 cm^{-1} 'de, 1394.98 cm^{-1} 'de ki titreşim bantları ise triazol halkasındaki ($-\text{C}-\text{N}$) grubuna ait titreşim bantlarıdır. **T9** bileşiğinin ($-\text{C}\equiv\text{N}$) nitril grubu gerilme titreşim bandı 2233.50 cm^{-1} 'de, karbonil grubuna ($-\text{C}=\text{O}$) ait titreşim bantları 1695.42 cm^{-1} 'de triazol halkasındaki ($-\text{N}=\text{N}-$) grubu titreşim bandı 1435.01 cm^{-1} 'de, 1397.14 ve 1359.97 cm^{-1} 'de ki titreşim bantları ise triazol halkasındaki ($-\text{C}-\text{N}$) grubuna ait titreşim bantlarıdır.



Şekil 5.1. T7, T8, T9 Bileşiklerinin sentez basamakları

Sentezlenen bileşiklerin tirozinaz, asetilkolinesteraz ve pankreatik lipaz enzim inhibisyon çalışmaları *in-vitro* ortamda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda sentezi gerçekleştirilen bileşiklerden bazılarının (T7 ve T9) standart ilaçlar orlistat, kojik asit ve takrin (IC_{50}) ile karşılaştırdığında yakın IC_{50} değerleri obezite, Alzheimer hastalığı hiperpigmentasyon ve hipopigmentasyon gibi çalışmalar için öncülük etmesi beklenmektedir.

Sentezleri gerçekleştirilen yeni 1,2,3-triazol (T7, T8, T9) bileşiklerinin tirozinaz enzimi üzerine etkilerinin incelendiği çalışma sonuçları sırasıyla T7 için $24,1 \mu\text{M}$, T8 için $29,2 \mu\text{M}$ ve T9 için $37 \mu\text{M}$ IC_{50} olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar kojik asit ($19,2 \mu\text{M}$) ile karşılaştırıldığında, IC_{50} değerlerinin kojik aside göre daha yüksek yani inhibisyon etkilerinin daha az oldukları görülmüştür. Bu bileşiklerin tirozinaz enzimine karşı orta düzeyde inhibitör etkisi gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. T7, T8, T9 bileşikleri arasında bir kıyaslama yapılacak olursa T7 bileşiğinin en düşük IC_{50} değerlerine, daha yüksek inhibisyon etkisi gösterdiği T9 bileşiğini ise en yüksek IC_{50} değerlerine, daha düşük inhibisyon etkisi gösterdiği anlaşılmaktadır.

Asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEi) Alzheimer hastalığının tedavisine yönelik en önemli ilaç grubudur. Ancak piyasada bulunan AChEi (Asetilkolinesteraz inhibitörleri) ilaçların hiçbirinde istenilen başarı elde edilememiştir. Bu nedenle, Alzheimer üzerinde etkili olabilecek koruyucu ve aynı zamanda tedavi edici potansiyellere sahip olan ajanların tespitine yönelik çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmıştır. Sentezlenen yeni 1,2,3-triazol türevlerinin asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin incelendiği çalışma sonuçlarında IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre sırasıyla IC₅₀ değerleri **T7** için **63,1 µM**, **T8** için **108,5 µM** ve **T9** için **57 µM** takrin için **62,6 µM** olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar takrin ile kıyaslandığında, **T7** bileşiğinin IC₅₀ değerinin takrine yakın olduğu, **T9** bileşiğinin IC₅₀ değerinin takrine göre daha düşük yani daha fazla inhibisyon etkisinin olduğu, **T8** bileşiğinin ise takrine göre daha yüksek yani daha az inhibisyon etkisinin olduğu görülmektedir. **T7** ve **T9** bileşiklerin asetilkolinesteraz enzimine karşı iyi düzeyde inhibitör etkisi gösterdiği fakat **T8** bileşiğinin daha düşük düzeyde inhibisyon etkisinin olduğu şeklinde yorumlanabilir. Sonuçlar **T7** ve **T9** 1,2,3-triazol bileşiklerinin AChE inhibitörü olabileceklerini göstermiştir. **T9** bileşiğinin yüksek inhibisyon etkisi yapısında bulunan –CN grubundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sentezlenen bileşiklerin pankreatik lipaz enzimi üzerine etkilerinin incelendiği çalışma sonuçları IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre sırasıyla IC₅₀ değerleri **T7** için **59,8 µM**, **T8** için **61,2 µM** ve **T9** için **94,6 µM** olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçların standart orlistat IC₅₀ **58 µM** ile karşılaştırıldığında, **T7** bileşiğinin IC₅₀ değerinin orlistat IC₅₀ değerine çok yakın bir değer olduğu görülmektedir. **T8** ve **T9** bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin orlistata göre daha yüksek yani daha az inhibisyon etkilerinin olduğu ve pankreatik lipaz enzimine karşı orta düzeyde inhibitör etki gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. **T7**, **T8** ve **T9** bileşikleri arasında **T7** bileşiğinin IC₅₀ değerinin daha düşük olduğu yani **T8** ve **T9** bileşiklerine göre daha iyi inhibisyon etki gösterdiği, **T9** bileşiğinin ise en yüksek IC₅₀ değerine en düşük inhibisyon etkisine sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Bileşiklerin DPPH radikal giderme çalışmalarında elde edilen veriler incelendiğinde sentezlenen **T7**, **T8**, **T9** bileşiklerinin DPPH serbest radikal giderme aktivitesi yöntemine göre beklenen aktiviteyi göstermediği, **T7**, **T8**, **T9** bileşiklerinin antioksidan madde olarak kullanımlarının uygun olmadığı anlaşılmaktadır.

ABTS^{•+} radikal giderme aktivite sonuçlarına göre, **T7** bileşiğinin **T8** ve **T9** bileşiklerine nazaran daha iyi antioksidan aktivite gösterdiği fakat BHT, askorbik asit,

α -tokoferol, pirogallol standart maddelere göre antioksidan etkilerinin az olduğu görülmektedir.

FRAP yöntemine göre indirgeme kapasite tayini absorbans değerleri incelendiğinde ise sentezlerini gerçekleştirdiğimiz 1,2,3-triazol bileşiklerinin FRAP yöntemi için uygun olmadıkları, antioksidan aktivitelerinin oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Tez kapsamında sentezlenen yeni sentetik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri Cu^{+2} indirgeme antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC) yöntemi ile belirlenmiştir. BHT, askorbik asit, α -tokoferol, pirogallol gibi standartlar kullanılmıştır. Kuprak (CUPRAC) metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini absorbans değerleri de FRAP yönteminde olduğu gibi standartlardan oldukça düşük çıkarak antioksidan aktivitelerinin düşük olduğunu kanıtlamaktadır.

Tez kapsamında antioksidan aktivite tayini için uyguladığımız dört yöntem H ve elektron transferi ile oksidan türleri temizleyen yöntemlerdir. **T7**, **T8** ve **T9** bileşiklerinin açık yapıları incelendiğinde moleküller üzerinde ABTS^+ , Fe^{+3} veya Cu^{+2} kanyonlarına kolaylıkla verilebilecek bir e^- (elektron) ya da DPPH radikaline verilebilecek bir H olmadığı için **T7**, **T8** ve **T9** bileşikleri düşük antioksidan aktivite göstermiştir ve bu durumda **T7**, **T8** ve **T9** bileşiklerinin antioksidan olarak kullanılmalarının uygun olmadığı anlaşılmaktadır.

Literatürde 1,2,3-triazol bileşiklerinin antioksidan aktivite tayinleriyle ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu da 1,2,3 triazollerin iyi antioksidan olmadıklarının kanıtı olabilir ya da 1,2,3 triazollerin antioksidan aktiviteleri ile ilgili yeterli çalışma yapılmadığını da gösterebilir.

Bu sonuçlar, ftalimid-triazol hibrit yapısının, yeni etkili pankreatik lipaz ve asetilkolinesteraz inhibitörleri geliştirmek amacıyla sonraki optimizasyon için önemli bir yapı iskelesi olabileceğini göstermektedir.

İlaç keşfi, kimyasal biyoloji ve proteomik uygulamalarda en yaygın araçlardan biri olan ‘‘Klik Kimyasını’’ tanıttığı için Sharpless'e teşekkür ederiz, kuşkusuz yaşamın iyileştirilmesine yönelik bilim camiasına yeni bir yol açmıştır.

KAYNAKLAR

- Abuo-Rahma, GEDAA., Abdel Aziz, M., Farag, N.A., Kaoud, T.S. 2014. Novel 1-[4-(Aminosulfonyl)phenyl]-1H-1,2,4-triazole derivatives with remarkable selective COX-2 inhibition: Design, synthesis, molecular docking, anti-inflammatory and ulcerogenicity studies, *European Journal of Medicinal Chemistry* 83, 398, doi: 10.1016/j.ejmech.2014.06.049.
- Agalave, S.G., Maujan, S.R., Pore, V.S. 2011. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores, *Chemistry–An Asian Journal*, 6, 2696–2718. DOI:10.1002/asia.201100432.
- Almasri, I.M., 2020. Computational approaches for the discovery of natural pancreatic lipase inhibitors as antiobesity agents *Future Medicinal Chemistry*, 12, 741-757
- Alves, B., Marshall, K., Tamang, D., Leong, J., Redelman, D., Elliott, V., Lowe, M. and D. Hudig. 2009. Lipid-dependent cytotoxicity by the lipase PLRP2 and by PLRP2-positive cytotoxic T lymphocytes (CTLs). *Cell Biochemistry Funct.* 27:296-308.
- Andersson, E. L., Hernell, O., Bläckberg, L., Fält, H., and Lindquist, S. 2011. BSSL and PLRP2: key enzymes for lipid digestion in the newborn examined using the Caco-2 cell line. *Journal of Lipid Research*, 52, 1949–1956. doi: 10.1194/jlr.M015685
- Anjaneyulu, B., Dharma Rao, G.B., Tanima Bajaj, 2021. Click chemistry: In vitro evaluation of glycosyl hybrid phosphorylated/thiophosphorylated 1,2,3-triazole derivatives as irreversible acetyl cholinesterase (AChE) inhibitors, *Results in Chemistry*, 3, 100093, ISSN 2211-7156, doi.org/10.1016/j.rechem.2020.100093.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12 (7), 1496-1547.
- Aras, A., Doğru, M., Bursal E., 2016. Determination of antioxidant potential of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*, *Analytical Chemistry Letters*, 6:6, 758-765, DOI: 10.1080/22297928.2016.1265467
- Armarego, W L.F., Perrin, D D., 2016, Purification of Laboratory Chemicals, 4th edition, *Butterworth-Heinemann*, Linacre House, Jordan Hill, Oxford
- Ashooriha, Khoshneviszadeh, M., Khoshneviszadeh, M., Moradi, S.E., Rafiei, A., Kardan, M., Emami, S., 2019. 1,2,3-Triazole-based kojic acid analogs as potent tyrosinase inhibitors: Design, synthesis and biological evaluation, *Bioorganic Chemistry*, 82, 414-422, ISSN 0045-2068, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.069>.
- Ashraf, Z., Rafiq, M., Nadeem, H., Hassan, M., Afzal, S., Waseem, M., Afzal, K., Latip, J., 2017. Carvacrol derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors;

- synthesis, kinetics mechanism and molecular docking studies, *Plos One* 12(5), 0178069.
- Ashraf, Z., Rafiq, M., Seo, S.-Y., Kwon, K.S., Babar, M.M., Sadaf Zaidi, N.-u.-S., 2015. Kinetic and in silico studies of novel hydroxy-based thymol analogues as inhibitors of mushroom tyrosinase, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 98, 203-11.
- Ashwini N., Garg M., Mohan C.D., Fuchs J.E., Rangappa S., Anusha S., et al. 2015. Synthesis of 1, 2-benzisoxazole tethered 1,2,3-triazoles that exhibit anticancer activity in acute myeloid leukemia cell lines by inhibiting histone deacetylases, and inducing p21 and tubulin acetylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23:6157-6165. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.07.069
- Astruc D, Liang L, Rapakousiou A, Ruiz J. 2012. Click dendrimers and triazolerealted aspects: Catalysts, mechanism, synthesis, and functions. A bridge between dendritic architectures and nanomaterials. *Accounts of Chemical Research*, 45:630-640. DOI:10.1021/ar200235m
- Bang, S.H., Han, S.J., Kim, D.H., 2008. Hydrolysis of arbutin to hydroquinone by human skin bacteria and its effect on antioxidant activity, *Journal of cosmetic dermatology* 7(3), 189-93.
- Barneda-Zahonero, B., Parra, M., 2012. Histone deacetylases and cancer, *Molecular oncology* 6(6) 579-89.
- Bekircan,O., Menteşe, E. Ülker, S., Kucuk, C., 2014. Synthesis of some new 1,2,4-triazole derivatives starting from 3-(4-chlorophenyl)-5-(4-methoxybenzyl)-4H-1,2,4-triazol with anti-lipase and anti-urease activities *Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences*, 347 pp. 387-397.
- Bekircan,O., Ülker, S., Menteşe, E., 2015. Synthesis of some novel heterocyclic compounds derived from 2-[3-(4-chlorophenyl)-5-(4-methoxybenzyl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl]aceto-hydrazide and investigation of their lipase and α -glucosidase inhibition J. Enzyme Inhib. *Journal of Medicinal Chemistry*, 30 pp. 1002-1009
- Bingol, M. N., Bursal, E. 2018. LC-MS/MS analysis of phenolic compounds and in vitro antioxidant potential of stachys lavandulifolia vahl. var. brachydon boiss. *International Letters of Natural Sciences*, 72, 28-36
- Birari, R.B., Bhutani, K.K., 2007. Pancreatic Lipase Inhibitors From Natural Sources: Unexplored Potential, *Drug Discovery Today*, 12, 879–889.
- Boatman, R.J., English, J.C., Perry, L.G., Bialecki, V.E., 1996. Differences in the nephrotoxicity of hydroquinone among Fischer 344 and Sprague-Dawley rats and B6C3F1 mice, *Journal Toxicol Environ Health* 47(2),159-72.
- Boechat, N., Ferreira, V.F., Ferreira, S.B., Ferreira, M.L.G., da Silva, F.C., Bastos, M.M., Costa, M.S., Lourenco, M.C.S., Pinto, A.C., Krettli, A.U., Aguiar, A.C., Teixeira, B.M., da Silva, N.V., Martins, P.R.C., Bezerra, F.A.F.M., Camilo,

- A.L.S., da Silva, G.P., Costa, C.C.P. 2011. Novel 1,2,3-Triazole Derivatives for Use against Mycobacterium tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) Strain, *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 5988–5999.
- Breathnach, A.C., Nazzaro-Porro, M., Passi, S., Zina, G., 1989. Azelaic acid therapy in disorders of pigmentation, *Clinics in dermatology*, 7(2),106-19.
- Buchholz, T., Melzig, M. F., 2015. Polyphenolic Compounds as Pancreatic Lipase Inhibitors, *Planta Medica*, 81, 771–783.
- Bursal, E., Aras, A., Kılıç, Ö. 2019a. Evaluation of antioxidant capacity of endemic plant *Marrubium astracanicum* subsp. *macrodon*: Identification of its phenolic contents by using HPLC-MS/MS, *Natural product research*, 33 (13), 1975-1979.
- Bursal, E., Aras, A., Kılıç, Ö., Taslimi, P., Gören, A.C., Gülçin, İ. 2019b. Phytochemical content, antioxidant activity, and enzyme inhibition effect of *Salvia eriophora* Boiss. & Kotschy against acetylcholinesterase, α -amylase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzymes, *Journal of food biochemistry*, 43 (3), e12776.
- Byers, T., Perry, G., 1992. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers, *Annual Review of Nutrition*. 12, 139–159, <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.12.070192.001035>
- Cacicedo, M. L., Manzo, R. M., Municoy, S., Bonazza, H. L., Islan, G. A., Desimone, M., Bellino, M., Mammarella, E. J., & Castro, G. R. 2019. Immobilized enzymes and their applications. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00007-8>
- Carrière, F., Thirstrup, K., Hjorth, S., and Boel, E. 1994. Cloning of the classical guinea pig pancreatic lipase and comparison with the lipase related protein 2. *FEBS Letters*, 338, 63–68. doi: 10.1016/0014-5793(94)80117-7
- Chan T.R., Hilgraf R., Sharpless K.B., Fokin V.V., 2004. Polytriazoles as copper (I)-stabilizing ligands in catalysis. *Organic Letters*, 6:2853-2855. DOI:10.1021/ol0493094
- Chande M.S., Jagtap R.S., 1997. Synthesis and insecticidal activity of organophosphorus compounds containing substituted s-triazole and fused ring heterocycles, *Indian Journal of Chemistry*, 30B, 199-202.
- Chang, T.S., 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors, *International journal of molecular sciences* 10(6), 2440-75.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases Cellular and Molecular Life Sciences, 61 pp. 192-208, 10.1007/s00018-003-3206-5
- Cheng H., Wan J., Lin M.I., Liu Y., Lu X., Liu J., Xu, Y., Chen, J., Tu, Z., Cheng, Y.S.E., Ding, K., 2012. Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of 1

- H-1,2,3-triazole-4-carboxamide derivatives as new anti-influenza A agents targeting virus nucleoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55:2144-2153. DOI: 10.1021/jm2013503
- Codelli J.A., Baskin J.M., Agard N.J., Bertozzi C.R., 2008. Second-generation difluorinated cyclooctynes for copperfree click chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 130: 11486-11493. DOI: 10.1021/ja803086r
- Coiffard, C., Coiffard, L.M., De Roeck-Holtzhauer, Y., 1999. Degradation kinetics of arbutin in solution, *Pharmazeutische Industrie* 61(6), 574-76.
- D'Agostino, D., and Lowe, M. E., 2004. Pancreatic lipase-related protein 2 is the major colipase-dependent pancreatic lipase in suckling mice. *The Journal of Nutrition*, 134, 132–134. doi: 10.1093/jn/134.1.132
- D'Agostino, E. L., Hernell, O., Bläckberg, L., Fält, H., and Lindquist, S. 2011. BSSL and PLRP2: key enzymes for lipid digestion in the newborn examined using the Caco-2 cell line. *Journal of Lipid Research*, 52, 1949–1956. doi: 10.1194/jlr.M015685
- Dalvie, D.K., Kalgutkar, A.S., Khojasteh-Bakht, S.C., Obach, R.S., Donnell, J.P. 2002. Biotransformation Reactions of Five-Membered Aromatic Heterocyclic Rings, *Chemical Research in Toxicology*, 15, 269–299.
- De Caro, J., Sias, B., Grandval, P., Ferrato, F., Halimi, H., Carrière, F., et al. 2004. Characterization of pancreatic lipase-related protein 2 isolated from human pancreatic juice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1701, 89–99. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.06.005
- De la Garza, A.L., Milagro, F.I., Boque, N., Campión, J., Martínez, J.A., 2011. Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment, *Planta Medica*, 77 pp. 773-785
- Dheer D, Singh V, Shankar R., 2017. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles:Current developments. *Bioorganic Chemistry*;71:30-54. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.01.010
- Do Hyun Kim, S.J.K., Ullah, S., Yun, H.Y., Chun, P., Moon, H.R., 2017. Design, synthesis, and antimelanogenic effects of (2-substituted phenyl-1, 3-dithiolan-4-yl) methanol derivatives, *Drug design, development and therapy* 11 827.
- Durust, Y., Karakus, H., Kaiser, M., Tasdemir, D., 2012. Synthesis and Anti-Protozoal Activity of Novel dihydropyrrolo[3,4-d][1,2,3]triazoles, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 48, 296, doi: 10.1016/j.ejmech.2011.12.028.
- Elliot, J.G., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology*, 53(2), 46-48.

- Fogal, S., Carotti, M., Giaretta, L., Lanciai, F., Nogara, L., Bubacco, L., Bergantino, E., 2015. Human Tyrosinase Produced in Insect Cells: A Landmark for the Screening of New Drugs Addressing its Activity, *Molecular Biotechnology* 57(1), 45-57.
- Garcia-Lopez, M., 1989. Double-blind comparison of azelaic acid and hydroquinone in the treatment of melasma, *Acta Derm Venereol* (Stockh) 143,58-61.
- Gilham, D., Labonté, E. D., Rojas, J. C., Jandacek, R. J., Howles, P. N., and Hui, D. Y., 2007. Carboxyl ester lipase deficiency exacerbates dietary lipid absorption abnormalities and resistance to diet-induced obesity in pancreatic triglyceride lipase knockout mice. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 24642–24649. doi: 10.1074/jbc.M702530200
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 pp. 909-930, 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gonçalez, M., Correa, M.A., Chorilli, M., 2013. Skin delivery of kojic acid-loaded nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of skin aging, *BioMed research international* 2013.
- Guantai E.M., Ncokazi K., Egan T.J., *et al.*, 2010. Design, synthesis and *in vitro* antimalarial evaluation of triazole-linked chalcone and dienone hybrid compounds, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(23), 8243-8256.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 2018. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 502, 183-186, 10.1016/j.bbrc.2018.05.045
- Gürdol, F., 2019. Tıbbi Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul.
- Haida, Z., Hakiman, M., 2019. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities *Food Science & Nutrition*, 7, 1555-1563, 10.1002/fsn3.1012
- Haider, S., Alam, M.S., Hamid, H. 2014. 1,2,3-Triazoles: Scaffold with Medicinal Significance, *Inflammation & Cell Signalling* 1-95, 1-10.
- Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.C., Hamdi, M., Lomascolo, A., 2006. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications, *Journal of Applied Microbiology*, 100(2),219-32.
- Halliwell, B., 1995. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism *Biochemical Pharmacology*, 49 pp. 1341-1348, 10.1016/0006-2952(95)00088-H
- Hamre, K., Christiansen, R., Waagbø, R., Maage, A., Torstensen, B.E., Lygren, B., Lie, E., Wathne Albrektsen, S., 2004. Antioxidant vitamins, minerals and lipid levels in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.): Effects on growth performance and fillet quality *Aquaculture Nutrition*, 10 pp. 113-123, 10.1111/j.1365-2095.2003.00288.x

- Harel, M., Quinn, D.M., Haridasan, K.N., Silman, I., Sussman, J.L., 1996. The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *Journal of the American Chemical Society*, 118(10), 2340-2346.
- He, Y.W., Dong, C.Z., Zhao, J.Y., Ma, L.L., Li, Y.H., Aisa, H.A. 2014. 1,2,3-Triazole-containing derivatives of rupestonic acid: click-chemical synthesis and antiviral activities against influenza viruses, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 76, 245, doi: 10.1016/j.ejmech.2014.02.029.
- Heck, A.M., Yanovski, J.A., Calis, K.A., 2000. Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity *Pharmacotherapy*, 20 pp. 270-279
- Heilgemeir, G., Balda, B., 1981. Irreversible toxic depigmentation. Observations following use of hydroquinonemonobenzylether-containing skin bleaching preparations, *MMW, Munchener medizinische Wochenschrift* 123(2), 47.
- Himo F., Lovell T., Hilgraf R., Rostovtsev V.V., Noodleman L., Sharpless K.B., et al. 2005. Copper (I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, 127:210-216. DOI: 10.1021/ja0471525
- Hochuli, E., Kupfer, E., Maurer, R., Meister, W., Mercadal, Y., Schmidt, K., 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. II. Chemistry and structure elucidation *The Journal of Antibiotics*, (Tokyo),40, 1086-1091
- Holla B.S., Mahalinga M., Karthikeyan M.S., *ve ark.*, 2005. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some substituted 1,2,3-triazoles, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40(11), 1173-1178.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. 2013. Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*, 6(4), 185–205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>
- Hosseini, S., Ali Pourmousavi, S., Mahdavi, M., Taslimi, P., 2022. Synthesis, and in vitro biological evaluations of novel naphthoquinone conjugated to aryl triazole acetamide derivatives as potential anti-Alzheimer agents, *Journal of Molecular Structure*, Volume 1255, 132229, ISSN 0022-2860, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132229>.
- Houston, M.C., 2005. Nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension *Progress in Cardiovascular Diseases*, 47 pp. 396-449, 10.1016/j.pcad.2005.01.004
- Huggins, K. W., Camarota, L. M., Howles, P. N., and Hui, D. Y. 2003. Pancreatic triglyceride lipase deficiency minimally affects dietary fat absorption but dramatically decreases dietary cholesterol absorption in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 42899–42905. doi: 10.1074/jbc.M303422200

- Huisgen R. 196. 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Proceedings of the Chemical Society*, 357. DOI: 10.1039/PS9610000357
- Huisgen, R., 1963. 1,3-Dipolar Cycloadditions Past and Future, *Angewandte Chemie., Int. Ed. Engl.*, 2(10), 656-598.
- Huisgen, R., 1984. 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, *Wiley*, 817, New York
- Illanes, A., Cauverhff, A., Wilson, L., & Castro, G. R. 2012. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, 115, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.050>
- Ito, S., 2003. A Chemist's View of Melanogenesis, *Pigment Cell Research* 16(3), 230-36.
- Jalaja, R., Leela, R.S.G., Valmiki, P.K., Salfeena, C.T.F., Ashitha, K.T., Rao, V.R.D.K., Nair, M.S., Gopalan R.K., Somappa, S.B., 2018. Discovery of natural product derived labdane appended triazoles as potent pancreatic lipase inhibitors, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9, pp.662-666.
- Jalani HB, Karagöz AÇ, Tsogoeva SB. 2017. Synthesis of substituted 1,2,3-triazoles via metal-free click cycloaddition reactions and alternative cyclization methods, *Synthesis*, 49:29-41. DOI:10.1055/s-0036-1588904
- Jung, H.J., Lee, M.J., Park, Y.J., Noh, S.G., Lee, A.K., Moon, K.M., Lee, E.K., Bang, E.J., Park, Y.J., Kim, S.J., 2018. A novel synthetic compound, (Z)-5-(3-hydroxy-4-methoxybenzylidene)-2-iminothiazolidin-4-one (MHY773) inhibits mushroom tyrosinase, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 82(5), 759-67.
- Kahveci, B., Yilmaz, F., Menteşe, E., Ülker, S., 2015. Microwave-assisted synthesis of some new coumarin derivatives including 1,2,4-triazol-3-one and investigation of their biological activities *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 51 pp.447-456
- Kallander LS, Lu Q, Chen W, Tomaszek T, Yang G, Tew D, et al. 2005. 4-Aryl-1,2,3-triazole: A novel template for a reversible methionine aminopeptidase 2 inhibitor, optimized to inhibit angiogenesis in vivo. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48:5644-5647
- Kalluraya B, Chimbalkar R, Gunga P. 1996. Synthesis and biological activities of some 1,2,4-triazoles and 1,3,4-oxadiazoles, *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry*, 6, 103-106.
- Kamal A., Hussaini S.A., Sucharitha M.L., Poornachandra Y., Sultana F., Kumar C.G., 2015. Synthesis and antimicrobial potential of nitrofurans-triazole congeners. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 13:9388-9397. DOI: 10.1039/C5OB01353D
- Kant R., Kumar D., Agarwal D., Gupta R.D., Tilak R., Awasthi S.K., et al. 2016. Synthesis of newer 1,2,3-triazole linked chalcone and flavone hybrid compounds and evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 113:34-49. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.02.041

- Kaushik, C.P., Lal, K., Kumar, A., Kumar, S., 2014. Synthesis and biological evaluation of amino acid-linked 1,2,3-bistriazole conjugates as potential antimicrobial agents, *Medicinal Chemistry Research*, 23, 2995, doi: 10.1016/j.ejmech.2013.04.045.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2020. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Khemis, A., Kaiafa, A., Queille-Roussel, C., Duteil, L., Ortonne, J., 2007. Evaluation of efficacy and safety of rucinol serum in patients with melasma: a randomized controlled trial, *British Journal of Dermatology* 156(5), 997-1004.
- Kim, T.W., Yong Y., Shin S.Y., Jung H., Park K.H., Lee Y.H., et al. 2015. Synthesis and biological evaluation of phenyl-1H-1,2,3-triazole derivatives as antiinflammatory agents. *Bioorganic Chemistry*, 59:1-11. DOI: 10.1016/j.bioorg.2015.01.003
- Kim, S.J., Yang, J., Lee, S. Park, C., Kang, D., Akter, J., Ullah, S., Kim, Y.-J., Chun, P., Moon, H.R., 2018. The tyrosinase inhibitory effects of isoxazolone derivatives with a (Z)- β -phenyl- α , β -unsaturated carbonyl scaffold, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26, (14), 7, 3882-3889. doi.org/10.1016/j.bmc.2018.05.047.
- Kolb, H.C., Finn M.G., Sharpless K.B., 2001. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*. 40:2004-2021. DOI:10.1002/1521-3773(20010601)40:112004AID-ANIE20043.0.CO;2-5
- Korkmaz, A., Bursal, E., 2022. An in vitro and in silico study on the synthesis and characterization of novel bis (sulfonate) derivatives as tyrosinase and pancreatic lipase inhibitors, *Journal of Molecular Structure*, 1259, 132734.
- Köpke, D., Mueller, R.H., Pyo, S.M., 2019. Phenylethyl resorcinol smartLipids for skin brightening—Increased loading & chemical stability, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 137 104992.
- Krajczyk A., Kulinska K., Kulinski T., Hurst B.L., Day C.W., Smee D.F., et al. 2014. Antivirally active ribavirin analogues—4, 5-disubstituted 1,2,3-triazole nucleosides: Biological evaluation against certain respiratory viruses and computational modelling. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 23:161-171. DOI: 10.3851/IMP2564
- Kumar, K.S., Vani, M.G., Wang, S.Y., Liao, J.W., Hsu, L.S., Yang, H.L., Hseu, Y.C., 2013. In vitro and in vivo studies disclosed the depigmenting effects of gallic acid: A novel skin lightening agent for hyperpigmentary skin diseases, *Biofactors* 39(3) 259-70.
- Labadie G.R., de la Iglesia A., Morbidoni H.R., 2011. Targeting tuberculosis through a small focused library of 1,2,3-triazoles. *Molecular Diversity*, 15: 1017-1024. DOI: 10.1007/s11030-011-9319-0

- Li, X., Lindquist, S., Lowe, M., Noppa, L., and Hernell, O. 2007. Bile salt-stimulated lipase and pancreatic lipase-related protein 2 are the dominating lipases in neonatal fat digestion in mice and rats. *Pediatric Research*, 62, 537–541. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181559e75
- Liang L, Astruc D., 2011. The copper (I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC)“click” reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 255: 2933-2945. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.06.028
- Liu S., Qian X., Song G., *ve ark.*, 2000. Fluorine containing heterocyclic compounds: synthesis of 6-substituted-2-substituted -aryl-1,2,4-triazolo[5, 1-*b*]1, 3, 5-thiadiazin-7-one derivatives, *Journal of Fluorine Chemistry*, 105, 111-115.
- Liu, T.-T., Liu, X.-T., Chen, Q.-X., Shi, Y., 2020. Lipase inhibitors for obesity: a review *Biomedicine Pharmacotherapy*, 128 Article 110314
- Lolak, N., Akocak, S., Türkeş, C., Taslimi, P., Işık, M., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Durgun, M., 2020. Synthesis, characterization, inhibition effects, and molecular docking studies as acetylcholinesterase, α -glycosidase, and carbonic anhydrase inhibitors of novel benzenesulfonamides incorporating 1,3,5-triazine structural motifs *Bioorganic Chemistry*, 100, 103897.
- Lv J.S., Peng X.M., Kishore B., Zhou C.H., 2014. 1,2,3-Triazole-derived naphthalimides as a novel type of potential antimicrobial agents: Synthesis, antimicrobial activity, interaction with calf thymus DNA and human serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 24: 308-313. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013. 11.013
- Mady, M. F., Awad, G.E.A., Jorgensen, K.B., 2014. Ultrasound-assisted synthesis of novel 1,2,3-triazoles coupled diaryl sulfone moieties by the CuAAC reaction, and biological evaluation of them as antioxidant and antimicrobial agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 433, doi: 10.1016/j.ejmech.2014.07.042.
- Mahdavi, M., Ashtari, A., Khoshneviszadeh, M., Ranjbar, S., Dehghani, A., Akbarzadeh, T., 2018. Synthesis of new benzimidazole-1,2,3-triazole hybrids as tyrosinase inhibitors. *Chemistry and Biodiversity*. 15(7)
- Majeed R, Sangwan P.L., Chinthakindi P.K., Khan I, Dangroo N.A., Thota N, et al. 2013. Synthesis of 3-Opropargylated betulonic acid and its 1,2,3-triazoles as potential apoptotic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63:782-792. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.03.028
- Mann, T., Scherner, C., Röhm, K.-H., Kolbe, L., 2018. Structure-activity relationships of thiazolyl resorcinols, potent and selective inhibitors of human tyrosinase, *International journal of molecular sciences* 19(3), 690.
- Maria de Lourdes G.F., Pinheiro L.C., Santos-Filho O.A., Peçanha M.D., Sacramento C.Q., Machado V, et al. 2014. Design, synthesis, and antiviral activity of new 1H-1,2,3-triazole nucleoside ribavirin analogs. *Medicinal Chemistry Research*, 23:1501-1511. DOI: 10.1007/s00044-013-0762-6

- Maymone, M.B.C., Neamah, H.H., Wiry, S.A., Patzelt, N.M., Secemsky, E.A., Zancanaro, P.Q., Vashi, N.A., 2017. The impact of skin hyperpigmentation and hyperchromia on quality of life: A cross-sectional study, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 77(4), 775-78.
- McCall, M.R., Frei, B., 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1034–1053, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00302-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00302-5)
- Meldal M, Tornøe CW. 2008. Cu-catalyzed azide_alkyne cycloaddition. *Chemical Reviews*, 108:2952-3015. DOI:10.1021/cr0783479
- Menteşe, E., Karaali, N., Yılmaz, F., Ülker, S., Kahveci B. 2013. Microwave-assisted synthesis and biological evaluation of some benzimidazole derivatives containing a 1,2,4-triazol ring *Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences*, 346 pp.556-561
- Menteşe, E., Yılmaz, F., Emirik, M., Ülker, S., & Kahveci, B. 2018. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of some benzimidazole derivatives as potent pancreatic lipase inhibitors. *Bioorganic chemistry*, 76, 478-486. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.12.023>
- Moehlenbrock, M. J., Minter, S. D. 2017. Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization. In *Enzyme Stabilization and Immobilization*, 1504, 1–7). doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4_1
- Naaz F., Pallavi M.P., Shafi S., Mulakayala N., Yar M.S, Kumar H.S., 2018. 1,2,3-triazole tethered indole-3-glyoxamide derivatives as multiple inhibitors of 5-LOX, COX-2 & tubulin: Their anti-proliferative & antiinflammatory activity. *Bioorganic Chemistry*, 81:1-20. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.07.029
- Najafi, Z., Mahdavi, M., Saeedi, M., Karimpour-Razkenari, E., Asatouri, R., Vafadarnejad, F., Moghadam, F. H., Khanavi, M., Sharifzadeh, M., Akbarzadeh, T., 2017. Novel tacrine-1,2,3-triazole hybrids: In vitro, in vivo biological evaluation and docking study of cholinesterase inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 1200-1212, ISSN 0223-5234, doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.008
- Nazir, Y., Rafique, H., Kausar, N., Abbas, Q., Ashraf, Z., Rachtanapun, P., Jantanasakulwong, K, Ruksiriwanich, W., 2021. Methoxy-Substituted Tyramine Derivatives Synthesis, Computational Studies and Tyrosinase Inhibitory Kinetics, *Molecules* 26(9), 2477.
- Nazir, Y., Saeed, A., Rafiq, M., Afzal, S., Ali, A., Latif, M., Zuegg, J., Hussein, W.M., Fercher, C., Barnard, R.T. Cooper, M.A., Blaskovich, M.A.T., Ashraf, Z. Ziora, Z.M., 2020. Hydroxyl substituted benzoic acid/cinnamic acid derivatives: Tyrosinase inhibitory kinetics, anti-melanogenic activity and molecular docking studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 30(1), 126722.

- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, 6th ed. New York, USA.
- Ngo JT, Adams SR, Deerinck TJ, Boassa D, Rodriguez-Rivera F, Palida SF, et al. 2016. Click-EM for imaging metabolically tagged nonprotein biomolecules. *Nature Chemical Biology*, 12:459-465. DOI: 10.1038/nchembio.2076
- Oba, M.K.A.H.T. 2013. Tyrosinase inhibitors, US201440112878A1
- Odlo K., Hentzen J., dit Chabert J.F., Ducki S., Gani O.A., Sylte I, et al. 2008. 1, 5-Disubstituted 1,2,3-triazoles as cisrestricted analogues of combretastatin A-4: Synthesis, molecular modeling and evaluation as cytotoxic agents and inhibitors of tubulin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16:4829-4838. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.03.049
- Olivares, C., Solano, F., 2009. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins, *Pigment Cell & Melanoma Research* 22(6), 750-60.
- Palmer, T., Bonner, P. L., 2011. 1-An Introduction to Enzymes, Editor(s): Trevor Palmer, Philip L. Bonner, *Enzymes (Second Edition)*, Woodhead Publishing, 2-13, ISBN 9781904275275, <https://doi.org/10.1533/9780857099921.1.2>.
- Patpi S.R., Pulipati L., Yogeewari P., Sriram D., Jain N., Sridhar B., et al. 2012. Design, synthesis, and structure–activity correlations of novel dibenzo [b,d] furan, dibenzo [b, d] thiophene, and N-methylcarbazole clubbed 1,2,3-triazoles as potent inhibitors of mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55:3911-3922. DOI: 10.1021/jm300125e
- Pedersen, D. S., Abell, A., 2011. 1,2,3-Triazoles in Peptidomimetic Chemistry, *European Journal of Organic Chemistry*, 2399. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201100157>
- Pera, L. M., Baigori, M. D., Pandey, A., & Castro, G. R. 2015. Biocatalysis. In *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00012-4>
- Rafiq, M., Nazir, Y., Ashraf, Z., Rafique, H., Afzal, S., Mumtaz, A., Hassan, M., Ali, A., Afzal, K., Yousuf, M.R., Saleem, M., Kotwica-Mojzzych, K., Mojzzych, M., 2019. Synthesis, computational studies, tyrosinase inhibitory kinetics and antimelanogenic activity of hydroxy substituted 2-[(4-acetylphenyl)amino]-2-oxoethyl derivatives, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 1562-72.
- Ramachary D.B., Ramakumar K., Narayana V.V., 2008. Amino acid-catalyzed cascade [3+2]-cycloaddition/hydrolysis reactions based on the push–pull dienamine platform: Synthesis of highly functionalized NH-1,2,3-triazoles. *Chemistry – A European Journal*, 14:9143-9147. DOI: 10.1002/chem.200801325

- Rasmussen, L. K., Boren, B. C., Fokin, V. V., 2007. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Aryl Azides and Alkynes. *Organic Letters*, 9 (26), 5337–5339.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N.V.R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective *Journal of Controlled Release*, 113 pp. 189-207, 10.1016/j.jconrel.2006.04.015
- Rezaei Z, Khabnadideh S, Pakshir K, *ve ark.*, 2009. Design, synthesis, and antifungal activity of triazole and benzotriazole derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(7), 3064-3067.
- Rizvi, S., Raza, S.T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., Mahdi F., 2014. The role of Vitamin E in human health and some diseases, *Sultan Qaboos University Medical Journal*, J., 14 pp. 157-165/pmc/articles/PMC3997530/
- Rosenberry, T.L., 1975. Acetylcholinesterase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 43, 103-218.
- Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B., 2002. *Angewandte Chemie International Edition*, 41: 2596-2599. DOI: 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4
- Roulier, B., Pérès, B., Haudecoeur, R., 2020. Advances in the Design of Genuine Human Tyrosinase Inhibitors for Targeting Melanogenesis and Related Pigmentations, *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(22), 13428-43.
- Ruddaraju R.R., Murugulla A.C, Kotla R., Tirumalasetty M.CB, Wudayagiri R., Donthabakthuni S., et al. 2016. Design, synthesis, anticancer, antimicrobial activities and molecular docking studies of theophylline containing acetylenes and theophylline containing 1,2,3 triazoles with variant nucleoside derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 123:379-396. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.07.024
- Rungratanawanich, W., Memo, M., Uberti, D., 2018. Redox homeostasis and natural dietary compounds: Focusing on antioxidants of rice (*Oryza sativa* L.) *Nutrients*, 10 p. 1605, [10.3390/NU10111605](https://doi.org/10.3390/NU10111605)
- Schulze B, Schubert U.S., 2014. Beyond click chemistry—Supramolecular interactions of 1,2,3-triazoles. *Chemical Society Reviews*, 43:2522-2571. DOI:10.1039/C3CS60386E
- Shahidi, F., 2015. Antioxidants: principles and applications F. Shahidi (Ed.), Handbook of Antioxidants for Food Preservation, Woodhead Publishing, Amsterdam 1-12.
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2015. Measurement of antioxidant activity *Journal of Functional Foods*, 18 pp. 757-781, 10.1016/j.jff.2015.01.047
- Sridhar, S., Palawat, S., Paul, A.T., 2020. Design, synthesis, evaluation, and molecular modeling studies of indolyl oxoacetamides as potential pancreatic lipase inhibitors, *Archiv der Pharmazie*, 353, 8 .

- Stefely JA, Palchauthuri R, Miller PA, Peterson RJ, Moraski GC, Hergenrother PJ, et al. 2010. N-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl) methyl) arylamide as a new scaffold that provides rapid access to antimicrotubule agents: Synthesis and evaluation of antiproliferative activity against select cancer cell lines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53:3389-3395. DOI: 10.1021/jm1000979
- Sztanke K, Tuzimski T, Rzymowska J, *ve ark.*, 2008. Synthesis, determination of the lipophilicity, anticancer and antimicrobial properties of some fused 1, 2, 4-triazole derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(2), 404-419.
- Tehrani, M.B., Emani, P., Rezaei, Z., Khoshneviszadeh, M., Ebrahimi, M., Edraki, N., Mahdavi, Bagher Larijani, M., Ranjbar, S., Foroumadi, A., Khoshneviszadeh, M.: 2019. Phthalimide-1,2,3-triazole hybrid compounds as tyrosinase inhibitors; synthesis, biological evaluation and molecular docking analysis, *Journal of Molecular Structure*, 1176, 86-93, ISSN 0022-2860, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.08.033>
- Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. 2002. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regioselective copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 67:3057-3064. DOI:10.1021/jo011148j
- Ulloora, S., Shabaraya, R., Adhikari, A.V. 2013. Facile Synthesis of New imidazo[1,2-a]pyridines Carrying 1,2,3-triazoles via Click Chemistry and Their Antiepileptic Studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23, 3368, doi: 10.1016/j.bmcl.2013.03.086.
- Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: An overview *Current Pharmaceutical Design*, 10 pp. 1677-1694, 10.2174/1381612043384655
- Wang Q., Chan T.R., Hilgraf R., Fokin V.V., Sharpless K.B., Finn M.G., 2003. Bioconjugation by copper (I)-catalyzed azide-alkyne [3+ 2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 125:3192-3193. DOI:10.1021/ja021381e
- Weibel, E.K., Hadvary, P., Hochuli, E., Kupfer, E., Lengsfeld, H., 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity *The Journal of Antibiotics*, (Tokyo), 40, 1081-1085.
- Wenjuan, Z., Zhi, Li., Meng, Z., Feng, Wu., Hou. Xueyan, Luo. Hao, Liu. Hao, 2014. Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl)coumarin derivatives as potential antitumor agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24 (3), 799, doi: 10.1016/j.bmcl.2013.12.095.
- Worell, B.T., Malik, J.A., Fokin, V.V., 2013. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science*, 340, 457-460. DOI:10.1126/science.1229506

- Wu P., Feldman A.K., Nugent A.K., Hawker C.J., Scheel A., Voit B., et al. 2004. Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper (I)-catalyzed ligation of azides and alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, 43:3928-3932. DOI: 10.1002/anie.200454078
- Xu, M., Peng, Y., Zhu, L., Wang, S., Ji, J., Rakesh, K.P., 2019. Triazole derivatives as inhibitors of Alzheimer's disease: current developments and structure-activity relationships, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 180, 656-672, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.059>.
- Yan S.J., Liu Y.J., Chen Y.L., Liu L., Lin J., 2010. An efficient one-pot synthesis of heterocycle-fused 1,2,3-triazole derivatives as anti-cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20:5225-5228. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.06.141
- Yu, F., Jia, Y. L., Wang, H. F., Zheng, J., Cui, Y., Fang, X. Y., Zhang, L. M., Chen, Q. X., 2015. Synthesis of triazole schiff's base derivatives and their inhibitory kinetics on tyrosinase activity. *PLoS One*, 10(9), e0138578. doi: 10.1371/journal.pone.0138578. eCollection 2015.
- Yu J.L., Wu Q.P., Zhang Q.S., Liu Y.H., Li Y.Z., Zhou Z.M., 2010. Synthesis and antitumor activity of novel 20, 30-dideoxy-20, 30-diethanethionucleosides bearing 1,2,3-triazole residues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20:240-243. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.10.127
- Yu, Ting-Bin; Bai, Jane Z.; Guan, Zhibin; 2009. Cycloaddition-promoted self-assembly of a polymer into well-defined b sheets and hierarchical nanofibrils; *Angewandte Chemie, International Edition*; 48(6); 1097-1101.
- Yun, H.Y., Do Hyun Kim, S.S., Ullah, S., Kim, S.J., Kim, Y.-J., Yoo, J.-W., Jung, Y., Chun, P., Moon, H.R., 2015. Design, synthesis, and anti-melanogenic effects of (E)-2-benzoyl-3- (substituted phenyl) acrylonitriles, *Drug design, development and therapy* 9, 4259.
- Zhang J, Redman N, Litke AP, *ve ark.*, 2011. Synthesis and antibacterial activity study of a novel class of cationic anthraquinone analogs, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(1), 498-503.
- Zhang, L., Chen, X., Xue, P., Sun, H. Y., Williams, I. D., Sharpless, K. B., Fokin, V., 2005. Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides. *Journal of the American Chemical Society*, 127(46), 15998-15999. DOI: 10.1021/ja054114s
- Zhang, W. Li, Z., Zhou, M., Wu, F., Hou, X., Lou, H., Liu, H., Han, X., Yan, G., Ding, Z., Li, R., 2014. Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl)coumarin derivatives as potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(3), 799-807.
- Zheng, Z.P., Cheng, K.W., Chao, J., Wu, J., Wang, M., 2008. Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*), *Food Chemistry*, 106,2, 529-535.

Zhou B., He Y., Zhang X., Xu J., Luo Y., Wang Y., et al. 2010. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 4573-4578. DOI: 10.1073/pnas.0909133107

