



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AMİNOKALKONLARDAN 3,4-
DİHİDROPİRİMİDİN-2-TİYON
TÜREVLERİNİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK
AKTİVİTESİ**

Hassan Ragab Abouelhassan MOHAMED

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

10/01/2023

Hassan Ragab Abouelhassan MOHAMED

TEŞEKKÜR

Çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU'na, Prof. Dr. Nurettin YAYLI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Seda FANDAKLI'ya, Araş. Gör. Şeyda KANBOLAT'a;

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren bana desteklerini esirgemeyen, maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hassan Ragab Abouelhassan MOHAMED



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Flavonoidler ve Kalkonlar	3
2.1.1. Kalkonların Biyolojik Aktiviteleri	5
2.1.2. Klinik Uygulamada Kalkonlar	5
2.2. Pirimidin Türevleri	6
2.3. Serbest Radikaller	7
2.3.1. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri	9
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	9
2.4.1. Endojen Antioksidanlar	10
2.4.1.1. Enzimatik Antioksidanlar	10
2.4.1.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)	10
2.4.1.1.2. Katalaz (CAT)	11
2.4.1.1.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)	11
2.4.1.1.4. Glutasyon S-transferazlar (GST)	11
2.4.1.1.5. Mitokondriyal sitokrom oksidaz	11
2.4.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	11
2.4.2. Ekzojen Antioksidanlar	12
2.5. Enzimler Hakkında Genel Bilgiler	13
2.5.1. Enzim İnhibisyonu	13
2.5.1.1. Geri Dönüşümlü (Reversibl) Enzim İnhibisyonu	13
2.5.1.1.1. Yarışmalı (Kompetatif) Enzim İnhibisyonu	13

2.5.1.1.2. Yarışmalı Olmayan (Nonkompetatif) Enzim İnhibisyonu	14
2.5.1.1.3. Yarışmasız (Ankompetatif) Enzim İnhibisyonu	14
2.5.1.2. Geri Dönüşümsüz (İrreversibl) Enzim İnhibisyonu	14
2.5.2. Tirozinaz	14
2.5.2.1. Tirozinaz enziminin inhibitörleri ve aktivatörleri	17
2.5.2.2. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen İnhibitörler	17
2.5.2.3. Tirozinaz İnhibitörlerinin Uygulamaları	20
2.6. Antibakteriyeller	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler	23
3.2. Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Cihazlar	24
3.3. Deneysel Çalışma Aşaması	25
3.3.1. Bileşiklerin Sentezi, Saflaştırması ve Karakterizasyonu Çalışmalar	25
3.3.1.1. A1-A3 No'lu Bileşiklerin Sentezi	25
3.3.1.2. B1-B3 No'lu Bileşiklerin Sentezi	27
3.3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	29
3.3.2.1. Sentezlenen Bileşiklerin Antioksidan Aktivite Çalışmaları	29
3.3.2.1.1. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini	30
3.3.2.1.2. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini	30
3.3.2.2. Tirozinaz İnhibitör Aktivitesi Tayini	31
3.3.2.3. Antimikrobiyal Aktivitelerin Belirlenmesi	32
3.3.3. Moleküler Docking Çalışmaları	32
4. BULGULAR	34
4.1. Bileşiklere Ait Formüller ve Adlandırmalar	34
4.2. A1-B3 No'lu Bileşiklerinin Yapılarının Aydınlatılması	35
4.3. Sentezlenen Bileşiklerinde Antioksidan Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	37
4.3.1. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Sonuçları	37
4.3.2. CUPRAC Tayini Sonuçları	38
4.4. Tirozinaz İnhibitör Aktivite Sonuçları	39
4.5. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Sonuçları	43
4.6. Docking çalışmalarının sonuçları	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	56

7. KAYNAKLAR	57
EKLER	71
Ek 1. A1 Nolu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d6)	72
Ek 2. A1 Nolu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d6)	73
Ek 3. A2 Nolu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d6)	74
Ek 4. A2 Nolu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d6)	75
Ek 5. A3 Nolu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d6)	76
Ek 6. A3 Nolu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d6)	77
Ek 7. B1 Nolu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d6)	78
Ek 8. B1 Nolu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d6)	79
Ek 9. B1 Nolu bileşiğin LC/MS-MS spektrumu	80
Ek 10. B1 Nolu bileşiğin FT-IR spektrumu	81
Ek 11. B2 Nolu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d6)	82
Ek 12. B2 Nolu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d6)	83
Ek 13. B2 Nolu bileşiğin LC/MS-MS spektrumu	84
Ek 14. B2 Nolu bileşiğin FT-IR spektrumu	85
Ek 15. B3 Nolu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d6)	86
Ek 16. B3 Nolu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d6)	87
Ek 17. B3 Nolu bileşiğin LC/MS-MS spektrumu	88
Ek 18. B3 Nolu bileşiğin FT-IR spektrumu	89
ÖZGEÇMİŞ	90

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Onaylanmış ve klinik olarak test edilmiş bazı kalkonlar	6
Tablo 2. Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	23
Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan cihazlar	24
Tablo 4. Sentezlenen bileşiklerin kısa kodları, adları ve kimyasal yapıları	34
Tablo 5. Test bileşiklerinin antioksidan aktivite tayini sonuçları	39
Tablo 6. Bileşiklerin tirozinaz inhibisyonu sonuçları	43
Tablo 7. Sentezlenen bileşiklerin agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile oluşturduğu inhibisyon çapları (mm)	44
Tablo 8. Standart (Kojik asit) ve B1-B3 moleküllerinin tirozinaz enzimi aktif bölgesine karşı bağlanma afiniteleri (kcal/mol) ile ilgili serbest bağlanma enerjileri ve etkileşimlerde fonksiyon gören amino asit rezidülerinin listesi.	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Flavonoidlerin genel yapısı	3
Şekil 2. Kalkon iskeletinin yapısal gösterimi	3
Şekil 3. Trans ve cis konfigürasyonlarında kalkonlar	4
Şekil 4. Kalkon sentezinin genel şeması	4
Şekil 5. Pirimidin ve tiyopirimidinin kimyasal yapıları	7
Şekil 6. Endojen ve eksojen antioksidanların sınıflandırılması	10
Şekil 7. Tirozinaz'ın kresolaz ve katekolaz aktivitesi	15
Şekil 8. Melanin biyosentez basamakları	15
Şekil 9. Melanin yapısı	16
Şekil 10. Tirozinazın enzimatik etkisi sırasında katekol o-kinonların ve diğer reaktif oksijen türlerinin üretilmesi	21
Şekil 11. Antibiyotiklerin ana hedefleri ve bakteriyel direnç mekanizmaları	22
Şekil 12. FRAP tayininde kullanılan troloks'a ait kalibrasyon grafiği	37
Şekil 13. Sentezlenen bileşiklerin FRAP değerleri	38
Şekil 14. CUPRAC tayininde kullanılan troloks'a ait kalibrasyon grafiği	38
Şekil 15. Sentezlenen bileşiklerin CUPRAC değerleri	39
Şekil 16. Kojik asitin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	39
Şekil 17. A1 bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	40
Şekil 18. A2 bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	40
Şekil 19. A3 bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	41
Şekil 20. B1 bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	41
Şekil 21. B2 bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	42
Şekil 22. B3 bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği	42
Şekil 23. Kojik asid ve A. bisporus tirozinaz arasındaki interfazın atomik detayları	46
Şekil 24. B1 bileşiği ve A. bisporus tirozinaz arasındaki interfazın atomik detayları	47
Şekil 25. B2 bileşiği ve A. bisporus tirozinaz arasındaki interfazın atomik detayları	48
Şekil 26. B3 bileşiği ve A. bisporus tirozinaz arasındaki interfazın atomik detayları	49

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ALA	Alanin
A_K	Numune körü absorbansı
A_N	Numunenin absorbansı
A_{NK}	Negatif kontrolün absorbansı
A_{NKB}	Negatif kontrolün kör absorbansı
APT	Karbon türünü belirten spektrum
ARG	Arginin
ASN	Asparajin
ATP	Adenozin trifosfat
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
cm	Santimetre
Cu(II)-Nc	Bakır(II)-neokuproin kompleksi
CUPRAC	Bakır (II) indirgeme/antioksidan kapasite
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EI	Enzim-inhibisyon
ES	Enzim-substrat
EtONa	Sodyum etoksit
FRAP	Demir (III) indirgeme antioksidan kapasitesi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	Gram
GLU	Glutamik asit
GLY	Glisin
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Okside glutatyon

H₂O	Su
HK	Hidrokinon
HIS	Histidin
¹H-NMR	Bir boyutlu nükleer manyetik rezonans spektrumu
İTK	İnce tabaka kromatografisi
KAT	Katalaz
Keap1-Nrf2-ARE	Kelch benzeri ECH-Birleştirici protein 1 nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2-antioksidan yanıt elemanı
Km	Enzim katalizli bir reaksiyonda maksimum hızın (V _{max}) yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonu
kob/mL	Koloni oluşturan birim= colony forming unit
LC-TOF-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
L-DOPA	3,4-dihidroksi-l-fenilalanin
MDA	Malonildialdehit
M	Molar
MET	Metionin
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat anhidrit
NaH₂PO₄	Sodyum dihidrojen fosfat
Nc	Neokuproin
NK	Negatif kontrol
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NOS	Nitrik oksit sentetazlar
NO	Nitrikoksit
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritma değeri
PHE	Fenilalanin
RNA	Ribonükleik asit
RNT	Reaktif azot türleri

ROT	Reaktif oksijen türleri
SER	Serin
SOD	Süperoksit dismutaz
TBHQ	Ter-butilhidrokinon
TEAC	Troloks eşdeğeri
TPTZ	Tripiridiltriazin
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
TRP1	Tirozinaz ile ilgili protein
UV	Ultraviyole
Vmax	Enzim katalizli bir reaksiyonda maksimum hızı
VAL	Valin
XOD	Ksantin oksidaz
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
Simgeler	
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
IC₅₀	%50 inhibisyon için gerekli inhibitör konsantrasyon
α	Alfa (Fonksiyonel gruba komşu ilk konum)
β	Beta (Fonksiyonel gruba komşu ikinci konum)
%	Yüzde
Formüller	
AlCl₃	Alüminyum klorür
Br	Brom
CH₃COONH₄	Amonyum asetat
Cl	Klor
Cu^{2,3+}	Bakır II, III iyonu
CuCl₂.2H₂O	Bakır (II) klorür dihidrat
Cu(I)-Nc	Bakır(I)-neokuproin kompleksi
Cu(II)-Nc	Bakır(II)-neokuproin kompleksi
Fe^{2,3+}	Demir II, III iyonu

FeCl₃	Demir(III) klorür
HCl	Hidroklorik asit
HCO₃	Bikarbonat iyonu
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HOCl	Hipoklorik asit
HO₂[•]	Perhidroksil radikali
K₃(Fe)CN₆	Potasyum hekzasiyanoferrat (III)
NaOH	Sodyum hidroksit
Nc	Neokuproin
NH₂	Amin
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
NO⁻	Nitroksil iyonu (anyonu)
NO[•]	Azot monoksit radikali
1O₂	Singlet oksijen
O₂^{-•}	Süperoksit radikali
O₂	Oksijen
OH[•]	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
SH	Tiyol
Zn	Çinko

ÖZET

Aminokalkonlardan 3,4-Dihidropirimidin-2-Tiyon Türevlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitesi

Aminokalkonlardan 3,4-Dihidropirimidin-2-Tiyon Türevleri sentezlenerek antioksidan, antimikrobiyal, tirozinaz inhibitör aktivitelerinin incelenmesi ve moleküler docking çalışmasının yapılması amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında, altı adet 2-amino kalkon ve pirimidin-tiyon türevi sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin antioksidan, antitirozinaz ve antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. 2-Amino asetofenon ile benzaldehit, 2,5-dimetoksi, 3-/brom/klor, baz için NaOH, çözücü için etanol ile su kullanılarak A1-A3 No'lu bileşikler sentezlenmiştir. A1-A3 No'lu bileşikler bazik ortamda tiyoüre ile reaksiyona girerek tiyopirimidin türevleri (B1-B3) elde edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapıları NMR (¹H-NMR, C-NMR), FT-IR ve kütle (LC-TOF-MS) spektroskopisi teknikleri ile aydınlatılmıştır. Bileşiklerin antioksidan (FRAP Tayini, CUPRAC Tayini), antimikrobiyal ve tirozinaz inhibitor aktiviteleri ölçülmüştür. Sentezlenen bileşikler ve tirozinaz enzimi arasında atomik düzeyde bağlanma modunu ve ligand-hedef etkileşimini belirlemek için moleküler docking çalışması yapılmıştır.

Sentezlenen tüm bileşiklerin değişik düzeylerde antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur. Özellikle B1 bileşiğinin antioksidan aktivitesi diğer bileşiklere göre daha yüksek tespit edilmiştir. Tüm bileşiklerin test edilen mikroorganizmaların bazılarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur. Özellikle B2 bileşiği test edilen mikroorganizmaların tümüne karşı iyi bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. En yüksek tirozinaz inhibisyonu gözlenen A2 ve A3 bileşiğinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 138.151±0,94 µg/mL, 177,743±1,10 µg/mL olarak bulunmuştur.

Yapılan bu tez çalışması, yeni preklinik çalışmalara öncülük ederek elde edilen bilgiler eczacılık, kozmetik ve tıp bilimlerinde literatüre katkı sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Aminokalkon, Pirimidin-tiyon, Tirozinaz inhibitör aktivite, Antioksidanlar

ABSTRACT

Synthesis, Characterization and Biological Activity of 3,4-Dihydropyrimidine-2-Thione Derivatives from Aminoalcones

This study was conducted to synthesize 3,4-Dihydropyrimidine-2-Thione Derivatives from aminoalcones. The antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibitory activities of these compounds were examined and their molecular docking studies were performed.

In this thesis, six 2-amino chalcone and pyrimidine-thione derivatives were synthesized. The antioxidant, antityrosinase and antimicrobial activities of these compounds were tested. Compounds A1-A3 were synthesized using 2-amino acetophenone and 2,5-dimethoxy, 3-bromo, and 3-chloro-substituted benzaldehydes. NaOH was used as the base, and ethanol and water as the solvent. Thiopyrimidine derivatives (B1-B3) were obtained by reacting compounds A1-A3 with thiourea in basic medium. The chemical structures of the synthesized compounds were elucidated by NMR (¹H-NMR, C-NMR), FT-IR, and mass (LC-TOF-MS) spectroscopy techniques. The antioxidant (FRAP Assay, CUPRAC Assay), antimicrobial and tyrosinase inhibitory activities of the compounds were measured. Moreover, molecular docking study was performed to determine the binding mode and ligand-target interaction between the synthesized compounds and the tyrosinase enzyme at atomic level.

It was found that all synthesized compounds showed different levels of antioxidant activities. In particular, the antioxidant activity of compound B1 was found to be higher than other compounds. All compounds also were found to have antimicrobial activity against some of the tested microorganisms. In particular, compound B2 exhibited good antimicrobial activity against all tested microorganisms. The IC₅₀ values of compounds A2 and A3, which showed the highest tyrosinase inhibition, were determined as 138.151±0.94 µg/mL and 177.743±1.10 µg/mL, respectively.

This thesis study can lead to new preclinical studies and the results obtained may contribute to the literature in pharmacy, cosmetics and medical sciences.

Keywords: Aminoalcone, Pyrimidine-thione, Tyrosinase inhibitory activity, Antioxidants

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan vücudundaki çeşitli metabolik yollarda serbest radikallerin oluşumu gerçekleşebilir. Serbest radikaller vücudun düzgün çalışması için gerekli olan hücresel süreçleri engelleyen bir reaksiyona yol açabilir. Serbest radikaller genellikle vücudun doğal antioksidan sistemi tarafından yok edilir. Oksidatif stres, vücuttaki antioksidan sistem ile reaktif oksijen türleri (ROT) ile arasındaki dengesizlik sonucu oluşmaktadır. ROT birikimi, kardiyovasküler hastalıklar, ateroskleroz, metabolik bozukluklar, diyabet ve kanser gibi bazı hastalıkların gelişimine ve ilerleyişine neden olan hücre ve doku hasarına yol açmaktadır (1). Oksidasyon reaksiyonları vücut üzerindeki zararlı etkilerinin yanında gıda ürünlerinin bozulmasına, zararlı bileşiklerin oluşmasına ve istenmeyen tatların oluşmasına da neden olmaktadır (2).

Tirozinaz enzimi vücutta vitiligo, psöriazis gibi melanin sentezinin az olmasından kaynaklanan hipopigmentasyon problemlerinde ve cilt lekesi gibi melanin sentezinin fazla olmasından kaynaklanan hiperpigmentasyon problemlerinde önemi olan bir enzimdir (3, 4). Ayrıca tirozinaz enzimi gıdaların enzimatik oksidasyonunu (Esmerleşme reaksiyonları) katalize ederek kalite ve özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır (5).

Tirozinaz enzimi ile ilgili olan ürünler genellikle kozmetik ürünleridir. Tirozinaz inhibisyonu yaparak antimelanojenik özellikler göstermektedirler. Bu maddeler genel olarak enzimin aktif bölgesine veya enzim-substrat kompleksine bağlanırlar. Böylece melanozom oluşumunu engelleyerek, tirozinaz enzim aktivitesini azaltarak ya da durdurarak etki gösterirler. Sonuçta melanin üretimi inhibe edilmiş olur. Tirozinazı aktive eden ajanlar hipopigmentasyon tedavisinde, inhibe eden ajanlar ise hiperpigmentasyon tedavisinde kullanılabilir. Hidrokinon, arbutin, vitamin C ve kojik asit tirozinaz inhibitörleri olarak bilinirler. Bunların cilt tahrişi, memeli hücrelerinde mutajenik aktivite ve melanositlerde sitotoksikite gibi yan etkileri de gözlenebilmektedir (3, 6). Hidrokinonun yol açtığı stabilite ve sitotoksikite sorunları nedeniyle kozmetik ürünlerinde kullanımı sınırlandırılmıştır. Kojik asit hücrelere uzun süre kullanıldığında kanserojen etki yapabilmektedir. Bu nedenle güvenilir ve stabil olabilecek yeni doğal tirozinaz inhibitörlerinin araştırılması ihtiyacı doğmuştur.

Antibiyotikler morbidite ve mortalitesi yüksek olan birçok enfeksiyöz hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (7). Günümüzde çeşitli enfeksiyöz hastalıkların tedavisi için doğal, yarı sentetik ve sentetik antimikrobiyal ilaçlar kullanılmaktadır. Antibiyotik direnci

dünyada küresel sağlık problemi haline gelmiştir. Bu nedenle daha iyi tolere edilen, daha etkili ve daha güvenli yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilebileceği ümit edilmektedir.

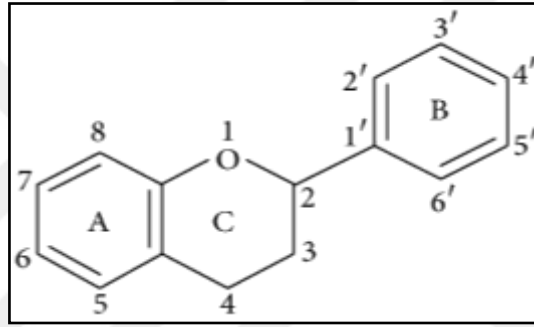
Flavonlar, flavonoller, kalkonlar ve pirimidin türevlerinin antikanser, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antitüberküloz, antidiyabetik, antioksidan, antitirozinaz, antimikrobiyal, antiviral, antimalaryal ve nöroprotektif etkileri bulunmaktadır (8, 9). Kalkonlar (1,3-diaril-2-propen-1-on) ve bunların heterosiklik analogları flavonoid ailesine aittir. Kalkonlar geniş biyolojik aktiviteye, iyi biyoyararlanıma ve düşük yan etkilere sahiptir (8, 9).

Piyasada kullanılan tirozinaz inhibitörü olan kojik asidin tedavi edici etkinliğinin yanısıra uzun süre kullanımında kanserojen etkisi gözlenebilmektedir. İlaç kullanımında ortaya çıkabilecek yan etkilerin oldukça azaltılması ya da insan sağlığı refahının artırılması amacıyla kimyasal olarak sentezlediğimiz bileşiklerin cilt problemlerinin tedavisinde kullanılabilirliğini irdelemek düşüncesiyle tez konumuz oluşturulmuştur. Bu bağlamda amacımız; aminokalkonlardan 3,4-dihidropirimidin-2-tiyon türevlerini sentezlemek, karakterizasyonunu gerçekleştirmek ve bu bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal ve antitirozinaz aktivitelerini aydınlatmaktır. Ayrıca moleküler modelleme çalışmaları ile yapı-aktivite arasındaki ilişkinin araştırılması da hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Flavonoidler ve Kalkonlar

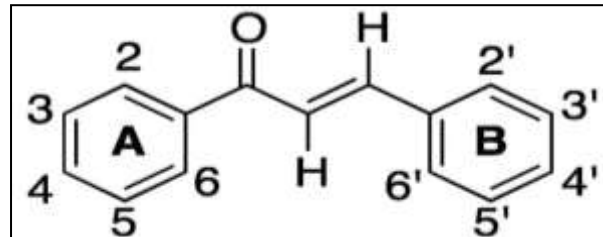
Kimyasal olarak flavonoidler, heterosiklik bir piran halkası (C) ile bağlanmış iki benzen halkasından (A ve B) oluşan on beş karbonlu bir iskeleti içerirler (Şekil 1). Flavonoidlerin çeşitli sınıfları, hidroksilasyon seviyesi ve C halkasının sübstitüe modeli bakımından farklılık gösterirken, bir sınıf içindeki tek tek bileşikler, A ve B halkalarının sübstitüe modelinde farklılık gösterir. Böylece flavonoid ailesinin üyeleri oluşur. Bu flavonoid ailesinin üyeleri; flavon, flavanon, flavanonol, flavonol, kateşin, antosiyanidin, auron ve kalkondur (10).



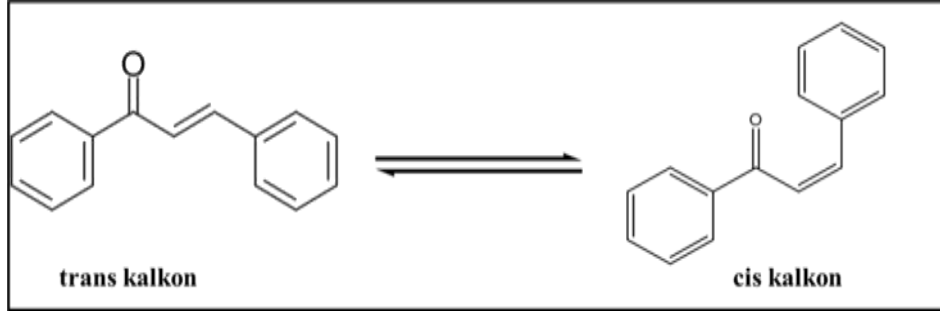
Şekil 1. Flavonoidlerin genel yapısı (Bravo'dan, 10)

"Kalkon", doğal kalkon renginden türeyen "bronz" anlamına gelen Yunanca "kalkos" kelimesinden türetilmiştir. Kalkon iskeletinin yapısal gösterimi Şekil 2'de verilmiştir. Kalkonların yapısında iki aromatik halka, üç karbonla birbirine bağlanmıştır.

Ayrıca bu yapının düz zincirinde doymuş bir karbonil grubu veya α , β -doymamış karbonil grubu bulunur. Kalkonlar cis ya da trans konfigürasyonunda bulunabilirler (Şekil 3) (11).

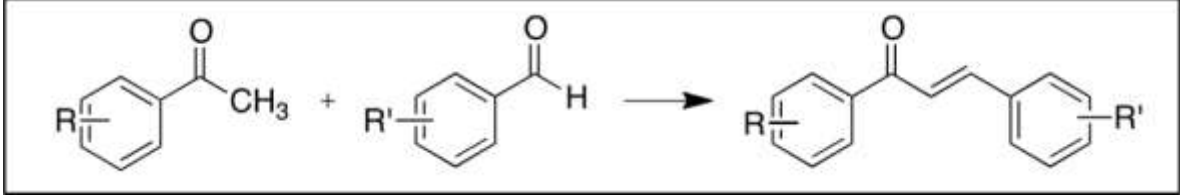


Şekil 2. Kalkon iskeletinin yapısal gösterimi (Zhuang'dan, 8)



Şekil 3. Trans ve cis konfigürasyonlarında kalkonlar (Zhuang'dan, 8)

Kalkonlar, flavonoidler ailesine ait ikincil metabolitlerdir ve flavonoid biyosentetik yolların önemli ara maddeleridir (8, 11, 12). Kalkonlar; kolaylıkla sentezlenebilmesi ve süstitüsyon çeşitliliği sağlayabilmesi özelliklerinden dolayı bilhassa ilaç kimyası ve organik kimya açısından yoğun araştırmalara konu olmuştur. Kalkon bileşiklerini hazırlamak için en yaygın yöntem Claisen-Schmidt kondenzasyonu yöntemidir. Aldehit ve ketonun baz veya asit katalizli kondenzasyonunu ve ardından dehidrasyonunu içerir (Şekil 4) (13).



Şekil 4. Kalkon sentezinin genel şeması (Irfan'dan, 13)

Kalkonların basit aromatik bileşiklerden sentezlenmesi kolaydır. Bu bileşikler fonksiyonelleştirilmiş kalkon türevleri sentezlemek için yapısal olarak kolayca modifiye edilebilirler. Yapısal modifikasyon esas olarak her iki fenil halkasında meydana gelmektedir (8). Kalkonların yapısında bulunan üç karbon atomundan meydana gelen α , β -doymamış karbonil grubu, elektronların hareketini sağlamaktadır. Bundan dolayı da heterosiklik bileşiklerin sentezi için başlangıç maddesi olarak sıkça tercih edilmektedir. Michael reaksiyonu karbon-karbon bağı oluşumu için en etkili yöntemlerdendir ve sentetik kimyada yaygın olarak uygulanılmaktadır (8, 14).

α , β doymamış ester, keton, nitro ve nitril bileşikleri gibi olefin ya da alkin grupları ile O, N, S ve C atomları bulunduran nükleofiller arasında konjuge katılmalar gerçekleşebilir (15). Bu katılmalara Michael katılma reaksiyonları denir. Örneğin

kalkonlar, Keap1 sisteinlerinin kovalent modifikasyonu yoluyla oksidatif strese karşı en önemli savunma mekanizmalarından biri olan Keap1-Nrf2-ARE yolunu modüle edebilmektedir (16).

2.1.1. Kalkonların Biyolojik Aktiviteleri

Kalkonlar, flavonoid ailesinin önemli bir üyesidir. Meyveler (domates ve narenciye), kabuklu yemişler ve sebzeler gibi birçok yenilebilir bitkide bulunurlar. Doğal kalkonlar ve bunların sentetik analogları çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir (8, 17, 18). Ayrıca, zararlı mikroorganizmalardan, böceklerden ve hayvanlardan korumak için bitkilerin ikincil metabolitleri olarak işlev görürler (19). Kalkonların; antikanser, antioksidan, antimalaryal, antitüberküler, antiviral, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antihistaminik, antiülser ve antibakteriyel gibi çok geniş farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (8, 11, 12, 19). Ayrıca kalkonlar, pirimidin türevleri gibi farmakolojik olarak aktif heterosiklik bileşiklerin sentezi için başlangıç maddesi olarak kullanılırlar. Ayrıca endüstride stabilize edici ve tatlandırıcı ajanlar, analitik ve spektrometrik reaktifler olarak kullanılırlar (8, 11, 20).

2.1.2. Klinik Uygulamada Kalkonlar

Kalkonlar, geniş farmakolojik aktivitelerinin yanı sıra sentezlenmesinin basit olması nedeniyle yoğun araştırmalara maruz kalmıştır. Tablo 1'de gösterilen kalkonlar, klinik uygulamada kullanılan kalkonlara örnek teşkil etmektedir (17).

Tablo 1. Onaylanmış ve klinik olarak test edilmiş bazı kalkonlar (Maciejewska'dan, 16)

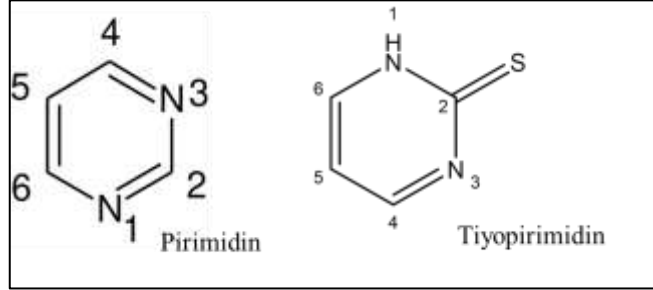
İlaç	Aktivite	Etki Mekanizması
Sofalcone	Mukozal koruyucu Helicobacter pylori büyümesinin inhibitörü	H2-reseptör antagonisti, Helicobacter pylori üzerinde doğrudan bakterisidal etkiye sahiptir ve anti-üreaz aktivitesine sahiptir
Metokalkon	Koleretik ve diüretik	PCSK9 enzim inhibitörü
Isoliquiritigenin	Antioksidatif, antitümör antiaging, anti-inflamatuar, anti diyabetik	Tirozinaz inhibitörü NMDA reseptör antagonisti GABA-A benzodiyapin reseptörü Pozitif allosterik modülatör
Ksantohumol	Antikanser, antioksidan ve anti- inflamatuar	Farnesoid X reseptör agonistim, NFkB inhibitörü ve NRF2 İnhibitörü
Hesperidin- metil kalkon	Damar koruyucu Antioksidan Antienflamatuar Nöroprotektif	Oksidatif stres inhibitörü Sitokin üretiminin inhibitörü NF-κB (Nükleer Faktör kappa B) İnhibitörü

2.2. Pirimidin Türevleri

Yıllar boyunca, heterosiklik bileşikler, tıbbi kimya araştırmalarındaki geniş uygulamaları nedeniyle çok dikkat çekmiştir. Heterosiklik bileşikler, en az iki farklı atoma sahip halkalı bileşiklerdir. Bu bileşiklerde en yaygın bulunan atomlar azot, oksijen ve kükürttür (21). Heterosiklik bileşikler doğada bol miktarda bulunurlar. Pirimidin halkası, doğada yaygın olarak bulunan heterosiklik aromatik bir bileşiktir. Pirimidinler, nitrojen bazları olarak adlandırılan nitrojen içeren moleküllerin en önemli iki biyolojik ailesinden biridir (21, 22). Pirimidin halkası çok sayıda doğal bileşiğin yapısında yer alır. DNA'nın yapısında bulunan timin bazı, RNA'nın yapısında yer alan urasil bazı, DNA ve RNA'nın yapısında yer alan sitozin bazı, pirimidin halkası içerir. Pirimidinler ve türevleri, birçok doğal ürün ve ilaçta sıkça bulunur. Antiviral, antioksidan, antihelmintik, antimikrobiyal (23), anti-hepatit (24), anti-inflamatuar özellikler (25), kanser kemoterapisinde (26) ve kızamık hastalığı tedavisinde (27) gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteler gösterirler.

Tiyopirimidinler, antiviral, antitümör, anti-inflamatuar, analjezik, antikanser, herbisidal, antileishmanial, antineoplastik, antioksidan, antimikrobiyal ve antitüberküler özellikler gösterir (23-25, 28-31). 2-merkaptopirimidinler olarak da adlandırılan 2-tiyopirimidinler, pirimidinlerin en önemli sınıflarından biridir. Kardiyotonik ilaçlar, antitüberküler ve antiinflamatuar ajanların hazırlanmasındaki geniş uygulama alanları nedeniyle ilgi çekici moleküllerdir (32-34). Tiyopirimidinlerin, akciğer, karaciğer, kolon ve prostat hücre hatlarına karşı güçlü antitümör aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (32,

34, 35). Ayrıca tiyopirimidin çekirdeği içeren bileşiklerin önemli anti HIV aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (36).



Şekil 5. Pirimidin ve tiyopirimidinin kimyasal yapıları (Lagoia'dan, 21; Khaldi'den, 23)

Aminopirimidin-2-on/tion türevleri, organik kimyada önemli bir başlangıç bileşiği olarak görülmektedir. İyi bilinen kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle, kalkon türevlerinin tiyöüre ile reaksiyonundan 2-tiopirimidin türevlerinin sentezi elde edilebilmektedir (9, 37). Pirimidin ve tiyopirimidinin kimyasal yapıları Şekil 5'de gösterilmektedir. Pirimidin yapısı gösteren bileşiklerin farmakolojik etkilerinin olması sebebiyle bu bileşiklerin sentezi günümüzde oldukça yoğun bir araştırma konusunu oluşturmaktadır.

2.3. Serbest Radikaller

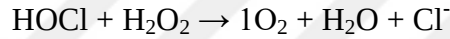
Serbest radikal, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve bir atom veya molekül olarak tanımlanabilmektedir. Bu moleküller, eşlenmemiş elektronlara sahip olduğundan dolayı son derece reaktif ve kararsız olarak bilinirler (1). Bu nedenle protein, lipid, koenzimler, nükleotit ve DNA gibi çevrelerindeki çoğu molekülle tepkimeye girme eğilimleri oldukça yüksektir ve dolayısıyla zararlı etkiler meydana getirirler (38, 39). Diabetes mellitus, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, katarakt, kardiyovasküler hastalıklar, solunum hastalıkları gibi çeşitli insan hastalıklarında ve ayrıca yaşlanma sürecinde artan oksidatif strese yol açmaktadır (40, 41).

Reaktif oksijen türleri (ROT), oksidatif fosforilasyon sırasında O₂'nin kısmi indirgenmesi nedeniyle oluşan oldukça reaktif oksijen türevleridir. Süperoksit radikali, oksijen metabolizmasının ilk ara ürünüdür. Süperoksit radikali, hidroperoksil radikalini oluşturmak için düşük pH'da protonlanır. Süperoksit radikali, hidrojen peroksit üretiminde ve vücuttaki geçiş metallerinin indirgenmesinde rol oynar (42, 43).

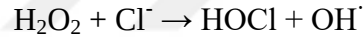
Reaktif bir serbest radikal olan hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$); karbonhidratlar, DNA, lipidler ve proteinler dahil olmak üzere hem organik hem de inorganik moleküllerle reaksiyona girebilir. H_2O_2 , metal iyonları (Fe^{+2} veya Cu^+) ile reaksiyona girdiğinde Fenton reaksiyonu gerçekleşir. Haber-Weiss reaksiyonunda süperoksit radikali ile H_2O_2 reaksiyona girer (44).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), diğer moleküllerden elektronları yakalayan süperoksit veya moleküler oksijenden oluşan radikal olmayan bir oksidandır. (45, 46). Oldukça reaktif olan hidroksil radikali, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek hasara neden olabilir. (1, 47).

Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$), DNA ve doku hasarına neden olabilen oldukça güçlü bir oksitleyici ajandır (48).



HOCl, aktive edilmiş nötrofiller tarafından üretilen miyeloperoksidaz enzimi tarafından katalize edilen bir reaksiyonda hidrojen peroksit ve klorürden üretilen ana oksidandır.



HOCl, oksidasyon ve klorlama reaksiyonlarında yer alan güçlü bir reaktif türdür (40). Askorbat, ürat, piridin nükleotidleri ve triptofan dahil olmak üzere tiyoller ve diğer biyolojik molekülleri oksitleyebilir.

Süperoksidin protonlanması ile meydana gelen perhidroksil radikali ($\text{HOO}^\bullet$), yağ asidi peroksidasyonunu başlatabilir (49).

Süperoksit ile nitrik oksit moleküllerin tepkimeye girmesi sonucu peroksinitrit anyonu (ONOO^-) oluşmaktadır. Peroksinitrit anyonu fizyolojik pH'da azotdioksit ve hidroksil benzeri radikaller meydana getirerek DNA'nın parçalanmasına ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (50, 51).

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentetaz enzimi (NOS) ile L-Arginin ve oksijenden üretilir (52, 53). Sulu ortamda çok kısa yarı ömrüne sahiptir ve bu nedenle oldukça reaktiftir.

2.3.1. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif stresin kanser, diyabet, nörodejeneratif bozukluklar, bronşit, amfizem ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların etiolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir. (54, 55).

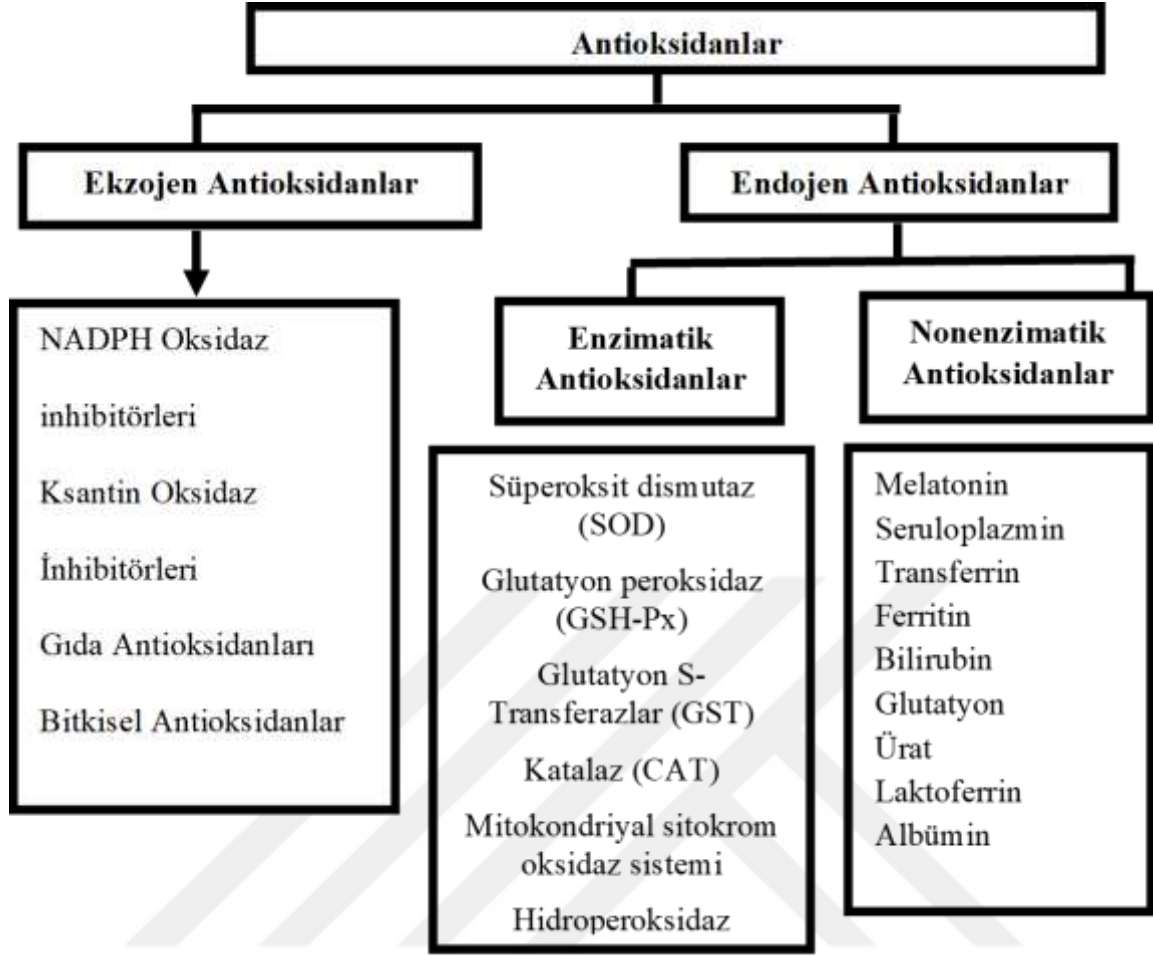
Serbest radikaller, deoksiribozlar ve nükleotid bazları ile kolayca reaksiyona girerek DNA'ya zarar verebilirler. H_2O_2 hücre zarından geçerek çekirdeğe ulaşabilir ve DNA bazlarıyla reaksiyona girerek DNA hasarına neden olabilir (56). Bazen bu DNA modifikasyonlarının onarılamadığı durumlarda mutasyon, fonksiyon kaybı ve hücre ölümü meydana gelmektedir (57).

Serbest radikaller ayrıca hücre zarındaki kolesterol ve doymamış yağ asidi ile kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Lipid peroksidasyonunda, hücre zarlarındaki doymamış yağ asitlerinde bulunan konjuge çift bağlardaki bir hidrojen atomu çıkarılır ve peroksi radikalleri meydana gelir (58, 59).

Kükürt içeren amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden oldukça kolay etkilenirler. Özellikle bu etkilenme sonucunda karbon merkezli organik radikaller ile sülfür radikalleri meydana gelir (60, 61). Serbest radikaller proteinlerle etkileşerek üçüncül yapılarında değişikliklere neden olarak immünoglobulin G, albümin ve hem içeren proteinler gibi birçok biyolojik molekülü etkileyerek fonksiyonlarını bozarlar (42, 52, 62). Serbest radikaller DNA, RNA ve proteinlere zarar vererek koroner kalp hastalığı, diyabet, romatoid artrit, hipertansiyon, kanser ve yaşlanma gibi çeşitli patolojik durumların gelişmesine yol açabilir (42, 52, 63).

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidan sistem, serbest radikal süpürücü özellikleri sayesinde, serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarı engeller. Vücutta serbest radikal üretimi ile antioksidan seviyeleri arasında bir denge vardır ve artan radikal seviyeleri ile bu denge bozulduğunda oksidatif stres ve patolojik olaylar meydana gelir. (39, 40, 42). Antioksidanları başlıca iki grup altında sınıflandırabiliriz (Şekil 6) (1).



Şekil 6. Endojen ve eksojen antioksidanların sınıflandırılması (Badem'den, 43)

2.4.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanları, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak 2 gruba ayırabiliriz (1).

2.4.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.4.1.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutazlar, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikalini moleküler hidrojen peroksit ve oksijene parçalanmasını katalize ederler. İnsanlarda, süperoksit dismutazın üç farklı izoenzimi mevcuttur (1). SOD1 sitoplazmada, SOD2 mitokondride ve SOD3 ekstrasellüler sıvıda bulunur. SOD1 ve SOD3 bakır (Cu) ve çinko (Zn) içerirken SOD2 manganez (Mn) içerir (54, 64).

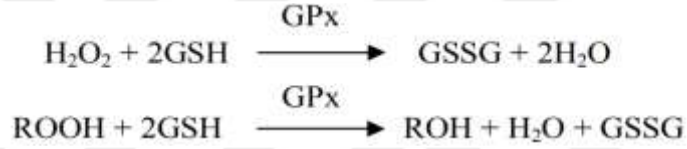


2.4.1.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, hidrojen peroksitin suya ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eden hemoprotein enzimidir. Katalaz, yapısında bir hem grubu ve dört protein alt birimi yer alır. Her alt birim bir hem grubu ve bir NADPH molekülü bulundurur. Tüm aerobik hücrelerde bulunur. Çizgili kaslar, miyokard, böbrek, eritrositler ve karaciğer katalazın en bol olduğu yerlerdir (65).



2.4.1.1.3. Glutatyon peroksidaz (GPx)



GPx, hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin parçalanmasını katalize eder (40).

2.4.1.1.4. Glutatyon S-transferazlar (GST)

GST, detoksifikasyon metabolizmasında ve lipit hidroperoksitlerinin detoksifikasyonunda görev alır. GST hücresel makromolekülleri reaktif elektrofillerin saldırısından koruma işlevi gören bir detoksifikasyon enzimidir. Ayrıca hücrede lipofilik veya hidrofilik bileşiklerin bağlanması, metabolize edilmesi ve taşınmasında görev almaktadır (1, 66).

2.4.1.1.5. Mitokondriyal sitokrom oksidaz

Mitokondriyal sitokrom oksidaz (COX), süperoksit radikallerinin azaltılmasında rol oynar.

2.4.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

İndirgenmiş glutatyon, koenzim Q, albümin, lipoik asit, bilirubin, transferrin, melatonin, seruloplazmin ve ürik asit enzimatik olmayan antioksidanlardandır (67).

Melatonin: Triptofandan sentezlenen lipofilik antioksidandır. Oksijen radikallerinin temizleyicisi olarak görev yaptığı bildirilmiştir (68).

Seruloplazmin: Fe^{2+} 'yi toksik olmayan Fe^{3+} formuna oksitleyebilen bakır içeren bir ferroksidazdır (69).

Transferrin, Laktoferrin ve Ferritin: Dolaşımda bulunan serbest Fe^{+3} 'ü hücrelere taşır ve ferritin dokularda bulunan Fe^{+3} 'ü bağlar. Hücredeki demir iyonlarının (Fe^{+2}) miktarını azaltarak Fenton reaksiyonunun gelişmesini engellerler (55).

Bilirubin: Hem proteinlerinin katabolizmasından üretilir. Bilirubin, hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı korur (70).

Glutatyon: H_2O_2 , serbest radikaller, disülfidler ve askorbik asiti indirgeyerek hücreleri oksidatif strese karşı koruyan bir tripeptittir. Ayrıca hücredeki proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmiş durumunu da korur (71).

Ürik asit: Hidrofilik bir antioksidandır. Ayrıca Fe ve Cu gibi geçiş metallerini şelatlayabilir (72).

Albümin: Miyeloperoksidaz enzimi tarafından aktive edilmiş fagositlerde üretilen hipokloröz asidin neden olduğu oksidatif stresin azaltılmasında rol oynar (73).

2.4.2. Ekzojen Antioksidanlar

Ksantin oksidaz inhibitörleri: Ekzojen antioksidan olarak bilinen Allopurinol, hipoksantin ve ksantin ve ürik aside oksidasyonu sırasında ksantin oksidaz tarafından oluşturulan ROT'u azaltır (74).

NADPH oksidaz inhibitörleri: NADPH oksidaz, elektron donörü olarak NADPH kullanarak süperoksit veya H_2O_2 üretmek için elektronların O_2 'ye transferini katalize eder. Bu nedenle hücre dışı sıvılarda ROT seviyelerinin artmasına katkıda bulunur (1).

Gıda antioksidanları: Bütıl hidroksianisol (BHA), Ter-butilhidrokinon (TBHQ) ve Bütıl hidroksitoluen (BHT) olarak bilinen gıda antioksidanları lipid peroksidasyonunu önlemeye yardımcı olmak için gıda koruyucuları olarak kullanılırlar (75, 76).

Bitkisel Antioksidanlar: En önemli doğal antioksidan maddeler bitkilerde (sebzeler, meyveler, otlar, yağlı tohumlar, tahıllar) bulunur. Bu maddelerin antioksidan özelliklerini, flavonoidler, fenolik asitler, karotenoidler (A Vitamini), E Vitamini ve C Vitamini gibi bileşenler oluşturur (50, 77).

2.5. Enzimler Hakkında Genel Bilgiler

Enzimler, organizmadaki metabolik reaksiyonları hızlandıran ve biyolojik katalizörler olarak işlev gören proteinlerdir. Enzimlerin katalitik aktivitelerinin kimyasal katalizörlerden 10^6 - 10^{16} kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Enzimler oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere 6 sınıfa ayrılır (43, 78, 79).

Oksidoredüktazlar: Oksidasyon indirgeme reaksiyonlarını katalize eden tüm enzimler bu sınıfa aittir. Tirozinaz enzimi bu sınıfın iyi bir örneğidir.

Transferazlar: Bir grubu (örneğin, bir metil grubu veya bir glikozil grubu) bir bileşikten (verici) diğerine (alıcı) aktaran enzimlerdir.

Hidrolazlar: C-C, C-N ve C-O bağlarının ve fosforik anhidrit bağları dahil olmak üzere diğer bazı bağların su yardımıyla hidrolitik ayrılmasını katalize ederler.

Liyazlar: C-O, C-N, C-S ve C-C bağlarını hidrolitik ve oksidatif dışındaki farklı bir mekanizma ile yıkan enzimlerdir.

İzomerazlar: Molekül içi yeniden düzenleme ile bir molekül içindeki yapısal veya geometrik değişiklikleri katalize eden enzimlerdir.

Ligazlar: GTP veya ATP'deki bir difosfat bağının hidrolizi tarafından sağlanan enerjiyi kullanarak iki molekülün birleşmesini katalize ederler.

2.5.1. Enzim İnhibisyonu

Enzim katalizli reaksiyonun hızını azaltabilen veya önleyebilen maddelere inhibitör, enzim katalizinin engellenmesine de inhibisyon denir.

2.5.1.1. Geri Dönüşümlü (Reversibl) Enzim İnhibisyonu

Tersinir enzim inhibisyonlarında, substrat veya enzim konsantrasyonunda meydana gelen bir değişiklik, inhibitör madde ile enzim arasındaki ilişkiyi etkilemektedir (79).

2.5.1.1.1. Yarışmalı (Kompetatif) Enzim İnhibisyonu

Substrata yapısal olarak benzeyen bir madde enzimin aktif bölgesine bağlandığında substrat ile enzim arasındaki etkileşimi engelleyerek enzimin katalitik etkisini yavaşlatır. Örneğin, süksinat dehidrojenaz tarafından süksinik asidin fumarik aside dönüştürüldüğü krebs döngüsünde, yapısal olarak fumarik aside benzeyen malonik asidin varlığı bu

reaksiyonu yavaşlatır. Enzim katalizli bir reaksiyonda maksimum hızın (V_{max}) yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonu K_m değeri olarak ifade edilir. Azalan bir K_m değeri, enzimin substrata artan afinitesini gösterir. Yarışmalı enzim inhibisyonunda V_{max} değeri değişmezken K_m değeri artar (43, 79, 80).

2.5.1.1.2. Yarışmalı Olmayan (Nonkompetatif) Enzim İnhibisyonu

İnhibitör ve substrat arasında yapısal bir benzerlik yoktur. İnhibitör, enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanır ve ürün oluşum hızını azaltır. Bu inhibisyon tipinde K_m değeri değişmeyip reaksiyonun V_{max} değeri azalır (79).

2.5.1.1.3. Yarışmasız (Ankompetitif) Enzim İnhibisyonu

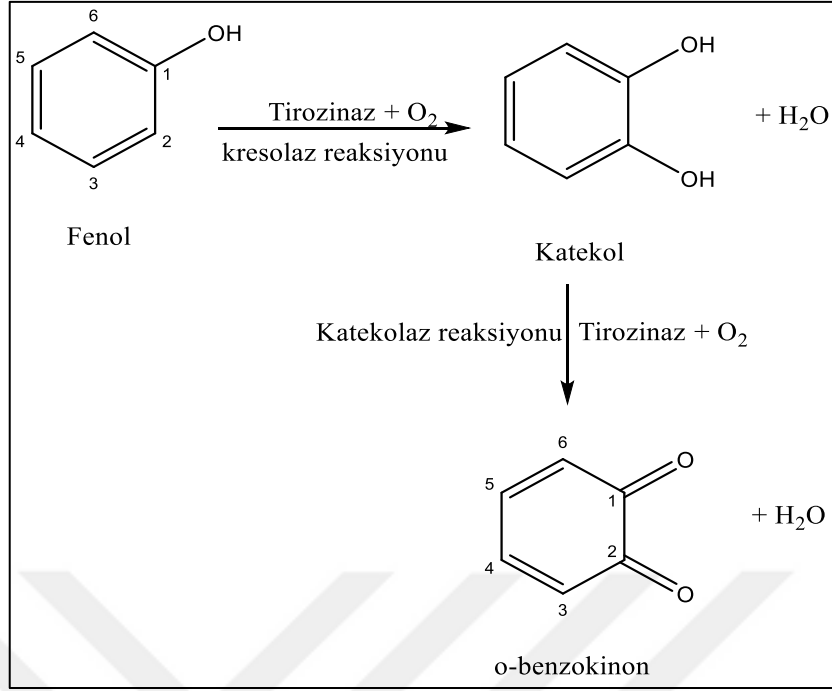
İnhibitör, enzimin aktif bölgesinden farklı bir bölgeye geri dönüşümlü olarak bağlanır. Bu inhibisyon tipinde V_{max} ve K_m azalır (79).

2.5.1.2. Geri Dönüşümsüz (İrreversibl) Enzim İnhibisyonu

İnhibitör, enzimin aktif bölgesindeki fonksiyonel bir gruba kovalent olarak bağlanarak enzimi inaktive eder. İnhibitör-enzim bağı o kadar güçlüdür ki, inhibisyon fazla substrat ilavesiyle tersine çevrilemez (79). Bakteri hücre duvarlarında peptidoglikan tabakasının oluşumundan sorumlu olan transpeptidaz enzimine geri dönüşümsüz olarak bağlanan penisilin antibiyotikleri örnek olarak verilebilir (81).

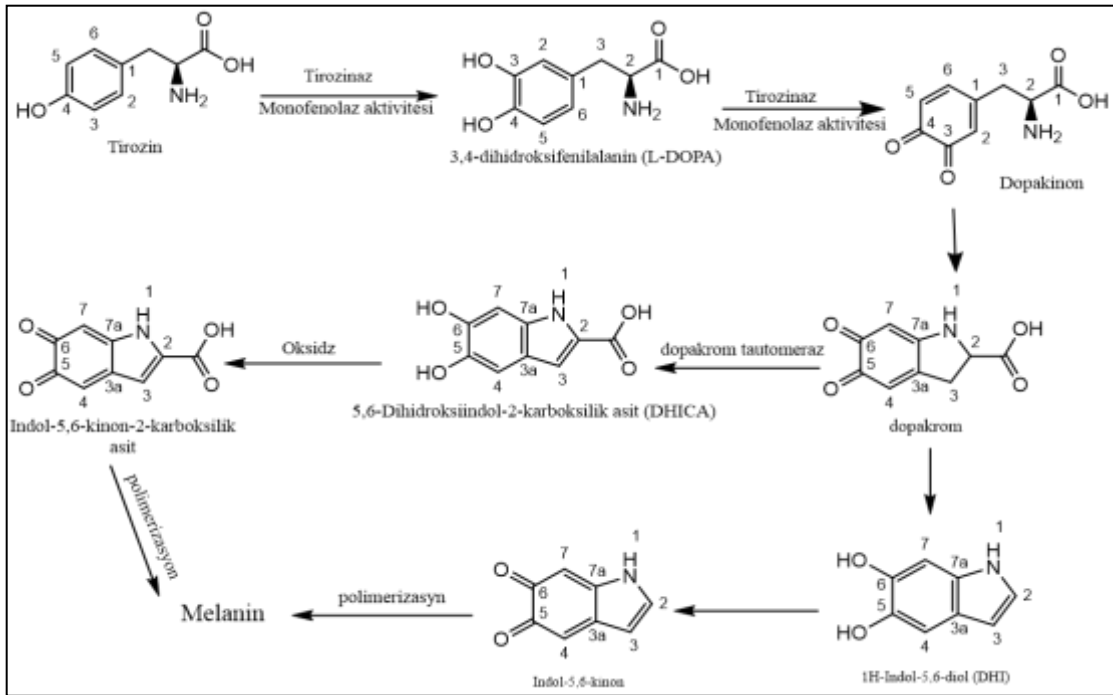
2.5.2. Tirozinaz

Tirozinaz enzimi (EC 1.14.18.1) oksidoredüktaz sınıfı içinde yer alan bir enzimdir. Bu enzim aynı zamanda fenolaz, monofenol oksidaz, polifenol oksidaz veya katekolaz olarak da bilinir (82).



Şekil 7. Tirozinaz'ın kresolaz ve katekolaz aktivitesi (83)

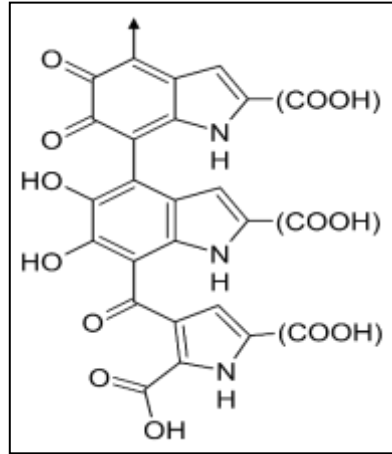
Doğada memelilerde, bitkilerde, mikroorganizmalarda ve mantarlarda bulunmaktadır (84, 85). Tirozinaz, monofenollerin o-difenollere oksidasyonunu ve ardından o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu katalize etmektedir (3).



Şekil 8. Melanin biyosentez basamakları (Kondo ve Hearing'den, 85)

Tirozinaz, melanin üretimi için hız sınırlayıcı enzimdir. Tirozinaz enzimi ile tirozinden melaninin oluşum aşamaları şekil 8'de gösterilmiştir (86). Epidermiste oksidasyon ve indirgeme sürecinde yer almaktadır. Enzimin katalize ettiği bu kimyasal reaksiyonlar, melanogenez sürecinde temel öneme sahiptir (82). Tirozinaz, bakteri, mantar, bitki ve memelilerde melanin pigmentlerinin üretiminde rol oynayan ve bakır içeren bir oksidaz enzimidir. Monofenollerin difenollere ve ardından kinonlara oksidasyonunu katalize ederek etki etmektedir. Bu işlemi, kinonların melanin pigmentlerine polimerizasyonu takip etmektedir (84, 85). Tirozinazın etkisiyle ortaya çıkan aşırı pigment üretimi, deride hiperpigmentasyon ile ilgili farklı rahatsızlıklara neden olabilir (87). Aşırı melanin birikimi, insanlarda hiperpigmentasyon, çil, melazma, lentigo, efelid, hiperpigmentasyon, gebelik yarası, yaşlılık lekeleri ve melanom gibi dermatolojik durumlara neden olmaktadır (88).

Tirozinaz, dopaminin dopamin kinon türevlerine oksidasyonunu katalize edip beyinde nöromelanin birikimine neden olmaktadır. Parkinson hastalığında nöromelanin içeren nöronların, özellikle de önemli nigra dopaminerjik nöronların seçici bir dejenerasyonu vardır. İnsan tirozinazının substantia nigra'da aşırı ekspresyonu, nigral dopaminerjik nöronlarda nöromelaninin yaşa bağlı üretimi ile sonuçlanır.



Şekil 9. Melanin yapısı (Kondo ve Hearing'den, 85)

Ayrıca tirozinaz sebze, içecek ve meyvelerde istenmeyen esmerleşmeden sorumlu olup, besin kalitesinin düşmesine ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (3, 89). Bundan başka melanin, yara iyileşmesi sırasında böcekler için bir savunma molekülü olarak önemli bir role sahiptir (90).

Bakteriyel melanin, bakterileri UV radyasyonundan (91) ve şelat metallereinden koruyarak çevresel stres altında bakterinin hayatta kalmasına katkıda bulunabilir (92). Ayrıca polimiksin B, kanamisin, tetrasiklin ve ampisilin gibi antibiyotikleri nötralize edebilir ve bu antibiyotiklerin gerekli inhibitör dozunu artırabilir (93).

2.5.2.1. Tirozinaz enziminin inhibitörleri ve aktivatörleri

Meyve veya sebzelerin kararması gibi istenmeyen reaksiyonları önlemek için gıda endüstrisinde tirozinaz inhibitörleri ve tirozinaz aktivatörleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi deterjanlar, tirozinaz enzim aktivatörlerindendir. Üzümlerden izole edilen tirozinaz aktivitesi, asidik bir ortama veya üre çözeltisine maruz bırakıldığında 4-10 kat arttığı bulunmuştur. Aktivatörlerin etkileri, tirozinazın optimum pH'ına, optimum sıcaklığına ve substrat özgülüğüne bağlıdır. Bu faktörler tirozinazın kaynağına göre değişir. Örneğin, turptan ekstrakte edilen tirozinazın aktivitesini Cu^{2+} 'nin arttırdığı, patatesten ekstrakte edilen tirozinazı ise etkilemediği belirtilmiştir. Tirozinaz aktivatörlerinin etki mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak bazı çalışmalar aktivatörlerin, tirozinaz gibi bakır içeren enzim monomerlerinden oligomerler oluşturarak enzimi biyolojik aktivite için gerekli polimer yapısına getirdiğini göstermektedir (94, 95).

Karbon monoksit, siyanür, askorbik asit, azidler ve sodyum dietil-ditiyokarbamat (DICEA) gibi bazı spesifik ligandlar tirozinaz enziminin prostetik grubundaki bakır ile şelatlanarak tirozinazı inhibe etmektedir. Florür, bakladan elde edilen tirozinazı yarışmalı olmayan bir şekilde inhibe ederken borat ve polivinilpirrolidin (PVP), tirozinazı yarışmalı olarak inhibe etmektedir. PVP gibi çözünebilir polimerler tarafından tirozinazın inhibisyonu, ortama anyonik deterjan eklenerek tersine çevrilebilmektedir (95). Ayrıca fenil hidrazin, ferrosiyanür, askorbik asit, hidroksil ve amin gallik asit gibi indirgeyici maddeler mantardan izole edilmiş tirozinaz enzimini inhibe eder. Bu maddeler tirozinazın prostetik grubundaki Cu^{2+} 'nin indirgenmesine neden olmaktadır (96). Tirozinaz inhibitörleri anormal melanin üretiminin neden olduğu birçok cilt bozukluğunun tedavisinde kullanılabilmektedir (3).

2.5.2.2. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen İnhibitörler

Tirozinaz enzimi için inhibitör olarak kullanılan bileşiklerin çoğu bitki ve mantarlardan elde edilmektedir (95). Fenoller, aldehytler ve diğer türevler doğal kaynaklardan elde edilen tirozinaz inhibitörlerindendir. Aloesin, anisik asit, arbutin, kumik

asit, anakardik asit, p-kumarik asit, kemferol, 4-hidroksi-3-metoksi sinamik asit, metallotiyonin, kojik asit, azelaik asit, agaritin, oksiresveratrol, 3,4-dihidroksi sinnamik asit doğal tirozinaz inhibitörlerindendir (97).

Fenoller, kemferol, cesretin, gallik asit, luteolin 4'-O-glukozit ve luteolin 7-O-glukozit gibi birçok fenolik bileşik, enzimin aktif bölgesinde bulunan bakır ile şelat oluşturma yeteneklerinden dolayı önemli bir tirozinaz enzim inhibisyonuna sahiptir (98). Ayrıca D-glukoz ile çapraz esterleşme ile oluşturulan gallik asit ve türevlerinin güçlü tirozinaz inhibitör etkilerinin olduğu bildirilmiştir (99). *p*-Kumarik asit, tirozinazın katekolaz ve kresolaz aktivitesini inhibe eder. *p*-Kumarik asit'in para pozisyonundaki hidroksi grubu, kresolaz aktivitesini arttırırken katekolaz aktivitesini azaltmıştır (97).

Oksiresveratrol, oldukça güçlü antitirozinaz aktivitesine sahip fenolik bir bileşiktir. İnhibitör etkisinin, yapısında çok sayıda hidroksi grubunun bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (100).

Bitkilerden izole edilen aldehitler ve türevlerinin, enzimlerin yapısındaki amino grupları gibi nükleofilik gruplarla reaksiyona girdiği bilinmektedir. Aldehit ve türevleri enzimlerin yapısındaki amino grupları ile etkileşimde bulunarak Schiff bazlarını oluştururlar ve bundan dolayı antitirozinaz özelliğe sahip olduğu söylenmektedir (101).

Mantar kaynaklarından elde edilen tirozinaz inhibitörleri arasında Kojik asit, Azelaik asit ve Metallotiyonin bulunur (102). Kojik asit, tirozinazın yapısında bulunan bakır iyonunu şelatlayarak enzimin aktivitesini önemli ölçüde inhibe edebilmektedir (103).

Tirozinaz inhibitörleri potansiyel antibakteriyel ajanlar olabileceğinden tirozinaz inhibitörleri olarak adlandırılan tüm bileşikler için antibakteriyel analizler yapmak faydalı olacaktır (104). Kojik asit, antibakteriyel aktiviteye sahip en yaygın kullanılan tirozinaz inhibitörlerinden birisidir (105, 106). Kojik asit, arbutin, hidrokinon, L-askorbik asit, ellagik asit ve azelaik asit gibi tirozinaz inhibitörleri cilt beyazlatma maddeleri olarak kullanılmaktadır (105).

Hidrokinon (HK), memeli hücrelerinde potansiyel olarak mutajeniktir. HK, iğnelenme hissi, tahriş, kontakt dermatit, geçici eritem, lökoderma, yanma, tırnaklarda kestane lekeleri, hipokromi ve okronoz gibi bir dizi yan etkiye yol açabilir (107). HK, güvenlik endişelerine rağmen dünya çapında en çok tercih edilen cilt beyazlatıcı bir ajandır. HK, tirozinaz enzimini inhibe ederek melanine dönüşümü engeller. Ayrıca DNA

ve RNA sentezini, melanositlerde melanozomların oluşumunu ve ayrışmasını engeller. Tirozinaz inhibitörlerinin yan etkileri konsantrasyona bağlıdır. Tahriş, kuruluk, kaşıntı, alerjik reaksiyonlar ve tırnak hiperpigmentasyonu gibi yan etkiler nedeniyle %5'ten yüksek konsantrasyonlar önerilmez. Ayrıca, uygulama alanı dışındaki bölgelerde de vitiligo benzeri depigmentasyonlar oluşabildiğinden yan etkiler sadece uygulama yeri ile sınırlı değildir. HK, yüksek reaktivitesinden dolayı melanositler için güçlü sitotoksik ve mutajenik bir bileşiktir (99, 108). Tirozinaz tarafından metabolize edilince aktifleşen Hidrokinon Monobenzil Eter, melanositlerde kalıcı hasara neden olan serbest radikalleri oluşturan tirozinaz inhibitörüdür (95). Topikal kortikosteroidler cilt beyazlatma aktivitesine sahiptir. Ancak yan etkileri nedeniyle uzun süreli kullanımları kısıtlıdır. Sıklıkla kalıcı depigmentasyona neden olurlar (109).

Tretinoin, zayıf bir cilt aydınlatma aktivitesine sahiptir. Melanin üretimini engelleyerek ve keratinositler içinde melanozomların yayılmasını sağlayarak etki eder. Ayrıca epidermisin yenilenme hızını da arttırır. Uygulama yerinde tahriş ve dehidrasyon yaygın yan etkileridir.

L-Askorbik Asit, melanin oluşumunu baskılar. Ayrıca, oksitlenmiş melanin formlarını da azaltır. L-Askorbik asit ısıya duyarlı olduğundan ve kolayca parçalandığından, cilt aydınlatma maddesi olarak kullanımı verimli değildir. Magnezyum-L-askorbil-2-fosfat gibi daha kararlı formlar geliştirilmiş ve tıpta kullanılmıştır.

Retinoik Asit, tirozinaz ve tirozinaz ile ilgili protein 1 (TRP-1) sentezini inhibe ederek melanin biyosentezini önemli ölçüde bloke eder. Yan etkileri arasında hafif kızarıklık ve kuruluk yer alır.

Ellagik Asit, doğal olarak oluşan bir polifenoldür. Güçlü bir antioksidan görevi görür ve tirozinaz aktivitesini bloke edebilir. Ellagik asidin bakır iyonları ile kolaylıkla şelat oluşturarak tirozinaz aktivitesini azalttığı düşünülmektedir. Ellagik asit çözünmez ve bu nedenle biyoyararlanımı zayıftır (110).

Arbutin, tirozinaz enzimini inhibe ederek melanin sentezini azaltır veya inhibe eder. Arbutin, yaban mersini bitkisinden elde edilen glikozillenmiş bir hidrokinondur. Bir tirozinaz inhibitörü görevi görür ve hidrokinondan daha güvenli bir terapötik indekse sahiptir.

Azelaik asit, melazma ve post-inflamatuvar hiperpigmentasyon ve akne tedavisinde kullanılmaktadır. Azelaik asit de tirozinaz inhibitörü görevi görür ve hidrokinona alternatif olarak önerilmiştir (3, 111).

B3 vitamininin aktif formu olan Niasinamid, melanositlerden keratinositlere melanozomların transferini engelleyerek etki gösterir (112).

Salisilik asit ve o-hidroksi benzoik asit, tirozinaz inhibitörleri olarak işlev görür (113). Kojik asit, kanserojen olmasından dolayı kozmetikte kullanımı sınırlandırılmıştır (114, 115). Bu nedenle, ilaç benzeri özelliklere sahip yeni tirozinaz inhibitörlerinin geliştirilmesine büyük ihtiyaç duyulmaktadır.

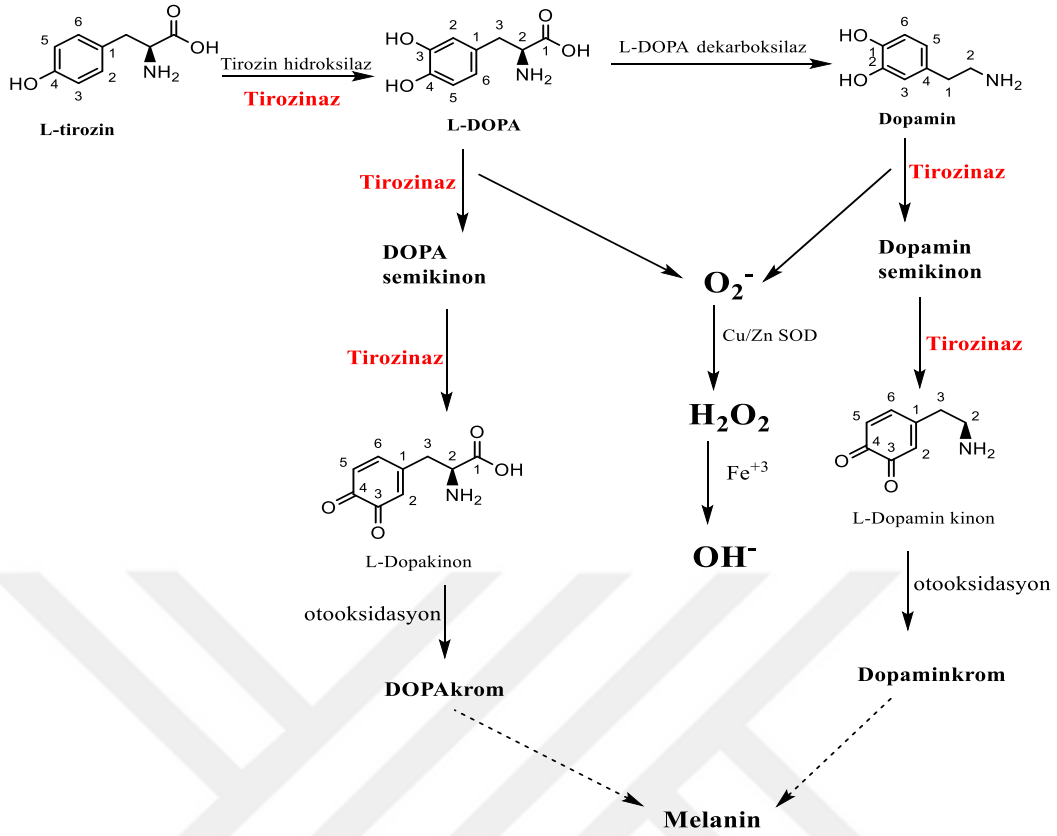
2.5.2.3. Tirozinaz İnhibitörlerinin Uygulamaları

Tirozinaz inhibitörleri başlıca gıda ve kozmetik endüstrilerinde kullanılmaktadır. Tirozinaz, proteinlerin amino ve sülfhidril gruplarıyla etkileşir. Sebzelerin, içeceklerin ve meyvelerin istenmeyen şekilde esmerleşmesine neden olarak, besin kalitesinin düşmesine ve ekonomik kayıplara neden olur. Gıda endüstrisinde meyve ve sebzelerin ekonomik değerini korumak için tirozinaz inhibitörleri kullanılsa da toksik olmayan tirozinaz inhibitörlerine ihtiyaç olduğu kabul edilmektedir (102, 116).

Melanin, böcekler için bir savunma molekülü olarak önemli rol oynar. Böceklerin hayatta kalması ve pestisit direnci için gereklidir. Bu nedenle tarımda haşere kontrolünde uygulanan stratejilerden biri de tirozinaz enziminin inhibisyonudur (117).

Melanin ayrıca cildi UV ve ROT hasarına karşı korur. Hücrelerde bulunan pigmentlerin rastgele düzensiz dağılımı ile hiperpigmentasyon ya da hipopigmentasyon, yaşa bağlı lekeler, çil, aktinik hasarlar ve melazma gibi dermatolojik rahatsızlıklar meydana gelebilir (3). Bu nedenle, farmasötik ve kozmetik endüstrilerinde, doğal kaynaklı ve melanin oluşumunu engelleyen yeni tirozinaz inhibitörlerinin bulunması araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir.

Tirozin sinir hücrelerinde L-DOPA'ya ve daha sonra bir dekarboksilasyon reaksiyonu ile dopamine dönüşür (82). Tirozinaz, beyindeki dopaminerjik nöronlar hasar görürse katekolamin sentezinin devamını sağlar (Şekil 10). Dopaminin oksitlenmesi sonucu okside dopamin türevleri olarak bilinen dopamin kinonların Parkinson hastalığı ile ilişkili nörotoksisiteye neden olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle Tirozinaz inhibitörleri, Parkinson hastalığının tedavisi için yeni stratejilerden biri olabilir (4, 118).

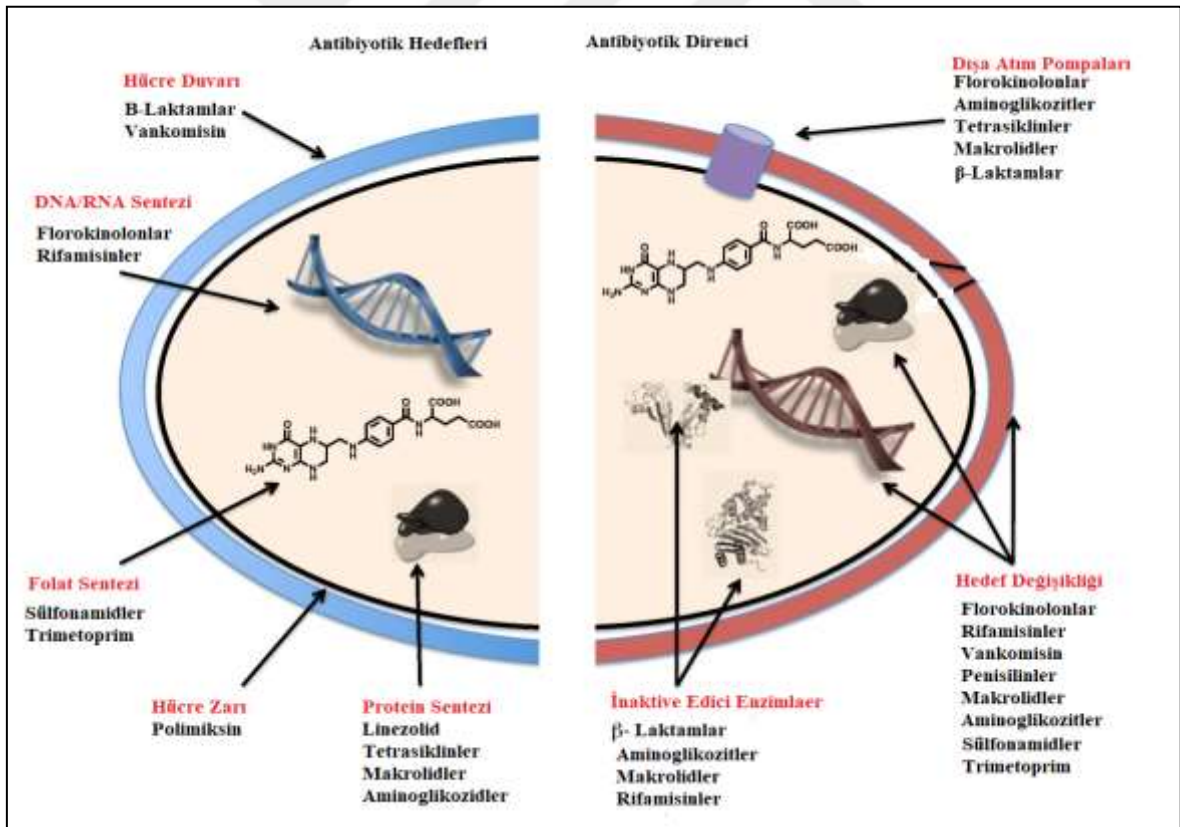


Şekil 10. Tirozinazın enzimatik etkisi sırasında katekol o-kinonların ve diğer reaktif oksijen türlerinin üretilmesi (Hasegawa'dan, 4)

2.6. Antibakteriyeller

Bakteriyel patojenlerde antibiyotik direnci endişe verici seviyelere ulaşmıştır. Antibiyotik direnci, bu ilaçların aşırı ve yanlış kullanımı sonucunda ortaya çıkmıştır. Ne yazık ki, antibiyotik keşfi ve gelişimindeki yavaş ilerleme, klinik kullanım için yeni bileşiklerin sınırlı bir mevcudiyetine yol açmıştır, böylece antibiyotik direncinin morbidite ve mortalite oranları üzerindeki yükünü ağırlaştırmıştır (7). Antibiyotik direnci, sağlık, veterinerlik, gıda ve tarım sektörlerinin yanı sıra yaşamın her aşamasında insanları etkileme potansiyeline sahiptir. Bu da onu dünyanın en acil halk sağlığı sorunlarından biri haline getirmektedir (119). Bazı bakteriler belirli antibiyotik türlerine doğal olarak dirençlidirler. Bakteriler zamanla birçok direnç özelliği kazanabildikleri için farklı antibiyotik türlerine karşı dirençli hale gelebilmektedir (120). Metisiline Dirençli Staphylococcus Aureus (MRSA), antibiyotiğe dirençli bakterilerden birisidir. Tıp merkezlerinde MRSA, çeşitli enfeksiyonların yanı sıra pnömoniye de neden olmaktadır. Treptococcus pneumoniae bakterileri, pnömoni ve birçok hastalığa neden olmaktadır.

Yediğimiz gıdalar Enterobacteriaceae türleri tarafından kontamine olursa gıda zehirlenmesine veya gastroenterite neden olabilmektedir (121). Bu nedenle yeni antibakteriyel ajanların keşfi günümüzün önemli araştırma konularından biri olmuştur. Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yoğun ve bilinçsiz olarak kullanıldığında, dirençli bakteri suşlarının ve antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu durum, morbidite, mortalite ve sağlık bakım maliyetlerini artırarak ve tedavi etkinliğini azaltarak halk sağlığı için bir tehdit oluşturmaktadır (122). Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine rağmen; bakteriler tarafından zamanla direncin yeniden oluşturulması sorunu, bilim insanlarını sürekli olarak yeni antimikrobiyal kaynakları keşfetmeye sevk etmiştir (123). Antibakteriyel ilaçlar için üç hedef vardır: (a) bakteri hücre duvarı veya plazma zarı biyosentezi; (b) bakteriyel protein sentezi; ve (c) bakteriyel DNA replikasyonu ve onarımı (122). Antibiyotiklerin bakteriyel süreçleri nasıl bozabileceğini ve antibiyotik dirençli bakterilerin kullandığı yöntemleri Şekil 11'de gösterilmiştir (124).



Şekil 11. Antibiyotiklerin ana hedefleri ve bakteriyel direnç mekanizmaları (117)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler

Bileşiklerin sentez ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılan 2-aminoasetofenon, 2,5-dimetoksi benzaldehit, 3-bromo benzaldehit, 3-kloro benzaldehit, tiyoüre, metalik sodyum, etanol, metanol, DMSO (dimetil sülfoksit), etil asetat ve n-hegzan Sigma-Aldrich (Munich, Almanya)'den temin edilmiştir. NMR çözücüsü olarak DMSO kullanılmıştır (Merck, %99.8). Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan tirozinaz, kojik asit, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , L-DOPA, TPTZ, HCl, FeCl_3 , asetik asit, metanol, etanol, NaOH, troloks, Na_2CO_3 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ve neokuproin Sigma-Aldrich (Munich, Almanya)'den temin edilmiştir. Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan çözücüler ve hazırlanışları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
HCl (40 mM):	25 mL saf suyun üzerine % 37'lik HCl'den 340 μL ilave edildi ve son hacim 100 mL olacak şekilde saf suyla tamamlandı.
TPTZ (10 mM):	234.249 mg TPTZ tartıldı ve 75 mL 40 mM'lık HCl içinde çözüldü.
FeCl_3 (20 mM):	324.4 mg FeCl_3 distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6)	2.325 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 'ya 12 mL glasiyel asetik asit ilave edildi ve hacim distile su ile 750 mL'ye tamamlandı.
FRAP Reaktifi	Sırasıyla 300 mM pH 3.6 asetat tamponu, 10 mM TPTZ, 20 mM FeCl_3 'ün 10:1:1 oranında karıştırılmasıyla taze olarak hazırlandı.
Trolox (0.25 mg/mL)	2.5 mg trolox'un 10 mL metanol içinde çözülmesiyle bir stok solüsyon hazırlandı. Trolox 1000, 500, 250, 125, 62.5 μM konsantrasyonlarda metanolla seyreltilerek hazırlandı.
10 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	92.4 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mL distile su ile çözülerek hazırlandı (pH:7'ye NaOH ilave edilerek ayarlandı).
1M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$	3.8 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 50 mL saf su ile çözüldü (pH:7'ye NaOH ilave edilerek ayarlandı).
7.5 mM Neokuproin çözeltisi	78 mg neokuproin 50 mL metanol içinde çözüldü.
L- DOPA çözeltisi (2.5 mM)	0.004925g L-DOPA 10 mL fosfat tamponu (pH 6.8) içinde çözülerek hazırlandı.
Kojik asit standardı (500, 100, 50, 25 mg/mL)	2.5 mg kojik asit 5 mL fosfat tamponu çözeltisinde çözüldü. Hazırlanan 500 mg/mL kojik asit çözeltisi tampon çözelti ile seyreltilerek istenilen derişimlerdeki çözeltileri hazırlandı.
Tirozinaz Enzim Çözeltisi (5571 U/mg)	1 mg tirozinaz 25 mL tampon içinde çözülmesiyle 25 m'Llik bir stok solüsyon hazırlanır. Enzim çözeltisi 5.16 mL stok çözelti alınarak tampon ile 10 m'ye tamamlanarak hazırlanır.

3.2. Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar marka/model olarak Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka/Model
Hassas Terazı	OHAUS Pioneer
Isıtıcılı Magnetik karıştırıcı	Heidolph MR
Vakum pompası	Millipore
Cam Geri Soğutucu	PYREX™
NMR Spektrometresi	Bruker 400 MHz NMR cihazı,
UV Spektrofotometresi	Unicam UV2-100 spektrofotometresi
Kütle Spektrometresi	Micromass Quattro LC-MS/MS
Elementel Analiz	Costech ECS 4010
Rotary evaporatör	Heidolph Hei-VAP Precision
IR Spektrofotometresi	Perkin-Elmer 1600 FT-IR (4000-400 cm ⁻¹) spektrofotometresi
Erime noktası belirleme cihazı	Thermo-var cihazı
pH metre	OHARUS
Saf Su Cihazı	Thermo Scientific
Vorteks karıştırıcı	Heidolph Reax Top Vortex Mixer
Hassas Terazı	OHAUS Pioneer
Yarı otomatik pipetler	Eppendorf
İnkübatör	Memmer
Mikro plate okuyucu	BMG Labtech Spectrostar Nano

¹H spektrumları TMS pikine, APT spektrumları ise DMSO çözücü pikine (δ 40.0 ppm) göre ayarlanmıştır. Kütle spektrumları elektron sprey (ES/EI) yöntemi ile tayin edilmiştir. Kolon kromatografisinde (KK) normal faz 230-400 mesh silika jel, normal faz silika jel 60 F254 ve alüminyum oksit kaplı alüminyum plakalar ince tabaka kromatografisinde (İTK) kullanılmıştır. İnce tabakada bulunan bölünmelerini kontrol etmek için kap içinde 254 nm'lik bir UV lambası ve renklendirici olarak iyot (UV olmayan aktif maddelerde) kullanılmıştır. İTK işlemlerinde çözücü olarak kloroform ve metanol kullanıldı.

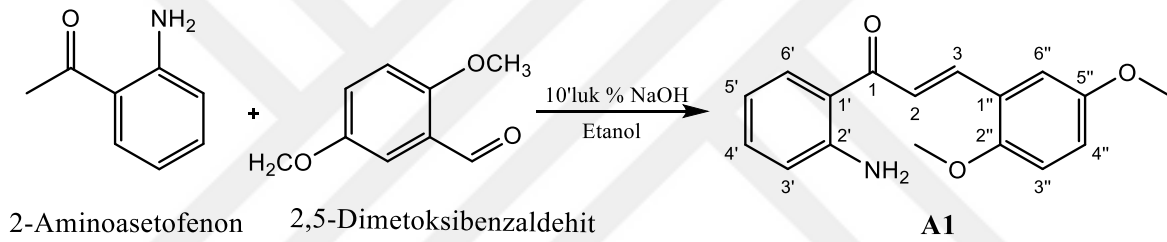
3.3. Deneysel Çalışma Aşaması

3.3.1. Bileşiklerin Sentezi, Saflaştırması ve Karakterizasyonu Çalışmaları

3.3.1.1. A1-A3 No'lu Bileşiklerin Sentezi

A1-A3 No'lu amino süstitüe kalkon bileşikleri, klasik Claisen-Schmidt kondenzasyonu yöntemi kullanılarak sentezlendi (125). Başlangıç olarak 2-aminoasetofenon, sırasıyla bileşikler A1-A3'ü elde etmek için 2,5-dimetoksi benzaldehit, 3-bromo benzaldehit, 3-kloro benzaldehit ile reaksiyona sokuldu. Reaksiyonda, baz olarak NaOH ve çözücü olarak etanol ile su kullanılmıştır. Reaksiyonlar oda koşullarında ($\approx 25^\circ\text{C}$) gerçekleştirilmiştir (126-128). Reaksiyonlar ve yapıları aşağıdaki gibidir.

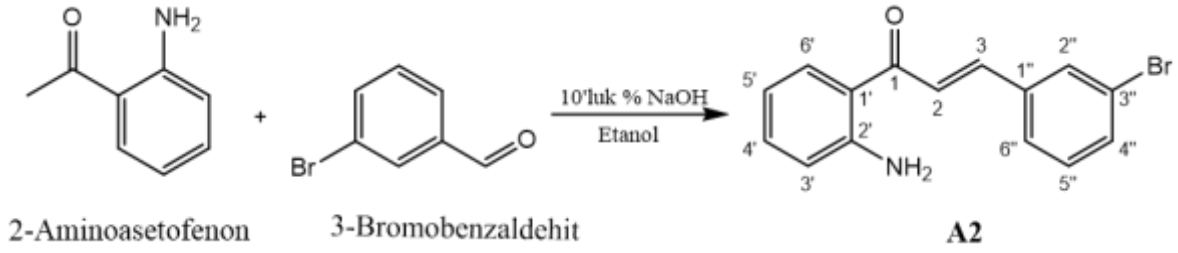
[(E)-1-(2-aminofenil)-3-(2,5-dimetoksifenil)prop-2-en-1-on] (A1) Sentezi



Bir beher (250 mL) içerisinde, NaOH'yi (1g, 25 mmol) çözmek için saf H_2O ve etil alkolden (1:1, 10 mL) çözücü karışımı kullanıldı. Reaksiyon karışımı, buz banyosunda ($0\sim 5^\circ\text{C}$) sıcaklıkta soğutularak 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 2 ml etil alkol içinde çözülmüş 1,35 g (0.01 mol) 2-aminoasetofenon, NaOH çözeltisine ilave edildi ve 15 dakika boyunca karıştırıldı. 3 ml etil alkolde çözülmüş 1.66 g (0.01 mol) 2,5-dimetoksibenzaldehit soğutulan çözeltiye yavaş yavaş eklendi. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında 12 saat karıştırılarak ve TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı. Çökelti, vakum pompası kullanılarak süzüldü ve saf su ile yıkandı. İTK kullanarak saflığı kontrol edildi. Oluşan saf sarı çökelti desikatörde kurutuldu.

Verim (%)	: 90
Rf	: 0.66 (hegzan -diethyl eter, 2:1)
Erime noktası ($^\circ\text{C}$)	: 101
^1H -NMR Spektrumu	: Ek 1
^{13}C -NMR (APT) Spektrumu	: Ek 2

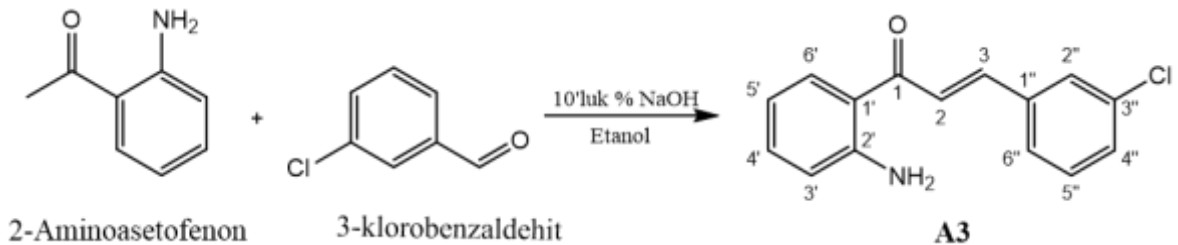
[(E)-1-(2-aminofenil)-3-(3-bromofenil)prop-2-en-1-on] (A2) Sentezi



Bir beher (250 mL) içerisinde, NaOH'yi (1g, 25 mmol) çözmek için saf H₂O ve etil alkolden (1:1, 10 mL) çözücü karışımı kullanıldı. Reaksiyon karışımı, buz banyosunda (0~5°C) sıcaklıkta soğutularak 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 2 ml etil alkol içinde çözülmüş 1,35 g (0.01 mol) 2-amino asetofenon, NaOH çözeltisine ilave edildi ve 15 dakika boyunca karıştırıldı. 3 ml etil alkolde çözülmüş 1.85 g (0.01 mol) 3-bromobenzaldehyt soğutulan çözeltiye yavaş yavaş eklendi. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında 12 saat karıştırılarak ve TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı. Çökelti, vakum pompası kullanılarak süzüldü ve saf su ile yıkandı. İTK kullanarak saflığı kontrol edildi. Oluşan saf sarı çökelti desikatörde kurutuldu.

Verim (%)	: 92
Rf	: 0.64 (hegzan -dietil eter, 2:1)
Erime noktası (°C)	: 97
¹ H-NMR Spektrumu	: Ek 3
¹³ C-NMR (APT) Spektrumu	: Ek 4

[(E)-1-(2-aminofenil)-3-(3-klorofenil)prop-2-en-1-on] (A3) Sentezi

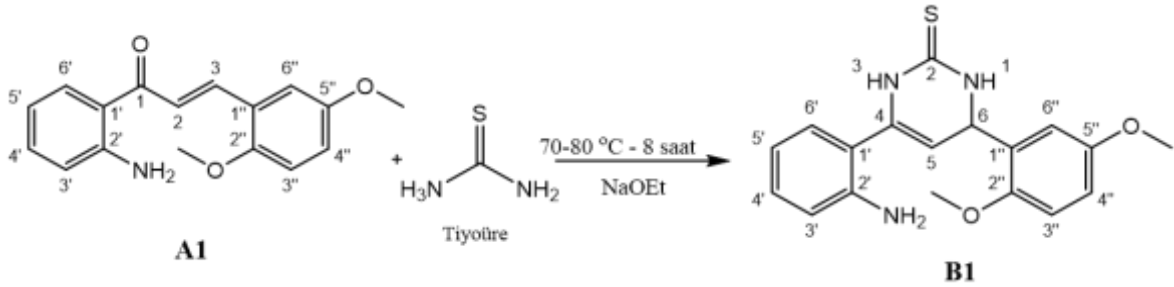


Bir beher (250 mL) içerisinde, NaOH'yi (1g, 25 mmol) çözmek için saf H₂O ve etil alkolden (1:1, 10 mL) çözücü karışımı kullanıldı. Reaksiyon karışımı, buz banyosunda (0~5°C) sıcaklıkta soğutularak 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 2 ml etil alkol içinde çözülmüş 1,35 g (0.01 mol) 2-amino asetofenon, NaOH çözeltisine ilave edildi ve 15 dakika boyunca karıştırıldı. 3 ml etil alkolde çözülmüş 1.40 g (0.01 mol) 3-klorobenzaldehit soğutulan çözeltiye yavaş yavaş eklendi. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında 12 saat karıştırılarak ve TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı. Çökelti, vakum pompası kullanılarak süzülde ve saf su ile yıkandı. İTK kullanarak saflığı kontrol edildi. Oluşan saf sarı çökelek desikatörde kurutuldu.

Verim (%)	: 76
R _f	: 0.63 (hegzan -dietil eter, 2:1)
Erime noktası (°C)	: 101
¹ H-NMR Spektrumu	: Ek 5
¹³ C-NMR (APT) Spektrumu:	Ek 6

3.3.1.2. B1-B3 No'lu Bileşiklerin Sentezi

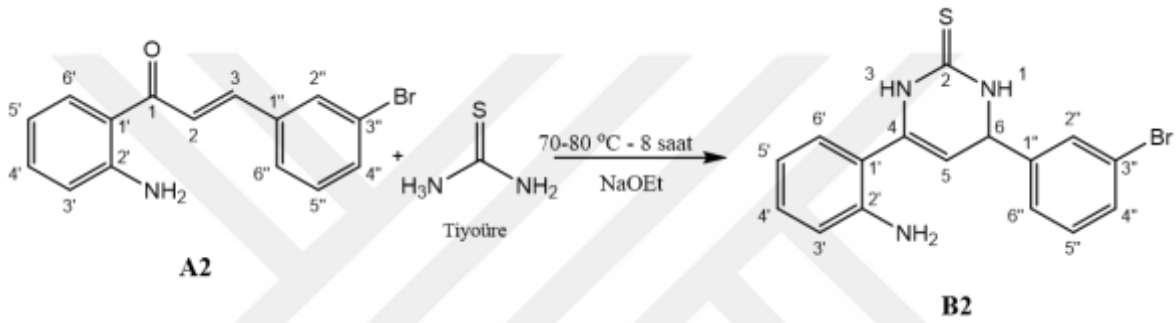
[4-(2-aminofenil)-6-(2,5-dimetoksifenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tion] (B1)



250 mL'lik bir balon içerisinde 5 mmol kalkon (A1) bileşiğı, 20 mL kuru etanol ile çözüldü. Ardından 0.38 g (5mmol) tiyoüre ve 10 mL sodyum etoksit (g) ilave edildi. Karışım, geri soğutucu kullanılarak ve azot atmosferi altında 70-80°C sıcaklıklar arasında ısıtılarak karıştırıldı. Reaksiyon İnce Tabaka kromatografisi (İTK) ile takip edildi. Ardından Reaksiyon karışımı bir gece boyunca bekletildikten sonra vakum pompası yardımıyla süzülde. Elde edilen katı toplandı, su ile yıkandı ve Etanol içinde tekrar kristallendirilmiştir. Oluşan kristaller krozeden süzölüp, liyofilizatörde kurutuldu ve saf madde elde edildi.

Verim (%)	: 80
Rf	: 0.68 (hegzan -dietil eter, 2:1)
Erime Noktası (°C)	: 194-195
¹ H-NMR Spektrumu	: Ek 7
¹³ C-NMR (APT) Spektrumu	: Ek 8
LC/MS-MS Spektrumu	: Ek 9
FT-IR Spektrumu	: Ek 10

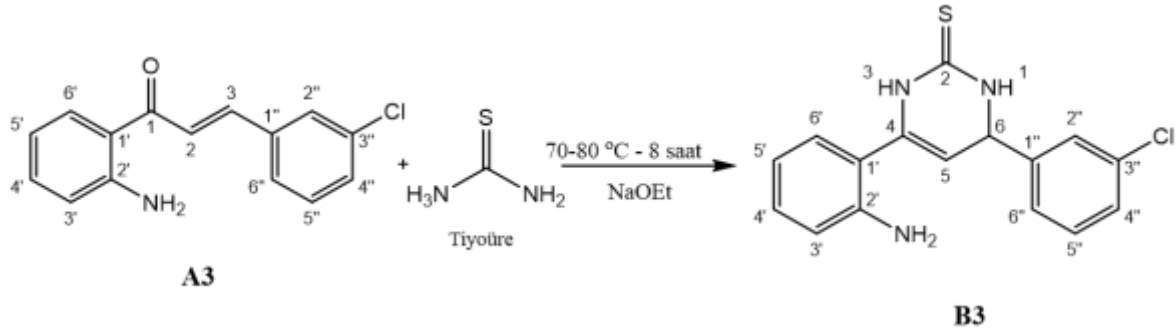
[4-(2-aminofenil)-6-(3-bromofenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tion] (B2)



250 mL'lik bir beher içerisinde 1.4 g (5 mmol) A2 kalkan bileşiği 20 mL etanol ile çözüldü. Behere 0.38 g (5mmol) tiyoüre ve 10 mL sodyum ekoksit ilave edildi. Karışım, geri soğutucu kullanılarak ve azot atmosferi altında 70-80°C sıcaklıklar arasında ısıtılarak karıştırıldı. Reaksiyon İnce Tabaka kromatografisi (İTK) ile takip edildi. Ardından reaksiyon karışımı etil asetat/su ile 3 kere ekstrakte edildi. Etil asetat kısmı balona alınıp evapore edildi. Elde edilen ham karışım, hegzan-etil asetat 100 mL (4:1), 100 mL (4:2), 100 mL (1:1) çözücü sistemleri kullanılarak kolon kromatografisiyle (2x50 cm, silika jel- 230-400 ağ, 40 g) analiz edildi. Toplanan fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilmiştir ve NMR cihazıyla yardımıyla saf yağlı B2 bileşiği tayin edilmiştir.

Verim (%)	: 48
Rf	: 0.70 (hegzan-dietil eter, 1:3)
Erime Noktası (°C)	: yağlı
¹ H-NMR Spektrumu	: Ek 11
¹³ C-NMR (APT) Spektrumu	: Ek 12
LC/MS-MS Spektrumu	: Ek 13
FT-IR Spektrumu	: Ek 14

[4-(2-aminofenil)-6-(3-klorofenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tion] (B3)



250 mL'lik bir beher içersinde 1.5 g (5 mmol) bağıl A2 Kalkon 20 mL etanol ile çözüldü. Behere 0.38 g (5mmol) tiyoüre ve yeni hazırlanmış 10 mL sodyum etoksit ilave edildi. Karışım, geri soğutucu kullanılarak ve azot atmosferi altında 70-80°C sıcaklıklar arasında ısıtılarak karıştırıldı. Reaksiyon İnce Tabaka kromatografisi (İTK) ile takip edildi. Reaksiyon İnce Tabaka kromatografisi (İTK) ile takip edildi. Ardından reaksiyon karışımı etil asetat/su ile 3 kere ekstrakte edildi. Etil asetat kısmı balona alınıp evapore edildi. Elde edilen ham karışım, hegzan-etil asetat 100 mL (4:1), 100 mL (4:2), 100 mL (1:1) çözücü sistemleri kullanılarak kolon kromatografisiyle (2x50 cm, silika jel-230-400 ağ, 40 g) analiz edildi. Toplanan fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilmiştir ve NMR cihazıyla yardımıyla turuncu katı saf B3 bileşiği tayin edilmiştir.

Verim (%)	: 78
Rf	: 0.69 (hegzan-dietil eter, 1:3)
Erime noktası (°C)	: yağlı
¹ H-NMR Spektrumu	: Ek 15
¹³ C-NMR (APT) Spektrumu	: Ek 16
LC-MS/MS Spektrumu	: Ek 17
¹ H-NMR Spektrumu	: Ek 18

3.3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.3.2.1. Sentezlenen Bileşiklerin Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve Cu(II) iyon indirgeme kapasitesi (CUPRAC) incelenerek belirlenmiştir.

3.3.2.1.1. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Bu yöntemin prensibi, antioksidanların varlığında Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tris(2-piridli)-S-triazin) kompleksinin mavi renkli Fe(II)-TPTZ'ye indirgenmesine bağlıdır. Renk yoğunluğu antioksidanın gücü ile doğru orantılıdır ve üretilen renk 595 nm'de en yüksek absorbens değerini verir (129, 130). Bu yöntemde, sentezlenen tüm bileşiklere ait numuneler, 10 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Troloks'un 62.5, 125, 250, 500, 1000 μ M konsantrasyonlarında hazırlanan metanolik çözeltileri kullanılmıştır. Deney, aşağıda verilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak FRAP reaktifi (taze olacak şekilde) ve test çözeltileri hazırlanmıştır. 50 μ L numune/standart solüsyonları test 1, test 2 ve test 3 ve numune körü tüplerine pipetlenmiştir. Reaktif körü sırasına ise 50 μ L numune/standart çözücüsü pipetlenmiştir. Spektrofotometrenin dalga boyu 595 nm'ye ayarlanmıştır. Test 1, test 2, test 3 ve reaktif körü tüplerine (20 sn aralıklarla) 1.5 mL FRAP reaktifi ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Numune körü tüplerine ise 1.5 mL su-metanol (2:3) (FRAP Reaktifi çözücüsü) (20 s aralıklarla) ilave edilmiştir ve karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında (25 °C) 20 dakika inkübe edilmiştir ve absorbens değerleri 595 nm'de okunmuştur. Çalışma üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Trolox'un standart kalibrasyon eğrisi çizilmiştir ve numunelerin FRAP değeri, grafik yardımıyla bulunmuştur. FRAP değerleri, g numune başına μ M olarak hesaplanmıştır.

3.3.2.1.2. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

CUPRAC yöntemi, elektron veren antioksidanların varlığında bakır(II)-neocuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc) bakır(I)-neocuproine (Cu(I)-Nc) indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan sarı-turuncu (Cu(I)-Nc) kompleksin yoğunluğu 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Absorbans değerleri, test edilen bileşiklerin antioksidan gücü ile doğru orantılıdır (130, 131). Bu yöntemde, sentezlenen tüm bileşiklere ait numuneler, 10 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Troloks'un 62.5, 125, 250, 500, 1000 μ M konsantrasyonlarında hazırlanan metanolik çözeltileri kullanılmıştır.

Prosedürler sırasıyla; Test çözeltileri ve reaktifler hazırlanmıştır (3 paralel çalışılmıştır). 500 μ L numune/standart test 1, test 2, test 3 ve numune körü tüplerine pipetlenmiştir. Reaktif körü tüplerine 500 μ L numune/standart çözücüsü eklenmiştir.

Spektrofotometre 450 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. Tüm tüplere 1000 µL $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}^-$ çözeltisi ve 1000 µL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi eklenmiştir. Test 1, test 2, test 3 ve reaktif körü tüplerine 1000 µL neocuproin reaktifi eklenirken, numune körü tüplerine 1000 µL metanol (neocuproin reaktifi çözücüsü) 20 saniye arayla pipetlenmiştir. Karanlıkta oda sıcaklığında (25 °C) 30 dakika bekletilmiştir. İlk tüpten başlanarak 30 dakika sonra ilk tüp alınıp plastik bir küvete aktarılmıştır ve 450 nm’de tüm tüplerin absorbansı okunmuştur. Sonuçlar TEAC (Trolox eşdeğer antioksidan kapasite) (µM) olarak ifade edilmiştir.

3.3.2.2. Tirozinaz İnhibitör Aktivitesi Tayini

Örneklerin tirozinaz enzim inhibisyonu aktivitesi L-DOPA substratı ile dopakrom metoduna göre belirlenmiştir (43). Sentezlenen bileşikler fosfat tamponu (pH 6.8) ve DMSO ile çözülmüştür ve 10 mg/mL konsantrasyonunda çözeltileri hazırlanmıştır. Numuneler ve standart (α -kojik asit) fosfat tamponu (pH 6.8) ile 25, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde seyreltilmiştir. Örneklerin ölçümleri, 96 kuyucuklu bir mikropłaka kullanılarak 492 nm dalga boyunda bir ELISA okuyucusu kullanılarak yapılmıştır.

Deney protokolü A, B, C ve D harfleri verilerek oluşturulmuştur. Bu harfleri içeren kuyucuklara

A: 40 µL tirozinaz çözeltisi (46 ünite/ mL), 120 µL fosfat tamponu (pH=6.8);

B: 160 µL fosfat tamponu (pH 6.8);

C: 40 µL tirozinaz çözeltisi (46 ünite/ mL), 40 µL numune/standart çözeltisi, 80 µL fosfat tamponu (pH 6.8);

D: 40 µL numune/standart çözeltisi, 120 µL fosfat tamponu (pH 6.8) eklenmiştir.

Karışımlar 23 °C’de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Her bir karışıma 40 µL L-DOPA çözeltisi ilave edilmiştir. Tekrar 23 °C’de 10 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra mikropłaklar ELISA cihazına yerleştirilmiştir. 490 nm dalga boyunda örneklerin ve kontrol numunesinin absorbansları ölçülmüştür.

Absorbans değerlerini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır. Değerler yerlerine yazılarak örneklerin tirozinaz enzim inhibisyon değerleri bulunmuştur. Her örnek 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A-B) - (C-D)] / (A-B) \times 100$$

Bulduğumuz sonuçlar madde miktarının logaritması ile % enzim inhibisyon (absis-ordinat) değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen denklemden numunelerin enzim üzerine olan IC50 değerleri hesaplanmıştır.

3.3.2.3. Antimikrobiyal Aktivitelerin Belirlenmesi

Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerinin tayin edilmesinde Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi kullanılmıştır. Çalışmalar sırasında kullanılan test mikroorganizmaları *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermis* (ATCC12228), *Bacillus cereus* (RSKK709), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231) olarak belirlenmiştir. Slyvka ve ark. (2022)'nın yönteminde modifikasyonlar yapılarak çalışılmıştır (132). Agar kuyucuk difüzyon testi için 121 °C'de 15 dakika sterilize edilen Muller Hilton Agar, steril kabin içinde 20-25 mm kalınlığında olacak şekilde petrilere dökülmüştür. Soğuduktan sonra, bakteri yoğunluğu 0.5 Mc Farlanda, maya yoğunluğu 2.0 Mc Farlanda ayarlanmış olup eküvyon çubuğuyla agar yüzeyine yayılmıştır. Sonrasında agar yüzeyinde 6-7 mm çapında kuyucuklar açılmış ve her bir kuyucuğa 75 µL test bileşiği fraksiyonu koyulmuştur. Petriler *Candida albicans* için 25 °C'de diğer mikroorganizmalar için ise 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon zon çapları (mm) ölçülmüştür. Çalışmamızda standart madde olarak bakteriler için ampisilin (10 µg) ve mayalar için flukonazol (5µg) kullanılmıştır.

3.3.3. Moleküler Docking Çalışmaları

Sentezlenen B1-B3 bileşiklerinin tirozinaz enzimini inhibe etme potansiyelleri moleküler kenetleme çalışmaları içinden test edildi. AutoDock Vina V.1.2.0. yazılımı kullanılarak, sentezlenen bileşiklerin, *Agaricus bisporus* kristal tirozinaz proteini (PDB kodu: 2Y9X) aktif bölgesine bağlanma afiniteleri moleküler hedefleme yoluyla test edildi. Bunun için başlangıçta, 2Y9X üç boyutlu (3D) yapısında bulunan su molekülleri uzaklaştırıldı. Daha sonra, kristalografik bozuklukları ve doldurulmamış değerlik atomlarını hazırlamak, düzeltmek için hızlı hazırlama seçenekleri (Quick preparation options) kullanıldı. CHARRM kuvvet alanları uygulanarak protein enerjisi en aza indirildi. Sonuç olarak, yerleştirme işlemi için gerekli olan amino asitler tanımlandı ve hazırlandı. Chem-Bio Draw Ultra17.0 kullanılarak test edilen bileşiklerin 2D yapıları çizildi ve SDF dosyaları oluşturularak kaydedildi. AutoDock Vina yazılımı kullanılarak kaydedilen dosyalar açıldı, 3D yapılar protonlandı ve MMFF94 kuvvet alanı (MMFF94 force field) ile

0.1 RMSD de sentezlenmiş her bir serbest enerjisi (kcal/mol) minimize edildi. Daha sonra ligand hazırlama araçları ile minimize edilmiş yapılar Docking'e hazırlandı. Moleküler Docking işlemi, AutoDock Vina programı arayüzünde docking seçeneği seçilerek her bir bileşik için birbirinden bağımsız deneysel süreçler olarak gerçekleştirildi. Ligandların serbest hareket etmesine izin verilirken reseptör bağlanma bölgesi sabit tutuldu. Moleküler hedefleme esnasında her molekülün protein ile on farklı etkileşim pozunu üretmesine izin verildi. Daha sonra *A. bisporus* tirozinaz aktif bölgesi ile en uygun pozların Docking puanları (Enzim ligand kompleksinin serbest bağlanma enerjisi) elde edildi ve Discovery Studio 2019 Client yazılımı kullanılarak enzim ligand kompleks yapılarının 3D görüntüleri ve protein-ligand etkileşimlerini rezidü seviyesinde belirten 2D Plot analiz verileri oluşturuldu.

4. BULGULAR

4.1. Bileşiklere Ait Formüller ve Adlandırmalar

Kimyasal sentez çalışmaları sonucunda 3 adet 2-amino substitüeli kalkon bileşiği sentezlendi. Sentezlenen kalkon bileşiklerine tiyoüre eklenerek üç pirimidin-tiyon bileşiği sentezlenmiştir. Bileşiklere ait kodlar, formüller ve adlandırmalar Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Sentezlenen bileşiklerin kısa kodları, adları ve kimyasal yapıları

Kod	Bil. Adı	Kimyasal yapı
A1	(Z)-1-(2-aminofenil)-3-(2,5-dimetoksifenil)prop-2-en-1-on	
A2	(E)-1-(2-aminofenil)-3-(3-bromofenil)prop-2-en-1-on	
A3	(E)-1-(2-aminofenil)-3-(3-klorofenil)prop-2-en-1-on	
B1	4-(2-aminofenil)-6-(2,5-dimetoksifenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tion	
B2	4-(2-aminofenil)-6-(3-bromofenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tion	
B3	4-(2-aminofenil)-6-(3-klorofenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tion	

4.2. A1-B3 No'lu Bileşiklerinin Yapılarının Aydınlatılması

Sentezlenen 6 adet (A1-A3, B1-B3) bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR), LC-TOF-MS ve FT-IR spektroskopik yöntemlerden yararlanılmıştır. Bileşiklere dair spektrumlar Ek 1-18'de verilmiştir. Sentezlenen A1-A3 nolu kalkon bileşikleri bilinmekte olup veriler literatürdeki kalkon bileşiklerinin verileri ile uyumludur (133), ACD-NMR programından (134) yararlanılarak desteklenmiştir. Diğer sentezlenen B1-B3 bileşikleri bu tezde ilk defa sentezlenmiştir.

[(Z)-1-(2-aminofenil)-3-(2,5-dimetoksifenil)prop-2-en-1-on] (A1) Sentezi

Bileşiğine ait spektral veriler aşağıda verilmiştir.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 (δ , ppm): 3.7, 3.8 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 8.1 (1H, H-3, *d*, J = 7.6 Hz), 6.8 (1H, H-2, *d*, J = 8.4 Hz), Ar-H: [7.5 (d, 2H), 7.5 (d, 1H), 7.4 (brs, 2H, $-\text{NH}_2$), 7.2 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 6.9-7.0 (m, 1H), 6.8 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.2 (t, 1H, J = 8.0 Hz)].

^{13}C -NMR (APT) (100 MHz, DMSO- d_6 (δ , ppm): 191.1 (C_1), 134.6 (C_3), 123.7(C_2), 56.11, 56.55 ($-\text{OCH}_3$), Ar-C: [153.7 (C), 152.8 (C), 152.5 (C), 136.7 (CH), 131.8 (CH), 124.3 (C), 117.9 (C), 117.9 (CH), 117.3 (CH), 114.9(CH), 113.6(CH), 112.8(CH)].

[(E)-1-(2-aminofenil)-3-(3-bromofenil)prop-2-en-1-on] (A2)

Bileşiğine ait spektral veriler aşağıda verilmiştir.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 (δ , ppm): 8.0 (1H, H-3, *d*, J = 15.2 Hz), 7.5-7.6 (m, 1H, H-2), Ar-H: [8.1 (s, 1H), 8.1 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.8 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 7.5-7.6 (m, 2H), 7.4 (brs, 2H, $-\text{NH}_2$), 7.4-7.3 (m, 1H), 7.2-7.3 (m, 1H), 6.8 (d, 1H, J = 8.4 Hz)].

^{13}C -NMR (APT) (100 MHz, DMSO- d_6 (δ , ppm): 190.4 (C_1), 134.9 (C_3), 125.3(C_2), Ar-C: [152.6 (C), 140.6 (CH), 138.0 (C), 133.0 (CH), 132.1 (CH), 130.3(CH), 130.0(CH), 128.4(CH), 122.8 (C), 117.7 (C), 117.3(CH), 114.8(CH)].

[(E)-1-(2-aminofenil)-3-(3-klorofenil)prop-2-en-1-on] (A3) Sentezi

Bileşiğine ait spektral veriler aşağıda verilmiştir.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 (δ , ppm): 8.08-8.04 (m, 1H, H-3), 7.6 (1H, H-2, *d*, J = 15.6 Hz), Ar-H: [8.08-8.04 (m, 1H), 8.1 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.7 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 7.4-7.7 (m, 4H, (2H/ $-\text{NH}_2$)), 7.2-7.3 (m, 1H), 6.8 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.6-6.7 (m, 1H)].

¹³C-NMR (APT) (100 MHz, DMSO-d₆ (δ, ppm): 190.1 (C₁), 140.7 (C₃), 125.3 (C₂), Ar-C: [152.6 (C), 137.7 (C), 134.9 (CH), 134.2 (C), 132.0 (CH), 131.0 (CH), 130.8 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 117.7 (C), 117.3 (CH), 114.8 (CH)].

[4-(2-aminofenil)-6-(2,5-dimetoksifenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tion] (B1)

Bileşiğine ait spektral veriler aşağıda verilmiştir.

FT-IR (cm⁻¹): 747, 1044, 1185, 1272, 1489,1557,1615, 2938, 3124-3374.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆ (δ, ppm): 8.7, 9.4 (s, 2H, pirimidin/-NH), 5.0 (s, 1H, pirimidin-H₆), 5.2 (s, 1H, pirimidin -H₅), 4.8 (s, 2H, -NH₂), 3.7, 3.6 (s, 6H, -OCH₃), [ar-H: 7.0 (t, 1H, J= 8 Hz), 6.7-6.8 (m, 2H), 6.8-6.9 (m, 2H), 6.6 (d, 1H, J=8 Hz), 6.5 (t, 1H, J=8 Hz)].

APT-NMR (100 MHz, CDCl₃ δ, ppm): 55.8, 56.4 (-OCH₃), 50.5 (pirimidin-C₆), 101.9 (pirimidin-C₅), 133.5 (pirimidin-C₄), 176.0 (C=S), ar-C [112.4 (CH), 112.5 (CH), 113.9 (CH), 115.6 (CH), 116.6 (CH), 119.1 (C), 133.0 (C), 129.3 (CH), 129.7 (CH), 145.9 (C), 149.8 (C), 153.7 (C)].

LC/ MS-MS: (m/z) (%) [M-CH₃+H₂O+H]⁺: 345.81 (100),calc. 345.42.

[4-(2-aminofenil)-6-(3-bromofenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tion] (B2)

Bileşiğine ait spektral veriler aşağıda verilmiştir.

FT-IR (cm⁻¹): 748, 1182, 1245, 1314, 1472,1501,1544, 1614, 3174-3314.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆ (δ, ppm): 9.0, 9.5 (s, 2H, pirimidin/-NH), 5.0 (s, 1H, pirimidin-H₆), 5.1 (s, 1H, pirimidin -H₅), 4.9 (brs, 2H, -NH₂), [ar-H: 7.5 (s, 1H, 7.5 Hz), 7.5 (d, 1H, J=8 Hz), 7.3-7.4 (m, 2H), 7.0-7.1 (m, 2H), 6.7 (d, 1H, J=8 Hz), 6.5-6.6 (m, 1H)].

APT-NMR, (100 MHz, CDCl₃ δ, ppm): 54.7 (pirimidin-C₆), 102.5 (pirimidin-C₅), 133.5 (pirimidin-C₄), 175.05 (C=S), ar-C [115.94 (CH), 116.44 (CH), 126.01 (CH), 129.60 (CH), 129.7 (CH), 119.2 (C), 122.1 (C), 129.9 (CH), 130.8 (CH), 131.4 (CH), 145.9 (C), 147.1 (C)].

LC/MS-MS :(m/z) (%) [M(⁷⁹Br)]⁺: 359.71 (85), hesaplanan, 359.41; [M(⁸¹Br)]⁺: 361.81 (100), hesaplanan, 361.41.

[4-(2-aminofenil)-6-(3-klorofenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tion] (B3)

Bileşiğine ait spektral veriler aşağıda verilmiştir.

FT-IR (cm⁻¹): 781, 1179, 1245, 1315, 1473,1491,1539, 1614, 2924, 3178-3310.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆ (δ, ppm): 9.6, 9.8 (s, 2H, pirimidin/-NH), 5.1 (s, 1H, pirimidin -H₅), 5.0 (s, 1H, pirimidin -H₆), 4.9 (s, 2H, -NH₂), [ar-H: 7.3-7.4 (m, 4H), 6.9-7.1 (m, 2H), 6.7(d, 2H, J=8.0Hz)].

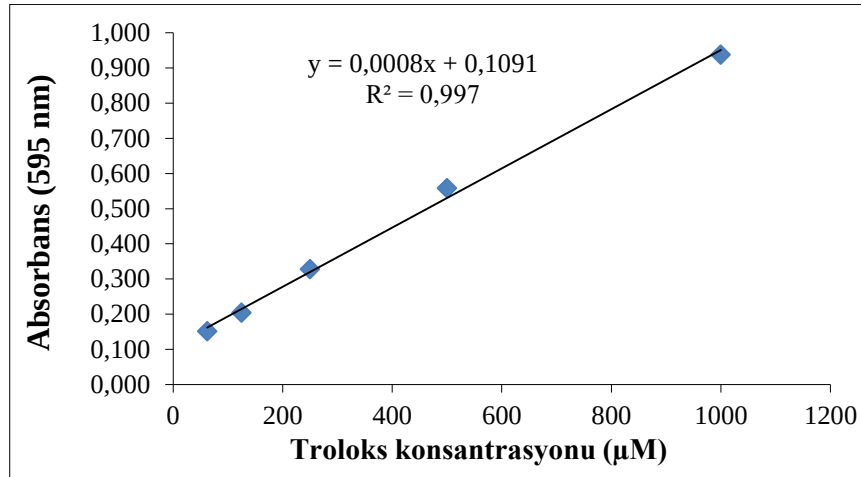
APT-NMR (100 MHz, CDCl₃ δ, ppm): 54.6 (pirimidin-C₆), 101.8 (pirimidin -C₅), 133.8 (pirimidin-C₄), 175.3 (C=S), ar-C [115.8 (CH), 116.6 (CH), 125.6 (CH), 126.8 (CH), 128.0 (CH), 129.6 (CH), 129.9 (CH), 131.1 (CH), 133.7 (C), 145.9 (C), 147.2 (C)]

LC/ MS-MS: (m/z) (%) [M+H₂O]⁺: 333.21 (100),hesaplanan, 333.50.

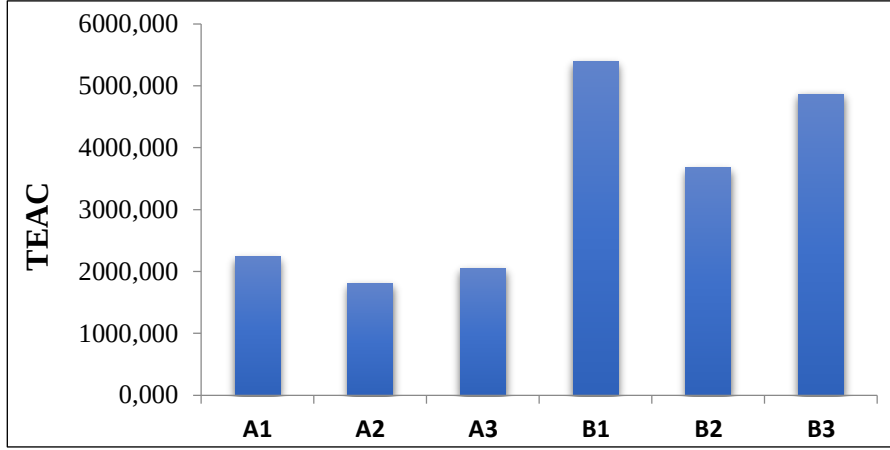
4.3. Sentezlenen Bileşiklerinde Antioksidan Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

4.3.1. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Sonuçları

Sentezlenen bileşiklerin FRAP değerleri troloks standardının kullanıldığı kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak bulunmuştur. Troloks için hazırlanan kalibrasyon eğrisi Şekil 12’de gösterilmiştir. Bileşiklerin FRAP değerleri Troloks ile karşılaştırılarak, TEAC (µM) olarak Şekil 13’de ve Tablo 5’de verilmiştir.



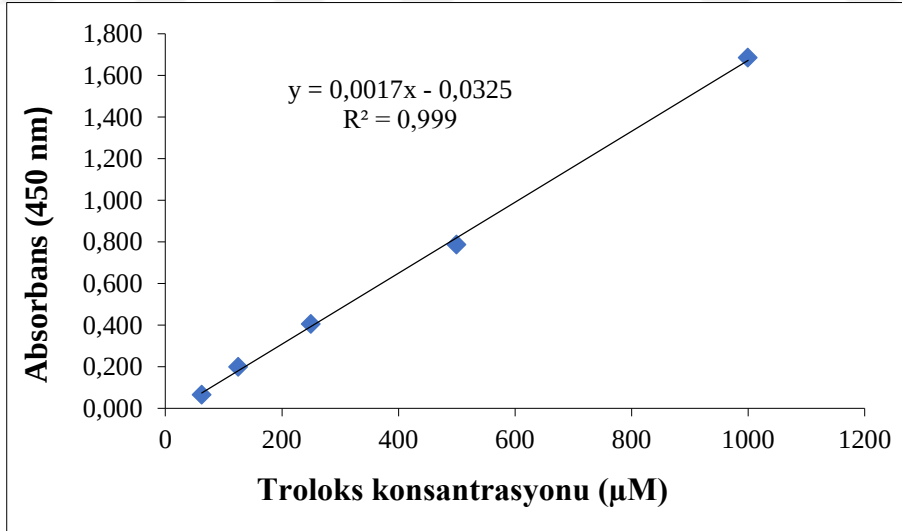
Şekil 12. FRAP tayininde kullanılan troloks’a ait kalibrasyon grafiği



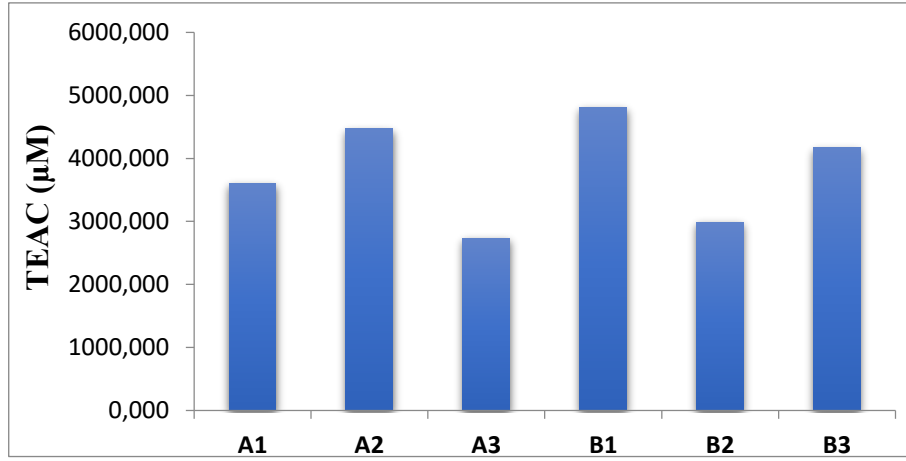
Şekil 13. Sentezlenen bileşiklerin FRAP değerleri

4.3.2. CUPRAC Tayini Sonuçları

Sentezlenen bileşiklerin CUPRAC değerleri troloks standardı kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak bulunmuştur. Troloks için hazırlanan kalibrasyon grafiği Şekil 14’de gösterilmiştir. Bileşiklerin CUPRAC değerleri Troloks ile karşılaştırılarak TEAC (μM) olarak Şekil 15’de ve Tablo 5’de verilmiştir.



Şekil 14. CUPRAC tayininde kullanılan troloks’a ait kalibrasyon grafiği



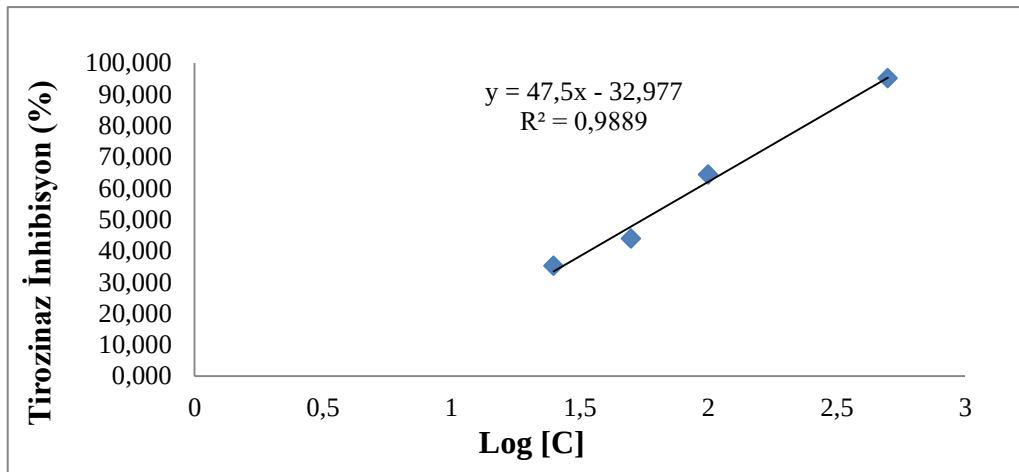
Şekil 15. Sentezlenen bileşiklerin CUPRAC değerleri

Tablo 5. Test bileşiklerinin antioksidan aktivite tayini sonuçları

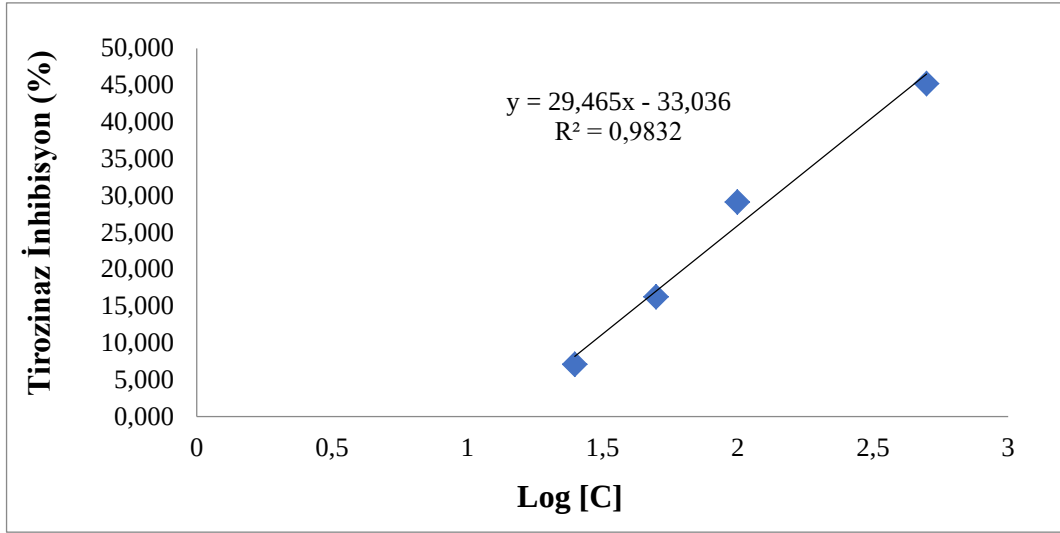
Test Bileşikleri	CUPRAC TEAC(µM)	FRAP TEAC(µM)
A1	3602.745 ± 3.69	2238.083 ± 3.26
A2	4474.510 ± 1.04	1801.417 ± 1.69
A3	2729.255 ± 2.54	2043.917 ± 0.82
B1	4812.078 ± 3.73	5389.750 ± 1.36
B2	2989.412 ± 1.98	3675.583 ± 3.07
B3	4172.941 ± 2.15	4862.250 ± 2.17

4.4. Tirozinaz İnhibitör Aktivite Sonuçları

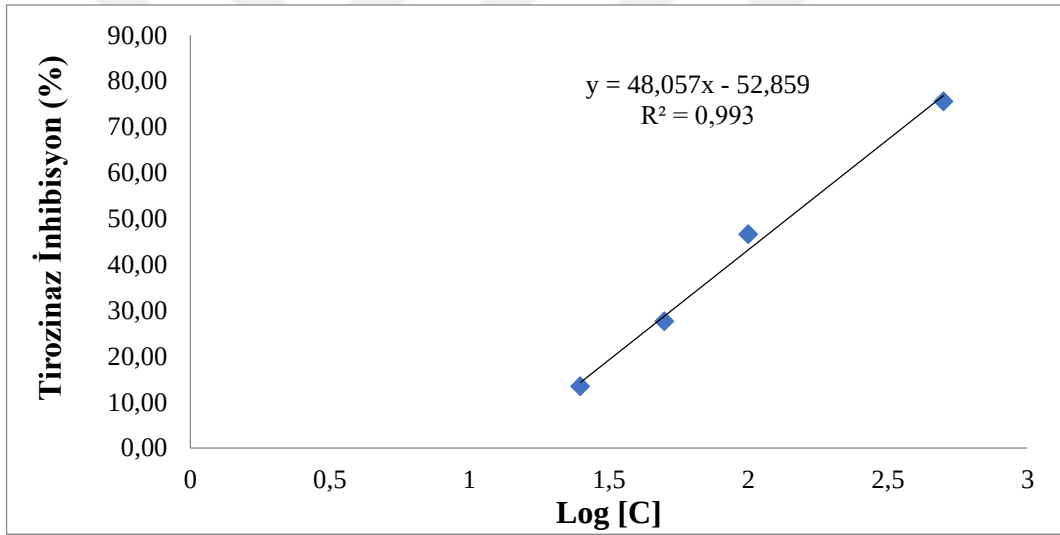
Sentezlenen bileşiklerin ve kojik asitin % inhibisyonu ve IC₅₀ değerleri Tablo 6'da gösterilmiştir. Kojik asit standardının ve sentezlenen bileşiklerin % tirozinaz inhibisyon grafikleri Şekil 16-22'de verilmiştir.



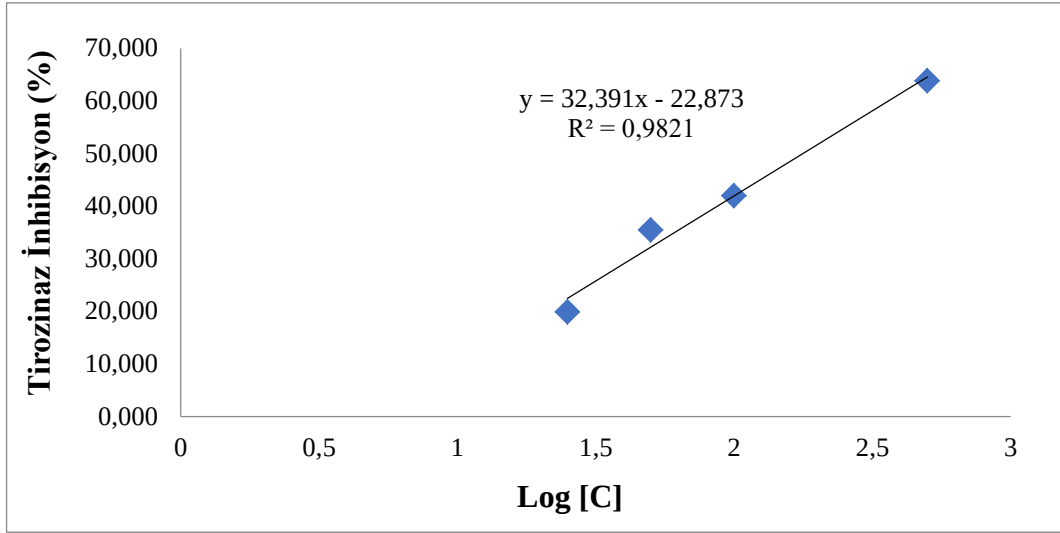
Şekil 16. Kojik asitin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



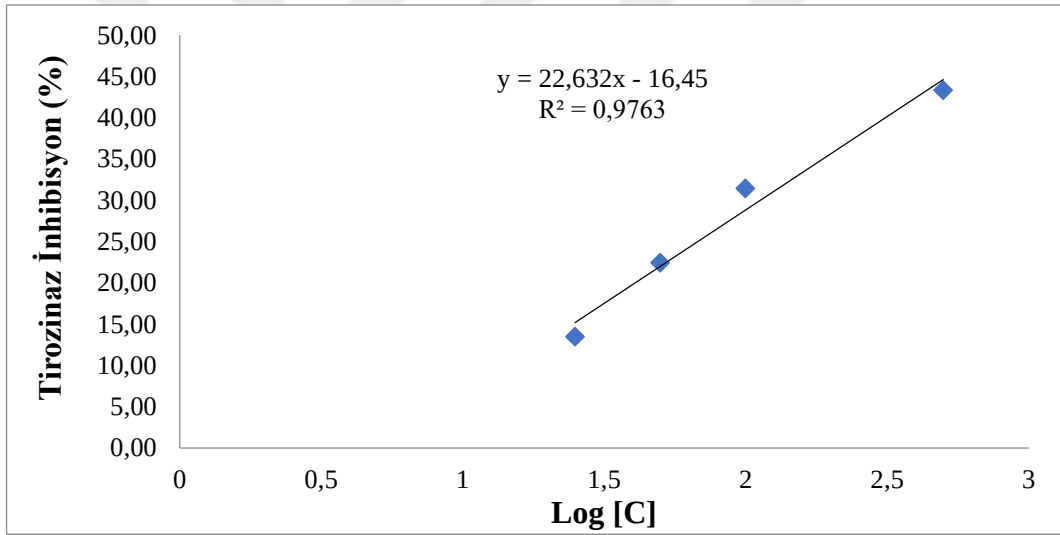
Şekil 17. A1 bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



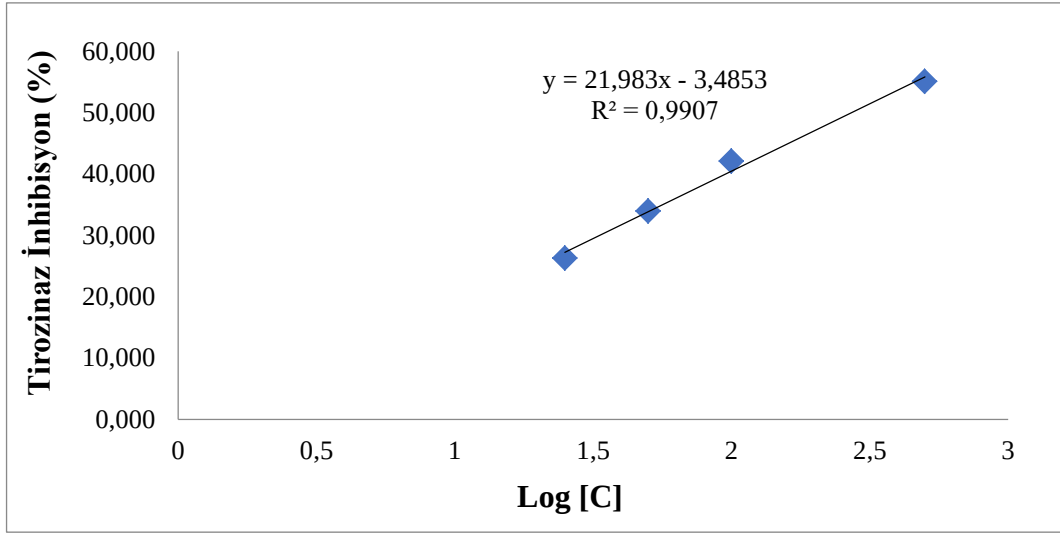
Şekil 18. A2 bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



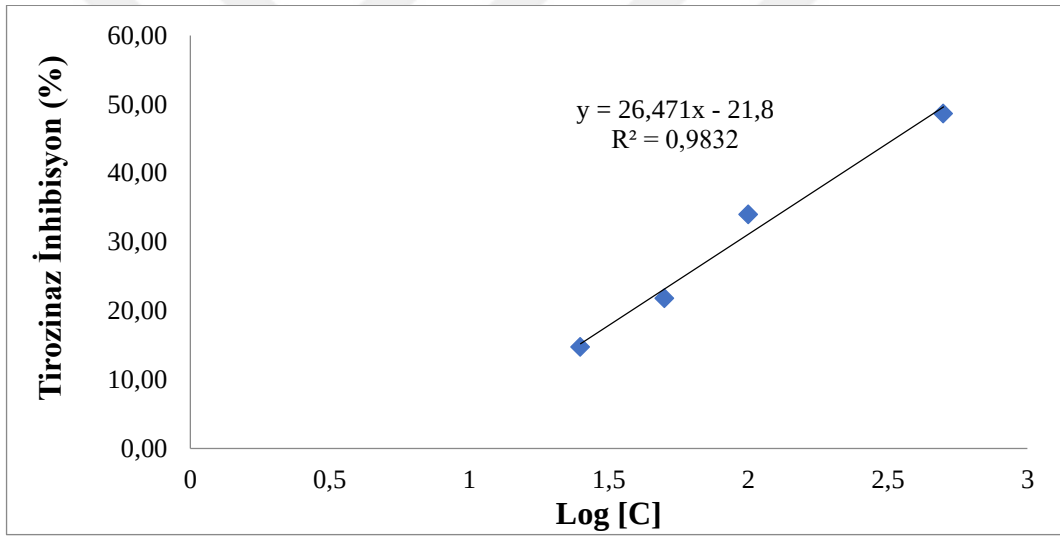
Şekil 19. A3 bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 20. B1 bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu grafiği



Şekil 21. B2 bileşiğın tirozinaz enzim inhibisyonu grafiğı



Şekil 22. B3 bileşiğın tirozinaz enzim inhibisyonu grafiğı

Tablo 6. Bileşiklerin tirozinaz inhibisyonu sonuçları

Test Bileşikleri	Konsantrasyon	% İnhibisyonu	IC ₅₀ Değeri (µg/mL)
Kojik Asit	25 µg/mL	35.185 ± 2.04	58.832 ± 1.67
	50 µg/mL	43.827 ± 1.08	
	100 µg/mL	64.321 ± 1.37	
	200 µg/mL	95.062 ± 2.96	
A1	25 µg/mL	7.051 ± 2.17	657.844 ± 1.19
	50 µg/mL	16.218 ± 1.08	
	100 µg/mL	29.103 ± 2.37	
	200 µg/mL	45.192 ± 1.66	
A2	25 µg/mL	13.462 ± 1.04	138.151 ± 0.94
	50 µg/mL	27.564 ± 2.08	
	100 µg/mL	46.603 ± 2.37	
	200 µg/mL	75.577 ± 1.06	
A3	25 µg/mL	19.872 ± 2.23	177.743 ± 1.10
	50 µg/mL	35.449 ± 1.38	
	100 µg/mL	41.923 ± 1.19	
	200 µg/mL	63.782 ± 2.77	
B1	25 µg/mL	13.462 ± 1.14	863.194 ± 1.98
	50 µg/mL	22.436 ± 1.35	
	100 µg/mL	31.410 ± 2.71	
	200 µg/mL	43.333 ± 2.09	
B2	25 µg/mL	26.282 ± 1.03	271.038 ± 1.87
	50 µg/mL	33.974 ± 1.88	
	100 µg/mL	42.115 ± 2.37	
	200 µg/mL	55.064 ± 1.46	
B3	25 µg/mL	14.744 ± 2.44	515.706 ± 1.75
	50 µg/mL	21.795 ± 1.78	
	100 µg/mL	33.974 ± 2.32	
	200 µg/mL	48.654 ± 1.43	

4.5. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Sonuçları

Sentezlenen bileşiklerin agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile oluşturduğu inhibisyon çapları mm olarak Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Sentezlenen bileşiklerin agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile oluşturduğu inhibisyon çapları (mm)

Örnek	Mikroorganizmalar ve Zon Çapları (mm)				
	Gram negatif		Gram pozitif		Maya mantarı
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Candida albicans</i>
A1	10±0.20	-	9±0.14	-	7±0.19
A2	11±0.24	-	9±0.14	-	5±0.11
A3	10±0.18	-	-	12±0.71	5±0.12
B1	-	-	10±0.71	-	-
B2	10±0.28	11±0.71	19±0.58	15±0.77	8±0.14
B3	-	-	19±0.36	-	-
Ampicillin	10	15	35	30	-
Fluconazole	-	-	-	-	25

Ec: *Escherichia coli*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Bc: *Bacillus cereus*, Ca: *Candida albicans*, Se: *Staphylococcus epidermidis*, Amp.: Ampisilin, Flu.: Flukonazol.

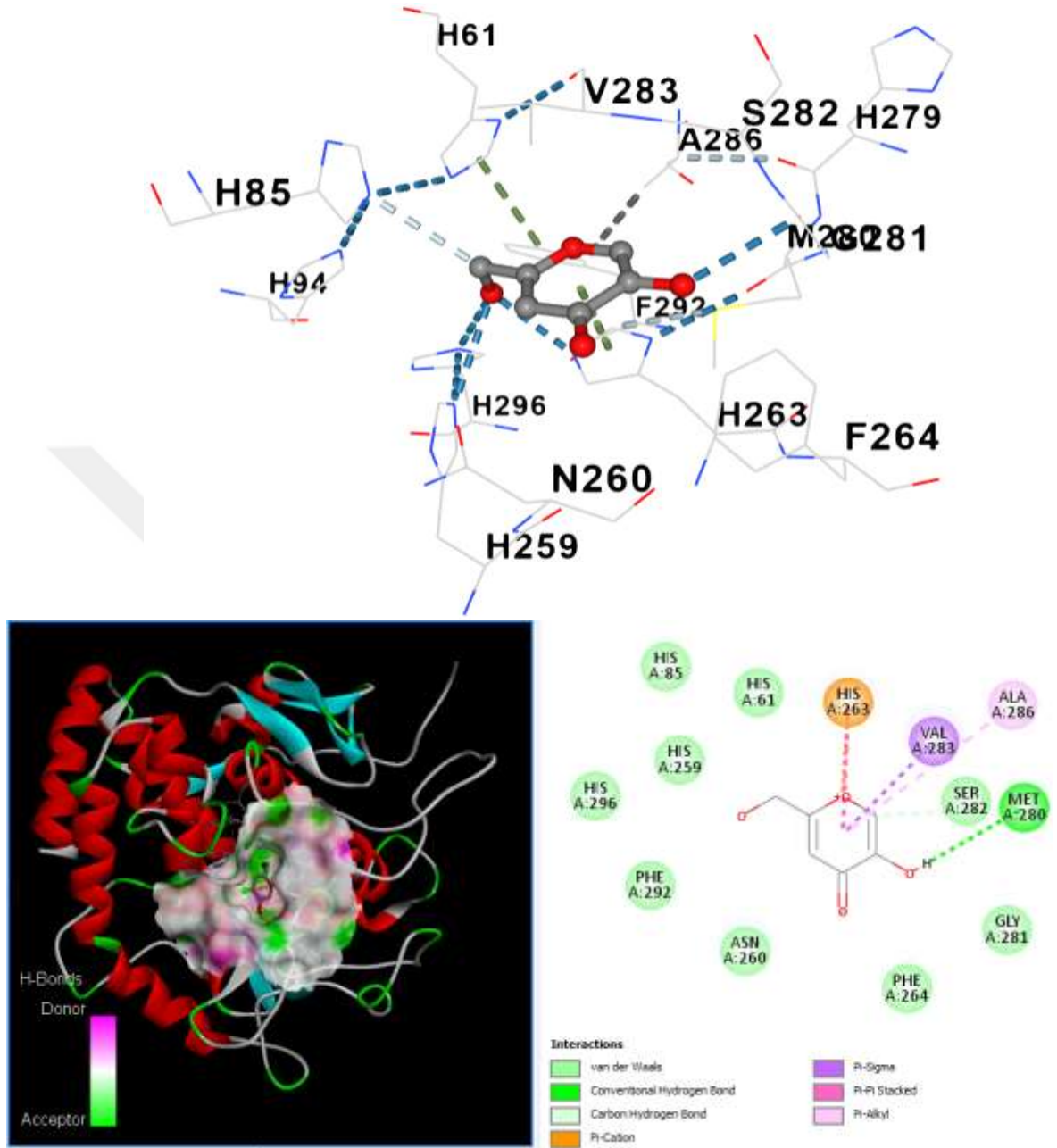
4.6. Docking çalışmalarının sonuçları

Yapılan moleküler hedefleme analizleri neticesinde, B1-B3 bileşiklerinin tirozinaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu iş için bilinen bir tirozinaz inhibitörü olan Kojik asit, standart kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Elde edilen moleküler hedefleme bulgular değerlendirildiğinde, B1-B3 bileşiklerinin, tirozinaz aktif bölgesine, daha düşük serbest bağlanma enerjisi varlığında yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği anlaşılmıştır (Tablo 8). Bu bağlamda en düşük bağlanma enerjili bileşik olarak B2 bileşiği belirlenmiştir (Tablo 8) (Şekil 25).

Tablo 8. Standart (Kojik asit) ve B1-B3 moleküllerinin tirozinaz enzimi aktif bölgesine karşı bağlanma afiniteleri (kcal/mol) ile ilgili serbest bağlanma enerjileri ve etkileşimlerde fonksiyon gören amino asit rezidülerinin listesi.

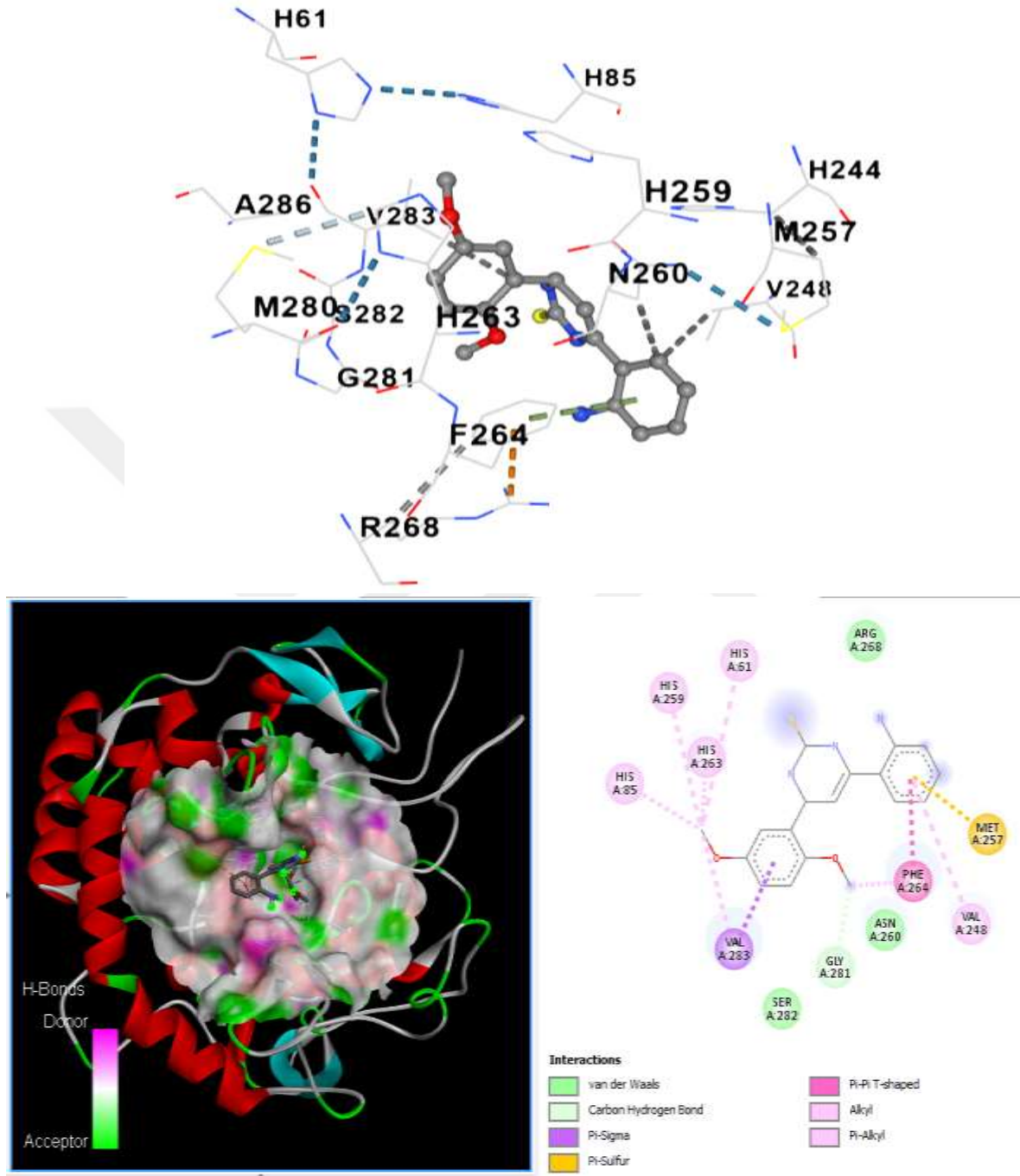
B3	B2	B1	Kojik asit	Bileşik
<chem>N1C(\C=C(/NC1=S)c2c(cccc2)N)c3cc(ccc3)Cl</chem>	<chem>N1C(\C=C(/NC1=S)c2c(cccc2)N)c3cc(ccc3)Br</chem>	<chem>N1C(\C=C(/NC1=S)c2c(cccc2)N)c3c(ccc(c3)OC)OC</chem>	<chem>C1=C(OC=C(C1=O)O)CO</chem>	Bileşik Yapısı
-7.1	-7.2	-7.0	-5.7	Bağlanma Afinitesi (kcal/mol)
HIS61 HIS85 HIS244 VAL248 HIS259 ASN260 HIS263 PHE264 ARG268 MET280 GLY281 SER282 VAL283 ALA286 PHE292	HIS61 HIS85 HIS94 HIS244 GLU256 HIS259 ASN260 HIS263 PHE264 ARG268 MET280 GLY281 SER282 VAL283 ALA286 PHE292 HIS296	HIS61 HIS85 HIS244 VAL248 MET257 HIS259 ASN260 HIS263 PHE264 ARG268 MET280 GLY281 SER282 VAL283 ALA286	HIS61 HIS85 HIS94 HIS259 ASN260 HIS263 PHE264 HIS279 MET280 GLY281 SER282 VAL283 ALA286 PHE292 HIS296	Ligand-protein etkileşimindeki rezidüler
-10, -28, -44	-10, -28, -44	-10, -28, -44	-10, -28, -44	Center (x, y, z)
21, 21, 21	21, 21, 21	21, 21, 21	17, 17, 17	Docking size (x, y, z)

Kojic acid



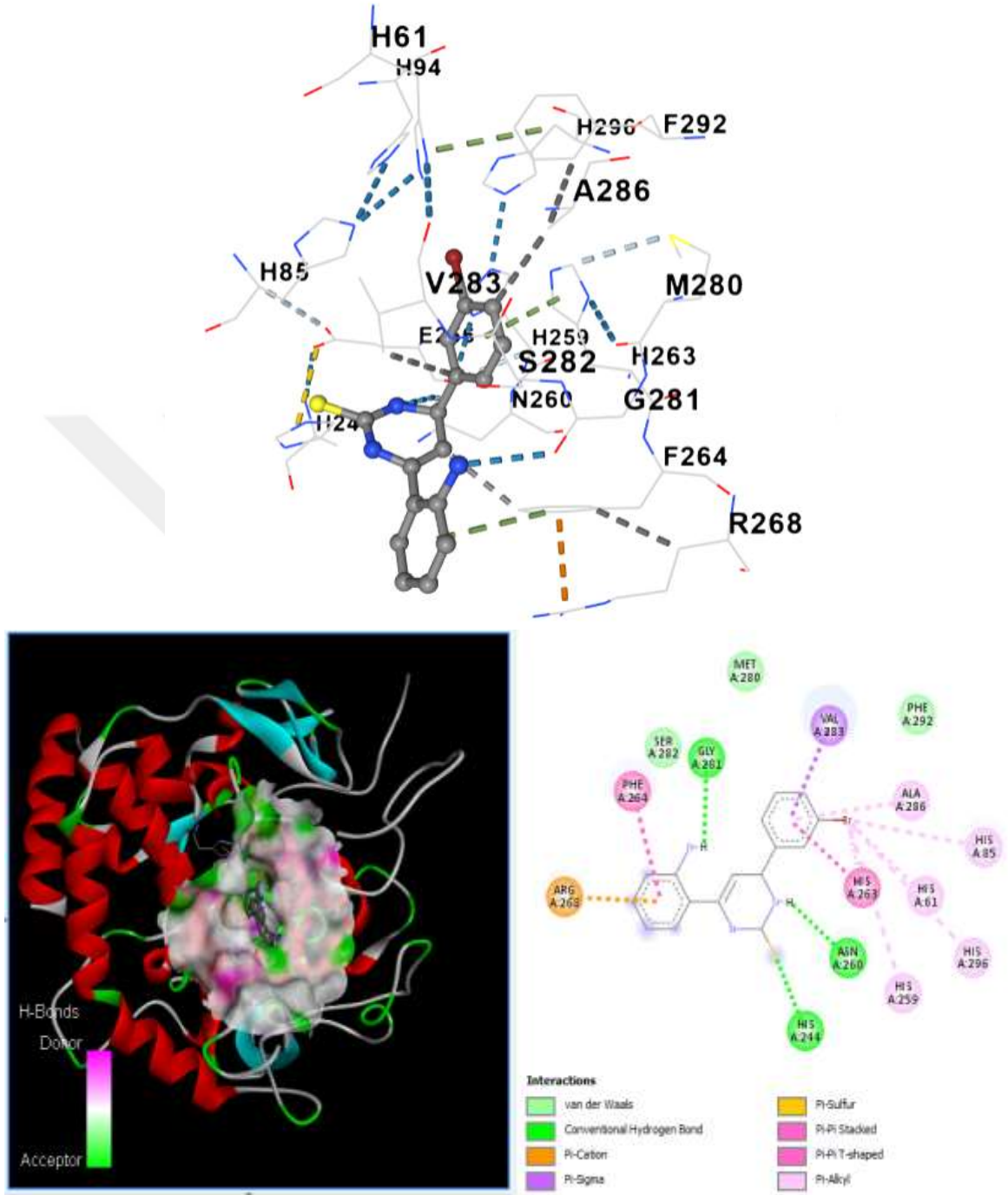
Şekil 23. Kojik asid ve *A. bisporus* tirozinaz enzim kompleksine ait 3D ve 2D görselleri

B1 Bileşiği



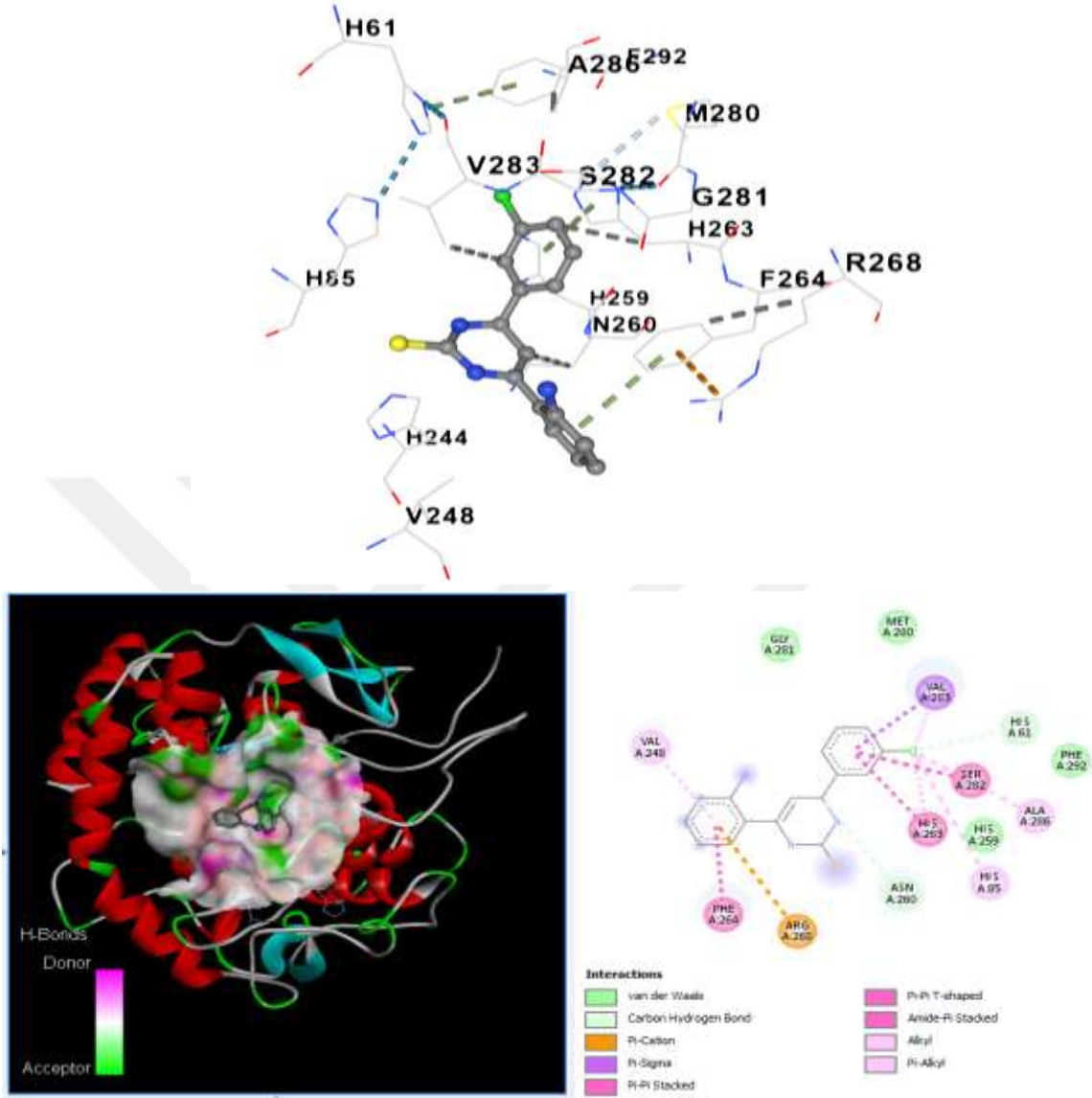
Şekil 24. B1 bileşiği ve *A. bisporus* tirozinaz enzim kompleksine ait 3D ve 2D görselleri

B2 Bileşiği



Şekil 25. B2 bileşiği ve *A. bisporus* tirozinaz enzim kompleksine ait 3D ve 2D görselleri

B3 Bileşiği



Şekil 26. B3 bileşiği ve *A. bisporus* tirozinaz enzim kompleksine ait 3D ve 2D görselleri

Yapılan detaylı incelemelerde, özellikle enzim aktif bölge rezidüleri ile ligand moleküller arasında oluşmuş bağ-bağ etkileşimleri irdelenmiştir. Kontrol ligandı kojik asit ile tirozinaz enzimi 2D etkileşim verileri incelendiğinde, kojik asitin enzim aktif bölgesine bağlandığı esnada sadece bir adet hidrojen bağı oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 23). Ancak B1 ve B3 moleküllerinin 2D etkileşim verileri irdelendiğinde ise, yüksek bağlanma afinitelerine rağmen, her iki bileşiğin de enzim aktif bölgesine bağlandığı esnada herhangi bir hidrojen bağı oluşturmadıkları, diğer bir deyişle inhibisyon etkilerinin çok kuvvetli olmadığı sonucunda varılmıştır (Şekil 24 ve Şekil 26). Ancak moleküler docking

alışmalarına konu B2 molekölü için 2D etkileşim düzlemi incelendiğinde, B2 ligandının tirozinaz aktif bölge rezidüleri ile toplamda üç adet hidrojen bağı yapabildiği belirlenmiştir (Şekil 25). Bu durum, deneysel inhibisyon verileri ile önemli ölçüde örtüşme sağlamıştır ve deneysel verileri destekleyici öngörüler sağlamıştır. Zira B2 molekülünün deneysel inhibisyon verileri (IC50 değeri), B1 ve B3 molekölüne kıyasla daha düşük olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, moleküler hedefleme verilerinin bu bağlamda deneysel inhibisyon analiz sonuçları ile paralellik gösterdiği sonucuna varılmıştır.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Melanin, UV kaynaklı cilt bozukluklarına karşı koruyucudur. Ancak anormal melanin üretimi insanlarda hem estetik hem de patolojik birçok soruna neden olur (97). Tirozinaz enzimi inhibitörleri, cilt beyazlatma etkileri için kozmetik ve farmasötik alanlarda kullanılmaktadır. Bu inhibitörlerin çoğu advers reaksiyona ve düşük stabiliteye sahip olduğu için ilaç pazarında kullanımı kısıtlıdır (3). Tirozinazın vitiligo tedavisinde rolü bulunmaktadır. Tirozinaz inhibisyonu hayvanlarda çok sayıda çalışmanın konusu olmuştur, ancak insanlar üzerinde yapılan araştırmalar kısıtlıdır. Tirozinaz inhibitörlerinin vitiligo tedavisindeki yeri, tirozinaz inhibitörlerinin mekanizmaları ve aktivitelerini doğrulamak, güvenlik ve etkinliklerini artırmak için çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır (102). Eczacılık, pestisit, tıp, gıda ve kozmetik endüstrisinde tirozinaz enzimi önemli bir enzimdir. İlaçların ortaya çıkardığı yan etkilerin azaltılması ve insan sağlığı refahının geliştirilmesi amacıyla sentezlediğimiz bileşiklerin cilt problemleri tedavisinde kullanılabilirliği düşüncesiyle proje şekillendirilmiştir. Bu bağlamda amacımız; “Aminokalkonlardan 3,4-Dihidropirimidin-2-Tiyon Türevlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitesi’ni aydınlatmaktır.

Çalışmamızda sentezlenen bileşiklerin antioksidan aktiviteleri FRAP ve CUPRAC tayin yöntemleri kullanılarak ölçülmüştür. Bu metodlara göre B1 bileşiğinin en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur. FRAP ve CUPRAC yöntemleri, bir antioksidanın in vitro indirgeme gücünü değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Antioksidanların indirgeme gücü ile antioksidan aktivitesi arasında yakın bir ilişki vardır ve antioksidan kapasitenin genellikle artan indirgeme gücü ile arttığı görülmektedir (130). Kalkonlar, güçlü antioksidan aktiviteleri ile bilinmektedirler. Fenil halkalarında izoprenil grupları bulunan birçok hidroksi kalkon bileşiği antioksidan aktiviteye sahiptir (20). Butein, sappankalkon ve okanin gibi doğal 3,4-dihidroksi kalkonlar etkili antioksidanlardır (135).

Sıçan beyni homojenatında, broussokalkon, konsantrasyona bağlı bir şekilde demir kaynaklı lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca broussokalkon’un bütillenmiş hidroksil toluen kadar etkili olduğu bildirilmiştir (136). Yapılan bir çalışmada broussokalkon ve 3-hidroksiksantoangelol’ün, α -tokoferolden daha fazla radikal süpürücü etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Broussokalkon A’nın konsantrasyona bağlı olarak NO oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (137).

Emelda ve ark. Claisen-Schmidt kondensyonu ile yedi kalkon türevi sentezleyerek antioksidan aktivitelerini çalışmışlardır. Okolo ve ark.'nın yaptığı çalışmada kalkon bileşiklerin, in vitro demir iyonu şelatlama aktivitelerine bakılarak antioksidan potansiyelleri açısından değerlendirildiğinde standart olarak kullanılan EDTA'dan daha yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir (138).

Prasad ve ark. 16 adet 4-aminokalkon türevi sentezlemiştir. Bu bileşiklerin süperoksit temizleme aktivitesini, hidroksil radikali temizleme aktivitesini, ABTS radikal kasyon temizleme aktivitesini ve lipid peroksidasyon inhibitör aktivitesini incelemiştir. Bu çalışmadan, benzen halkasının orto ve/veya para pozisyonlarında elektron veren grupların yer değiştirmesinin kalkonların antioksidan aktivitesini artırabileceği sonucuna varılabilir (139).

Çeşitli kalkonların gram pozitif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Kalkonların birçok mikroorganizmaya karşı koruyucu etkileri vardır. Çalışmamızda sentezlenen bileşiklerin, orta düzeyde antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Özellikle B2 bileşiği, test edilen tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermiştir.

Sugamoto ve ark. sentezledikleri kalkonların antibakteriyel etkinliğini gram negatif bakterilere (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens*) ve gram pozitif bakterilere (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*) karşı incelemiştir. Tüm kalkonların gram negatif bakterilere karşı etki göstermediğini bulmuşlardır. 4-Hidroksiderrisin, isobavakalkon, ksantoangelol, ksantoangelol F, bavakalkon ve broussokalkon B'nin gram pozitif bakterilere karşı aktif bileşikler olduğunu bulmuşlardır (140).

Inamori ve ark. Angelica keiskei kökünden izole edilen ksantoangelol ve 4-hidroksiderrisin'in gram pozitif patojenik bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (141). Kromann ve ark., Licochalcone A'nın lipofilik karakterinin antibakteriyel aktivite için gerekli olduğunu göstermişlerdir (142).

Hatano ve ark., glikofenon ve glikoizoflavanon'nun metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*'e karşı güçlü antibakteriyel etki gösterdiklerini bulmuşlardır (143). Selvakumar ve arkadaşları, kalkonların ve oksazolidinonların antibakteriyel aktivitesini sinerjize etmek amacıyla hem kalkon hem de oksazolidinon kısımlarına sahip birkaç hibrit bileşik sentezlemiştir ve

antibakteriyel aktivitelerini araştırmışlardır. Aromatik halka yerine heterosikller içeren hibrit moleküllerin aktif olduğu rapor edilmiştir (144). Tomar ve ark., Piperazin içeren bir dizi kalkon sentezledikleri ve sentezlenen tüm kalkonların da güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir (145). Özellikle 10 ve 15 numaralı bileşiklerin, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı çok güçlü aktivite gösterdiği belirtilmiştir (145). Kozłowska ve ark., sentezlediği 18 aminokalkon türevlerinin antimikrobiyal aktivitesini incelemiştir. 0.25-0.5 mg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında test edilen tüm suşların büyümesini tamamen sınırlayan 4'-aminokalkon varlığında olduğu belirtilmiştir. En güçlü bakteriyostatik aktivitenin, MIC = 0,0625 mg mL⁻¹ ile *E. coli* ATCC10536'nın büyümesini önleyen yeni 3'-amino-4-benziloksikalkon tarafından olduğu rapor edilmiştir (127).

Birçok kalkonun, çeşitli maya ve mantarların büyümesini engellediği gösterilmiştir. Kalkonların antifungal etki mekanizmasının mantar hücre duvarının baskılanmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. ElSohly ve ark., izole edilen tüm bileşikleri mantar patojenleri, *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans*'a karşı değerlendirmiştir. İsobavachalcone olarak adlandırılan bileşik 2'nin test edilen mantar patojenlerine karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (146). López ve ark., A ve B halkalarında farklı süstitüentlere sahip kalkonların dermatofitlere karşı aktif olduğunu göstermişlerdir (147).

Tirozinaz inhibitörleri kozmetik, eczacılık, tıp, gıda ve tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Daha güvenli ve daha etkili tirozinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi dikkat çekici araştırma konuları arasındadır (140). Çalışmamızda özellikle A2, A3 bileşiklerinin ve kojik asitin IC₅₀ değerleri sırasıyla 138.151±0.94, 177.743±1.10, 58.832±1.67 µg/mL bulunmuştur.

Nerya ve ark., meyan ekstresinde glabren ve isoliquiritigenin (2',4',4-trihidroksikalkon), hem mono- hem de difenolaz tirozinaz aktivitelerini inhibe edebildiğini göstermişlerdir. Glabren ve isoliquiritigenin'in tirozinaz aktivitesi üzerindeki etkilerinin doza bağımlı olduğunu ve melanositlerde melanin oluşumunu inhibe etme yetenekleriyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. İzoflavenlerin ve kalkonların potansiyel cilt beyazlatıcı ajanlar olarak düşünülebileceğini bildirmişlerdir (148). Yapılan bir çalışmada tetra-süstitüe edilmiş hidroksil grupları olan kalkonlar sentezleyerek tirozinaz inhibitör aktivitelerini incelemiştir. 2,4,3',4'-hidroksikalkon ve 2,4,2',4'-hidroksikalkon'un çok

aktif tirozinaz inhibitörü olduğunu belirtmişlerdir. 2,4,2',4'-hidroksikalkon'un 0.02 μM konsantrasyonda en güçlü tirozinaz inhibitör aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (149).

Jun ve ark., sentezledikleri 2',4',6'-trihidroksikalkon, 2,2',3,4',6'-pentahidroksikalkon, 2',3,4,4',5,6'-heksahidroksikalkon, 2',4',6'-trihidroksi-3,4-dimetoksikalkon ve 2,2',4,4',6'-pentahidroksikalkon'un güçlü tirozinaz inhibitör aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapı-aktivite ilişkisi açısından kalkon iskeletindeki 2',4',6'-trihidroksil alt yapısının tirozinaz aktivitesinin inhibisyonu için etkili olduğu öne sürülmüştür (150). Radhakrishnan ve ark., aminokalkon türevi bileşikler sentezlemişlerdir. Bu bileşikler daha sonra murin B16F10 melanom hücre dizilerinde tirozinaz ve melanogenez üzerindeki inhibe edici aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. İki yeni amino kalkon bileşiği, kontrol kojik asitten (IC_{50} : 22.83 μM) daha yüksek tirozinaz inhibitör aktiviteleri (sırasıyla 9.75 μM ve 7.82 μM IC_{50} değerleri) sergilemiştir. Bu çalışmanın, yeni amino kalkon bileşiklerinin depigmentasyon etkisinin, tirozinaz aktivitesinin inhibisyonuna atfedilebileceğini ve amino kalkonların, depigmentasyon maddeleri veya esmerleşme önleyici gıda katkı maddeleri olarak kullanım için umut verici bir aday olduğunu öne belirtmişlerdir (128).

Yeni sentezlenen bileşikler ve tirozinaz arasındaki olası etkileşimi tanımlamak için, AutoDock Vina yazılımı kullanılarak moleküler docking çalışması yapılmıştır. Tirozinazın katalitik merkezi, Şekil 23-26'de gösterildiği gibi HIS61, HIS85, HIS259, HIS263 ve HIS296 dahil olmak üzere çoklu histidin rezidülerini barındıran dar bir hidrofobik cep olarak görünür (151). Etkileşim detayları Şekil 23-26 ve tablo 8'de gösterilmektedir.

Standart kojik asitin bağlanma modu, tirozinaz hedef bölgesine karşı -5.7 kcal/mol'lük bir enerji bağlanması sergilemiştir. Kojik asit, tirozinaz aktif bölgesinde yer alan MET280 ile hidrojen bağı yaparak etkileşime girmiştir. Ayrıca HIS263 ile Pi-Katyon bağı ve VAL283 ile Pi-Sigma bağı oluşturmuştur.

Bileşik B1'in bağlanma modu, tirozinaz hedef bölgesine karşı -7.0 kcal/mol'lük bir enerji bağlanması sergilemiştir. HIS61, HIS85, HIS244 ve VAL248 ile 4 Pi-Alkil bağı ile etkileşir. Ayrıca, GLY281, PHE264, VAL283 ve MET257 ile karbon-hidrojen, Pi-Pi T-şekli, Pi-sigma ve Pi-Sülfür bağı etkileşimleri oluşturmuştur.

Bileşik B2'nin bağlanma modu, tirozinaz hedef bölgesine karşı -7.2 kcal/mol'lük bir enerji bağlanması sergilemiştir. HIS244, ASN260 ve GLY281 ile 3 hidrojen bağı ile

etkileşime girdiği anlaşılmıştır. Ayrıca, ARG268 ile Pi-Kasyon bağı, HIS263 ve PHE264 ile Pi-Pi bağları oluşturmuştur.

B3 bileşiğinin bağlanma modu, tirozinaz hedef bölgesine karşı -7.1 kcal/mol'lük bir enerji bağlanması sergilemiştir. Pi-Pi T-şekilli bağlarla HIS263, PHE264 ve SER282 ile etkileşime girmiştir. Ayrıca VAL283 ile Pi-Sigma bağı ve ARG268 ile Pi-Cation bağı oluşturmuştur.

Bu tez çalışması ile birlikte, sentezlenen bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmaları ve moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiş olup; çalışmalardan elde edilen veriler, bu bileşiklerle ilgili var olan literatür boşluğunun doldurulmasına katkı sağlayacaktır. Yapılan biyolojik aktivite çalışmalarının sonuçları, bileşiklerin iyi bir antioksidan, antimikrobiyal ve antitirozinaz etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler, literatürdeki boşluğun doldurulmasının yanı sıra bu bileşiklerle ilgili yapılacak daha ileri çalışmalara zemin hazırlaması yönünden önem arz etmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sentezlenen tüm bileşiklerin değişik düzeylerde antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur. Özellikle B1 ve B2 bileşiğinin antioksidan aktivitesi diğer bileşiklere göre daha yüksek tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin antioksidan etkileri, DPPH süpürme aktivitesi ve hidroksil radikal süpürme aktivite deneyleri gibi farklı *in vitro* antioksidan test teknikleri kullanılarak daha fazla araştırılabilir.

Tüm bileşiklerin test edilen mikroorganizmaların bazılarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur. Özellikle B2 bileşiği test edilen mikroorganizmaların tümüne karşı iyi bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Daha fazla mikroorganizma kullanılarak antibakteriyel etkinlik araştırılabilir.

Test edilen bileşikler, çeşitli düzeylerde tirozinaz inhibitör aktivite göstermiştir. Ayrıca sentezlenen bileşikler ve tirozinaz enzimi arasındaki bağlanma afinitesi docking çalışmalarıyla doğrulanmıştır. En yüksek tirozinaz inhibisyonu gözlenen A2 ve A3 bileşiğinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 138.151±0,94 µg/mL ve 177,743±1,10 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle bileşiklerin TRP1 ve TRP2 inhibe edici aktiviteleri de araştırılabilir. Bileşiklerin murin melanom B16F10 hücre kültüründe melanin içeriği ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri de değerlendirilebilir.

Proje sonucunda sentezlenen bileşiklerden elde edilen veriler ışığında tirozinaz enzim inhibisyonu iyi olan bileşiklerin insanlarda hiperpigmentasyon ve gıdalarda esmerleşme reaksiyonlarının önlenmesi açısından kullanılabilirliği konusunda daha kapsamlı araştırmalar yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344(8924): 721-724.
2. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry* 73(3): 285-290.
3. Chang T-S (2009). An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. 10(6): 2440-2475.
4. Hasegawa T (2010). Tyrosinase-Expressing Neuronal Cell Line as in Vitro Model of Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences* 11: 1082-1089.
5. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F (2012). Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update. 11(4): 378-398.
6. Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, Yonemori S (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69(1): 197-201.
7. Ventola CL (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* 40(4): 277-283.
8. Zhuang C, Zhang W, Sheng C, Zhang W, Xing C, Miao Z (2017). Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chemical Reviews* 117(12): 7762-7810.
9. Ajani OO, Isaac JT, Owoeye TF, Akinsiku AAC (2015). Exploration of the chemistry and biological properties of pyrimidine as a privilege pharmacophore in therapeutics. *International Journal of Biological Chemistry* 9(4): 148-177.
10. Bravo L (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56(11): 317-333.
11. Sahu NK, Balbhadra SS, Choudhary J, Kohli DV (2012). Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Curr Med Chem* 19(2): 209-225.
12. Singh P, Anand A, Kumar V (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. *Eur J Med Chem* 85: 758-777.
13. Irfan R, Mousavi S, Alazmi M, Saleem RSZ (2020). A Comprehensive Review of Aminochalcones. 25(22): 5381.

14. Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P (2001). Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3404-3409.
15. Abuo-Rahma GE-D (2020). Molecular targets and anticancer activity of quinoline–chalcone hybrids: literature review. *RSC Advances* 10: 31139.
16. Srinivasan B, Johnson TE, Lad R, Xing C (2009). Structure-activity relationship studies of chalcone leading to 3-hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and its analogues as potent nuclear factor kappaB inhibitors and their anticancer activities. *J Med Chem* 52(22): 7228-7235.
17. Maciejewska N, Olszewski M, Jurasz J, Serocki M, Dzierzynska M, Cekala K, Wiczerzak E, Baginski M (2022). Novel chalcone-derived pyrazoles as potential therapeutic agents for the treatment of non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 12(1): 3703.
18. Rozmer Z, Perjési P (2016). Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry reviews* 15(1): 87-120.
19. Díaz-Tielas C, Graña E, Reigosa Roger M, Sánchez-Moreiras A (2016). Biological activities and novel applications of chalcones. *Planta Daninha* 34: 607-616.
20. Singh M, Sharma P, Sharma A, Puri V, Arora S (2020). Chalcones: A privileged scaffold with diverse biological activities. *Plant Arch* 20(1):3812-3819.
21. Lagoja IM (2005). Pyrimidine as constituent of natural biologically active compounds. *Chem Biodivers* 2(1): 1-50.
22. Jain K, Chitre T, Miniyaar P, Muthu K, Bendre VS, Veer V, Shahane S, Shishoo C (2006). Biological and medicinal significance of pyrimidines. *Current Science* 90: 793-803.
23. Khaldi-Khellafi N, Makhoulfi-Chebli M, Oukacha-Hikem D, Bouaziz ST, Lamara KO, Idir T, Benazzouz-Touami A, Dumas F (2019). Green synthesis, antioxidant and antibacterial activities of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidinones/thiones derivatives of curcumin. Theoretical calculations and mechanism study. *Journal of Molecular Structure* 1181: 261-269.

24. Wang N-Y, Zuo W-Q, Xu Y, Gao C, Zeng X-X, Zhang L-D, You X-Y, Peng C-T, Shen Y, Yang S-Y, Wei Y-Q, Yu L-T (2014). Discovery and structure–activity relationships study of novel thieno[2,3-b]pyridine analogues as hepatitis C virus inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24(6): 1581-1588.
25. Dinakaran VS, Jacob D, Mathew JE (2012). Synthesis and biological evaluation of novel pyrimidine-2(1H)-ones/thiones as potent anti-inflammatory and anticancer agents. *Medicinal Chemistry Research* 21(11): 3598-3606.
26. Prabakaran P, Robert JJ, Muthiah PT, Bocelli G, Righi L (2001). Aminopyrimidine-carboxyl(ate) interactions in trimethoprim maleate, an antifolate drug. *Acta Crystallogr C* 57(Pt 4): 459-461.
27. Kumar R, Nath M, Tyrrell DL (2002). Design and synthesis of novel 5-substituted acyclic pyrimidine nucleosides as potent and selective inhibitors of hepatitis B virus. *J Med Chem* 45(10): 2032-2040.
28. Sheikhi-Mohammareh S, Beyzaei H, Yarmohammadi E (2020). New efficient design and synthesis of novel antioxidant and antifungal 7-imino[1,3]selenazolo[4,5-d]pyrimidine-5(4H)-thiones utilizing a base-promoted cascade addition/cyclization sequence. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* 151(6):963-969.
29. Talaat IE-E, Abdel-Mohsen SA, Mohamed SA (2021). An Efficient Synthesis and Reactions of 5-Acetyl-6-Methyl-4-(1,3-Diphenyl-1H-Pyrazol-4-yl)-3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-Thione as Potential Antimicrobial and Anti-Inflammatory Agents. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 47(2): 561-571.
30. Desta D, Sjöholm R, Lee L, Lee M, Dittenhafer K, Canche S, Babu B, Chavda S, Dewar C, Yanow S, Best AA, Lee M (2011). Synthesis and antiprotozoal activity of 1,2,3,4-tetrahydro-2-thioxopyrimidine analogs of combretastatin A-4. *Medicinal Chemistry Research* 20(3): 364-369.
31. Lal K, Paliwal LJ, Bagade MB (2018). Synthesis, Molecular Docking and Pharmacological Study of Some New Thiopyrimidine Derivatives. *Materials Today: Proceedings* 5(7, Part 2): 15354-15360.
32. Lamie PF, Philoppes JN (2020). 2-Thiopyrimidine/chalcone hybrids: design, synthesis, ADMET prediction, and anticancer evaluation as STAT3/STAT5a inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 35(1): 864-879.

33. Sondhi SM, Goyal RN, Lahoti AM, Singh N, Shukla R, Raghubir R (2005). Synthesis and biological evaluation of 2-thiopyrimidine derivatives. *Bioorg Med Chem* 13(9): 3185-3195.
34. Prachayasittikul S, Worachartcheewan A, Nantasenamat C, Chinworrungsee M, Sornsongkhram N, Ruchirawat S, Prachayasittikul V (2011). Synthesis and structure-activity relationship of 2-thiopyrimidine-4-one analogs as antimicrobial and anticancer agents. *Eur J Med Chem* 46(2): 738-742.
35. Syam YM, Anwar MM, Kotb ER, Elseginy SA, Awad HM, Awad GEA (2019). Development of Promising Thiopyrimidine-Based Anti-cancer and Antimicrobial Agents: Synthesis and QSAR Analysis. *Mini Rev Med Chem* 19(15): 1255-1275.
36. Al-Masoudi NA, Abbas A, Al-Asadi MJB (2015). Synthesis, biological activity and modeling study of some thiopyrimidine derivatives and their platinum(II) and ruthenium(III) metal complexes. *70(5): 343-353.*
37. Al-Hazam HA, Al-Shamkani ZA, Al-Masoudi NA, Saeed BA, Pannecouque C (2017). New chalcones and thiopyrimidine analogues derived from mefenamic acid: microwave-assisted synthesis, anti-HIV activity and cytotoxicity as antileukemic agents. *72(4): 249-256.*
38. Nilgün A, Sepici-Dinçel A, Bicer C (2006). Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. *Türk Biyokimya Dergisi* 31(2): 51-56.
39. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
40. Halliwell B, Gutteridge JM (2015). *Free radicals in biology and medicine* Oxford university press, USA.
41. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40.
42. Akkuş İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları, Konya* 1: 57-63.

43. Badem M (2019). *Barbarea auriculata* var. *paludosa*, *B. integrifolia* ve *b. plantaginea* (Brassicaceae)nın biyokimyasal, fitokimyasal ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması. Doktora tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
44. Haber F, Weiss JJPotRSoLSA-M, Sciences P (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. 147(861): 332-351.
45. Boots AW, Haenen GR, Bast A (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. Eur J Pharmacol 585(2-3): 325-337.
46. Halliwell B, Clement MV, Long LH (2000). Hydrogen peroxide in the human body. FEBS Lett 486(1): 10-13.
47. Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? Metabolism 49(2 Suppl 1): 3-8.
48. DeFedericis HC, Patrzyc HB, Rajecki MJ, Budzinski EE, Iijima H, Dawidzik JB, Evans MS, Greene KF, Box HC (2006). Singlet oxygen-induced DNA damage. Radiat Res. 165(4):445-51.
49. De Grey AD (2002). HO₂*: the forgotten radical. DNA Cell Biol 21(4): 251-257.
50. Miser E (2011). Çeşitli bitkisel halk ilaçlarının antioksidan aktivite yönünden değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
51. Ekici L, SAĞDIÇ O (2008). Serbest radikaller ve antioksidan gıdalarla inhibisyonu. Gıda 33(5): 251-260.
52. Marks DB, Marks AD, Smith CM (1996). Basic medical biochemistry: a clinical approach. Lippincott, Baltimore, Maryland .
53. Gantner BN, LaFond KM, Bonini MG (2020). Nitric oxide in cellular adaptation and disease. Redox Biol 34: 101550.
54. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev 4(8): 118-126.
55. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci 4(2): 89-96.

56. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32(11): 1102-1115.
57. Halliwell B (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31(4): 261-272.
58. Marnett LJ (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424(1-2): 83-95.
59. Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41(12): 1819-1828.
60. Butterfield DA, Koppal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, Yatin S, Allen K, Aksenov M, Aksenova M, Carney J (1998). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone and vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 854: 448-462.
61. Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 4(1): 50-59.
62. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER (2000). Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 33 Suppl: S99-108.
63. Hawkins CL, Davies MJ (1998). Degradation of hyaluronic acid, poly- and monosaccharides, and model compounds by hypochlorite: evidence for radical intermediates and fragmentation. *Free Radic Biol Med* 24(9): 1396-1410.
64. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22(2): 111-180.
65. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN (1996). Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 87(4): 1595-1599.
66. Townsend DM, Tew KD (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22(47): 7369-7375.

67. Atik G (2020). *Eryngium billardieri* bitki ekstraktlerinin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
68. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ (2015). Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules* 20(10): 18886-18906.
69. Wiggins JE, Goyal M, Wharram BL, Wiggins RC (2006). Antioxidant Ceruloplasmin Is Expressed by Glomerular Parietal Epithelial Cells and Secreted into Urine in Association with Glomerular Aging and High-Calorie Diet. *17(5): 1382-1387.*
70. Ziberna L, Martelanc M, Franko M, Passamonti S (2016). Bilirubin is an Endogenous Antioxidant in Human Vascular Endothelial Cells. *Sci Rep* 6: 1-6.
71. Sies H (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 916-921.
72. Mikami T, Sorimachi M (2017). Uric acid contributes greatly to hepatic antioxidant capacity besides protein. *Physiol Res* 66(6): 1001-1007.
73. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 582(13): 1783-1787.
74. Vickneson K, George J (2021). Xanthine Oxidoreductase Inhibitors. *Handb Exp Pharmacol* 264: 205-228.
75. Augustyniak A, Bartosz G, Čipak A, Duburs G, Horáková LU, Łuczaj W, Majekova M, Odyseos AD, Rackova L, Skrzydlewska EJFr (2010). Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *44(10): 1216-1262.*
76. Botterweck AAM, Verhagen H, Goldbohm RA, Kleinjans J, van den Brandt PA (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food and Chemical Toxicology* 38(7): 599-605.
77. Huang D (2018). Dietary Antioxidants and Health Promotion. *Antioxidants (Basel)* 7(1): 9.
78. Robinson PK (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* 59: 1-41.

79. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
80. Kuddus M (2019). *Introduction to food enzymes*. *Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier, 1-18.
81. Gordon E, Mouz N, Duée E, Dideberg O (2000). The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance¹¹Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology* 299(2): 477-485.
82. Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F, García-Carmona F (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1247(1): 1-11.
83. Karbassi F, Haghbeen K, Saboury AA, Ranjbar B, Moosavi-Movahedi AA (2003). Activity, structural and stability changes of mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 32(2): 137-143.
84. Agarwal P, Singh M, Singh J, Singh R (2019). *Microbial tyrosinases: A novel enzyme, structural features, and applications*. *Applied microbiology and bioengineering*. Elsevier, 3-19.
85. Wang G, Aazaz A, Peng Z, Shen P (2000). Cloning and overexpression of a tyrosinase gene mel from *Pseudomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters* 185(1): 23-27.
86. Kondo T, Hearing VJ (2011). Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol* 6(1): 97-108.
87. Ortonne JP, Bissett DL (2008). Latest insights into skin hyperpigmentation. *J Investig Dermatol Symp Proc* 13(1): 10-14.
88. Arroo RRJ, Sari S, Barut B, Özel A, Ruparelia KC, Şöhretoğlu D (2020). Flavones as tyrosinase inhibitors: kinetic studies in vitro and in silico. *Phytochem Anal* 31(3): 314-321.
89. Zheng Z-P, Cheng K-W, To JT-K, Li H, Wang M (2008). Isolation of tyrosinase inhibitors from *Artocarpus heterophyllus* and use of its extract as antibrowning agent. *Food Chemistry* 112(12): 1530-1538.

90. Kubo I, Kinst-Hori I, Nihei K-I, Soria F, Takasaki M, Calderón JS, Céspedes CL (2003). Tyrosinase inhibitors from galls of *Rhus javanica* leaves and their effects on insects. *Zeitschrift für Naturforschung* 58(9-10): 719-725.
91. Geng J, Yu SB, Wan X, Wang XJ, Shen P, Zhou P, Chen XD (2008). Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. *J Biochem Biophys Methods* 70(6): 1151-1155.
92. Nosanchuk JD, Casadevall A (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 5(4): 203-223.
93. Lin WP, Lai HL, Liu YL, Chiung YM, Shiau CY, Han JM, Yang CM, Liu YT (2005). Effect of melanin produced by a recombinant *Escherichia coli* on antibacterial activity of antibiotics. *J Microbiol Immunol Infect* 38(5): 320-326.
94. Vámos-Vigyázó L (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr* 15(1): 49-127.
95. Calay Ö (2010). Tirozinaz enziminin bazı tıbbi bitkiler tarafından inhibisyonu. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
96. Özçelik D (2005). Mantardan (*agaricus bisporus*) tirozinaz enziminin izole edilmesi ve fenol giderilmesinde kullanılması. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
97. Kim YJ, Uyama H (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 62(15): 1707-1723.
98. Badria FA, elGayyar MA (2001). A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation. *Boll Chim Farm* 140(4): 267-271.
99. Parvez S, Kang M, Chung HS, Cho C, Hong MC, Shin MK, Bae H (2006). Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother Res* 20(11): 921-934.
100. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, Kim Y (1998). Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* 243(3): 801-803.

101. Schallreuter KU, Wood JW (1990). A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. *Arch Dermatol Res* 282(3): 168-171.
102. Parvez S, Kang M, Chung HS, Bae H (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother Res* 21(9): 805-816.
103. Niwa Y, Akamatsu H (1991). Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation. *Inflammation* 15(4): 303-315.
104. Yuan Y, Jin W, Nazir Y, Fercher C, Blaskovich MAT, Cooper MA, Barnard RT, Ziora ZM (2020). Tyrosinase inhibitors as potential antibacterial agents. *Eur J Med Chem* 187: 111892.
105. Wu Y, Shi YG, Zeng LY, Pan Y, Huang XY, Bian LQ, Zhu YJ, Zhang RR, Zhang J (2019). Evaluation of antibacterial and anti-biofilm properties of kojic acid against five food-related bacteria and related subcellular mechanisms of bacterial inactivation. *Food Sci Technol Int* 25(1): 3-15.
106. Liu X, Xia W, Jiang Q, Xu Y, Yu P (2015). Effect of kojic acid-grafted-chitosan oligosaccharides as a novel antibacterial agent on cell membrane of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Biosci Bioeng* 120(3): 335-339.
107. Fisher AA (1983). Current contact news. Hydroquinone uses and abnormal reactions. *Cutis* 31(3): 240-244, 250.
108. Schwartz C, Jan A, Zito PM (2022). Hydroquinone. StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL).
109. Dey VK (2014). Misuse of topical corticosteroids: A clinical study of adverse effects. *Indian Dermatol Online J* 5(4): 436-440.
110. Spínola V, Mendes B, Câmara JS, Castilho PC (2013). Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. *LWT - Food Science and Technology* 50(2): 489-495.
111. Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V (2017). Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 32(1): 403-425.

112. Hakozaiki T, Minwalla L, Zhuang J, Chhoa M, Matsubara A, Miyamoto K, Greatens A, Hillebrand GG, Bissett DL, Boissy RE (2002). The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Br J Dermatol* 147(1): 20-31.
113. Zhang J-P, Chen Q-X, Song K-K, Xie J-J (2006). Inhibitory effects of salicylic acid family compounds on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry* 95: 579-584.
114. Zhou H, Kepa JK, Siegel D, Miura S, Hiraki Y, Ross D (2009). Benzene metabolite hydroquinone up-regulates chondromodulin-I and inhibits tube formation in human bone marrow endothelial cells. *Mol Pharmacol* 76(3): 579-587.
115. Fujimoto N, Onodera H, Mitsumori K, Tamura T, Maruyama S, Ito A (1999). Changes in thyroid function during development of thyroid hyperplasia induced by kojic acid in F344 rats. *Carcinogenesis* 20(8): 1567-1571.
116. Friedman M (1996). Food Browning and Its Prevention: An Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(3): 631-653.
117. Sugumaran M (1991). Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis Comparison with insect cuticular sclerotization 1. 293(1-2): 4-10.
118. Xu Y, Stokes AH, Freeman WM, Kumer SC, Vogt BA, Vrana KE (1997). Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. *Brain Res Mol Brain Res* 45(1): 159-162.
119. Dadgostar PJI, resistance d (2019). Antimicrobial resistance: implications and costs. 12: 3903.
120. Lewis R (1995). The rise of antibiotic-resistant infections. *FDA consumer magazine* 29(1): 11-15.
121. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G (2018). Textbook of diagnostic microbiology-e-book Elsevier Health Sciences.
122. Walsh C (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406(6797): 775-781.
123. Davies J, Davies D (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. 74(3): 417-433.

124. Wikimedia Commons, the free media repository. File:Antibiotic resistance mechanisms.jpg [online]. Available from: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Antibiotic_resistance_mechanisms.jpg&oldid=461161405. [Accessed 15 October 2022]
125. Furniss BS (1989). Vogel's textbook of practical organic chemistry Pearson Education India; Sayfa: 718.
126. Fandaklı S (2016). Pirimidin türevi bileşiklerin kalkonlardan mikrodalga yöntemi ile sentezi ve biyolojik aktiviteleri. Doktora tezi, KTÜ Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
127. Kozłowska J, Potaniec B, Baczyńska D, Żarowska B, Anioł M (2019). Synthesis and Biological Evaluation of Novel Aminochalcones as Potential Anticancer and Antimicrobial Agents. *Molecules* 24(22): 4129.
128. Radhakrishnan S, Shimmon R, Conn C, Baker A (2015). Design, synthesis and biological evaluation of hydroxy substituted amino chalcone compounds for antityrosinase activity in B16 cells. *Bioorg Chem* 62: 117-123.
129. Benzie IF, Strain JJ (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
130. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21(2): 143-152.
131. Apak R, Güçlü K, Ozyürek M, Esin Karademir S, Erçağ E (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int J Food Sci Nutr* 57(5-6): 292-304.
132. Slyvka I, Tsisaryk O, Musii L, Kushnir I, Koziorowski M, Koziorowska A (2022). Identification and Investigation of properties of strains *Enterococcus* spp. Isolated from artisanal Carpathian cheese. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 39: 102259.

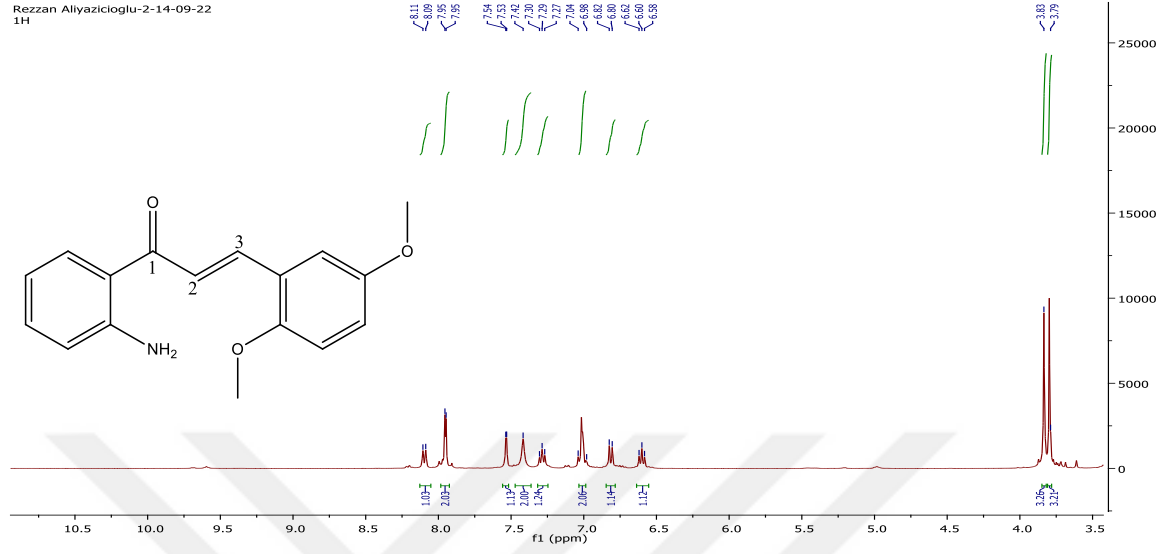
133. Santos MB, Pinhanelli VC, Garcia MAR, Silva G, Baek SJ, França SC, Fachin AL, Marins M, Regasini LO (2017). Antiproliferative and pro-apoptotic activities of 2'- and 4'-aminochalcones against tumor canine cells. *European journal of medicinal chemistry* 138: 884-889.
134. ACD/Labs (2011). Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software. ACD/Labs Canada.
135. Cai YZ, Mei S, Jie X, Luo Q, Corke H (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci* 78(25): 2872-2888.
136. Cheng Z, Lin C, Hwang T, Teng C (2001). Brousochalcone A, a potent antioxidant and effective suppressor of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochem Pharmacol* 61(8): 939-946.
137. Aoki N, Muko M, Ohta E, Ohta S (2008). C-geranylated chalcones from the stems of *Angelica keiskei* with superoxide-scavenging activity. *J Nat Prod* 71(7): 1308-1310.
138. Okolo EN, Ugwu DI, Ezema BE, Ndefo JC, Eze FU, Ezema CG, Ezugwu JA, Ujam OT (2021). New chalcone derivatives as potential antimicrobial and antioxidant agent. *Sci Rep* 11(1): 21781.
139. Prasad YR, Rani VJ, Rao AS (2013). In vitro Antioxidant Activity and Scavenging Effects of Some Synthesized 4'-Aminochalcones. *Asian Journal of Chemistry* 25(1): 52-58.
140. Sugamoto K, Matsusita Y-i, Matsui K, Kurogi C, Matsui T (2011). Synthesis and antibacterial activity of chalcones bearing prenyl or geranyl groups from *Angelica keiskei*. *Tetrahedron* 67: 5346-5359.
141. Inamori Y, Baba K, Tsujibo H, Taniguchi M, Nakata K, Kozawa M (1991). Antibacterial activity of two chalcones, xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, isolated from the root of *Angelica keiskei* KOIDZUMI. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 39(6): 1604-1605.
142. Kromann H, Larsen M, Boesen T, Schønning K, Nielsen SF (2004). Synthesis of prenylated benzaldehydes and their use in the synthesis of analogues of licochalcone A. *Eur J Med Chem* 39(11): 993-1000.

143. Hatano T, Shintani Y, Aga Y, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T (2000). Phenolic constituents of licorice. VIII. Structures of glicophenone and glicoisoflavanone, and effects of licorice phenolics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 48(9): 1286-1292.
144. Selvakumar N, Kumar GS, Azhagan AM, Rajulu GG, Sharma S, Kumar MS, Das J, Iqbal J, Trehan S (2007). Synthesis, SAR and antibacterial studies on novel chalcone oxazolidinone hybrids. *Eur J Med Chem* 42(4): 538-543.
145. Tomar V, Bhattacharjee G, Kamaluddin, Kumar A (2007). Synthesis and antimicrobial evaluation of new chalcones containing piperazine or 2,5-dichlorothiophene moiety. *Bioorg Med Chem Lett* 17(19): 5321-5324.
146. ElSohly HN, Joshi AS, Nimrod AC, Walker LA, Clark AM (2001). Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. *Planta Med* 67(1): 87-89.
147. López SN, Castelli MV, Zacchino SA, Domínguez JN, Lobo G, Charris-Charris J, Cortés JC, Ribas JC, Devia C, Rodríguez AM, Enriz RD (2001). In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg Med Chem* 9(8): 1999-2013.
148. Nerya O, Vaya J, Musa R, Izrael S, Ben-Arie R, Tamir S (2003). Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J Agric Food Chem* 51(5): 1201-1207.
149. Khatib S, Nerya O, Musa R, Shmuel M, Tamir S, Vaya J (2005). Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorg Med Chem* 13(2): 433-441.
150. Jun N, Hong G, Jun K (2007). Synthesis and evaluation of 2',4',6'-trihydroxychalcones as a new class of tyrosinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 15(6): 2396-2402.
151. Ismaya WT, Rozeboom HJ, Weijn A, Mes JJ, Fusetti F, Wichers HJ, Dijkstra BW (2011). Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* 50(24): 5477-5486.

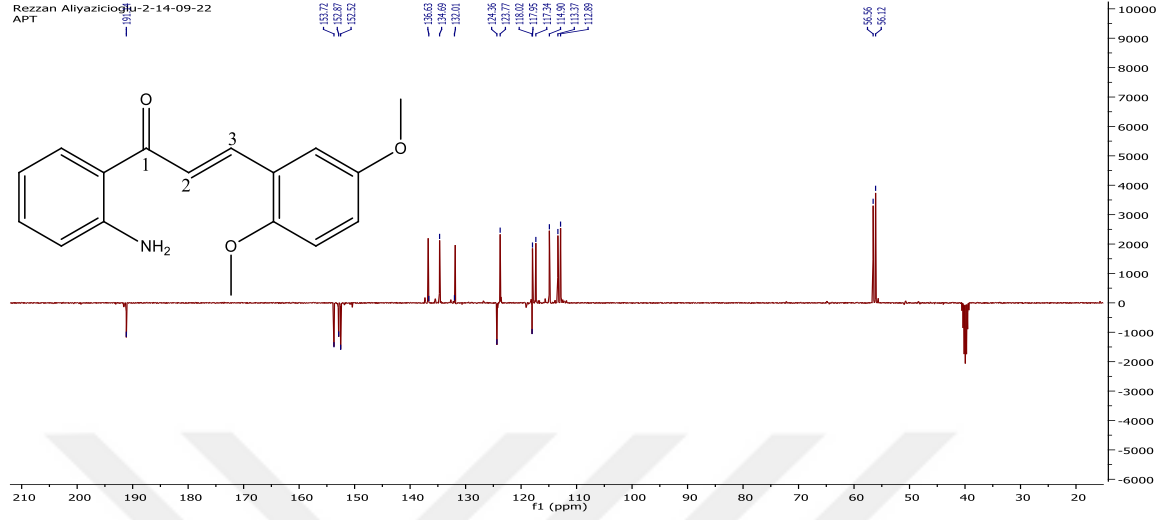


EKLER

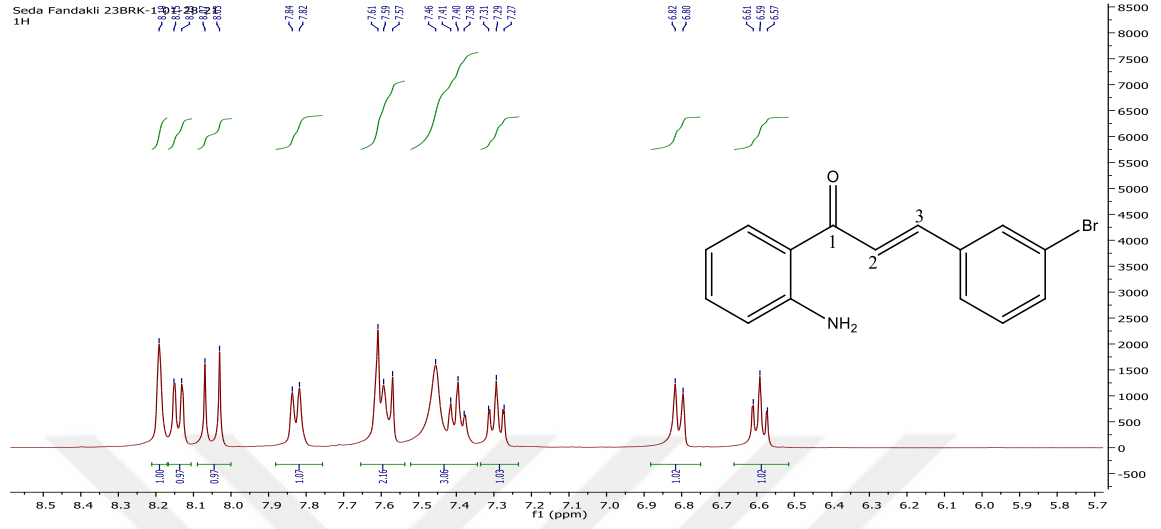
Ek 1. A1 Nolu bileşğin 1H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d6)



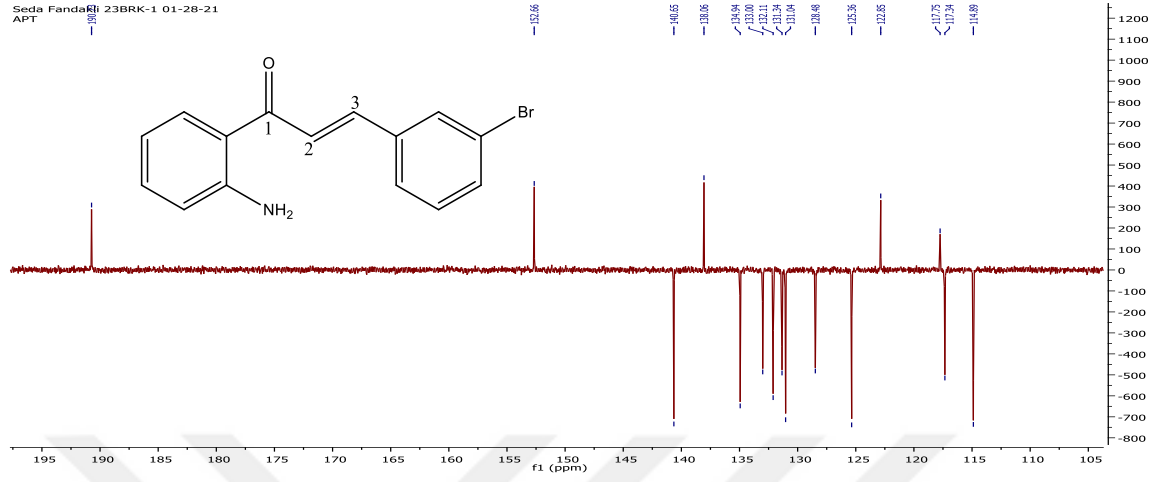
Ek 2. A1 Nolu bileşğin ¹³C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d₆)



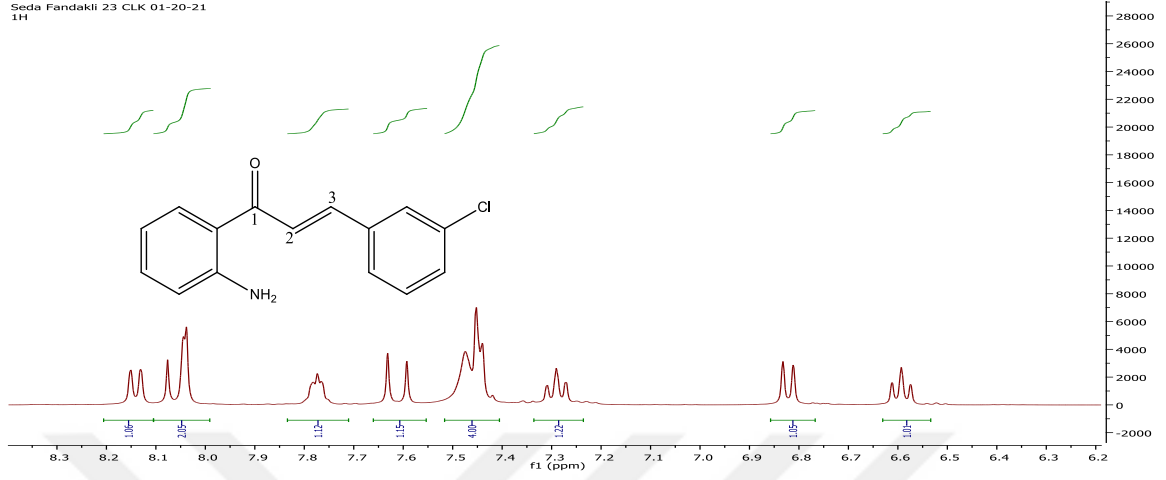
Ek 3. A2 Nolu bileşiğin 1H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d6)



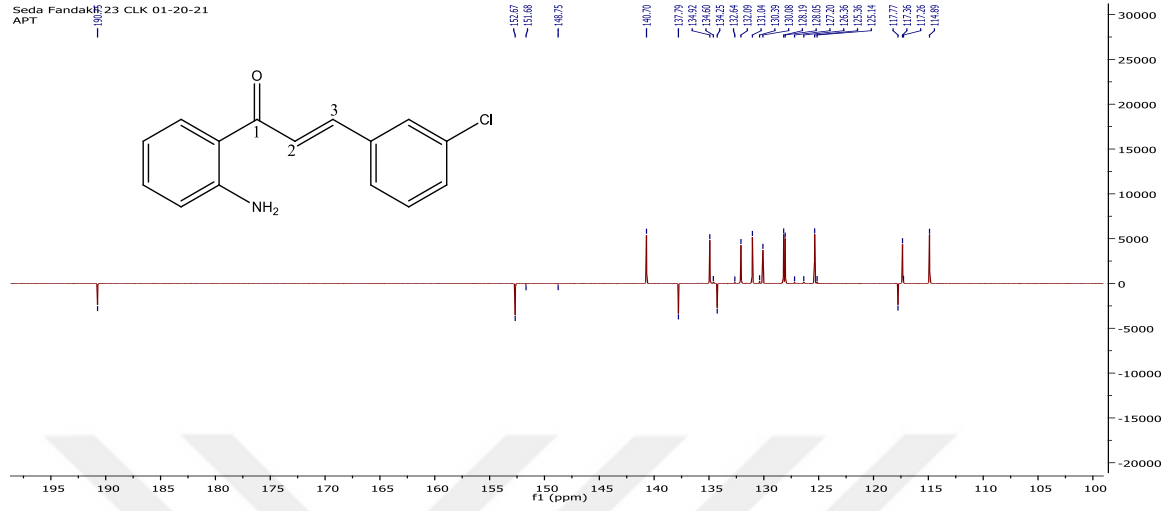
Ek 4. A2 Nolu bileşğin ¹³C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d₆)



Ek 5. A3 Nolu bileşğin 1H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d6)

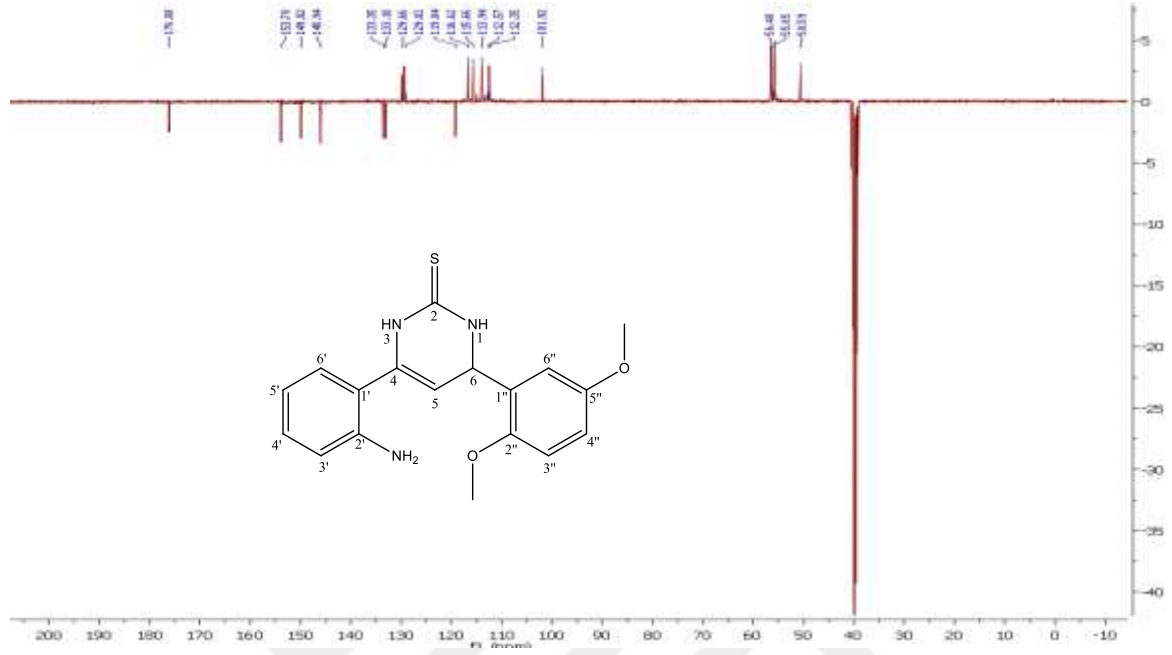


Ek 6. A3 Nolu bileşiğin ¹³C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d₆)



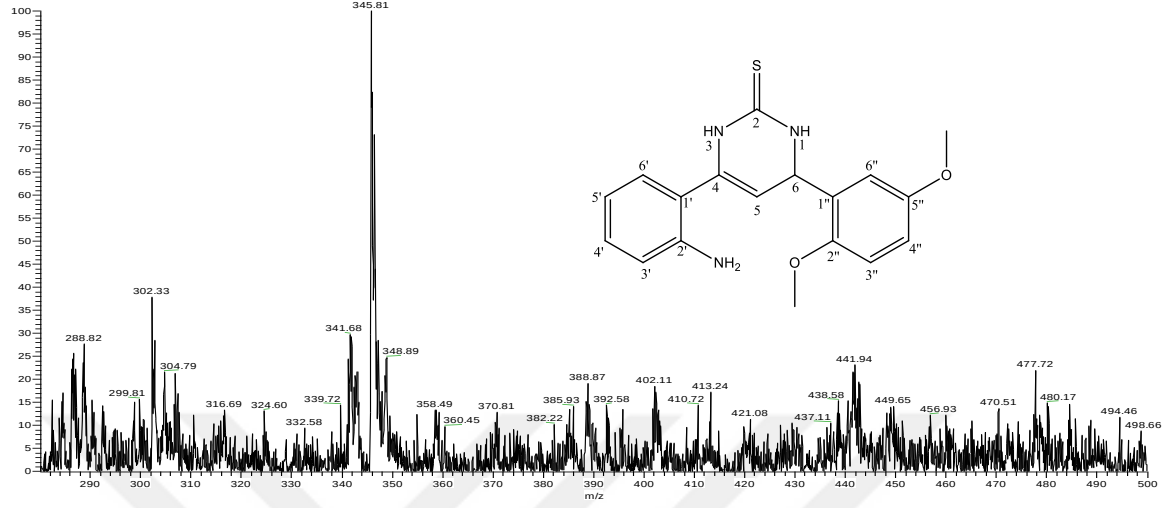
Chemical structure of compound 10 is shown above the ^1H NMR spectrum. The structure is a 1,3,4-triazole derivative with a 2-amino-5-methoxyphenyl group at position 4 and a 2-methoxy-5-methylphenyl group at position 2. The spectrum shows peaks from 0 to 10 ppm. Key peaks include a broad peak at ~9.8 ppm (NH₂), a peak at ~8.2 ppm (NH), a peak at ~7.8 ppm (NH), a peak at ~7.5 ppm (NH), a peak at ~7.2 ppm (NH), a peak at ~6.8 ppm (NH), a peak at ~6.5 ppm (NH), a peak at ~6.2 ppm (NH), a peak at ~5.8 ppm (NH), a peak at ~5.5 ppm (NH), a peak at ~5.2 ppm (NH), a peak at ~4.8 ppm (NH), a peak at ~4.5 ppm (NH), a peak at ~4.2 ppm (NH), a peak at ~3.8 ppm (NH), a peak at ~3.5 ppm (NH), a peak at ~3.2 ppm (NH), a peak at ~2.8 ppm (NH), a peak at ~2.5 ppm (NH), a peak at ~2.2 ppm (NH), a peak at ~1.8 ppm (NH), a peak at ~1.5 ppm (NH), a peak at ~1.2 ppm (NH), a peak at ~0.8 ppm (NH), a peak at ~0.5 ppm (NH), a peak at ~0.2 ppm (NH).

Ek 8. B1 Nolu bileşiğin ¹³C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d₆)

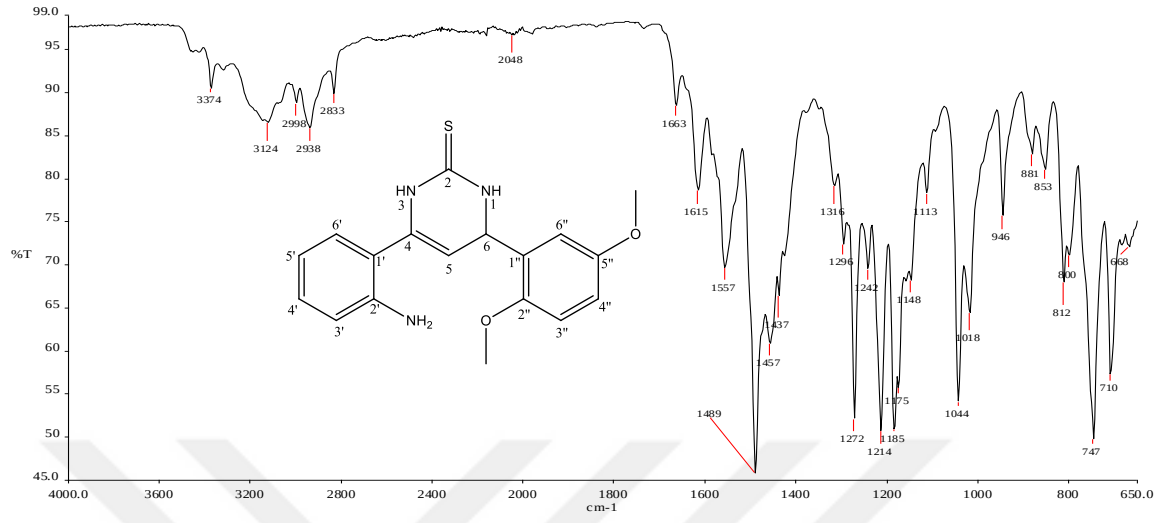


Ek 9. B1 Nolu bileşiğin LC/MS-MS spektrumu

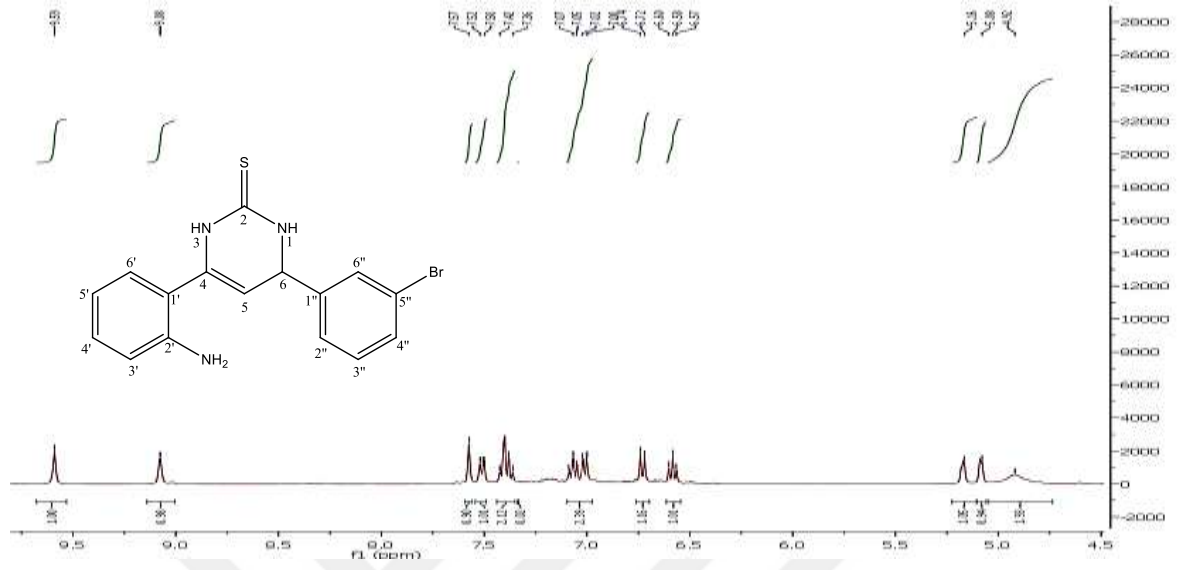
R-ALİYAZICIOĞLU-225PRM#38 RT: 0.33 AV: 1 NL: 1.23E6
T: + p ESI Q1MS [280.070-500.000]



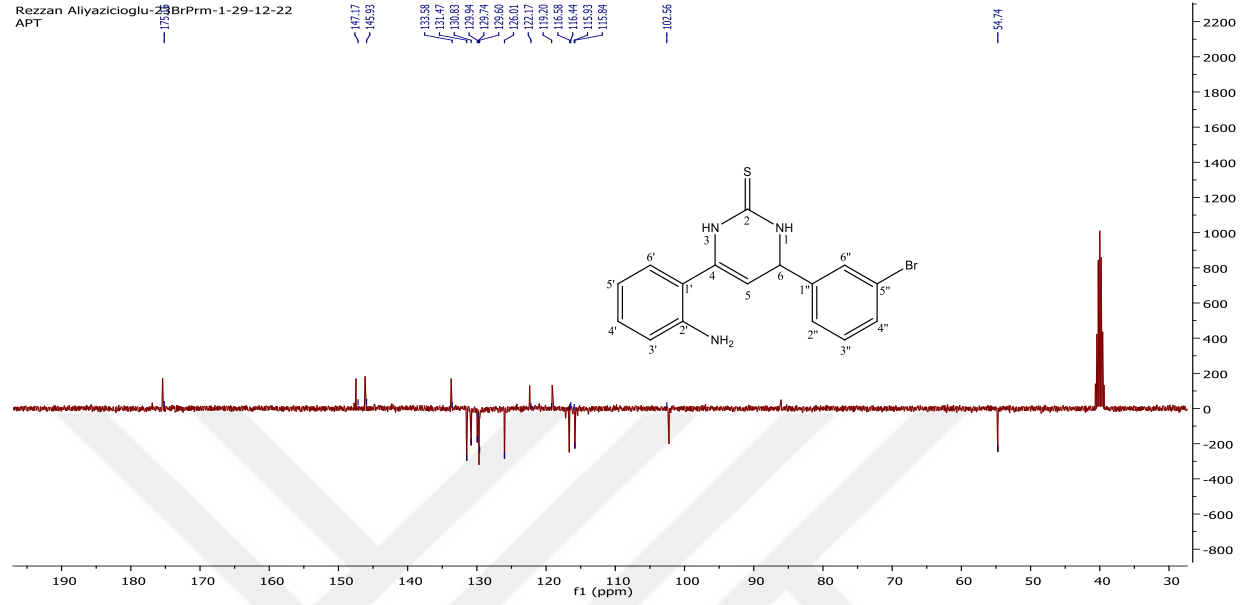
Ek 10. B1 Nolu bileşiğin FT-IR spektrumu



Ek 11. B2 Nolu bileşiğin ¹H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d₆)

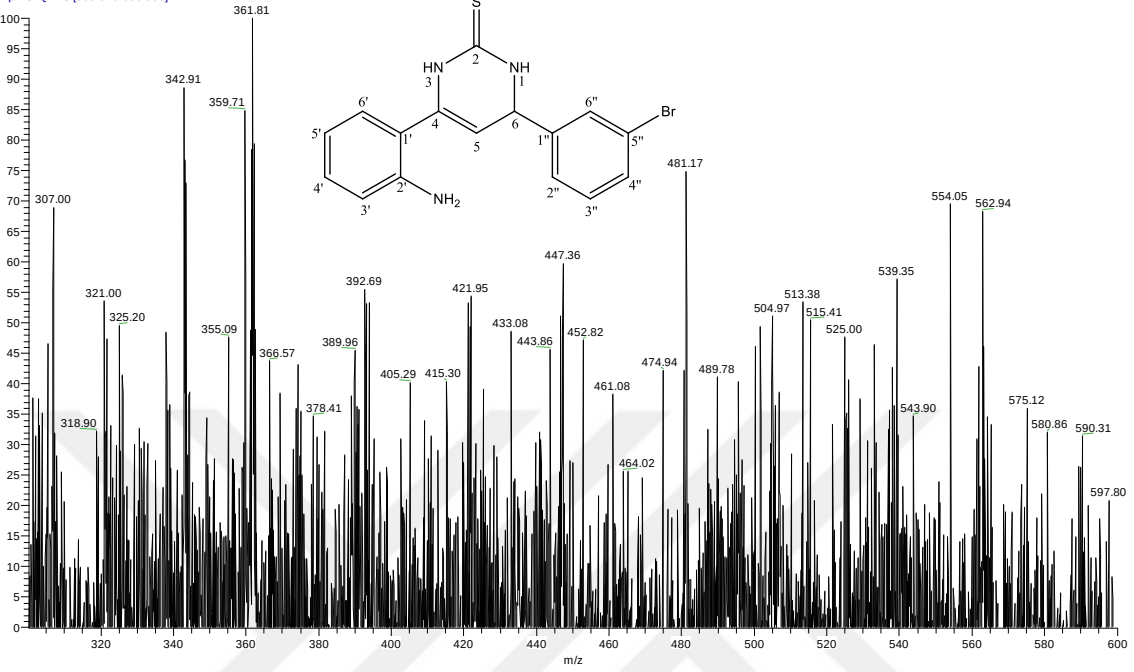


Ek 12. B2 Nolu bileşiğin ¹³C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d₆)

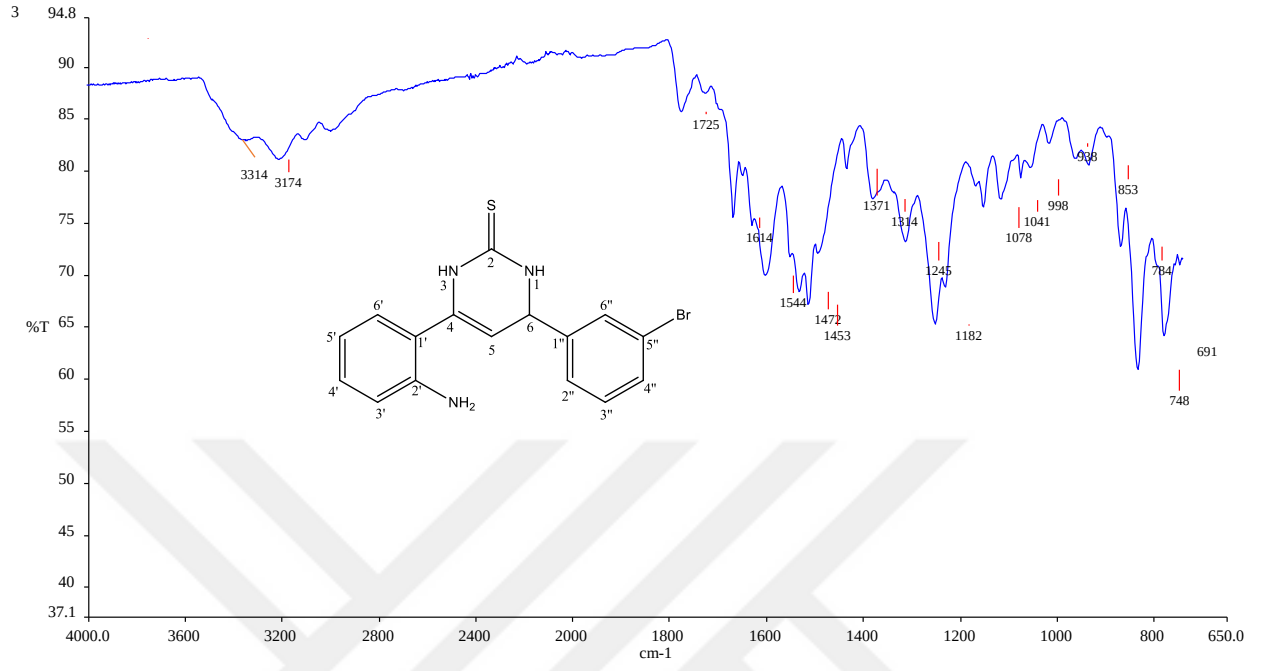


Ek 13. B2 Nolu bileşiğin LC/MS-MS spektrumu

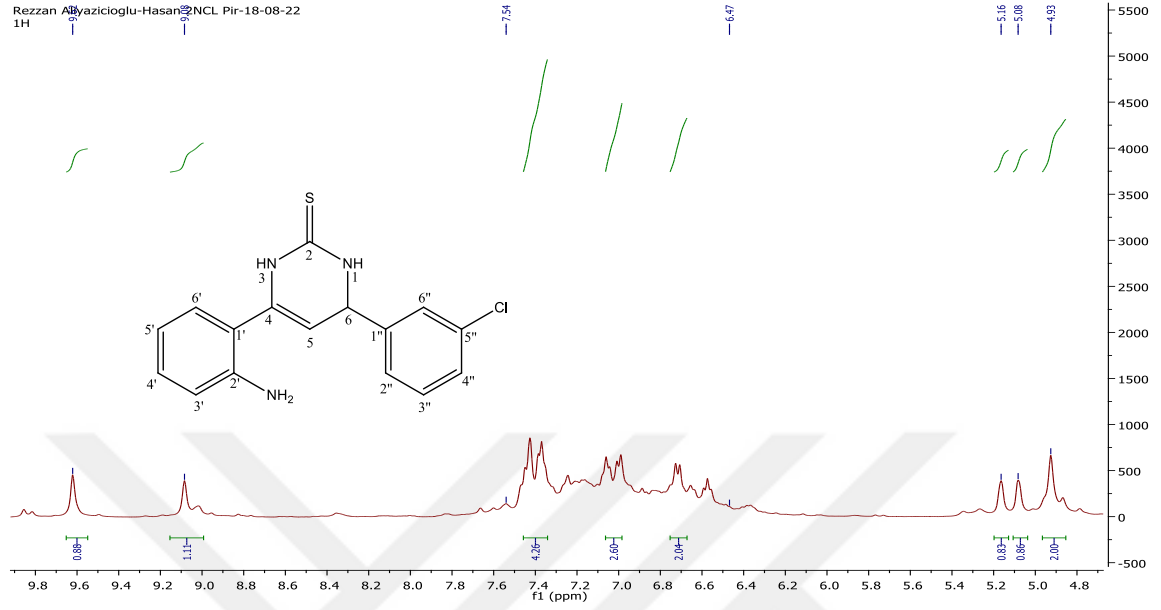
REZZAN-3 #51 RT: 0.44 AV: 1 SB: 35 0.22-0.42, 0.46-0.55 NL: 2.92E5
T: +p ESI Q1MS [300.070-600.000]



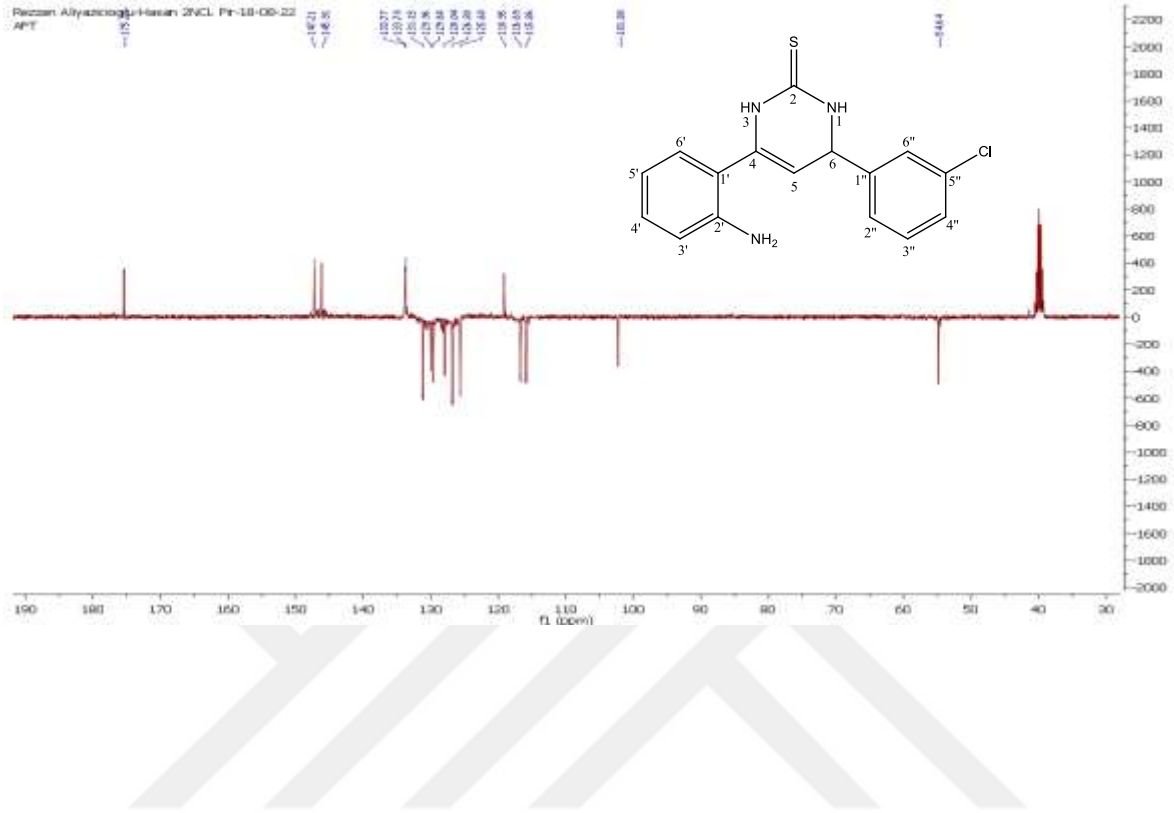
Ek 14. B2 Nolu bileşiğin FT-IR spektrumu



Ek 15. B3 Nolu bileşiğin ¹H-NMR spektrumu, (400 MHz, DMSO-d₆)

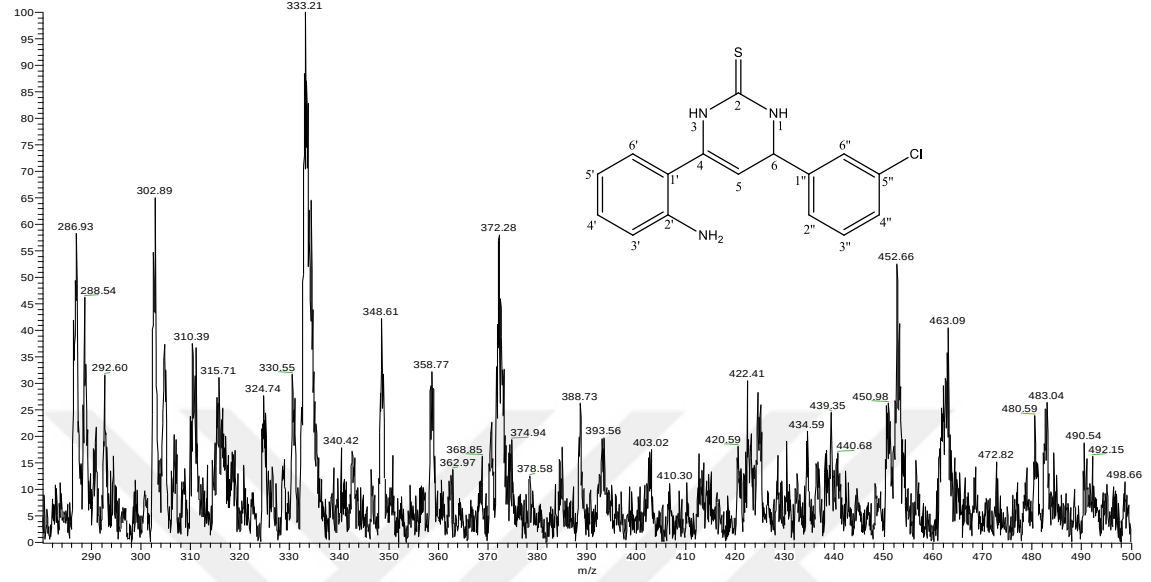


Ek 16. B3 Nolu bileşğin ¹³C-NMR (APT) spektrumu, (100 MHz, DMSO-d₆)



Ek 17. B3 Nolu bileşiğin LC/MS-MS spektrumu

R: ALIYAZICIOGLU-2N-CL-PRM #45-49 RT: 0.38-0.42 AV: 5 NL: 5.04E5
T: +p ESI Q1MS [280.070-500.000]



Ek 18. B3 Nolu bileşğin FT-IR spektrumu

