

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI TRIAZOL BİLEŞİKLERİNİN ÜREAZ  
İNİHİBSYONU POTANSİYELLERİNİN KİNETİK OLARAK VE MOLEKÜLER  
MODELLEMELERİ İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager Aylin KALFA**

**ŞUBAT 2016**

**TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI TRIAZOL BİLEŞİKLERİNİN ÜREAZ İNHİBİSYONU  
POTANSİYELLERİNİN KİNETİK OLARAK VE MOLEKÜLER MODELLEMEYLE  
İNCELENMESİ**

**Aylin KALFA**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**  
**“YÜKSEK LİSANS (KİMYA)”**  
**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 08 / 02 / 2016**

**Tezin Savunma Tarihi : 25 / 02 / 2016**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK**

**Trabzon 2016**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kimya Anabilim Dalında  
Aylin KALFA Tarafından Hazırlanan**

**YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI TRİAZOL BİLEŞİKLERİNİN ÜREAZ İNHİBİSYONU  
POTANSİYELLERİNİN KİNETİK OLARAK VE MOLEKÜLER MODELLEMEYLE  
İNCELENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 09 / 02 / 2016 gün ve 1639 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK**

**Üye : Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU**

**Üye : Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Bu tezin konusu veren, çalışmalarım esnasında her konuda desteğini esirgemeyen ve çalışmalarına yön veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince her an yanımda olan, maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen sayın hocalarım Ümmühan ÇAKMAK'a, Çiğdem AYNA'a, Fulya ÖZ'e en yakın arkadaşım ve hocam olan Elif AYAZOĞLU DEMİR'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tek tek isimlerini saymadığım bütün Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarında ki arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans tez süresince beni anlayışla karşılayan, her zaman yanımda olan tüm can dostlarıma ve müstakbel eşime teşekkür ederim.

Tez çalışmama sağladıkları maddi destekten ötürü, TÜBİTAK'a (Proje No: 114Z711) teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi desteğini, ilgisini ve sevgisini hiçbir zaman eksik etmeyen her zaman yanımda olan aileme sonsuz minnet duygularımı sunuyorum. Hakkınızı ödeyemem, sizleri çok seviyorum.

Aylin KALFA  
Trabzon 2016

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yeni Sentezlenmiş Bazı Triazol Bileşiklerinin Üreaz İnhibisyonu Potansiyellerinin Kinetik Olarak ve Moleküler Modellemeyle İncelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/ analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim 25/02/2016

Aylin KALFA

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ .....	XI
1 GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. İnhibitör Olarak Küçük Moleküller ve Hedef Enzimleri .....	3
1.3. Endüstride Enzim Kullanımı .....	5
1.4. Triazollerin Yapısı ve Biyolojik Aktiviteleri .....	6
1.5. Üreaz .....	8
1.5.1. Dağılımı ve Fonksiyonu .....	9
1.5.2. Yapısı ve Katalitik Mekanizması .....	10
1.5.3. Klinik ve Endüstriyel Önemi.....	13
1.5.4. İnhibitörleri ve İnhibisyonu.....	15
1.5.5. Üreazın Uygulama Alanları.....	17
1.5.5.1. Üre Konsantrasyonunun Analizi .....	17
1.5.5.2. Kreatinin Analizi .....	17
1.5.5.3. L-arginin Analizi .....	18
1.5.5.4. İmmünoğlobülin G (IgG) Ölçümleri .....	18
1.5.5.5. Ağır Metal İyonları ve Diğer Kirleticilerin Analizi .....	19
1.5.5.6. Böbrek Rahatsızlıklarında Ürenin Üreaz ile Uzaklaştırılması .....	19
1.5.5.7. Alkollü İçeceklerde Ürenin Asit Üreaz ile Uzaklaştırılması.....	20
1.6. Üreaz Aktivite Tayin Yöntemleri.....	21
1.6.1. Nessler Yöntemi .....	21
1.6.2. Çift Enzim Yöntemi .....	21

1.6.3.	Weatherburn Yöntemi .....	22
1.7.	Enzim İnhibisyon Çalışmalarında Yaklaşım ve Stratejiler .....	22
1.8.	Çalışmanın Amacı ve Önemi .....	24
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	26
2.1.	Kullanılan Materyaller .....	26
2.1.1.	Cihazlar .....	26
2.1.2.	Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler .....	27
2.1.3.	Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar .....	27
2.1.3.1.	Tampon Çözeltiler .....	27
2.1.3.2.	Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler ...	28
2.1.3.3.	Çalışmada Kullanılan İnhibitör Moleküller .....	28
2.2.	Aktivitenin Optimizasyonu ve İnhibisyon Çalışmaları .....	30
2.2.1.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	30
2.2.2.	Enzim Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi .....	30
2.2.3.	Substrat Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi .....	30
2.2.4.	Sıcaklığın Aktivite Üzerine Etkisi .....	31
2.2.5.	pH'nın Aktivite Üzerine Etkisi .....	31
2.2.6.	Reaksiyon Süresinin Aktivite Üzerine Etkisi .....	31
2.2.7.	Organik Moleküllerin Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	32
2.3.	Moleküler Modelleme Çalışması .....	33
2.4.	İstatistiki Analiz .....	34
3.	BULGULAR .....	35
3.1.	Enzim Aktivitesinin Optimizasyonu .....	35
3.1.1.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi .....	35
3.1.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	35
3.1.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi .....	37
3.1.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	37
3.1.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi .....	38
3.2.	Üreaz İnhibisyonu Çalışmaları .....	39
3.3.	Moleküler Modelleme Çalışmaları .....	43
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	45
5.	ÖNERİLER .....	50
6.	KAYNAKLAR .....	51

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans

ÖZET

YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI TRIAZOL BİLEŞİKLERİNİN ÜREAZ İNHİBİSYONU  
POTANSİYELLERİNİN KİNETİK OLARAK VE MOLEKÜLER MODELLEMEYLE  
İNCELENMESİ

Aylin KALFA

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyokimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK  
2016, 60 Sayfa

Bu çalışmada bazı triazol bileşiklerinin klinik ve endüstriyel öneme sahip üreaz enzimi üzerindeki inhibisyon potansiyelleri incelenmiştir, aynı zamanda bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 114Z711). Öncelikle, hazır satın alınan bu enzim için optimum reaksiyon şartları tespit edildikten sonra, kinetik çalışmalar yapılarak organik moleküllerin inhibisyona sebep olup olmadığı ve  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiştir. Daha sonra, üreaz için en etkili inhibitör molekülü varlığında inhibisyonun türü ve  $K_i$  değeri belirlendi. Son olarak, Gaussian, Autodock vina ve PyMOL programları kullanılarak organik moleküllerle üreazın etkileşimleri ve bağlanma enerjileri incelenmiştir. Buna göre, çalışılan bazı moleküller varlığında üreaz enziminin etkili bir şekilde inhibe olduğu gözlenmiştir. Üreaz için yapılan deneysel çalışmada, B20 bileşiği için  $IC_{50}$  değeri 420  $\mu$ M, inhibisyon türü nonkompetitif ve  $K_i$  değeri ise 254,6  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. Moleküler docking sonuçlarına göre ise, üreaz için B16 molekülü; aktif bölge bağlanma enerjisi en düşük olan dolayısıyla enzimle en güçlü etkileşim yapan molekül olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Triazol bileşikleri, Enzim inhibisyonu, Moleküler docking



Master Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF POTENTIAL INHIBITION EFFECTS OF SOME NEWLY SYNTHESIZED TRIAZOL COMPOUNDS ON UREASE ACTIVITY THROUGH KINETICS AND MOLECULAR DOCKING STUDIES

Aylin KALFA

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK  
2015, 60 pages

In this study, the inhibition potentials of certain triazole compounds on the urease enzyme having clinical and industrial importance have been studied and related research efforts was also supported by TUBITAK (Project Number: 114Z711). Firstly, optimum reaction conditions were determined for the commercially purchased enzyme and then, kinetic studies were performed to identify whether organic molecules trigger inhibition on urease enzyme and  $IC_{50}$  values. Later, the inhibition type and  $K_i$  value for urease enzyme were determined in the presence of the most effective inhibitor. Finally, the interaction of urease enzyme and organic molecules and their binding energies at active site were investigated through the software such as Gaussian, Autodock vina, and PyMOL. Based on experimental results, it has been observed that urease is efficiently inhibited by some organic molecules examined.  $IC_{50}$  value, inhibition type, and  $K_i$  value of the B20 compound for urease inhibition were determined to be 420  $\mu$ M, noncompetitive and 254.6  $\mu$ M, respectively. On the other hand, the data from molecular docking studies revealed that B16 compound was as the most potent interacting molecule with the lowest binding energies.

**Key Words:** Triazole compounds, Enzyme inhibition, Molecular docking

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Birbiri ile izomer olan iki triazol halkası .....	7
Şekil 2. Ticari ilaç olarak kullanılmakta olan bazı 1,2,4-triazol halkası içeren bileşikler ..	7
Şekil 3. Üreaz katalizli reaksiyon.....	9
Şekil.4. JBU, HPU, KAU ve BPU'ların alt birimleri.....	11
Şekil 5. a) JBU'ya göre, bakteriyel üreaz sekanslarına karşılık gelen benzerlik yüzdeleri, b) JBU ve bazı bakteriyel aminoasit dizi sıralarının karşılaştırılması .....	12
Şekil 6. Üreaz katalizli reaksiyon mekanizması .....	13
Şekil 7. Kreatinin Kreatinaz enzimi ile hidrolizi .....	18
Şekil 8. İndofenol oluşum mekanizması .....	22
Şekil 9. Protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi .....	35
Şekil 10. Enzimin substrat doygunluk eğrisi.....	36
Şekil 11. Üreaz enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	36
Şekil 12. pH'nın aktivite üzerine etkisi.....	37
Şekil 13. Sıcaklığın aktivite üzerine etkisi.....	38
Şekil 14. Reaksiyon süresinin aktivite üzerine etkisi .....	38
Şekil 15. B16 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi .....	39
Şekil 16. B17 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi .....	40
Şekil 17. B18 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi .....	40
Şekil 18. B19 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi .....	40
Şekil 19. B20 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi .....	41
Şekil 20. B21 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi .....	41
Şekil 21. Tiyoürenin üreaz aktivitesi üzerine etkisi .....	41
Şekil 22. B20 bileşiği varlığında üreaz inhibisyon türünün belirlenmesi .....	42
Şekil 23. B20 bileşiği varlığında üreaz inhibisyon türünün belirlenmesi .....	42
Şekil 24. Üreaz enzimi ile B16 (A) ve B20 (B) moleküllerinin etkileşimi.....	44

## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Klinik kullanımda olan bazı inhibitörler ve hedef enzimleri .....	5
Tablo 2. Endüstrideki uygulamalarda sıkça kullanılan bazı enzimler.....	6
Tablo 3. Çalışmada kullanılan gereçler .....	26
Tablo 4. Çalışmada kullanılan enzim ve kimyasallar .....	27
Tablo 5. Çalışmada kullanılan inhibitör moleküller .....	29
Tablo 6. İnhibitör moleküllerinin üreaz aktivitesi üzerine etkisi.....	42
Tablo 7. B20 bileşiği varlığında üreaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve $K_i$ değeri.....	43
Tablo 8. Üreaz varlığında çalışılan inhibitör moleküllerinin bağlanma enerjileri .....	43

## KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome (Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu)
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
°C	: Celcius ( sıcaklık birimi )
Dk.	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
E.C	: Enzim kod numarası
g	: Gram
HIV	: Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü)
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA redüktaz
I	: İnhibitör
$IC_{50}$	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kcal	: Kilokalori
kDa	: Kilodalton
$K_i$	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
$K_m$	: Maksimum hızın yarısına neden olan substrat konsantrasyonu
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
$\mu$ L	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
$\mu$ M	: Mikromolar
$\mu$ mol	: Mikromol
N	: Normalite
$NAD^+$	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
rpm	: Dakikadaki devir sayısı

S	: Substrat
U	: Ünite
V	: Enzimatik reaksiyon hızı
$V_{max}$	: Maksimum hız
$\Delta G$	: Gibbs serbest enerjisi

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Hayat bir seri kimyasal reaksiyonun iyi organize olması ve yönetilmesine bağlıdır. Bu reaksiyonların bir kısmı doğası gereği yavaş gerçekleşirken bazılarının da enzim denilen katalizörler varlığında oldukça yüksek hızda gerçekleşmesi gerekmektedir. Enzimlerin katalitik güçleri virüslerden insanlara kadar bütün hayat formlarında yaşam süreçlerini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle biyolojik katalizörler olan enzimler, canlılık adına çok önemli fonksiyonları yerine getirmektedirler (Copeland, 2000).

Hayat için enzimlerin ve aktivitelerinin son derece gerekli olmasının yanında enfekte edici organizmalardaki (virüsler, bakteriler) kritik enzimlerin seçimli inhibisyonu da bulaşıcı hastalıklara kemoterapik müdahalede son derece önemlidir. Seçimli enzim inhibisyonu stratejisi günümüzde modern eczacılıkta ilgi görmekte ve antiviral, antibiyotik ve antiparazitik ilaçların önemli bir kısmının etkinliklerini bu şekilde gösterdiği bilinmektedir. Buna ilave olarak regüle edilemeyen enzim aktivitesi hastalık haline öncülük edebilmektedir. Örneğin, bazı durumlarda enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, enzimin hücre içerisinde aşırı derecede üretilmesine neden olabilmekte veya bazı nokta mutasyon durumlarında da enzimdeki yapısal değişmelerden dolayı enzimin katalitik etkinliği artabilmektedir. Bu her iki durum da anormal düzeylerde reaksiyon ürünlerinin oluşumuyla sonuçlanır ki bu da spesifik patolojilere neden olabilmektedir. Bu nedenle enzimler, patofizyolojideki ve hayat sürecindeki önemli rollerinden dolayı, ilaç terapilerinde ilgi çekici hedef olmuşlardır.

2002 yılında yapılan bir anket göstermiştir ki klinik kullanımdaki tüm ticari küçük molekül ilaçların yaklaşık %50'si, terapötik etkisini enzim inhibisyonuyla ortaya koymaktadır (Hopkins ve Groom, 2002; Copeland, 2005). Enzim inhibitörleri olarak rol oynayan küçük molekül ilaçların dünya genelindeki pazarı, 2001 yılında 65 milyar doları bulurken bu rakamın 2006 yılında 95 milyar dolardan daha fazla olması yönündeki beklentiler kayıtlara geçmiştir. Bu durum, belli başlı ilaç veya biyoteknoloji firmalarının enzimleri hedef alan yeni ilaç keşfi ve tasarımı çalışmalarına yoğunlaşmalarına neden olmuştur (Copeland, 2005).

Bazı enzimler canlı organizmalardan ekstrakte edildikten sonra da katalitik etkinliklerini muhafaza ettiklerinden günümüzde enzimlerin birçok endüstride çok farklı biyoteknolojik süreçlerde ticari amaçlar için kullanılmaları mümkün olmuştur. Enzimlerin endüstride kullanımı, geleneksel kimyasal muamelelerle elde edilemeyen daha yüksek ürün kalitesi, daha düşük üretim maliyeti, daha az atık ve az enerji tüketimi gibi faydalarla sonuçlanır. Sıradan kimyasal reaksiyonlar genellikle spesifik değildir, istenmeyen yan ürünler ortaya çıkmaktadır, kontrol edilmesi kolay değildir ve ılımlı olmayan şartlarda gerçekleşmektedir. Bütün bu problemler enzimlerin kullanımı ile ortadan kalkmaktadır (URL-1, 2013). Dolayısıyla, günümüzde enzimler, gıda, tekstil, kozmetik, hayvan yemi, kağıt ve temizlik endüstrisinde, ilaç kimyasallarının sentezi ve diğer bazı önemli moleküllerin endüstriyel ölçekteki üretimi süreçlerinde ve diğer birçok alan için de vazgeçilmez olmuşlardır (Benjamin ve Pandey, 2000). Efedrin, aspartam ve amoksilin gibi iyi bilinen örnekleri de içeren ve birçok alanda kullanılabilen 500'den fazla maddenin üretiminde enzimlere başvurulmaktadır. 1960'lı yıllara kadar yıllık toplam enzim piyasası sadece birkaç milyon dolar iken bu piyasa son yıllarda oldukça büyük bir artış göstermiştir. Bu durum, amaca yönelik özel enzim üretimini ve endüstriyel prosesin kontrolünü sağlamak adına kontrollü regüle edilebilir enzimlerin kullanımını gerektirmektedir.

Bütün bu bilgiler ışığında söylenebilir ki, enzim inhibisyonu, sadece hastalıklarla mücadele edebilme açısından önemli olmamakta aynı zamanda biyoteknolojik süreçlerin kontrol altında tutulabilmesi açısından da önem arz etmektedir.

İster klinik odaklı kaygılar, isterse endüstriyel süreçlerin güvenliği açısından olsun spesifik enzimlerin inhibisyonu için sentezlenen küçük organik moleküllerin tanımlanmasına yönelik modern girişimlerin temelinde, bu moleküllerin, enzime etkili bir şekilde bağlanmasını sağlayacak fizikokimyasal ve stereokimyasal özelliklerinin incelenmesi yatmaktadır (Copeland, 2000). Aynı şekilde, inhibitör ve enzim molekülünün şekil ve topolojisi, inhibitör molekülü ve enzim bağlanma bölgesinin yapısal uygunluğunun belirlenmesinde ve dolayısıyla inhibitörün enzimin bağlanma bölgesine bağlanıp bağlanamayacağını tespitinde önemlidir. Herhangi bir enzim için potansiyel bir inhibitörün ortaya konulmuş olması, bu inhibitör molekülünün yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinde değişikliğe neden olabilecek türevlendirmeler yapılarak söz konusu yeni molekülün inhibisyon potansiyelindeki değişimlerin incelenbilmesinin önünü açmaktadır (Copeland, 2000). Bu yüzden organik kimyacılar tarafından her yıl onlarca yeni molekül sentezlenmekte ve yapı-aktivite ilişkisi (SAR, moleküler modelleme çalışmaları)

incelenmektedir. Ya da sentez yapılmadan önce yukarıda bahsedildiği gibi yapısal bilgilerin enzimin inhibisyonu üzerine etkisinin ne şekilde olabileceğini ortaya koyan moleküler modelleme çalışmaları yapılmakta ve daha sonra organik molekül sentezlenmektedir. Daha sonra bu organik moleküllerin inhibisyon potansiyelleri, biyokimyasal olarak enzim kinetiği ölçümleri (inhibitörsüz ve değişik konsantrasyonlardaki inhibitör organik molekülün varlığında yapılan enzim aktivite tayinleri) yardımıyla  $IC_{50}$  ya da  $K_i$  gibi değerlerin ortaya konulmasıyla ölçülebilmektedir.

## 1.2. İnhibitör Olarak Küçük Moleküller ve Hedef Enzimleri

Küçük organik moleküllerle sağlanan enzim inhibisyonu ve bu konuda yapılan araştırmalar, patojenik organizmaların neden olduğu bulaşıcı hastalıklara kemoterapik müdahalenin sağlanabilmesi amacıyla ve aşırı düzeylerde metabolit oluşumuyla sonuçlanan ve bu nedenle çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilebilen yüksek enzim etkinliğinin önlenmesi amacıyla klinik ve farmasötik anlamda önem arz etmektedir (Copeland, 2000; Copeland, 2005). Bu yönüyle, tıp, yirmi birinci yüzyılda büyük oranda, biyoaktivitesinin patojenik olduğu ya da en azından bir hastalıkla ilişkili olan spesifik makromoleküler hedeflere yönelik ilaç molekülleriyle ilgilenen bir moleküler bilim olmuştur.

Biyolojik makromoleküller arasında enzimler, ilaç moleküllerinin hedefi olarak lider pozisyonda bulunmaktadır. Bu durum enzimlerin, bazı hastalık süreçlerinde etkinliklerinin gözlenmesinden kaynaklandığı gibi enzim katalizinin yapısal dinamikleri nedeniyle enzimlerin küçük molekül kütleli ilaç molekülleriyle inhibe olabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Buna ilave olarak, ilaç olabilecek küçük organik moleküllerin hedefleri, yapısal olarak molekülle komplementer olan spesifik bağlanma cepleri/bölgeleri içermek zorundadır. Hatta ilaç molekülünün bağlanacağı bu bölge hedef molekülün biyolojik aktivitesi açısından kritik önemi olan bir bölge olmalıdır ve ilaçla söz konusu bölgenin etkileşimine bağlı olarak hedef molekülün biyolojik aktivitesi azalmalıdır. Bu nedenle de ilaç moleküllerinin etkileşeceği hedef moleküllerin başında enzimler gelmektedir ki enzimlerin üç boyutlu yapılarında sahip oldukları aktif bölgeleri ya da regülatör allosterik bağlanma bölgeleri (enzimin hacmine göre küçük hacimlidir ve biyolojik fonksiyon için kritik olan ve hidrojen bağı ya da diğer elektrostatik etkileşimleri yapabilecek spesifik olarak yönlendirilmiş atom ya da grupları içeren oldukça hidrofobik



bağlanma cebi içerirler) bu iş için en uygun bağlanma bölgeleridir. Bu nedenle, günümüzde klinik olarak kullanılan ilaçların yaklaşık yarısının enzim inhibitörü olması hiç şaşırtıcı değildir. Bu da yakın gelecek için farmasötik araştırmaların ana odak noktasının spesifik enzim inhibisyonu olarak kalmasının hayati bir zorunluluk olacağını göstermektedir (Copeland, 2005).

İlaç olarak en iyi etkinlik gösteren bileşiklerin genel olarak belli fizikokimyasal kriterlere uyduğu iyi bilinmektedir. Ayrıca, birçok klinik durumda uygun dozda ilacın oral yolla uygulanması istenmektedir. Bu kriter de protein, gen veya terapötik temelli bazı doğal ürünler yerine küçük molekül ilaçların daha uygun olmasına neden olmaktadır. Buna ilaveten, *in vivo* olarak etkili olabilmesi için ilaç olacak moleküllerin, absorblanması ve dağıtılması, moleküler hedeflerine ulaşabilmek üzere çoğunlukla hücre membranından geçebilmesi ve sistemik döngüde uygun bir zaman diliminde bozunmadan kalması gerekmektedir. Bu gereksinimlere de en iyi uygunluk gösteren moleküller çoğunlukla küçük (500 daltondan küçük molekül kütleli) organik moleküllerdir ki yapıları genel olarak hidrofobik olmakla birlikte sınırlı sayıda ve spesifik olarak yönelmiş heteroatom ve hidrojen bağı sunucusu içermektedirler (Ajay vd., 1998; Lipinski vd., 2001; Veber vd., 2002; Copeland, 2005). Bu nedenle yeni ilaç moleküllerinin belirlenebilmesi yukarıda bahsi geçen kriterleri yapısında bulunduran yeni küçük molekül kütleli organik bileşiğin sentezini ve bunların ilaç olarak etkinliklerinin incelenmesini zorunlu kılmaktadır. Bugün birçok ilaç şirketi Ar-Ge laboratuvarlarında ve akademik düzeyde araştırma yapan laboratuvarlarda geniş bir bileşik kütüphanesi oluşturulmakta ve bu bileşiklerin enzim-inhibitör etkileşimleri *in vitro* olarak incelenmektedir.

Yapılan çalışmalar neticesinde görülmüştür ki ilaçların çoğu hedef enzimle dönüşümlü olarak etkileşmektedir. İnhibitör, serbest enzime bağlanabileceği gibi enzim-substrat kompleksine veya her ikisine de bağlanabilir, ilaç etkileşiminin kantitatif büyüklüğünü ortaya koymanın en iyi yolu denge ayrışma sabitinin ( $K_i$ ) ve bağlanmaya ait Gibbs serbest enerjisinin bilinmesidir (Copeland, 2005). Tablo 1’de klinik kullanımda olan bazı ticari enzim inhibitörleri ve bunların hedef enzimleri sunulmaktadır (Hadvary vd., 1988; Miyazawa vd., 2003; Copeland, 2005; Shah ve Soomro, 2012).

Tablo 1. Klinik kullanımda olan bazı inhibitörler ve hedef enzimleri

Bileşik	Hedef Enzim	Klinik Kullanımı
Asetazolamid	Karbonik anhidraz	Glokom
Amprenavir, indinavir, ritonavir	HIV proteaz	AIDS
Allopurinol	Ksantin oksidaz	Gut
Argatroban	Trombin	Kalp hastalıkları
Aspirin	Siklooksijenaz	Ateş, ağrı
Amoxicillin	Penisilin bağlayan proteinler	Bakteriyal enfeksiyonlar
Kaptopril, enalapril	Antiyotensin dönüştürü enzim	Hipertansiyon
Karbidopa	Dopa dekarboksilaz	Parkinson
Digoksin	Sodyum-potasyum ATPaz	Kalp hastalıkları
CI-1040, PD0325901	MAP kinaz	Kanser
Lovastatin ve diğer statinler	HMG-CoA redüktaz	Kolesterol düşürücü
Norfloksasin	DNA giraz	İdrar yolu enfeksiyonları
Omeprazol	H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ATPaz	Peptik ülser
Orlistat	Pankreatik, gastrik lipaz	Obezite
Lithostat	Üreaz	Üriner sistem rahatsızlıkları
Arbutin	Tirosinaz	Hiperpigmentasyon

### 1.3. Endüstride Enzim Kullanımı

Bugün bilindiği üzere endüstride enzim kullanımı Alman kimyacı Otto Röhm'ün 1913 yılında pankreatik tripsinin çamaşırlardaki protein kaynaklı kirleri temizlemedeki etkinliğini keşfetmesiyle başlamıştır. Günümüzde ise mikrobiyal proteazlar artık temizlik endüstrisinin lokomotifine haline gelmiştir. Hemen hemen her deterjan paketinde proteazlar bulunmakta ve kan, süt ve yumurta orijinli lekelerin giysilerden etkili bir şekilde uzaklaştırılmasını katalizlemektedir (Copeland, 2000).

Diğer endüstri alanlarında da enzimatik prosesler neredeyse tamamen konvansiyonel kimyasal proseslerin yerini almışlardır. Mesela gıda endüstrisinde, mandıra ürünlerinde ve fırıncılıkta ürünlerin özelliklerini iyileştirmede kullanılmaktadır. Kuru temizleme sektöründe ve hatta taşlanmış kot üretiminde de yine enzimler kullanılmaktadır. Ayrıca, sentetik organik kimyada birçok reaksiyonun katalizinde, mısır nişastasından biyo-etanol üretiminde, moleküler biyolojide, protein mühendisliğinde ve daha birçok alanda giderek artan bir şekilde enzim uygulamalarıyla karşılaşılmaktadır (Copeland, 2000; Ahle, 2007).

Tablo 2’de endüstrinin değişik alanlarında uygulama sahası bulan bazı enzimler bulunmaktadır (Ahmed ve Vulphson, 1994; Sanchez-Amat ve Solano, 1997; Mayer, 2006; Aehle, 2007).

Tablo 2. Endüstrideki uygulamalarda sıkça kullanılan bazı enzimler

Enzim	Uygulama Alanı	Fonksiyonu
Glukoz oksidaz	Fırıncılık, mayalama, mandıra, tekstil	Gluten dayanıklılığını artırmak, raf ömrünü uzatmak, enzimatik ağartma
Katalaz	Mayalama, mandıra, tekstil	Raf ömrünü uzatmak, hidrojen peroksit uzaklaştırmak, atık su muamelesi
Transglutaminaz	Mandıra	Yoğurt lezzet artırıcı
Lipaz	Fırıncılık, mandıra, kuru temizleme, deterjan, hamuru, organik sentez	Ekmek özelliği geliştirmek, peynircilik, yağlı kirlerin uzaklaştırılması, kimyasal sentezi
$\alpha$ -Amilaz	Fırıncılık, meyve suyu, mayalanma, kuru temizleme, deterjan, hayvan yemi	Hamurun taze kalması, elma suyu üretimi, nişasta kökenli kirlerin temizlenmesi, sindirim kolaylaştırıcı
Pektin	Meyve suyu	Elma suyu üretimi
$\beta$ -Amilaz	Mayalanma	Ezme
Glukoamilaz	Meyve suyu, mayalanma	Elma suyu üretimi ve ezme
Selulaz	Kuru temizleme, tekstil, hayvan yemi	Toprak orijinli kirlerin temizlenmesi, renk parlatici, pamuk cilalama, yem katkısı
Ksiloz izomeraz	Tahıl Islak öğütme	Fruktoz üretimi
Polifenol oksidaz	Organik sentez, gıda işleme	Kimyasal sentez, gıdalarda esmerleşme
Proteaz	Tekstil, deterjan	İpek işleme, protein orijinli kirlerin uzaklaştırılması

Ancak bunların biyoteknolojik amaçlı kullanımı bu süreçlerde enzim etkinliğinin kontrolünü de zorunlu kılmaktadır. Bu yönüyle endüstride enzim uygulamalarının bir kısmında kontrol edilebilir süreçlerin temini açısından enzim inhibisyonu önem taşımaktadır.

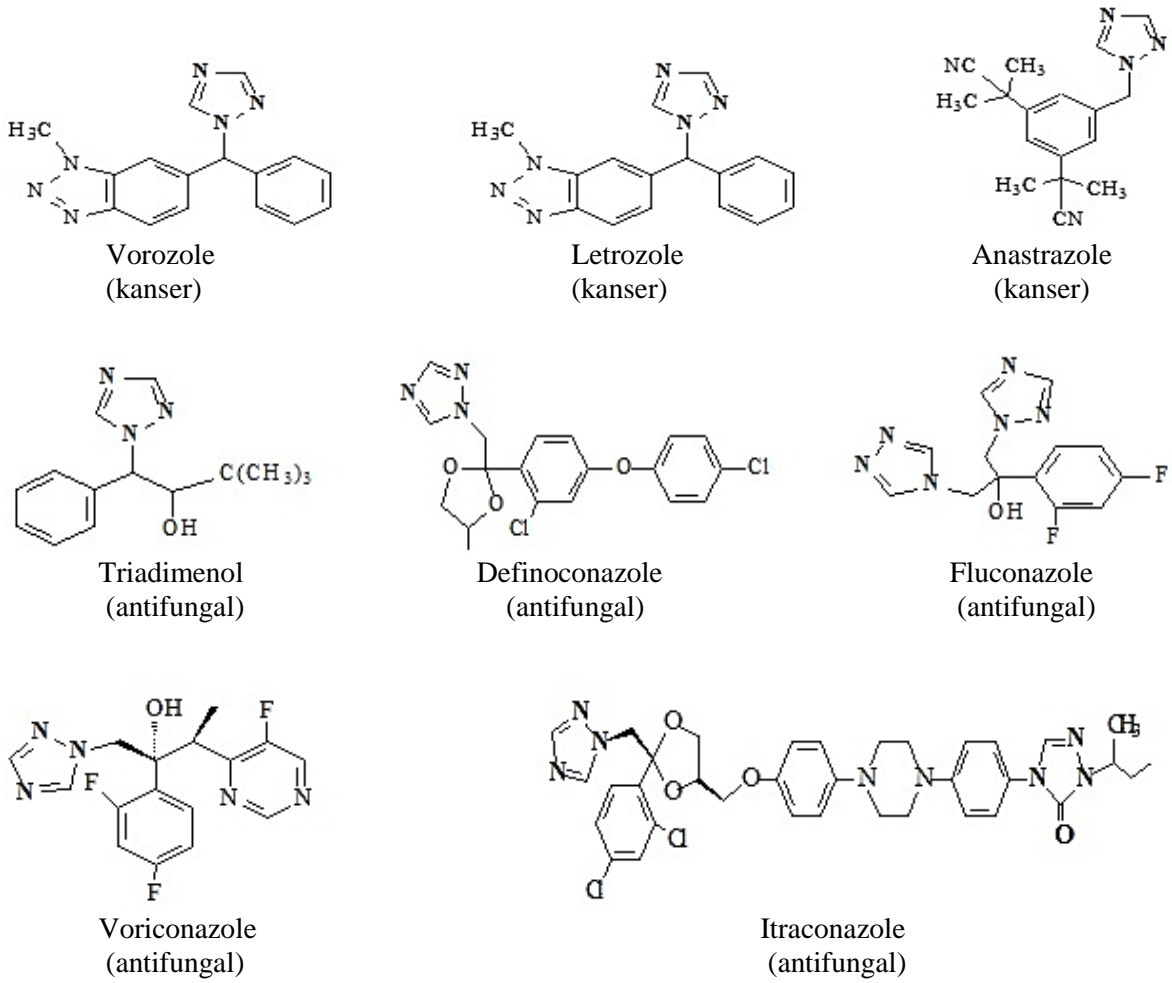
#### 1.4. Triazollerin Yapısı ve Biyolojik Aktiviteleri

Beşli halkada üç azot atomu içeren bileşiklere Triazol adı verilir. 1,2,3-triazol ve 1,2,4-triazol olmak üzere birbiri ile izomer olan iki triazol halkası (Şekil 1) vardır (Maddila vd., 2013).



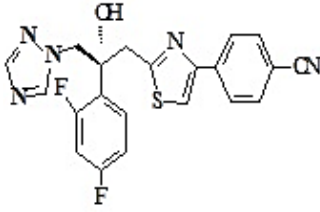
Şekil 1. Birbiri ile izomer olan iki triazol halkası

1,2,4-Triazol halkası içeren pek çok heterosiklik bileşiğin antikonvülsan, antifungal, antimikrobiyal, analjezik, antiviral, antiinflamatuvar, antioksidan, antitümör, anti HIV ve antihipertensif gibi önemli farmakolojik özelliklere sahip oldukları bilinmektedir (Maddila vd., 2013). Ayrıca, 1,2,4-triazol halkası içeren bazı bileşikler (Şekil 2) piyasada ilaç olarak kullanılmaktadır (Wakale vd., 2013).

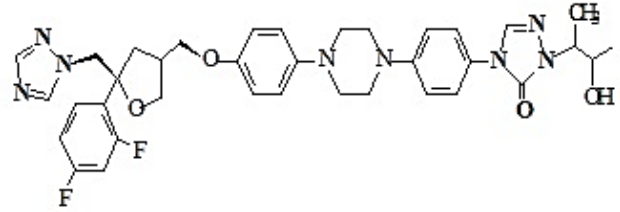


Şekil 2. Ticari ilaç olarak kullanılmakta olan bazı 1,2,4-triazol halkası içeren bileşikler

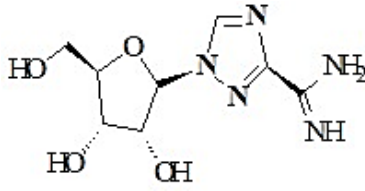
Şekil 2'nin devamı



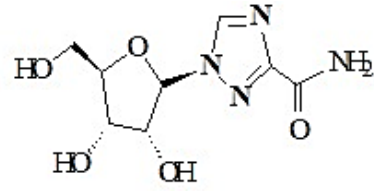
Ravuconazole  
(antifungal)



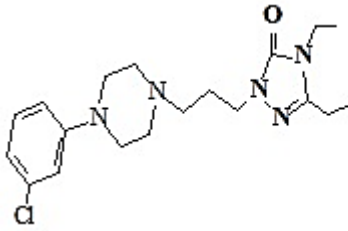
Pasaconazole  
(antifungal)



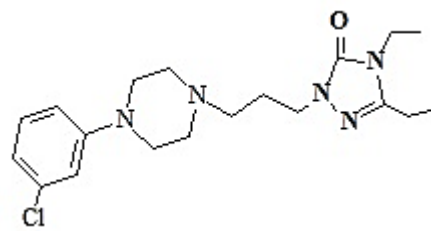
Viramidine  
(antiviral)



Ribavirin  
(hepatit C)



Etoperidone  
(antidepressan)



Nefazodone  
(antidepressan)

## 1.5. Üreaz

Üreaz, ürenin hidrolitik ayrışmasını sağlayan biyolojik bir katalizördür. Bu enzim aktif bölgesinde nikel bulunduran bir metaloenzimdir (Ciurli vd., 1999). Üreaz, tıbbi, ekolojik ve ekonomik önemi yanında, literatürde 1926'da Sumner tarafından kristalize edilen ilk enzim olma özelliğininide taşımaktadır. Sumner'ın bu keşfinden sonra *Canavalia ensiformis* (*C. ensiformis*) üreazı ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda *C. ensiformis* üreazının aktivitesi nikel iyonlarına ( $Ni^{2+}$ ) bağlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca, ilk kez Jabri ve arkadaşları 1995'te *Klebsiella aerogenes* (*K. aerogenes*) üreazının kristal yapısındaki atomlarının dizilimini X-ışın kırınım yöntemiyle rapor etmişlerdir. Daha sonra, *Bacillus pasteurii* (*B. pasteurii*), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *C. ensiformis* üreazlarının yapılarıda ortaya konulmuştur (Barakat vd., 2015).

Uluslararası Biokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUB) tarafından belirlenen enzim kod numarası EC 3.5.1.5.'dir.

Bu sıralamaya göre;

3 (Tip no) : Enzimin bir hidrolaz sınıfı olduğunu

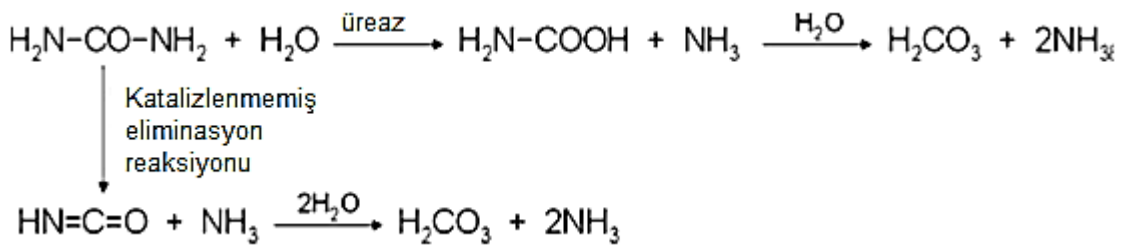
5 (Grup no) : Enzimin C-N bağlarına etkili olan amidaz alt grubuna dahil olduğunu

1 (Alt grup no) : Enzimin bir açilamidaz olduğunu

5 (Sistemik ad) : Enzimin sistemik adının “*üre amidohidrolaz*” olduğunu gösterir.

### 1.5.1. Dağılımı ve Fonksiyonu

Üreaz, bitki, alg, mantar ve değişik mikroorganizmalardaki ürenin amonyak ve karbondioksit parçalanmasını katalizlemektedir (Şekil 3) (Krajewska, 2009). Bu tepkime katalizör olmadan gerçekleşen reaksiyon hızından  $10^{14}$  kat daha hızlı gerçekleşmektedir (Kayastha ve Das, 1999). Katalizörsüz ortamda gerçekleşen reaksiyon sonucunda oluşan ürünler amonyak ve siyanürik asittir. Bunun aksine katalizör varlığında meydana gelen reaksiyonda ise oluşan son ürünler amonyak ve karbonik asittir (Blakeyand ve Zerner, 1984). Bu tepkime azot döngüsünde önemli bir rol oynamaktadır (Krajewska vd., 2001).



Şekil 3. Üreaz katalizli reaksiyon (Krajewska, 2009).

Üreazlar çeşitli bitki, mantar ve bakterilerden izole edilebilmektedirler. Bu enzimler bitkilerde savunma mekanizmasına katkı sağlamaktadırlar (Martinelli vd., 2014). Ayrıca ürenin hidrolizini sağlayan bu enzimler bazı bakterilerin (*H. pylori* gibi) asidik çevrelerde hayatta kalmasına katkı sağlamaktadırlar. Hayvanlarda üre, aminoasitlerin deaminasyonu ile önemli bir azotlu atık ürün olarak üretilmektedir (örneğin, karaciğerde) ve nefronlardan

atılmaktadır. Buna ek olarak, üre farklı organlarda veya dokularda ozmoregülasyona yardım etmektedir (Wang vd., 2008).

Yaygın olarak kullanılan üreaz kaynakları şunlardır;

1. *K. aerogenes*: Enterik bir bakteridir ve içerdiği üreaz (KAU) sayesinde azot metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır (Stefano, 2000).
2. *B. pasteurii*: Bu bakteriler toprakta, suda ve kanalizasyonlarda yaşamaktadırlar. Özellikle tarım ve çevresel olaylarla yakından ilişkilidirler ve bu bakteri içerdiği üreaz (BPU) sayesinde bitkiler için toprağı azotça zenginleştirirler (Stefano, 2000).
3. *C. ensiformis*: Bir tür baklagil olan *C. ensiformis* bulunduğu yetişkin bitkilerde topraktan azot emiliminin yeterli olmadığı durumlarda azot deposu olarak kullanılan argininin açığa çıkardığı üreyi, içerdiği üreaz (JBU) sayesinde amonyağa çevirerek azot kaynağı olarak kullanılmasına yardım etmektedir (Stefano, 2000).
4. *H. pylori*: İnsanlarda midenin asidik yapısını etkileyerek ülser, gastrit vb. hastalıklara sebep olan bir bakteridir (Stefano, 2000).

Üreaz, *Leguminosae*, *Cucurbitaceae*, *Asteraceae*, ve *Pinaceae* üyelerinin birçoğunun tohumlarında bulunmaktadır. Ayrıca vejetatif dokularda ya da farklı tür bitkilerde daha düşük miktarlarda bulunabilmektedirler (Zonia vd., 1995). Bitki üreazları tohumun kimyasal savunmasına katkı sağladıkları bilinmektedir (Polacco ve Holland, 1993). Üreaz, organizmalara büyümeleri için gerekli olan azotu amonyak formunda sağlamaktadır (Krajewska, 2009). Bitkilerde üreazlar, yaygın bir biçimde baklagil tohumlarında bulunmakta ve tohum gelişimi için önemli rol oynamaktadırlar (Zonia vd., 1995).

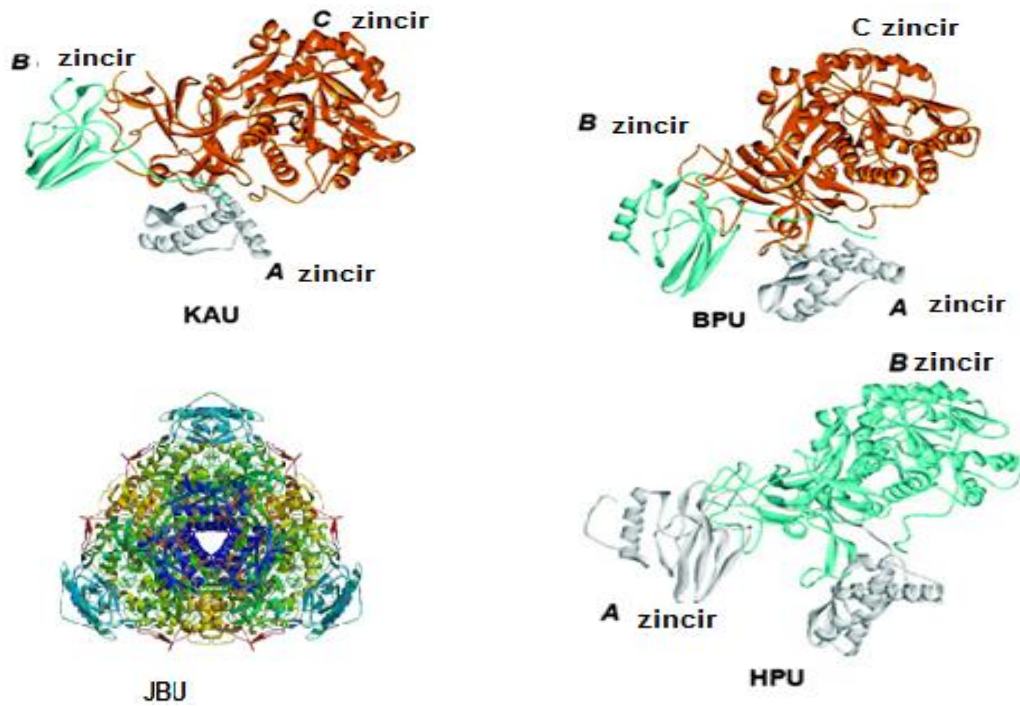
### 1.5.2. Yapısı ve Katalitik Mekanizması

Üreazların yapıları, alt birimlerinin yapısı ve sayıları, molekül ağırlıkları ve aminoasit dizilişleri çeşitli kaynaklardan elde edilişlerine göre farklılıklar göstermektedir (Kot vd., 2000).

Genetik çalışmalarla, yardımcı ve yapısal proteinleri kodlayan genler gruplandırılıp üreazın küme varlığı ortaya konulmuştur. Bakterilerin genleri ÜreA, ÜreB ve ÜreC'dir (kodlanan alt birimleri sırasıyla  $\gamma$ ,  $\beta$  ve  $\alpha$ ) fakat *H. pylori* bir gen füzyonu oluşturduğu için yapısında sadece üreA ve üreB bulunmaktadır (Stefano, 2000).

Bitkilerde üreaz (*C. ensiformis* gibi) yüksek bir molekül ağırlığına sahiptir. Bitki ve mantar üreazları 91 kDa ağırlığında özdeş alt birimlerden oluşan homo-oligomerik yapıdadırlar. Bakteriye üreazlar ise iki veya üç alt birimden meydana gelen multimer yapıdadırlar. Bakteri ve bitki üreazları üç boyutlu yapılarıyla ve korunmuş bir katalitik mekanizmaya sahip olmalarıyla büyük benzerlik göstermektedirler. Hem bakteriyel hem de bitki üreazları kendi üreolitik aktivitelerinden bağımsız olarak farklı biyolojik faaliyetlerde göstermektedirler (Balasubramanian ve Ponnuraj, 2010).

Bakteriyel üreazlardan en iyi bilinenler, *K. aerogenes* üreazı (KAU), *B. pasteurii* üreazı (BPU) ve *H. pylori* üreazı (HPU)'dır (Şekil 4).



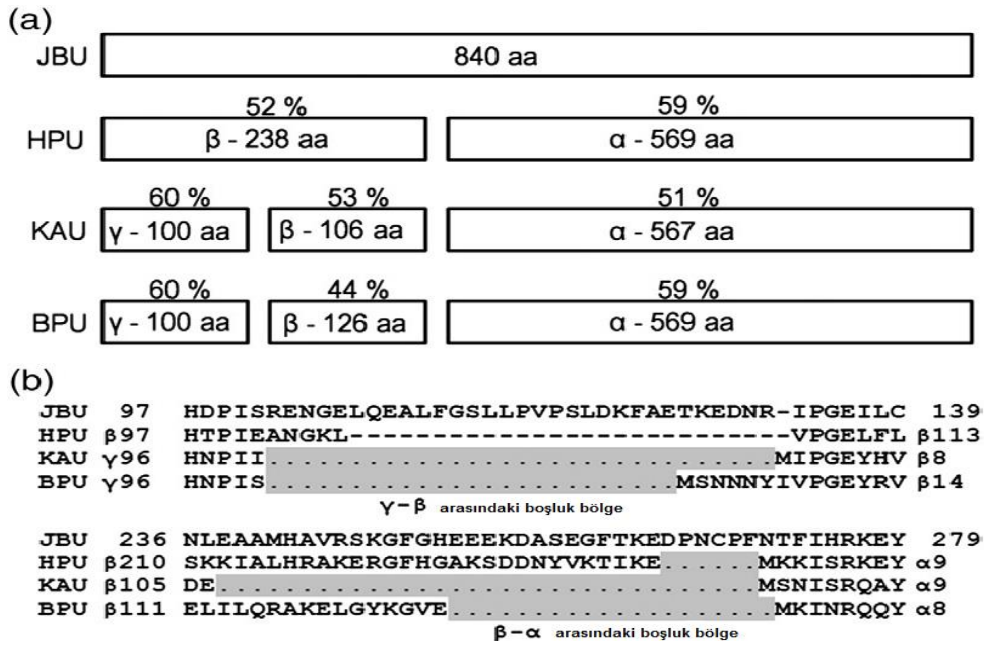
Şekil 4. JBU, HPU, KAU ve BPU'ların alt birimleri (Balasubramanian vd., 2013).

Bu enzimler,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  olarak adlandırılan üç alt birimin oluşturduğu heteropolimer yapıdadır ve aktif merkezleri  $\alpha$  alt birimlerinde bulunmaktadır. KAU'nun, aktif bölgesinde iki nikel atomu bulunmaktadır (Carter vd., 2009). Alt birimleri  $\alpha$  (60,3 kDa, ÜreC),  $\beta$  (11,7 kDa, ÜreB) ve  $\gamma$  (11,1 kDa, ÜreA)'dan oluşmaktadır (Finnegan vd., 1991; Wang vd., 1993). Bu alt birimlerin bir tanesi ile yüksek üreolitik aktiviteye sahip toprak bakterisi olan *B. pasteurii*'den elde edilen üreazın,  $\alpha$  (61,4, kDa),  $\beta$  (14,0, kDa) ve  $\gamma$  (11,1, kDa) alt biriminden bir tanesi benzerlik göstermektedir (Amtul vd., 2002). Bir diğer bakteriyel



ürezaz HPU'dur. Bu enzim 550 kDa ağırlığında ve nikel içerikli bir enzim olup iki alt birimden oluşan heterodimer yapıdadır (Dunn vd., 1990; Becker-Ritt vd., 2007).

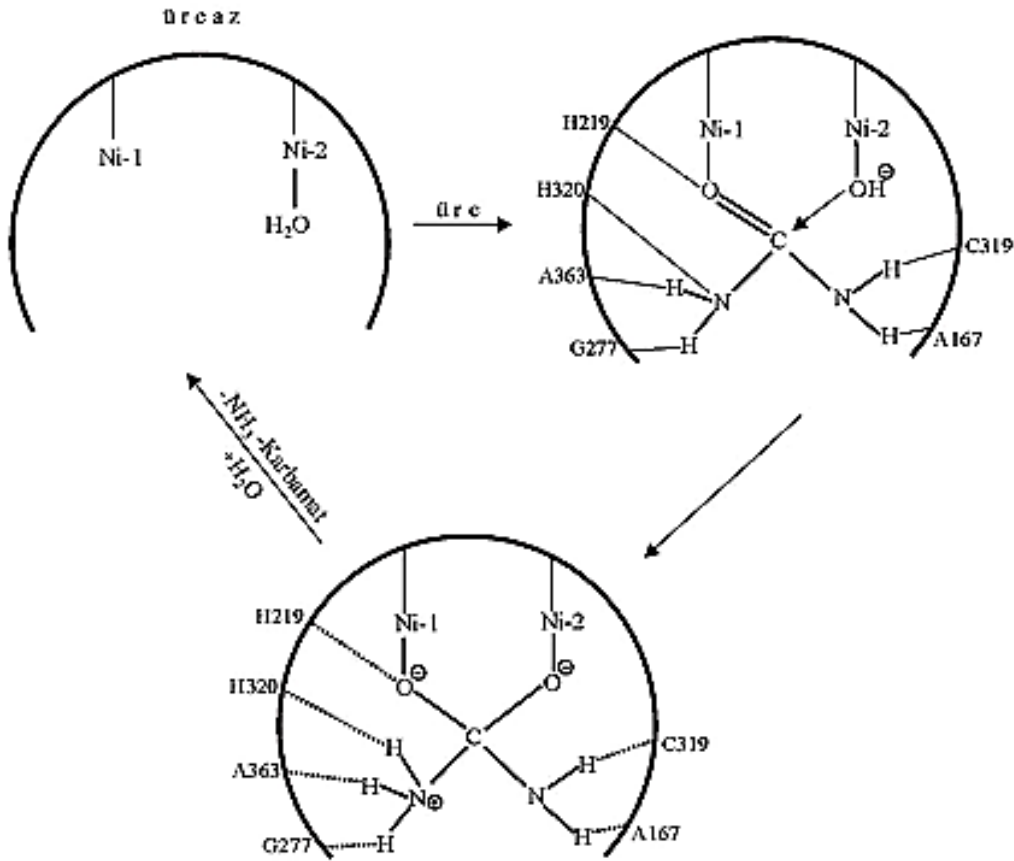
JBU, alt birimleri 91 kDa molekül ağırlığına sahip olup, altı benzer monomerik alt birimden oluşan heksamerik yapıdadır (Şekil 4) (Weber vd., 2008). Bakteriyel ürezazlar iki ya da üç polipeptid zincirinden oluşmasına rağmen JBU gibi bitki ürezazları tek bir polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Bitkisel ve bakteriyel ürezazların aminoasit sıra dizilim benzerlikleri Şekil 5'te verilmiştir. (Balasubramanian vd., 2013).



Şekil 5. a) JBU'ya göre, bakteriyel ürezaz sekanslarına karşılık gelen benzerlik yüzdeleri b) JBU ve bazı bakteriyel aminoasit dizi sıralarının karşılaştırılması (Balasubramanian vd., 2010).

Ürezazın katalizi üzerine birçok mekanizma önerilmiştir (Dixon vd., 1980; Ciurli vd., 1999). En çok kabul gören 1999'da Ciurli ve arkadaşları tarafından önerilmiş olan iki Ni<sup>2+</sup> iyonunun oynadığı farklı roller üzerine olan yaklaşımdır (Ciurli vd., 1999). Bu iyonlardan bir tanesi üreyi bağlayarak aktive ederken, diğeri nükleofil olan suyu bağlamakta ve aktive etmektedir. Bundan başka, Karplus ve arkadaşları da 1997'de (Şekil 6) KAU için detaylı bir mekanizma önermişlerdir (Karplus vd., 1997). Bu mekanizmada üre birinci nikel atomuna (Ni-1) karbonil oksijeni ile koordine olurken, ikinci nikel atomuna (Ni-2) hidrolitik su bağlanmaktadır. Bu bağlanmaların olduğu durumda ürenin dört protonu protein ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. Protonların üç tanesi oksijen atomlarına,

dördüncüsü ise hidrojen akseptörü olarak Sistein319 (Cys319) rezidüsüne hidrojen bağı ile bağlanmaktadır. Ni-2'ye bağlı olan hidroksitin OH iyonu üredeki karbonil karbonuna saldırarak tetrahedral hidrat üre yapısı oluşturmaktadır. Hidrat ürenin oluşumu esnasında üre azotu Histidin320 (His320) kalıntısı ile etkileşmekte ve His320 tarafından protonlanmaktadır. Bu protonlanma da ürenin konjuge asit değeri (pKa) -2'den yaklaşık olarak 6'ya ulaşmaktadır. Sonuç olarak azotun protonlanmasıyla tetrahedral bir merkez oluşmakta, amonyum iyonu ortamdan uzaklaşmakta ve bağlı karbamat ise enzimden disosiyate edilebilir hale gelmektedir (Karplus vd., 1997).



Şekil 6. Üreaz katalizli reaksiyon mekanizması (Karplus vd., 1997).

### 1.5.3. Klinik ve Endüstriyel Önemi

Bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen üreazlar insan ve hayvan hastalıklarının patojenezinde önemli rol oynamaktadırlar (Mobley ve Hausinger, 1989; Mobley vd.,

1995). Bu bakteri türlerinden bazıları *Proteus mirabilis* (*P. Mirabilis*), *Staphylococcus saprophiticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Ureaplasma urealiticum*'dir. Bakteri üreazları pyelonefrite, peptik ülser, gastrik kanserine, böbrek taşlarına ve başka bir çok hastalığa sebep olmaktadır (Moblely vd., 1995). Ayrıca bu üreazlar hepatolityaz, hepatik ensefalopati ve idrar yolunun tıkanmasına yol açmaktadır (Bayerdörffer ve Ottenjann, 1988; Devesa vd., 1998). En yaygın organizmalardan olan *P. mirabilis* insanlarda taş oluşumuna neden olmaktadır.

Pyelonefrit, akut veya kronik böbrek iltihaplanması olarak tanımlanmaktadır. İnsanlarda bu hastalığın başlıca sebebi *P. mirabilis* bakterisidir. Ürenin hidrolizi ile ortaya çıkan amonyağın ortamı alkalileştirmesi kısmen de olsa bu hastalıkla böbrek dokusunun nekrozu için ilişkilendirilmiştir (Stefano, 2000).

Gastrik kanseri dünyada en yaygın dördüncü kanser olup kanserle ilişkili ölümlerde dünyada ikinci sırada yer almaktadır (Howson vd., 1986; Parkin vd., 2001; Lopez-Munoz vd., 2005). Hastalığın oluşması genellikle *H. pylori* bakterisinden kaynaklanmaktadır. Bu bakteri normalde insan midesinin mukus kaplı yüzeyinde yaşamakta ve burada iltihaplanmalara sebep olmaktadır. Fakat bu bakterinin insan midesinde oluşturduğu bu rahatsızlık genellikle belirti göstermeden gelişmektedir (Marchetti vd., 1995). *H. pylorinin* yapısında bulunan üreaz enzimi, ürenin hidrolizini katalizleyerek karbondioksit ve amonyağı oluşturduğunda, midenin mukus kaplı yüzeyinde bulunan konağın direnç mekanizmalarını kırar (yani bazik bir ortam oluşturur) ve böylelikle midenin asidik yapısından kendisini korumuş olur. Ancak bu bazik ortam negatif ters etkiyi ortadan kaldırdığından, G hücrelerinden gastrin salınımını uyarmakta ve artan asit sekresyonu ile gastrit oluşumuna katkıda bulunmakta ya da direkt ve immünolojik yollar ile hasar oluşturmaktadır (Did, 1994).

Mikrobiyal üreazlar geniş getiren hayvanların azot metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadırlar. Hayvansal kaynaklı önemli miktardaki üre, kan dolaşımında difüzyonla ya da tükürükle işleme girerek geri kullanımı sağlanmaktadır. Burada gerçekleşen mikrobiyal üreolitik faaliyetle ortama amonyak yayılmakta ve onların ihtiyaçları için rumen bakteriler tarafından kullanılmaktadır. Daha sonra mikrobiyal biyo-kütle geniş getiren hayvan sindirim sistemi tarafından hayvan için azot ihtiva eden bileşiklere ayrıştırılmaktadır (Moblely ve Hausinger, 1989; Stefano, 2000).

Tarımda üre ile gübreleme sırasında topraktaki bakterilerin yüksek üreaz aktivitesi, büyük miktarda amonyağın atmosfere salınmasına neden olur ki bu da önemli çevresel ve

ekonomik problemlere yol açmaktadır (Mobley ve Hausinger, 1989; Sirko ve Brodzik, 2000). Gübredeki ürenin toprak üreazları tarafından amonyak ve karbondioksite hızlı bir şekilde hidroliz olması, pH'nın artmasına, amonyum iyonlarının birikmesine ve üre azotunun amonyak gazı olarak yok olmasıyla sonuçlanacağı gibi ortaya çıkan nitrit ve amonyak toksisitesi de genç bitkilerin, fidanların veya çimlenen tohumların zarar görmesine neden olmaktadır (Gasser, 1964; Tomlinson, 1970; Peters vd., 1988).

#### 1.5.4. İnhibitörleri ve İnhibisyonu

Yukarıda bahsi geçen durumlar, bakteriyal üreazların aktivitesinin azaltılması yönündeki çalışmaların bir gereklilik olduğuna işaret etmektedir. Bu nedenle son yıllarda üreazın inhibisyonuna yönelik birçok küçük molekül kütleli organik molekül, bilgisayar programları yardımıyla dizayn edilmiş, sentezlenmiş, üreaz aktivitesi açısından inhibitör etkinlikleri değerlendirilmiş ve hatta patentleri alınmıştır (Amtul vd., 2004).

Bu maksatla, Khan ve arkadaşları (2010) bazı yeni 1,2,4-triazol ve 1,3,4-tiyadiazol bileşikleri sentezleyerek söz konusu bileşikler üreaz inhibisyonu açısından ele almışlardır. Ayrıca, Amtul ve arkadaşları 2004'de üreaz enzimi için yarışmalı bazı yeni inhibitör moleküllerini tasarlamış, sentezlemiş ve enzimin inhibisyonu açısından (enzim kinetiği çalışmalarıyla) sentezledikleri molekülleri irdelemişlerdir.

Bunlara ek olarak fenilfosfodiamit (PPD), asetohidroksamik asit (AHA) borik asit ve florürün bakteri ve bitki üreazları inhibisyonu üzerine kinetik parametreleri hesaplanmış ve inhibisyon türlerinin, PPD, AHA ve borik asit için kompetitif, florür için ise unkompetitif olduğu rapor edilmiştir (Krajewska ve Zaborska, 2007).

*Viola betonicifolia*'dan yeni bir bileşik olarak 3-metoksidalbergion elde edilmiş ve bu bileşiğin üreaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir. Kinetik çalışmaları yapılarak üreaz enzimi üzerinde kompetitif inhibisyon yaptığı görülmüştür. Üreazın sebep olduğu hastalıklarla mücadelede kullanmak için ilaç yapımında kullanılabileceği düşünülmüştür (Muhammad vd., 2014).

Oksovanadyum (IV) kompleksleri ile aroilhidrazin ligandları sentezlenmiş ve sırasıyla aktif bölgelerinde nikel içeren *C. ensiformis* (soya fasülyesi) ve *B. pasteurii* üreazları ile vanadyum (IV)-aroilhidrazin türevlerinin inhibisyon mekanizmaları oluşturulmuştur. Bütün bileşikler için kinetik parametreler hesaplanmıştır. *C. ensiformis* üreazı için -R grupları 4-nitrobenzoilhidrazin, izonikotinoilhidrazin,

2-klorürbenzoilhidrazin, 3-klorürbenzoilhidrazin, 4-klorürbenzoilhidrazin ve 2-metoksibenzoilhidrazin olan vanadyum (IV)-aroilhidrazin kompleksleri kompetitif inhibisyon gösterirken, benzoilhidrazin, 2-nitrobenzoilhidrazin, 3-nikotinoilhidrazin, 4-metoksibenzoilhidrazin komplekslerinin nonkompetitif inhibisyon gösterdikleri rapor edilmiştir. *B. pasteurii* üreazı için -R grupları sırasıyla; benzoilhidrazin, 3-klorürbenzoilhidrazin ve 2-metoksibenzoilhidrazin olan vanadyum (IV)-aroilhidrazin komplekslerinin kompetitif inhibisyon, fakat 4-metoksibenzoilhidrazin nonkompetitif inhibisyon ve 2-nitrobenzoilhidrazin, 3-nikotinoilhidrazin, 4-izonikotinoilhidrazin, 2-klorürbenzoilhidrazin, 4-klorürbenzoilhidrazin kompleks bileşiklerinin ise unkompetitif inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir (Lodhi vd., 2015).

Bir başka çalışmada ise, 1,2,4-triazolkarboksilik asit türevi olan ve Cu, Zn ve Fe içeren yeni bileşikler sentezlenmiş ve tek kristal X-ışını diferansiyel analizine göre karakterize edilmiştir. Daha sonra *in vitro* ortamda bu moleküllerin soya fasülyesi üreazına karşı inhibitör aktiviteleri test edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerden iki tanesinin  $\text{Cu}^{2+}$  kompleksleri, üreaz inhibitörü olarak literatüre geçmiş olan asetohidroksamik asitten daha iyi inhibitör aktivitesi göstermişken  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  komplekslerinde inhibitör davranışı gözlenmemiştir. Enzim inhibisyon mekanizması için kinetik çalışmalar yürütülmüş olup bakır içeren komplekslerin karışık-kompetitif inhibitör mekanizması gösterdiği bulunmuştur (Xu vd., 2015).

Üreaz inhibitörleri iki alt sınıfa ayrılmaktadır.

- İnhibitor olarak davranan substratlar: Hidroksiüre ve hidroksamik asit türevleri
- İnhibitörler: Fosfordiamidazlar ve proton pompası inhibitörleri olan Lansaprazol, Omeprazol, Rabeprazol gibi imidazoller

Bu alt sınıflar dışında da diüretik özellik gösteren bazı ilaçlar bulunmaktadır. Bu ilaçlara örnek olarak fenofibrat verilebilmektedir. Üreaz aktivitesini etkilediği bilinen diğer inhibitörler arasında ağır metal iyonları da sayılmaktadır (Dinç, 2009).

Bizmut bileşikleri, uzun zamandan beri tüm dünyada dispepsi, diyare ve peptik ülser hastalıklarında tedavi edici etken olarak kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda *H. pylori*'nin oluşturduğu bakteriyel etkilere karşı birçok bizmut bileşiklerinin etkili olduğu gösterilmektedir (Zhang vd., 2006).

### 1.5.5. Üreazın Uygulama Alanları

#### 1.5.5.1. Üre Konsantrasyonunun Analizi

Ürenin medikal, biyolojik, biyoendüstriyel ve çevresel sıvılardaki analizleri son derece önemlidir. Üreaz, ürenin hidrolizini katalizleyerek reaksiyon sonucu amonyak ve karbondioksit açığa çıkmasını sağlamaktadır. Oluşan bu ürünler pH değişimlerine, reaksiyon çözeltilisindeki iyonik bileşimin ve sıcaklığın değişmesine sebep olmaktadır. Bu tür enzimatik reaksiyonlardan kaynaklanan değişimleri tayin etmek için birçok üre tayin yöntemi geliştirilmiştir.

Çözünebilir durumdaki enzimin her zaman stabil olmaması ve fazla miktarda kullanılması modern enzimatik analiz yöntemlerinin immobilize üreaz üzerinden yapılmasına sebep olmuştur. Immobilize üreazın kullanılmasıyla gerçekleşen analitik tayin yöntemleri potansiyometrik ( $\text{NH}_4^+$  veya  $\text{CO}_2$  gaz seçici elektrotlar,  $\text{NH}_4^+$  iyonuna duyarlı elektrotlar, pH elektrotları saha etkili transistörler), amperometrik, kondüktümetrik, optik, kalorimetrik, akustik, spektrofotometrik, ve iyon değişim likid kromatografisi şeklinde sıralanmaktadır.

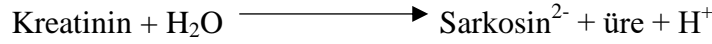
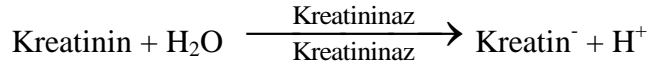
Üre biyosensörleri, kan serumunda, idrarda, suda, atık sularda, besinlerde ve alkollü içeceklerde üre konsantrasyonunu tayin etmede kullanılmaktadır (Rajesh vd., 2005). Ayrıca, üreazın biyokatalizör olarak üre biyosensörlerinde kullanımının geliştirilmesi biyokimya ve klinik analizcilerin ilgisini çekmeye devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda genel bir prensip olarak immobilize üreaz ile membran yüzeyi kaplanarak oluşturulan biyosensörlerde ürenin amonyum ve bikarbonata dönüştürülerek ürün miktarı gözlenilmektedir (Singhal vd., 2002).

#### 1.5.5.2. Kreatinin Analizi

Kreatinin kan testi böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Kan üre azotu (BUN) testi ve kreatinin testi genelde beraber yapılmaktadır. Kreatinin testi, kandaki mevcut kreatinin seviyesini saptamaktadır. Bu test aynı zamanda böbreklerin doğru çalışıp çalışmadığını da belirlemekte ve yüksek kreatinin seviyesi böbrek fonksiyonlarının zayıfladığını gösterebilmektedir. Kreatininaz, kreatinaz ve üreazı içeren üçlü enzim sistemi, üreaz ve L-aspariginaz gibi enzimler, kreatin, üre ve L-asparagin'in

belirlenmesinde kullanılmaktadır. Uygun enzim immobilizasyon sisteminin dikkatli seçilimi kullanılan cihazın cevap verme süresini saniyelere indirgemesine yol açar. Bu hızlı cevap süresi, akış sisteminde ürenin sürekli ölçümünü sağlayan üreaz modifiyeli cihazın birleşmesiyle bir akış hücresinin yapımına olanak sağlamaktadır.

Kreatinin kondüktümetrik tayini aşağıdaki reaksiyona göre gerçekleştirilmektedir (Şekil 7):



Şekil 7. Kreatinin Kreatinaz enzimi ile hidrolizi

Bu amaçla kullanılan kondüktümetrik biosensörlerler, derişimi 1-50 mM arasında değişen kreatini tayin etmede kullanılmaktadır (Cullen vd., 1990).

### 1.5.5.3. *L*-arginin Analizi

*L*-arginin büyüme ve azot döngüsünün sürekliliği için gerekli olan temel amino asitlerden biridir. *L*-arginin tıpta, endokrin hastalıkların tedavisinde ve bazı klinik terapilerde ilaç olarak kullanılmaktadır. Arginaz *L*-argininin ornitin ve üreye hidrolizini katalizlemektedir. *L*-arginin bunun sonucunda önemli bir üre kaynağı haline dönüşmektedir. Oluşan üre üreaz varlığında karbondioksit ve amonyağa dönüştürülmektedir. Bu analizde amonyağa dönüşen üre, indofenol mavisi oluşumu nedeniyle 629 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Bu nedenle, *L*-arginin tayini hem biyolojik prosesler hem de besin endüstrisi açısından önemlidir (Alonso vd., 1995).

### 1.5.5.4. İmmünoglobülin G (IgG) Ölçümleri

Bu tayinlerde parlak sarı ince selüloz asetat diyaliz membranı kullanan optik bir fiber sensör, pH sensörü gibi geliştirilmiştir. Bu sistem hızlı absorbans ölçümleri için tasarlanmış olup ticari amaçla geliştirilmiştir. Burada kullanılan selüloz asetat membranı

uygun başka bir membranla kaplanıp özel metabolit tayinleri için de kullanılabilir. Üreazın bu membranlara immobilize edilip 0,1-10 mM konsantrasyon aralığındaki üre tayinleri için kullanımı söz konusudur. Eğer üreaz kovalent bağ yerine immünokimyasal reaksiyon ile membran yüzeyine immobilize edilirse, bu biyosensör immünosensör şeklini almakta ve IgG tayinleri için kullanılmaktadır. Tayin edilebilen en düşük IgG miktarı 0,1 mg/mL'dir. Bu sistem hücre akışını ve absorbans ölçümünü hızlı analiz etmek için ticari olarak temin edilebilen aletlerin kullanılmasını kolaylaştırmaktadır (Sansubirino ve Mascini, 1994).

#### **1.5.5.5. Ağır Metal İyonları ve Diğer Kirleticilerin Analizi**

Üreazın kullanım alanlarından biri de ağır metal iyonlarının tayinidir. Bu metodun prensibi, üreaz aktivitesi üzerine ağır metal iyonlarının güçlü bir inhibitör etkisine sahip olmalarıdır. Örneğin; enzim aktivitesi inhibisyonuna bağlı olarak Hg (II) izlerinin belirlenmesi için otomatikleştirilmiş bir yöntem önerilmektedir. Bu yöntemde göre gözenekli cam üzerine immobilize edilen üreaz enzimi için akış enjeksiyon (FI) konfigürasyon yaklaşımı kullanılmaktadır (Bryce vd., 1994). Ayrıca, içme ve yer altı sularında, atık sularda ve toprak ekstraktlarındaki ağır metal iyonların tayinlerinde bu yöntem kullanılmaktadır (Winquist vd., 1988; Bryce vd., 1994; Preininger, 1999; Wittkindt vd., 1996).

#### **1.5.5.6. Böbrek Rahatsızlıklarında Ürenin Üreaz ile Uzaklaştırılması**

Üre, vücut tarafından sentez edilen önemli bir azotlu bileşik olup özellikle böbrek rahatsızlıklarında vücuttan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaca hizmet eden en etkili faktör üreazdır. Bununla ilgili ilk çalışmalar 1964'de Chang ve arkadaşları tarafından başlatılmış ve üreaz içeren yapay hücrelerin *in vivo* ortamda etkili bir biçimde vücut sıvılarındaki üreyi amonyuma dönüştürdüğü gözlemlenmiştir (Chang, 1964). Amonyum iyonlarının kandaki değeri  $10^{-4}$  M ve üzerinde olması durumunda insan sağlığı için sakıncalı bir durum oluşturmaktadır. Bu nedenle diyalizat rejenerasyon sistemlerinde üreazın kullanılması etkili bir amonyum uzaklaştırıcı prostestir. Üreazın üreyi amonyuma dönüştüren mikroenkapsülasyon reaktifi olarak kullanılması ile oluşan bu ürün yapay



hücrelerde uygulanmış ve gösterilmiştir. (Chang, 1964; Chang, 1966). Portatif yapay böbrekte üreaz üreyi amonyuma dönüştürür ve zirkonyum fosfat - zirkonyum oksid iyon değişim sistemi ile diyalizattaki amonyumu uzaklaştırır. Bu sistem 1973'ten beri ticari olarak uygulanmaktadır (Gordon, vd., 1969; Prakash, 1995; Patzer, 1995).

Bir başka yaklaşım da üre ve amonyumu esansiyel aminoasitlere dönüştüren multienzim enkapsülasyonu üzerine olanıdır. Glutamat dehidrojenaz ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz içeren yapay hücrede, üre, üreaz aktivitesi sonucu amonyağa ve  $\alpha$ -ketoglutarat ise NADPH varlığında *L*-glutamik aside dönüşür. Sistemde glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi, NADPH koenziminin rejenerasyonu amacıyla kullanılmaktadır (Cousineau ve Chang, 1977).

Bir diğer model çalışmada yapay hücre, üreaz glutamat dehidrojenaz ve glukoz dehidrojenaz içermektedir (Chang ve Malouf, 1979). Bu sistemde NADPH koenziminin rejenerasyonu glukoz dehidrojenaz katalizi ile glukozun, glukonata dönüşümü ile sağlanır. Ayrıca *L*-alanine dönüşümün sağlandığı model çalışmalar da geliştirilmiştir (Chang, 1979). Gerek ürenin *L*-glutamata gerekse *L*-alanine dönüşüm sistemlerinde oluşan amino asitler esansiyel değildirler. Üreaz içeren enzim sistemlerinin kullanılabilirliğini cazip kılmak amacıyla esansiyel aminoasitlere dönüşümün sağlandığı model çalışmalar da yapılmaktadır.

Üreaz, lösin dehidrojenaz, glukoz dehidrojenaz ve dekstran-NAD<sup>+</sup> içeren model çalışmada üre, esansiyel olan *L*-lösin, *L*-valin ya da *L*-izolösine dönüştürülmektedir (Chang, 1979; Gu ve Chang, 1989). Sistemdeki *D*-glukoz, dekstran-NADH rejenerasyon reaksiyonunda kosubstrat olarak etki etmektedir. Ayrıca alkol dehidrojenazın kullanıldığı çalışma literatürde de yer almaktadır (Gu ve Chang, 1988). Bu çoklu enzim sistemlerini kullanan modeller son derece pahalı olmaları nedeniyle kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Ayrıca bu güne kadar kana doğrudan verilebilen, üreaz içeren enzim sistemlerine literatürde rastlanmamaktadır.

#### **1.5.5.7. Alkollü İçeceklerde Ürenin Asit Üreaz ile Uzaklaştırılması**

Şaraplarda bulunan üre, depolanma esnasında karsinojenik etkisi iyi bilinen etil karbamatin öncü maddesidir (Gu ve Chang, 1990). Şarap gibi alkollü içeceklerin pH'sı 3,2-4,0 aralığında olduğundan ürenin uzaklaştırılması gibi işlemlerde asit üreazı kullanılmaktadır (Matsumoto, 1993). Asit üreazı ilk defa sıçan gastrointestinal sisteminde

bulunan *Lactobacillus* bakterisinde keşfedilmiş, daha sonraları ise *Streptococcus*, *Escherichia*, *Morganella* ve *Bifidobacterium* gibi farklı cins mikroorganizmalarda da bulunmuştur (Ough ve Trioli, 1988; Kakimoto vd., 1990).

Ürenin alkollü içeceklerden asit üreaz ile uzaklaştırılması Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Japonya'da endüstrileşmiş olup, şarap ve pirinçten elde edilen Japon rakılarında (saka) yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak işlemin bazı sakıncaları bulunmaktadır. Enzim kullanıldığında büyük miktarlara ihtiyaç duyulduğundan ekonomik olmamakta, uygulama işlemi genellikle uzun sürmekte (7-30 gün), sürekli bir uygulamaya izin verilmemektedir.

## **1.6. Üreaz Aktivitesi Tayin Yöntemleri**

### **1.6.1. Nessler Yöntemi**

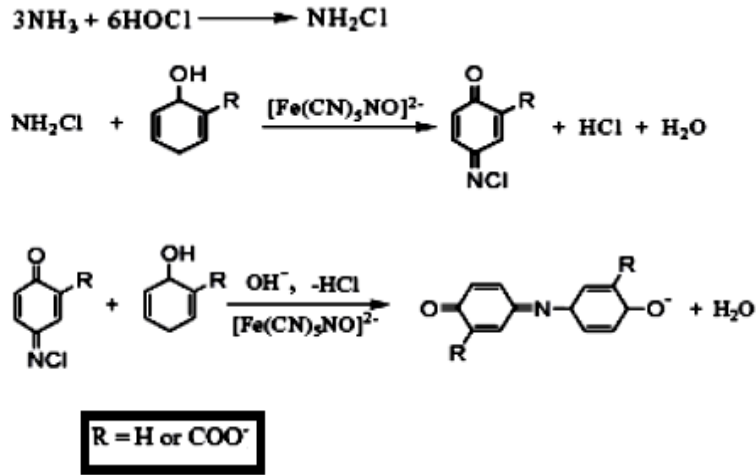
Nessler reaktifi çözelti içindeki düşük miktardaki amonyak tayininde kullanılmaktadır. Bu reaktif ilk kez 1856'da Julis Nessler tarafından önerilmiş fakat günümüzde bazı değişmelere uğramıştır (Nichols ve Willits, 1934). Çözeltilerde oluşan sarı renk, amonyak varlığını gösterirken yüksek amonyak dönüşümlerinde ise kahverengi çökelek oluşmaktadır. Reaktif, sulu potasyum iyodür ve potasyum hidroksit içinde civa (II) iyodürün yaklaşık %1,4'lük çözeltisinden oluşmaktadır ( $K_2HgI_4$ ). Üreazın üre ile enzimatik reaksiyonu sonucunda oluşan  $NH_3$  Nessler belirteci ile açık sarı koyu turuncu arasında renk oluşturmakta, oluşan bu renk de spektrofotometrik olarak tayin edilmektedir.

### **1.6.2. Çift Enzim Yöntemi**

Hastalık teşhisi için yapılan tetkiklerde en çok kullanılan spektrofotometrik yöntem çift enzim yöntemidir. Bir enzimatik tayinde substrat veya ürün ölçülebilir bir özelliğe sahip değilse, ikinci bir enzim kullanılarak ölçülebilir bir büyüklük elde edilmeye çalışılmaktadır. Örneğin; birinci enzim olan üreazın ürünü amonyak ve karbondioksit olup spektrofotometrik olarak ölçülememektedir. Bunu takip eden ikinci enzimatik reaksiyonda glutamat dehidrogenaz enzimi NADH'ı koenzim olarak kullanılmaktadır. Reaksiyon 340 nm'de takip edilerek tayin yapılmaktadır.

### 1.6.3. Weatherburn Yöntemi

Weatherburn tarafından geliştirilmiş olan ve halen en yaygın olarak kullanılan amonyak tayin metodlarından birisidir (Weatherburn, 1967). Üreaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, üreazın üreden belli koşullarda birim zamanda oluşturduğu amonyak miktarı dikkate alınmıştır. Üreazın, üre ile enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan  $\text{NH}_3$  sodyum hipokloritli ortamda ve sodyum nitroprosit eşliğinde fenol ile tepkimeye girerek mavi renkli bir çözelti oluşturmaktadır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak 625 nm'de ölçülmektedir.



Şekil 8. İndofenol oluşum mekanizması

### 1.7. Enzim İnhibisyon Çalışmalarında Yaklaşım ve Stratejiler

Enzimolojinin bugün geldiği noktada dahi enzim aktivitesinin detaylı mekanizması ve aktivite-yapı ilişkisiyle ilgili temel sorular hala bulunmaktadır. Modern zamanda bu sorulara çözüm getirecek olan en önemli iki gereçten birisi protein yapısının biyofiziksel problemlerinin kullanımı ve sürekli gelişimi, diğeri ise enzimolojide moleküler biyoloji metodlarının uygulanmasıdır. X-ışını kristalografisi, enzim ve enzim-ligand kompleksinin yapı aydınlatmasında rutin olarak kullanılmaya devam edilmektedir. Buna ilave olarak, yeni NMR metodları ve magnetizasyon transfer metodları sırasıyla, çözeltilerdeki küçük enzim moleküllerinin üç boyutlu yapılarının ve enzime bağlı ligandların yapısının değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır (Copeland, 2000).

Sinkrotron radyasyon kaynaklarıyla Laue difraksiyonunun uygulaması enzim katalizi boyunca reaksiyon ara ürünlerinin yapısı ve kataliz sırasında özel basamakların resmi hakkında bu alanla ilgilenen bilim adamlarına fırsatlar sunmaktadır ki bu da enzim aktif bölgesindeki katalitik ve bağlanma grupları hakkında araştırmacılara bilgiler vermektedir. Uv-vis, ve floresans optik spektroskopisi teknikleri ile infrared ve raman vibrasyonel spektroskopisi teknikleri gibi diğer biyofiziksel yöntemlerde çözeltide enzim yapısı ve reaktivitesi gibi sorulara cevap bulmak için uygulanan teknikler arasındadır (Copeland, 2000).

Günümüzde inhibisyona neden olduğu bilinen inhibitörlerin bir kısmı enzim yapısının belirlenmesinde başvurulan biyofiziksel yöntemlerle birlikte klasik farmakolojinin enzim yapısı temelli ilaç tasarımında akılcı yaklaşımların kombine kullanılması sonucu doğmuştur. Bu yaklaşım, enzimin aktif bölgesinin topolojisini belirlemek için X-ışını kristalografisi ya da NMR spektroskopisi tekniklerinden elde edilen yapısal bilgileri kullanmaktadır. Daha sonra bu bilgiler kullanılarak aktif bölge cebine uygun olabilecek molekülleri tasarlamak üzere model yapılar oluşturulmaktadır. Tasarlanan moleküller sentezlenerek inhibitör olarak test edilmektedir. Bu çalışmaların defalarca tekrarlanmasıyla oluşturulan süreçler hedef enzimlerin potansiyel inhibitörlerini keşfetmeye öncülük etmektedir. Günümüzde hastalıklarla ilişkili birçok enzim keşfedilmiş ve karakterize edilmiştir. Bunların aktivitelerini önlemek için de yeni inhibitör moleküllerinin tasarlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır ki insanlığın henüz karşılanmamış klinik ihtiyaçlarını gidermek için de çalışmalar devam etmektedir (Copeland, 2000).

İster klinik odaklı kaygılar, isterse endüstriyel süreçlerin güvenliği açısından olsun spesifik enzimlerin inhibitörlerini tanımlamak üzere yapılan modern girişimler çoğunlukla, inhibitör moleküllerinin enzime iyi bağlanmasına olanak sağlayacak stereokimyasal ve fizikokimyasal özelliklerinin izah edilmesine odaklanmıştır (Suckling, 1991).  $K_i$  ya da  $IC_{50}$  gibi inhibitör potansiyeli ifadeleri, inhibitörün çözünmüş sulu halden enzimin bağlanma bölgesindeki bağlı haline geçişine eşlik eden serbest enerjideki değişimi yansıtmaktadır.

Substrat ve enzim molekülünün şekil ve topolojisi, inhibitör molekülü ve enzim bağlanma bölgesinin yapısal uygunluğunun belirlenmesinde ve dolayısıyla substratın enzimin bağlanma bölgesine bağlanıp bağlanamayacağını tespitinde önemlidir. Substrat bağlanmasının, şeklinin ve topolojisinden sağlanan bilgiler yardımıyla empirik olarak nasıl bir inhibitörün enzimin bağlanma cebine bağlanacağı tahmin edilebilmektedir. Böylece, herhangi bir enzim için potansiyel bir inhibitörün ortaya konulmuş olması, bu inhibitör

molekölünün yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinde değişikliğe neden olabilecek türevlendirmeler yapılarak söz konusu yeni molekülün inhibisyon potansiyelindeki değişimlerin incelenbilmesinin önünü açmaktadır.

Yapısal değişmelerle inhibisyon etkinliğindeki değişikliklerin değerlendirilmesi yapı-aktivite ilişkisi (SAR) çalışmaları olarak bilinmektedir. Günümüzde SAR çalışmaları iki ana stratejik kategoriye ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi hedef enzim hakkında yapısal bilginin bulunmadığı SAR çalışmaları ve diğeri ise X-ışını kristalografisi ya da çok yönlü NMR çalışmalarından elde edilen enzim hakkındaki yapısal bilgilerin kullanıldığı SAR çalışmalarıdır. İkinci strateji, yapı temelli inhibitör dizaynı olarak bilinmektedir (Copeland, 2000).

### **1.8. Çalışmanın Amacı ve Önemi**

Bu çalışma kapsamında KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı araştırmacıları tarafından yeni sentezlenmiş olan bazı organik moleküllerin (triazol türevi bileşikler) klinik ve endüstriyel öneme sahip üreaz için inhibisyon potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Enzimin ve organik moleküllerin üç boyutlu yapılarını ortaya koyan yöntemlerle birlikte bu organik moleküllerin bağlanma bölgelerine uygunluğunu tespit etmede kullanılan modelleme yöntemlerinin kombine kullanılması yeni ilaç moleküllerinin tasarlanması veya sentezlenmiş moleküllerinin ilaç potansiyellerinin ortaya konulması açısından son derece önemlidir. Bu teorik aşamalarla birlikte söz konusu organik moleküllerin hedef enzimlerin inhibisyonu üzerine etkisinin biyokimyasal açıdan incelenmesi bu tür çalışmaları arzu edilen sonuca ulaştırmaktadır. Böylelikle bazı yeni organik moleküller henüz ele alınmadığı boyutuyla incelenerek alternatif ilaç molekülleri olarak farmasötik kimya ve endüstrinin değişik alanlarında kullanılmak üzere biyoteknoloji pazarına sunulmasının yolu açılacaktır. Aynı zamanda endüstride enzim kullanımının yaygınlaştırılması da sağlanabilecektir.

Bütün bu hususlar dikkate alındığında çalışmadaki temel amaçlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. Ticari olarak satın alınan üreazın biyokimyasal karakterizasyonu yapılarak optimum çalışma şartlarının (pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu) tespit edilmesi ve enzime ait kinetik büyüklüklerin ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) belirlenmesi,
2. Bu şartlar altında ve incelenen organik moleküllerin (triazol türevi bileşikler) reaksiyon karışımında mevcudiyetinde deneysel kinetik çalışmalar tekrarlanarak organik moleküllerin herhangi bir inhibisyona sebep olup olmadığının belirlenmesi ve eğer bir inhibisyon söz konusu ise incelenen moleküller için  $IC_{50}$  ve/veya  $K_i$  değerlerinin belirlenmesi,
3. İnhibisyona uğrayan üreazın en efektif inhibitör molekülü mevcudiyetinde ne tür bir inhibisyona uğradığının belirlenmesi,
4. Çalışılan moleküllerin ve üreazın üç boyutlu yapıları in siliko ortamda ortaya konulması,
5. Söz konusu organik moleküllerin, moleküler modelleme çalışmalarıyla, üreaza ne derece bağlanacağına enerji hesaplamalarıyla ortaya konulması ve böylece deneysel çalışmalarla teorik çalışmaların birlikte değerlendirilmesi,
6. Yüksek derecede inhibisyona neden olan organik moleküllerin alternatif ilaç molekülleri olarak farmasötik kimya ve endüstrinin değişik alanlarında kullanılmak üzere biyoteknoloji pazarına kazandırılması,
7. Bazı organik moleküllerin henüz ele alınmadığı boyutuyla incelenmesi, bu sayede söz konusu alanda yeni bilim insanlarının yetişmesine olanak sağlanması ve buradan kazanılan birikimlerle yeni kapsamlı ve multidisipliner projelerin hazırlanmasıdır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Materyaller

#### 2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3 de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan gereçler

Cihaz	Marka / Model
Hava banyolu çalkalayıcı	IKA, KS 4000 i Shaker
pH Metre	InoLab, WTW pH 720
Vorteks	Thermolyne, Type 37600 Mixer
Saf su cihazı	Sartorius, Arium 611UV
Isıtıcı	HS31, Chiltren
Spektrofotometre	Perkin Elmer, Lambda 25
Buzdolabı	Profilo, BD4303ANFE
Terazi	Ohaus, Pioneer
Magnetik karıştırıcı	HS31, Chiltren
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Acura 825, Socorex
Su banyosu	Memmert
Çeşitli cam malzemeler	Isolab
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/Lab-Line, MaxQ Mini 4450 Shaker
Güç Kaynağı	Thermo, EC 1000XL

### 2.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 4’te sunulmaktadır.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan enzim ve kimyasallar

Enzimler / Kimyasallar	Satın alındığı firma / Kodu
Üreaz (Jack Bean)	Sigma, 94280
Üre	Sigma, U5378
Tiyöüre	Sigma, T8656
di-Potasyum Hidrojen Fosfat	Merck, 1.05101.1000
Potasyum di-Hidrojen Fosfat	Merck, 1.04873.1000
Sodyum Hidroksit	Sigma, 06203
Fenol	Sigma, P1037
Sodyum Hipoklorit Çözeltisi	Sigma, 425044
Sodyum Nitroprussid	Sigma, PHR1423
Etanol	Sigma, 32221
DMSO	Sigma, S0481
Glisin	AppliChem, A3707

### 2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

#### 2.1.3.1. Tampon Çözeltiler

- Fosfat Tamponu (50 mM, pH 6,0): 0,05 g dipotasyum hidrojen fosfat ile 0,64 g potasyum dihidrojen fosfat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH’sı 1 N NaOH ile 6,0’a ayarlandı ve hacmi 100 mL’ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (50 mM, pH 6,5): 0,14 g dipotasyum hidrojen fosfat ile 0,57 g potasyum dihidrojen fosfat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH’sı 1 N NaOH ile 6,5’a ayarlandı ve hacmi 100 mL’ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7,0): 0,33 g dipotasyum hidrojen fosfat ile 0,42 g potasyum dihidrojen fosfat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH’sı 1 N NaOH ile 7,0’a ayarlandı ve hacmi 100 mL’ye tamamlandı.



- Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7,5): 0,29 g dipotasyum hidrojen fosfat ile 0,45 g potasyum dihidrojen fosfat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,187 g glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 8,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,3799 g glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 9,0'e ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

### 2.1.3.2. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler

- Fenol Reaktifi: 1 g Fenol, 50 mg sodyum nitroprusside saf suyla 100 mL'ye tamamlanarak taze kullanılmak üzere hazırlandı ve renkli bir şişede buzdolabında saklandı.
- Alkali Reaktifi: 0,5 g NaOH, 840 µL hipoklorit (%5'lik) saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve renkli bir şişede buzdolabında muhafaza edildi.
- Üre Çözeltisi (10 mM, stok): 6 mg üre tartılıp saf su ile biraz ısıtılarak çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Gerektiğinde taze olarak hazırlandı.
- Üreaz Çözeltisi (3 mg/mL, stok): 3 mg üreaz tartılıp 1 mL 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,5) çözüldü. Gerektiğinde taze olarak hazırlandı.
- Tiyoüre Çözeltisi (0,2 M, stok): 0,15 g tiyoüre tartılıp fosfat tamponunda (50 mM, pH 7,5) çözüldü ve son hacim tampon ile 10 mL'ye tamamlandı.

### 2.1.3.3. Çalışmada Kullanılan İnhibitör Moleküller

Çalışmada kullanılan organik moleküller Tablo 5'de sunulmaktadır.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan inhibitör moleküller

Kodu	Adlandırması	Formülü	Molekül Ağırlığı
<b>B16</b>	4-Metil-2-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-5-{{[3-(4-klorofenil)-5-(4-metoksibenzil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]metil}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion		539,00 g/mol
<b>B17</b>	4-Metil-2-[(4-fenilpiperazin-1-il)metil]-5-{{[3-(4-klorofenil)-5-(4-metoksibenzil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]metil}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion		603,47 g/mol
<b>B18</b>	4-(4-Klorofenil)-2-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-5-{{[3-(4-klorofenil)-5-(4-metoksibenzil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]metil}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion		601,46 g/mol
<b>B19</b>	4-Fenil-2-[(4-fenilpiperazin-1-il)metil]-5-{{[3-(4-klorofenil)-5-(4-metoksibenzil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]metil}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion		685,50 g/mol
<b>B20</b>	4-Fenil-2-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-5-{{[3-(4-klorofenil)-5-(4-metoksibenzil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]metil}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion		637,26 g/mol
<b>B21</b>	4-(4-Klorofenil)-2-[(4-fenilpiperazin-1-il)metil]-5-{{[3-(4-klorofenil)-5-(4-metoksibenzil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]metil}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion		699,18 g/mol

## **2.2. Aktivitenin Optimizasyonu ve İnhibisyon Çalışmaları**

### **2.2.1. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Üreaz aktivitesi, Weaterherburn yöntemi kullanılarak açığa çıkan amonyağın miktarının belirlenmesiyle tayin edildi (Weathernburn, 1967). 4 µL üre çözeltisi üzerine 40 µL üreaz çözeltisi ve 1 µL tampon ilave edilerek reaksiyon karışımı hava banyolu çalkalayıcıda 35 °C'de 80 rpm'de 15 dakika inkübe edildi. Bu karışıma 750 µL fenol reaktifi eklendi ve hızlıca çalkalandı. Üzerine 750 µL alkali reaktifi ekledi ve yine hızlıca çalkalandı. Hava banyolu çalkalayıcıda 35 °C'de 120 rpm'de 15 dakika inkübe edildikten sonra karışım küvete alınarak 625 nm'de köre karşı absorbans okundu. Açığa çıkan amonyağın miktarı önceden hazırlanan kalibrasyon grafiği yardımıyla belirlendi. Bir ünite enzim aktivitesi 1 mL reaksiyon karışımında reaksiyon şartlarında 1 dakikada açığa çıkan 1 µmol amonyak miktarı olarak hesaplandı (Amtul vd., 2004).

### **2.2.2. Enzim Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi**

Üreaz enziminin karakterizasyon ve inhibisyon çalışmalarında reaksiyon ortamında bulunması gereken konsantrasyonunu belirlemek için üre substratı varlığında (0.88 mM nihai) oda sıcaklığında (henüz optimum sıcaklık belirlenmediğinden) ve pH 7,5'da (50 mM fosfat tamponu) nihai enzim konsantrasyonu 0,05-1 mg/mL aralığında olacak şekilde bir seri aktivite ölçümü 2.2.1'de bahsedildiği gibi yapıldı. Hesaplanan enzim aktiviteleri enzim konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi ve bundan sonraki çalışmalar bu grafikten belirlenen ve ilk hız ölçümlerinin doğru bir şekilde yapılabileceği uygun bir enzim konsantrasyonunda gerçekleştirildi.

### **2.2.3. Substrat Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi**

Üreaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için, sabit enzim konsantrasyonu (0,10 mg/mL nihai), sıcaklık (henüz optimum sıcaklık belirlenmediğinden oda sıcaklığında çalışılmıştır) ve pH 7,5 (50 mM fosfat tamponu) değerinde değişen substrat konsantrasyonları için (0,09-8,90 mM nihai üre) bir seri

reaksiyon karışımı hazırlanarak enzim aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934).

#### **2.2.4. Sıcaklığın Aktivite Üzerine Etkisi**

Üreazın optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için önceden belirlenen enzim ve substrat konsantrasyonlarında (üreaz 0,10 mg/mL ve üre 0,88 mM nihai) ve pH 7,5 (50 mM fosfat tamponu) değerinde 20-55 °C sıcaklık aralığında bir seri reaksiyon karışımları hazırlanarak 2.2.1'de anlatıldığı şekilde enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlar kullanılarak sıcaklığa karşı % Bağıl Aktivite grafikleri çizildi ve optimum sıcaklık değerleri bulundu. Bundan sonraki çalışmalarda belirlenen optimum sıcaklık değeri kullanılmıştır.

#### **2.2.5. pH'nın Aktivite Üzerine Etkisi**

Üreazın optimum pH değerinin belirlenmesi için önceden belirlenen enzim ve substrat konsantrasyonlarında (üreaz 0,10 mg/mL ve üre 0,88 mM nihai) ve optimum sıcaklık değerinde (35 °C) üreaz için 50 mM fosfat tamponu pH 6,0- 7,5 ve 50 mM glisin-NaOH tamponu pH 8,0 ve 9,0 değerlerinde hazırlanan bir seri reaksiyon karışımı için 2.2.1'de anlatıldığı şekilde enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlar kullanılarak pH'ya karşı % Bağıl Aktivite grafikleri çizildi ve optimum pH değerleri bulundu. Bundan sonraki çalışmalarda belirlenen optimum pH değeri kullanılmıştır.

#### **2.2.6. Reaksiyon Süresinin Aktivite Üzerine Etkisi**

Üreazın optimum reaksiyon süresinin belirlenmesi için önceden belirlenen enzim ve substrat konsantrasyonlarında (üreaz 0,10 mg/mL ve üre 0,88 mM nihai), optimum sıcaklık (35 °C) ve optimum pH 7,5 (50 mM fosfat tamponu) hazırlanan bir seri reaksiyon karışımı için 2.2.1'de anlatıldığı şekilde enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlar kullanılarak reaksiyon süresine karşı % Bağıl Aktivite grafikleri çizildi ve optimum

reaksiyon süresi bulundu. Bundan sonraki çalışmalarda belirlenen optimum reaksiyon süresi değeri kullanılmıştır.

### 2.2.7. Organik Moleküllerin Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üreaz için yukarıda belirtildiği şekilde aktivite optimizasyonu sağlandıktan sonra Tablo 5'te verilen organik moleküllerin inhibisyon potansiyelleri incelendi. İnhibisyon çalışmalarında kullanılacak olan inhibitör molekülleri belirlenirken bu moleküllerin yapısı ve üreazın aktif bölgesinin kimyası göz önünde bulunduruldu. Buna ilave olarak, üreazın substratının ve literatürde söz konusu enzim için önceden bilinen inhibitörlerin yapısı ile incelenecek organik moleküllerin yapısal benzerlikleri dikkate alındı. Ayrıca, organik moleküllerin organik çözücülerdeki çözünürlükleri ve çözücünün inhibisyon etkisi, hangi organik molekülün çalışmada kullanılacağına belirlenmesinde etkili oldu. Bu değerlendirmeler sonucunda başlanılan inhibisyon çalışmaları için organik moleküllerin uygun çözücüde (etanol ve DMSO-etanol) farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinden reaksiyon karışımına eklenerek öncelikle inhibitörün enzimle ön inkübasyonu sağlandı (Amtul vd., 2002; Zaborska vd., 2015). Ancak her durumda da organik çözücünün reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonu %0,1-1 olacak şekilde ayarlandı (Copeland, 2005). Yapılan aktivite çalışmaları sonucunda inhibitör konsantrasyonları % Bağıl Aktiviteye karşı grafiğe geçirildi ve denenen her bir inhibitör molekülüne ait  $IC_{50}$  değerleri belirlenmeye çalışıldı. Daha sonra  $IC_{50}$  değeri belirlenebilen ve/veya  $IC_{50}$  değeri en düşük bulunan inhibitör molekülü mevcudiyetinde (genel yaklaşım olarak %10-%75 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyon aralığı ve  $0,2-5,0K_m$  substrat konsantrasyonu aralığı seçilerek) inhibisyonun türü (inhibitörlü ve inhibitörsüz ortamlarda elde edilen  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri karşılaştırılarak) ve  $K_i$  değerleri tespit edilmeye çalışıldı. Bu çalışmalar yukarıdaki çalışmalarla belirlenen enzim konsantrasyonunda ve optimum sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleştirildi.

Üreaz inhibisyonu çalışmaları için Tablo 5'te verilen organik moleküllerden B16-B21 molekülleri kullanıldı. Üreaz inhibisyonunu incelemek için literatürde belirtildiği gibi öncelikle enzimle çalışılacak organik molekülün ön inkübasyonu sağlandı (Amtul vd., 2002). Bunun için 1  $\mu$ L inhibitör çözeltisi (B16: 0-500  $\mu$ M, B17: 0-150  $\mu$ M, B18: 0-100  $\mu$ M, B19: 0-110  $\mu$ M, B20: 0-500  $\mu$ M ve B21: 0-120  $\mu$ M nihai konsantrasyon aralığında) ile 40  $\mu$ L üreaz çözeltisi karıştırılarak 10 dakika ön inkübasyon yapıldı. Daha

sonra 2.2.1’de anlatıldığı şekilde ürenin ortama konulmasını takiben bir seri aktivite tayini gerçekleştirildi. Kontrol denemede reaksiyon karışımına 1  $\mu\text{L}$  inhibitör çözücüsü katıldı. Elde edilen sonuçlarla her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonuna karşı % Bağıl Aktivite grafiği çizildi ve aktivitenin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu  $IC_{50}$  değeri olarak belirlendi. Daha sonra çalışılan moleküller içinde  $IC_{50}$  değeri belirlenebilen B20 bileşiği için üreazın inhibisyon türü incelendi. Bunun için inhibitör yokluğunda ve B20 bileşiğinin iki farklı konsantrasyonunda (100  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$ ) yukarıda belirtildiği gibi aktivite tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlardan Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibitör varlığında ve yokluğunda  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi. Bu değerler irdelenerek inhibisyon türü tespit edildi. Ayrıca matematiksel olarak da  $K_i$  değeri hesaplandı.

### 2.3. Moleküler Modelleme Çalışması

Organik inhibitör moleküllerinin enzime bağlanma özelliklerini araştırmak amacıyla docking çalışmaları yapıldı. Bu çalışmada organik moleküllerin enzimin aktif bölgesinde bağlanma enerjileri belirlendi ve sonrasında inhibisyon çalışmaları ile docking çalışmaları sonuçlarının uyumluluğu değerlendirildi. Docking çalışmalarına hazırlık olması amacıyla öncelikle Tablo 5’te verilen organik inhibitör molekülleri Gaussian 03 programı kullanılarak optimize edildi. Optimizasyon metodu olarak DFT 6-31(gd)++ kullanıldı (Hehre vd., 1972; Lee vd., 1988; Becke, 1993). Bileşiklerin docking işleminin gerçekleştirileceği hedef reseptör olarak seçilen enzimin kristal şekli literatürden (Balasubramanian, 2013) bulunup çeşitli kodlarla Protein Veri Bankası (PDB) web sitesinden pdb formatında (üreaz için 4G7E) temin edildi. Enzim discovery stüdyo 4.1 Client programı kullanılarak saflaştırıldı ve daha sonra AutoDock Vina 1.1.2 (Trott vd., 2010) ve PyMOL (Ringsdorf vd., 1992; Seeliger vd., 2010) programları kullanılarak organik bileşiklerin aktif bölgede ligand-protein etkileşimleri incelendi (Laskowski vd., 2011). Bu etkileşimlerde, gaussian ile optimize edilen organik moleküllerin, her biri için programın önerdiği yaklaşık 100 konformasyonundan gaz fazındaki en düşük enerjili 10 tanesi seçilerek enzimle aktif bölgede etkileşmesi incelendi. Bu etkileşimler doğrultusunda organik moleküllerin enzimlere bağlanma enerjileri belirlendi ve inhibisyon potansiyelleri teorik olarak ortaya konuldu.

## 2.4. İstatistiki Analiz

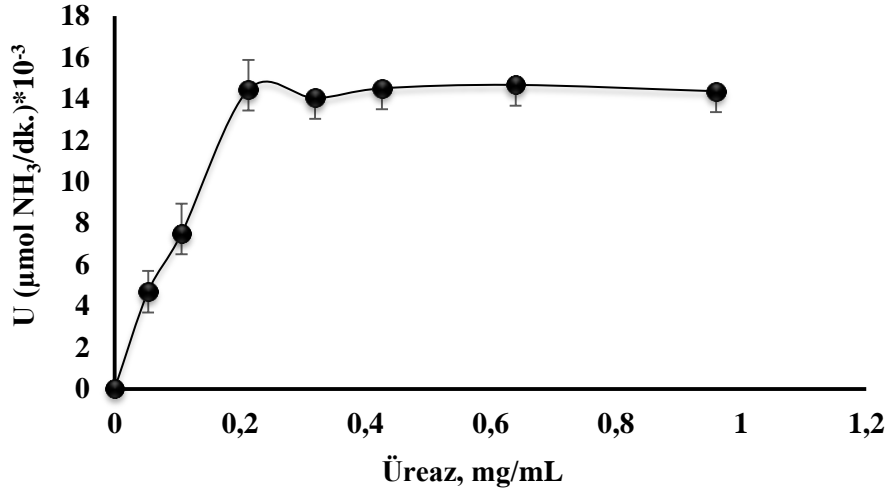
Denemeler üç tekrar şeklinde yapıldı. Elde edilen bulgular ortalamanın standart sapması olarak gösterildi. İstatistiksel anlamlılık, tek yönlü varyans analizi ve Duncan testi kullanılarak hesaplandı. Bu değerlerden  $P < 0,05$  olan değerler istatistiki olarak anlamlı bulundu.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Enzim Aktivitesinin Optimizasyonu

##### 3.1.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine protein miktarının etkisini incelemek için substrat konsantrasyonu sabit tutulup üreazın farklı konsantrasyonları (0,05-1 mg/mL aralığı) kullanılarak reaksiyon karışımları hazırlandı oluşan ürün miktarı spektrofotometrik olarak 625 nm'de absorbansın ölçülmesiyle belirlendi. Ölçülen aktivite değerlerine karşı protein konsantrasyon değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 9). Elde edilen hiperbolik eğriden, ilk hız ölçümlerinin doğru bir şekilde yapılabileceği uygun enzim konsantrasyonu 0,10 mg/mL olarak belirlendi.



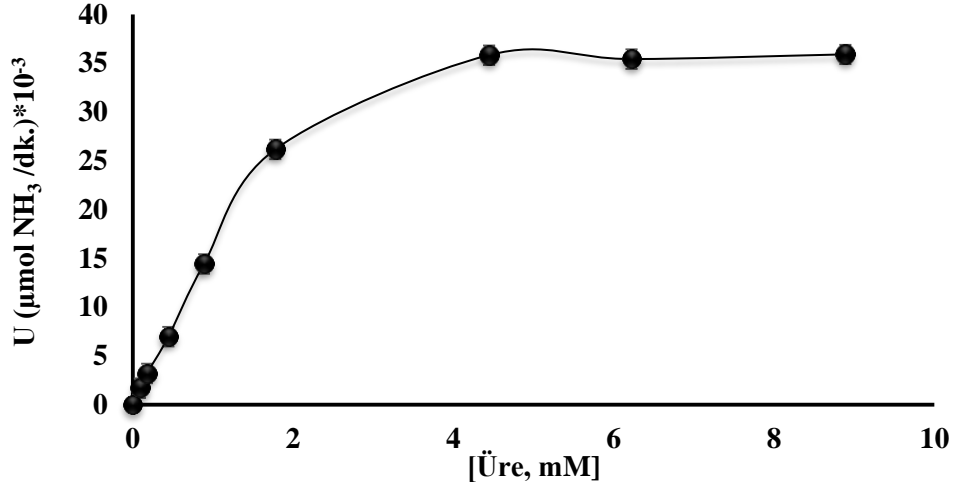
Şekil 9. Protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi

##### 3.1.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

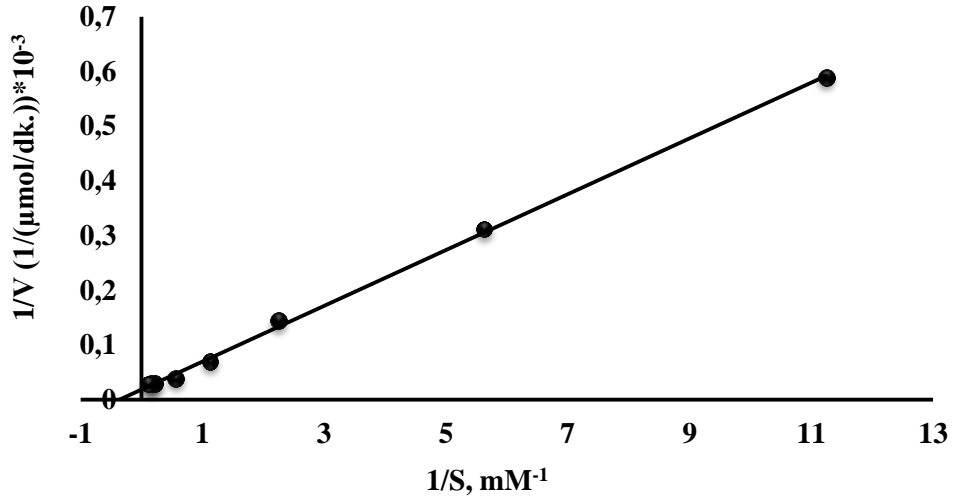
Aktivitenin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda (0,09-8,90 mM nihai) ürenin kullanıldığı reaksiyon karışımlarında enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 625 nm de ölçüldü. Elde edilen verilerden



substrat doygunluk eğrisi (Şekil 10) ve Lineweaver-Burk (Şekil 11) grafiği çizildi. Grafiklerden yola çıkarak, ilk hız ölçümlerinin doğru bir şekilde yapılabileceği uygun substrat konsantrasyonu 0,88 mM olarak, ayrıca  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla, 2,7 mM ve 36  $\mu\text{mol/dk.}$  olarak hesaplandı.



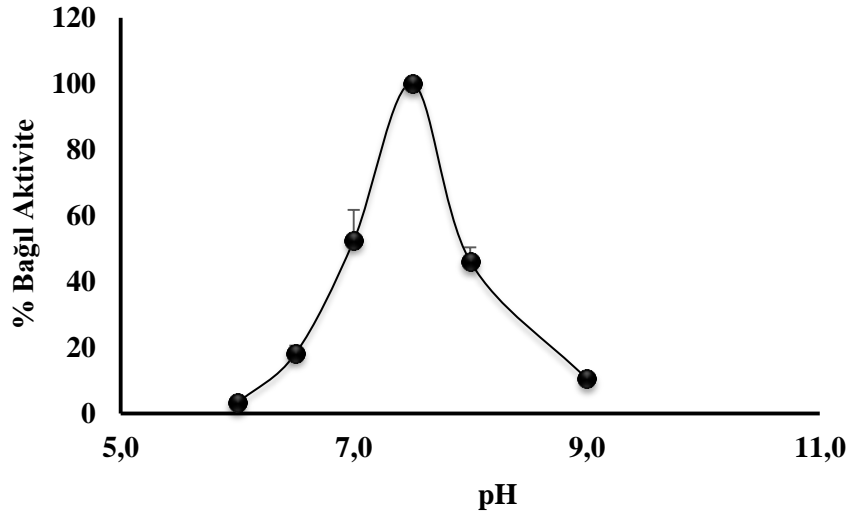
Şekil 10. Enzimin substrat doygunluk eğrisi



Şekil 11. Üreaz enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

### 3.1.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

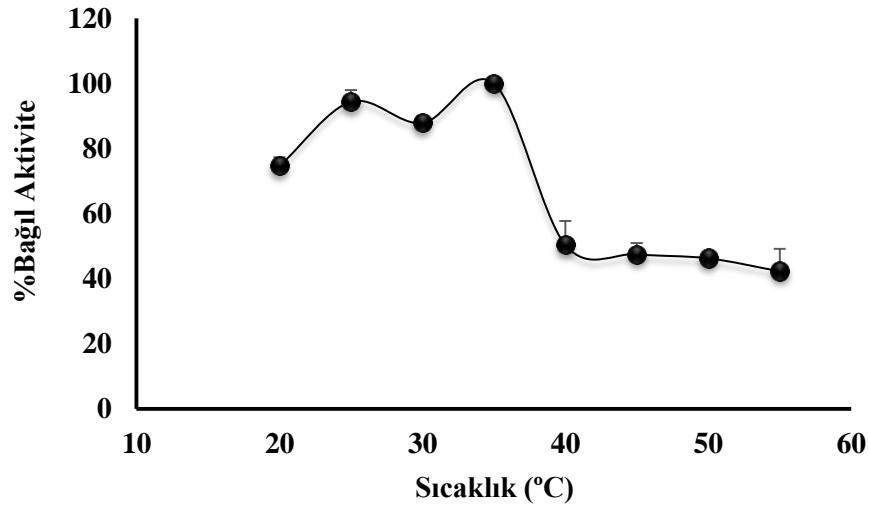
Enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla üre substratı varlığında farklı pH (50 mM fosfat tamponu pH 6,0- 7,5 ve 50 mM glisin-NaOH tamponu pH 8,0, 9,0) değerlerindeki tamponlar kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Aktivite tayinleri en az üç paralel olacak şekilde yapıldı. Sonuçlar hesaplanarak pH-% Bağlı Aktivite grafiğine geçirildi (Şekil 12). Üreaz enziminin en yüksek aktiviteyi 50 mM fosfat pH 7,5'ta gösterdiği bulundu ve bundan sonraki çalışmalar bu pH değerinde yapıldı.



Şekil 12. pH'nın aktivite üzerine etkisi

### 3.1.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

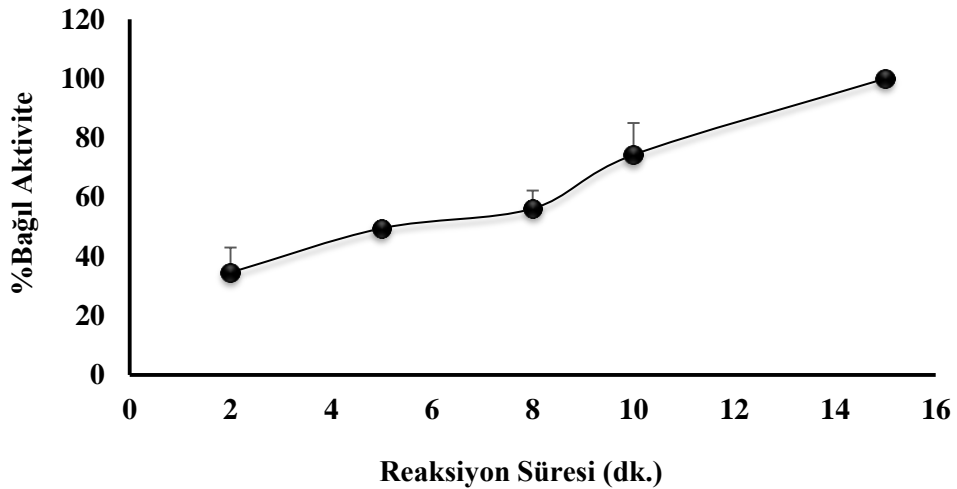
Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 20-55 °C aralığındaki sıcaklıklarda aktivite tayinleri en az üç paralel olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Sıcaklık-% Bağlı Aktivite grafiğine aktarıldı (Şekil 13). Bu sonuçlardan yola çıkarak, üreaz enziminin optimum sıcaklığı 35 °C olarak belirlendi ve bundan sonraki çalışmalar bu sıcaklıkta yapıldı.



Şekil 13. Sıcaklığın aktivite üzerine etkisi

### 3.1.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi

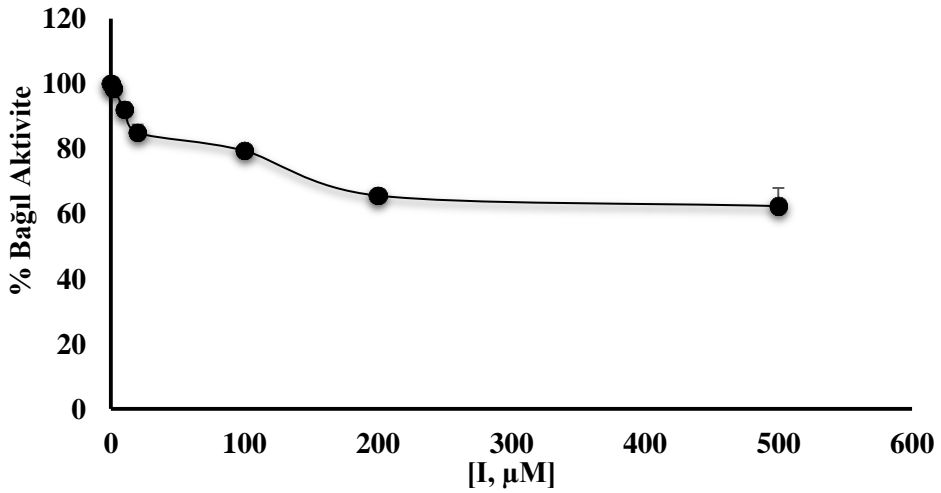
Üreaz aktivitesi için optimum reaksiyon süresini belirlemek amacıyla 2-15 dk. aralığında ölçüm yapıldı. Aktivite tayinleri en az üç paralel olacak şekilde yapıldı. Sonuçlar hesaplanarak grafiğe geçirildi. Üreaz enzimine ait Reaksiyon Süresi- % Bağlı Aktivite grafiği Şekil 14'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi üreaz enzimi çalışılan süreler içinde en yüksek aktiviteyi 15 dk. sonunda göstermiştir. Bundan sonraki çalışmalar reaksiyon süresi 15 dk. olacak şekilde planlandı.



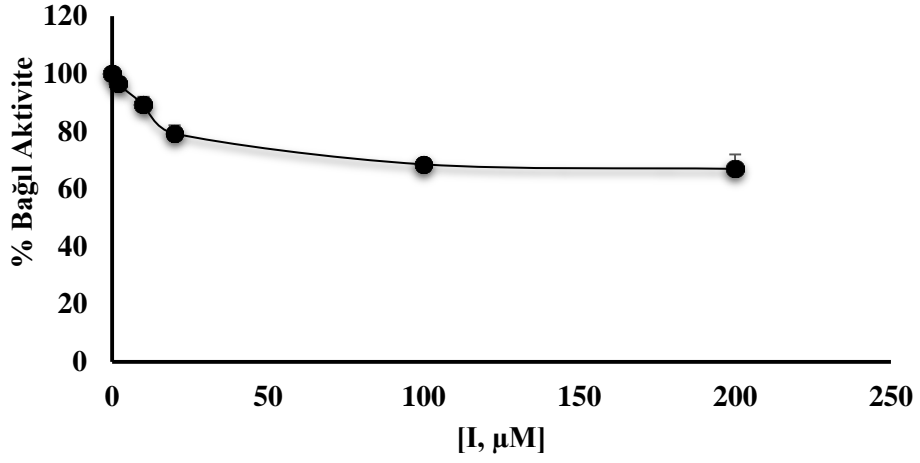
Şekil 14. Reaksiyon süresinin aktivite üzerine etkisi

### 3.2. Üreaz İnhibisyonu Çalışmaları

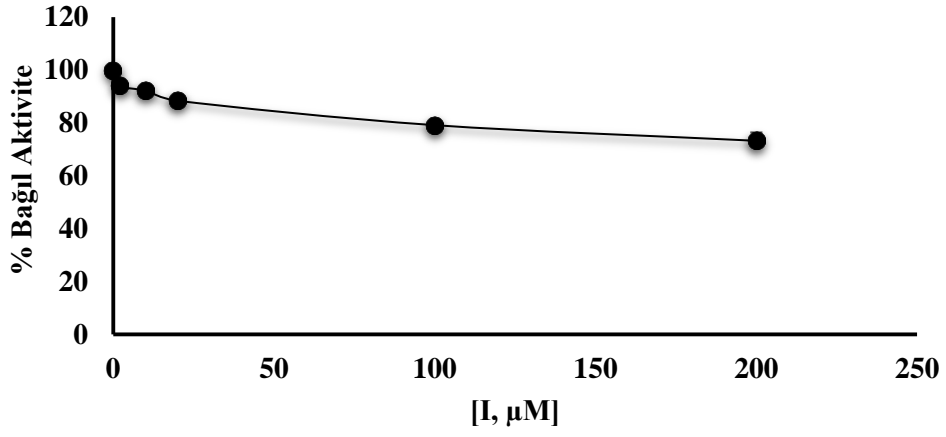
Üreaz inhibisyonu çalışmaları için B16-B21 molekülleri ve referans inhibitör molekül olarak da tiyoüre kullanıldı. İnhibisyon çalışmaları 2.2.7’te anlatıldığı gibi ve 2,7 mM ( $K_m$ ) üre substratı varlığında yapıldı. Elde edilen sonuçlarla her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonuna karşı % Bağlı Aktivite grafiği çizildi ve bağlı aktivitenin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu  $IC_{50}$  değeri olarak belirlendi (Şekil 15-20, Tablo 6). Şekil 19’de görüldüğü üzere sadece B20 bileşiği için  $IC_{50}$  değeri 420  $\mu$ M olarak belirlenebildi, diğer bileşiklerin varlığında ise üreazın etkili bir inhibisyonu izlenmedi. Bu nedenle B20 bileşiği varlığında üreazın inhibisyon türünün belirlenmesi çalışması yapıldı. Bunun için inhibitör yokluğunda ve B20 bileşiğinin iki farklı konsantrasyonunda (100  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M) ve 1-12,5 mM üre substratı varlığında bir seri üreaz aktivitesi tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlardan Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibitör varlığında ve yokluğunda  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi (Şekil 22-23, Tablo 7). Buna göre B20 bileşiği varlığında üreaz nonkompetitif olarak inhibe olmuşken  $K_i$  değeri yaklaşık 254,6  $\mu$ M olarak hesaplandı.



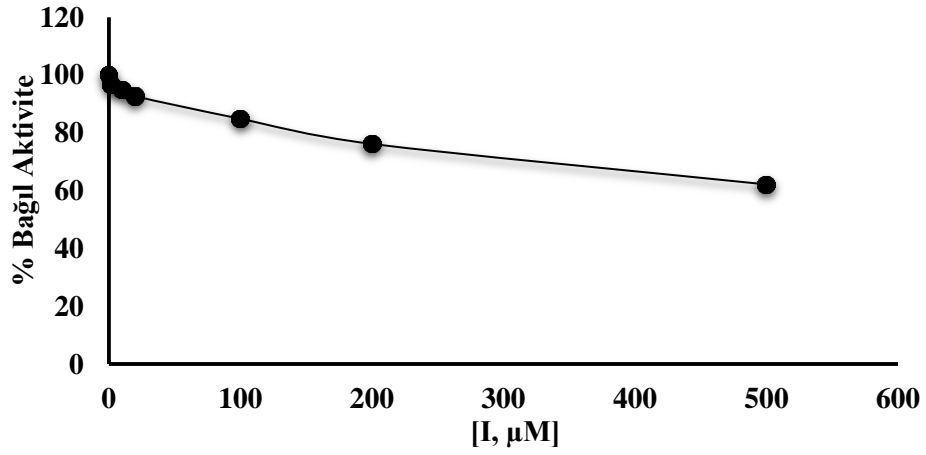
Şekil 15. B16 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



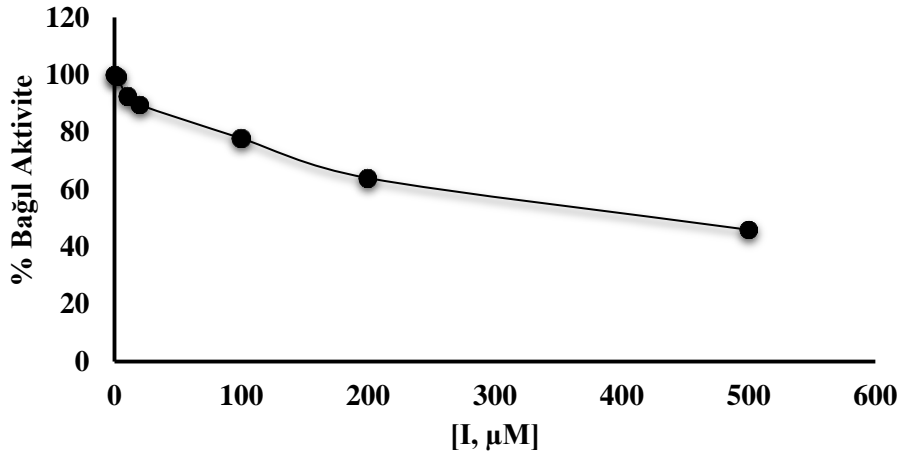
Şekil 16. B17 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



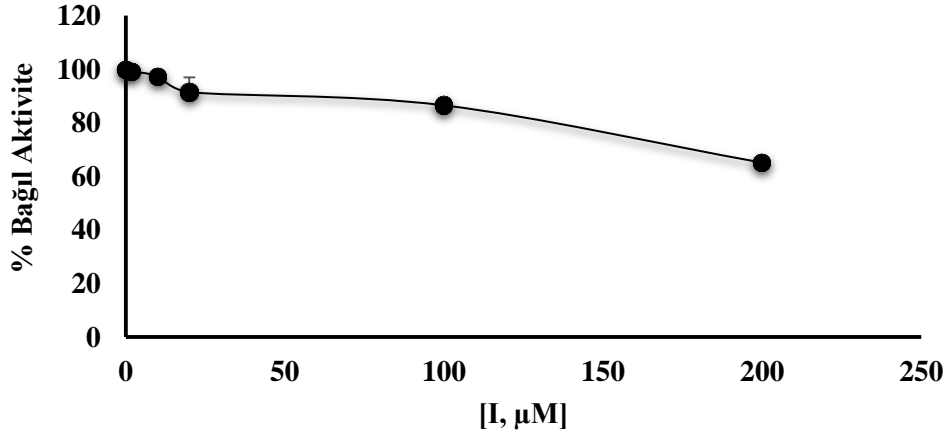
Şekil 17. B18 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



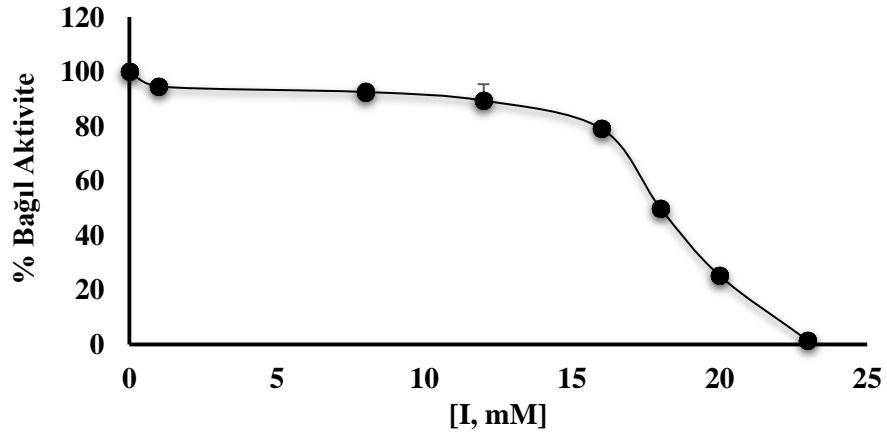
Şekil 18. B19 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 19. B20 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



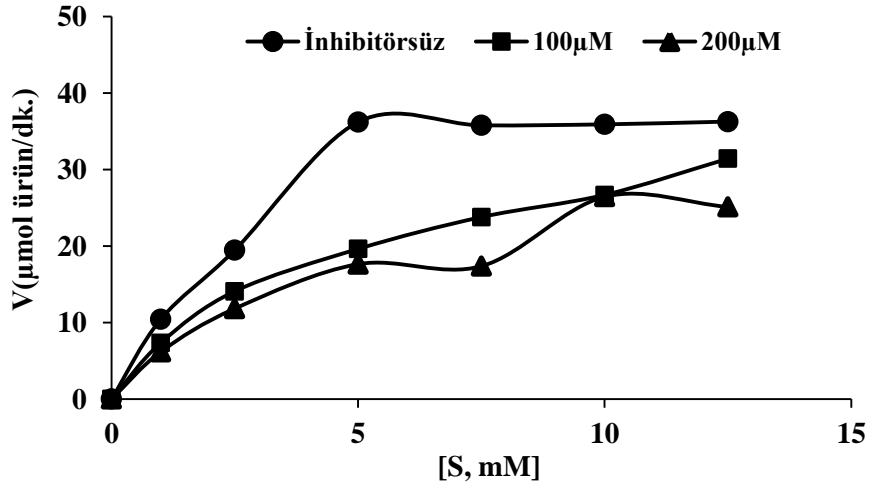
Şekil 20. B21 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



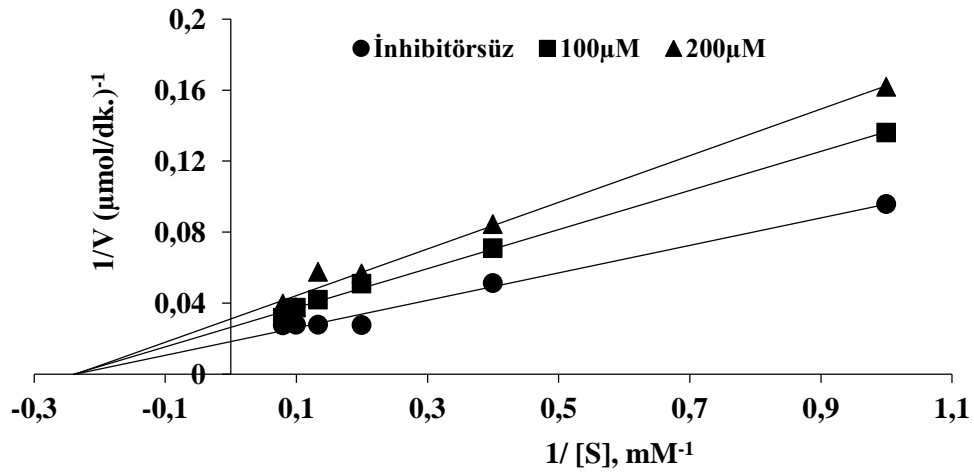
Şekil 21. Tiyoürenin üreaz aktivitesi üzerine etkisi

Tablo 6. İnhibitör moleküllerinin üreaz aktivitesi üzerine etkisi

İnhibitör $IC_{50}$ , $\mu\text{M}$		Max inhibisyon	
		%	[I], $\mu\text{M}$
B16	$\geq 500$	$36,5 \pm 1,90$	500
B17	$\geq 150$	$33,1 \pm 0,30$	150
B18	$\geq 100$	$26,8 \pm 0,20$	100
B19	$\geq 110$	$37,9 \pm 0,20$	110
B20	420	$54,0 \pm 0,07$	500
B21	$\geq 120$	$34,9 \pm 1,80$	120
Tiyoüre	18000	$99,6 \pm 0,07$	23000



Şekil 22. B20 bileşiği varlığında üreaz inhibisyon türünün belirlenmesi



Şekil 23. B20 bileşiği varlığında üreaz inhibisyon türünün belirlenmesi

Tablo 7. B20 bileşiği varlığında üreaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve  $K_i$  değeri

İnhibitör ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/dk.}$ )	İnhibisyon türü	Ortalama $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
İnhibitörsüz	4,2	55,5	Nonkompetitif	254,6
100	4,2	38,5		
200	4,2	32,3		

### 3.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları

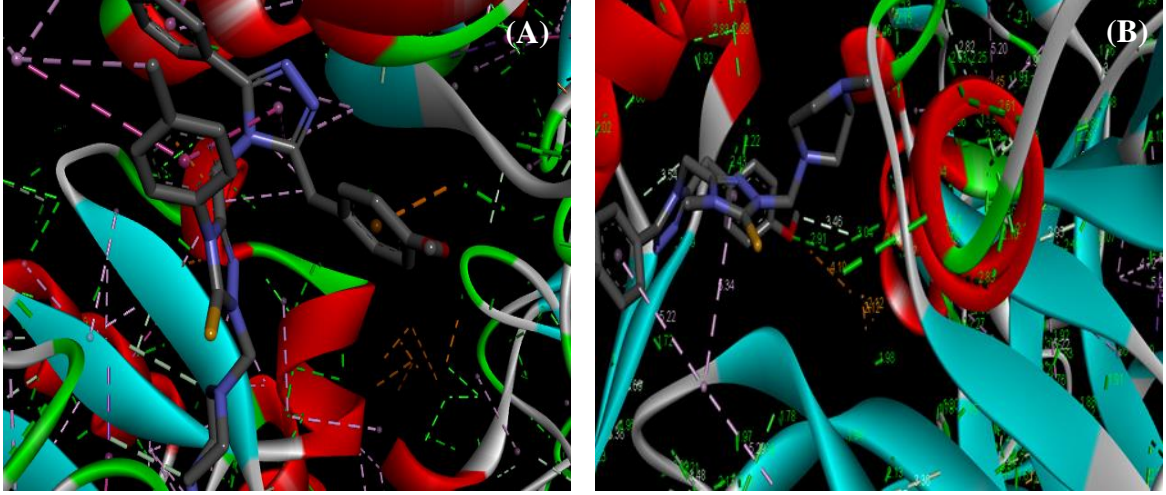
Etkili bir inhibisyonun gözleendiği ve  $IC_{50}$  değeri tespit edilebildiği üreaz için seçilen bir seri molekülün enzime aktif bölge bağlanma özellikleri teorik olarak docking çalışmalarıyla incelendi. Docking çalışmaları 2.3'te anlatıldığı gibi yapıldı. Docking çalışmalarına hazırlık olması amacıyla öncelikle çalışılan tüm moleküller gaussian 03 programı kullanılarak optimize edildi. Optimize edilen bu bileşiklerin her biri ile ilgili kullanılan program yaklaşık olarak 100 kadar konformasyon önerdi. Üreaz ile etkileştirilmek üzere bu konformasyonlardan her bir molekül için 10 tanesi (gaz fazında en düşük enerjili) seçilerek üreaz için PDB'den sağlanan enzim kristal yapısı ile aktif bölgede etkileştirildi. Bu çalışmalarla organik moleküllerin enzimin aktif bölgesine bağlanma enerjileri belirlendi ve hangi molekül durumunda etkileşimin daha güçlü olduğu dolayısıyla güçlü bir aktif bölge inhibisyonuna neden olacağı teorik olarak ortaya konuldu (Tablo 8).

Tablo 8. Üreaz varlığında çalışılan inhibitör moleküllerinin bağlanma enerjileri

Bileşikler	$\Delta G$ (kcal/mol)
B16	-20.88
B17	-1.76
B18	-8.7
B19	-9.3
B20	-7.6
B21	-15.4



Teorik sonuçlara göre, etkileşim enerjisi en düşük olan moleküller enzimle aktif bölgede en güçlü etkileşim yapan moleküller olarak belirlendi. Buna göre, üreaz için en etkili inhibitör molekülü teorik olarak B16 molekülünün olduğu tespit edildi. Bu sonuç doğrultusunda hem teorik hem de deneysel olarak güçlü inhibisyona neden olan molekülün üreazla etkileşimini ortaya koyan görüntüler Şekil 24’de sunulmaktadır.



Şekil 24. Üreaz enzimi ile B16 (A) ve B20 (B) moleküllerinin etkileşimi

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Biyolojik makromoleküller arasında enzimler, ilaç moleküllerinin hedefi olarak lider pozisyonda bulunmaktadır. Bu durum, bazı hastalık süreçlerinde enzimlerin etkinliklerinin gözlenmesinden kaynaklandığı gibi enzim katalizinin yapısal dinamikleri nedeniyle küçük molekül kütleli ilaç molekülleriyle enzimlerin inhibe olabilmelerinden kaynaklanmaktadır.

Günümüzde klinik olarak kullanılan ilaçların yaklaşık yarısının enzim inhibitörü olması hiç şaşırtıcı değildir. Bu da yakın gelecek için farmasötik araştırmaların ana odak noktasının spesifik enzim inhibisyonu olarak kalmasının hayati bir zorunluluk olacağını göstermektedir (Copeland, 2005).

Yeni ilaç moleküllerinin belirlenebilmesi yeni birçok küçük molekül kütleli organik bileşiğin sentezini ve bunların ilaç olarak etkinliklerinin incelenmesini zorunlu kılmaktadır. Bugün birçok ilaç şirketi Ar-Ge laboratuvarlarında ve akademik düzeyde araştırma yapan laboratuvarlarda geniş bir bileşik kütüphanesi oluşturulmakta ve bu bileşiklerin enzim-inhibitör etkileşimleri *in vitro* olarak incelenmektedir (Copeland, 2005).

Günümüzde ilaç olarak kullanılan birçok bileşiğin yapısında özellikle tiyadiazol, triazol ve oksadiazol gibi beş üyeli heterosiklik halka bulunmaktadır. Bu halkalar heteroatomların konumuna göre çeşitli izomerlere sahiptir. Ancak bu izomerler içerisinde biyolojik olarak en aktif olanlar 1,2,4-triazol, 1,3,4-tiyadiazol ve 1,3,4-oksadiazol türevleridir. Bu tür beş üyeli halka içeren bileşikler, başta antikanser aktivite olmak üzere antibakteriyel, antifungal anti-HIV, antiviral, antidepresan, antiinflamatuvar, antitüberküloz, diüretik, analjezik gibi çok geniş biyolojik aktivite spektrumuna sahiptirler (Todoulou vd., 1994; Küçükgül vd., 2004; Kömürcü vd., 1995; Rollas vd., 1993; Malbec vd., 1984; Modzelewska vd., 1999; Gülerman vd., 1997; Bekircan vd., 2005; Kahveci vd., 2005; Demirbas vd., 2002; Demirbas vd., 2005; Bekircan vd., 2006; Kauffman vd., 1997; Herbrecht 2004; Crance vd., 2003; Gori vd., 2005). Triazol halkalı bileşiklerin genel olarak farmakolojik özelliğe sahip olduğu ve özellikle 1,2,4-triazol-3-iyon ve türevi bileşiklerin klinik ve endüstriyel öneme sahip bazı enzimlerin inhibisyonuna neden olduğu yine yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Amtul vd., 2004; Serwar vd., 2009; Bele, 2011; Bektas vd., 2013). Organik molekülün enzimin substratına benzemesi bu özelliğini arttırmaktadır. Ayrıca, 1,2,4 triazollerin Schiff ve Mannich bazı türevlerinin basit bir

şekilde sentezlenebilmeleri ve çeşitli uygulamalarda kullanılabilirmeleri bu bileşiklerin son on yılda biyoloji ve kimya alanında büyük ilgi çekmelerine neden olmuştur (Haijian vd., 1998; Karthikeyan vd., 2006). Bu nedenle, bu çalışmada Bekircan vd. (2014) tarafından sentezlenen bazı 1,2,4-triazol bileşik türevleri daha önce ele alınmadığı yönüyle (bu moleküllerin önceden klinik ve/veya endüstriyel öneme sahip  $\alpha$ -glikozidaz ve lipaz inhibisyonu üzerine etkisi incelenmiş ve bu enzimler varlığında  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiştir) üreaz inhibisyonu açısından irdelenmemiştir. Bu çalışmada ayrıca önceki çalışmalardan farklı olarak üreaz varlığında sadece  $IC_{50}$  değerleri ve en etkili inhibitör molekülü belirlenmekle kalmamış, bunun yanında inhibisyon türü ve  $K_i$  değeri belirlenmiş ve moleküler docking çalışmalarıyla bu triazol moleküllerinin inhibisyon potansiyelleri teorik olarak da değerlendirilmiştir.

İnhibisyon çalışmalarına başlamadan önce ticari olarak satın alınan enzimlerin aktiviteleri literatüre uygun olarak belirlendi ve daha sonra bu aktivitelerin optimizasyonu gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmalarıyla üreazın çalışma sıcaklığı ve pH'ı belirlendi ve ayrıca inhibisyon çalışmalarında reaksiyon karışımında kullanılacak olan enzim ve substrat miktarı tespit edildi. Üreaz için denenen her bir inhibitör molekülüne ait  $IC_{50}$  değerini belirlemek üzere yapılan aktivite çalışmalarında inhibitör konsantrasyonları % Bağıl aktiviteye karşı grafiğe geçirildi. Bu nedenle öncelikle  $K_m$  değeri belirlendi (Şekil 11) ve inhibisyon çalışmalarındaki reaksiyon karışımları  $K_m$  değerindeki substrat konsantrasyonunda hazırlandı (Copeland, 2005). Daha sonra  $IC_{50}$  değeri belirlenebilen ve/veya en düşük bulunan inhibitör molekülü mevcudiyetinde inhibisyonun türü ve  $K_i$  değerleri tespit edilmeye çalışıldı.

Bu çalışma için bir seri substrat ve inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Substrat konsantrasyonu olarak  $0,2-5,0K_m$ , inhibitör konsantrasyonu olarak ise yukarıda çizilen inhibitör konsantrasyonu-% Bağıl aktivite grafiğinde %10-75 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyon aralığı kullanıldı (Copeland, 2005).

Tablo 5'te verilen hangi organik moleküllerin inhibisyon profillerinin inceleneceğine karar verilirken enzimlerin aktif bölgelerinin kimyası göz önünde bulunduruldu. Buna ilave olarak, her bir enzimin substratının ve literatürde söz konusu enzim için önceden bilinen inhibitörlerin yapısı ile incelenecek organik moleküllerin yapısal benzerlikleri dikkate alındı. Ayrıca, organik moleküllerin organik çözücülerdeki çözünürlükleri ve çözücünün inhibisyon etkisi, hangi organik molekülün hangi konsantrasyona kadar çalışmalarda kullanılabileceğinin belirlenmesinde etkili oldu. Bu değerlendirmeler

sonucunda başlanılan inhibisyon çalışmaları için organik moleküllerin etanol veya DMSO-etanol karışımı içerisinde çözeltileri hazırlandı. İnhibitör çözeltilerinin reaksiyon karışımına ilave edilmesiyle organik çözücünün reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonu %1'i aşmayacak şekilde ayarlandı. Literatürde belirtildiği gibi enzimler organik çözücüler varlığında inhibe olabilmektedir (Copeland, 2005) ve üreazın da DMSO varlığında inhibe olduğu görülmüştür. Bu nedenle inhibisyon çalışmalarındaki kontrol karışımlarında çözücünün inhibisyon etkisi de dikkate alınarak reaksiyon karışımları hazırlandı. Bunun yanında organik bileşiklerin uygun bir organik çözücüde belirli bir konsantrasyonda çözeltisi hazırlansa bile reaksiyon ortamına katılması müteakibinde zaman zaman çökme olduğu görülmüştür. Bu durum inhibitör organik molekülün büyük oranda tampon çözelti içeren reaksiyon karışımlarında çökmesine atfedilmektedir. Çalışmada kullanılan her bir organik molekülün bu şekildeki davranış profili farklı olduğundan yukarıda belirtildiği gibi üreaz enzimi için yapılan inhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör moleküllerin denenen konsantrasyon aralığı da molekülden moleküle farklı olmuştur (Şekil 15-21).

Bu tespitler ışığında üreaz inhibisyonu çalışmaları için Tablo 5'te verilen B16-B21 bileşikleri kullanıldı ve üre substratı varlığında (2,7 mM) inhibisyon çalışmaları yapıldı. İnhibitör organik moleküllerin reaksiyon karışımlarındaki nihai konsantrasyon aralığı B16 ve B20 bileşikleri için 0-500  $\mu$ M, B17 için 0-150  $\mu$ M, B18 için 0-100  $\mu$ M, B19 için 0-110  $\mu$ M ve B21 için ise 0-120  $\mu$ M olacak şekilde aktivite çalışmaları gerçekleştirildi. Buna göre sadece B20 bileşiği varlığında 420  $\mu$ M olarak  $IC_{50}$  değeri belirlenebilmişken diğer inhibitör molekülleri varlığında  $IC_{50}$  değeri belirlenememiş ancak çalışılan en yüksek inhibitör konsantrasyonlarında dahi %26,8-37,9 aralığında üreaz inhibisyonu gözlenmiştir (Tablo 6).

Çalışmada referans inhibitör molekül olarak tiyüere kullanılmış ve  $IC_{50}$  değeri 18 mM olarak belirlenmiştir. Bu durumda çalışmada kullanılan B20 bileşiğinin tiyüereye kıyasla daha potansiyel bir üreaz inhibitörü olduğu söylenebilir. Ancak çözünürlük problemleri nedeniyle B20 bileşiği 500  $\mu$ M'dan daha yüksek konsantrasyonları için çalışılmamış ve bu konsantrasyonda da maksimum %54'lük bir inhibisyon gözlenmiştir. Oysa tiyüere suda çözünebilir bir molekül olup, 23 mM nihai konsantrasyonunda üreazı hemen hemen tamamen inhibe etmiştir.

Khan vd. (2010) 4,5-disubstitue-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion türevleri ile yapmış olduğu üreaz inhibisyon çalışmalarında 18 farklı molekül için  $IC_{50}$  değerleri

hesaplamış ve en yüksek ve en düşük  $IC_{50}$  değerlerini sırasıyla 483,6  $\mu\text{M}$  ve 45,6  $\mu\text{M}$  olarak bildirmişlerdir.

Bir başka çalışmada Akhtar vd. (2014) 2-arilamino-5-ariloksilalkil-1,3,4-oksadiazol ve türevi olan 21 sentez bileşiğinde en yüksek ve en düşük  $IC_{50}$  değerlerini sırasıyla 57,2  $\mu\text{M}$  ve 6,03  $\mu\text{M}$  olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlara göre B20 bileşiğinin inhibisyon potansiyeli  $IC_{50}$  değerleri dikkate alındığında Khan vd. (2010)'nin bildirdiği moleküllere göre daha etkili ancak Akhtar vd. (2014)'ne göre ise daha zayıf olduğu söylenebilir.

Buna ilave olarak, Serwar vd. (2009) tarafından sentezlenen 5-aril-4-(1-fenilpropil)-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-tion türevi 9 bileşik ile yapılan inhibisyon çalışmalarında  $IC_{50}$  değerleri 7,8-117  $\mu\text{M}$  arasında değiştiği gözlenmiştir. Başka bir çalışmada ise Arayne vd. (2014) 5-amino-1-siklopropil-7-[(3R,5S)3,5-dimethylpiperazin-1-il]-6,8-difloro-4-okso-kinolin-3 karboksilik asitin 3 türevi ile üreaz enzim inhibisyonu gözlemlenmiştir ve belirledikleri  $IC_{50}$  değerleri 393-421  $\mu\text{M}$  arasında değişmektedir. Buna göre çalışmalarımızda üreaz inhibisyonu için literatürle uyumlu sonuçların gözlemlendiği söylenebilir.

Üreaz inhibisyonu türünü belirlemek üzere 1-12,5 mM üre konsantrasyonu aralığında (yaklaşık 0,2-5,0  $K_m$ ) ve 100  $\mu\text{M}$  ile 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında (%10-75 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonları seçilerek) B20 bileşiği için ayrı ayrı aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Her iki inhibitör konsantrasyonundaki  $1/[S]-1/V$  grafikleri çizildi. İnhibisyon mekanizması, diğer inhibitör molekülleri varlığında etkili bir inhibisyon gözlenemediğinden sadece B20 bileşiği için aydınlatılmaya çalışıldı. Ayrıca belli bir başlangıç molekülünden türeyen ve belli pozisyondaki değişken gruplarla türevlendirilen bileşiklerin inhibitör etkinliklerinin ve mekanizmalarının muhtemelen benzer olacağı bildirilmiştir (Copeland, 2005). Buna göre, inhibitör yokluğunda yapılan aktivite ölçümleri sonucunda  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 4,2 mM ve 55,5  $\mu\text{mol/dk.}$  olarak belirlendi. Oysa 100  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$  B20 bileşiği varlığında belirlenen  $K_m$  değeri değişmezken  $V_{max}$  değerleri inhibitör konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak önce 38,5  $\mu\text{mol/dk.}$  ve sonra da 32,3  $\mu\text{mol/dk}$  olacak şekilde azalmıştır (Tablo 7). Bu durum, inhibitör konsantrasyonu değişimiyle  $K_m$  değerinin sabit kaldığı ancak  $V_{max}$  değerinin azaldığı nonkompetitif inhibisyona işaret etmekte ve B20 bileşiğinin böyle bir mekanizmayla üreazı inhibe ettiğini göstermektedir (Şekil 23). Buna göre, B20 bileşiğinin enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgede serbest enzime veya enzim-substrat kompleksine zayıf bir etkileşimle ve dönüşümlü olarak bağlanmasıyla inhibisyona neden olduğu söylenebilir. Ayrıca bu çalışma

neticesinde  $K_i$  değeri 254,6  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Ancak, Krajewska vd. (2001) 2-merkaptolanolün üreaz inhibisyonu üzerine etkisini incelemiş,  $K_i$  değerini 0,72 mM ve inhibisyon türünü de kompetitif inhibisyon olarak belirtmiştir.

Üreaz için yapılan moleküler docking çalışmalarında inhibitör moleküllerinin enzime aktif bölge bağlanma enerjileri hesaplandı. Buna göre en düşük bağlanma enerjisine sahip olan molekülün enzimle en güçlü etkileşim yapan ve dolayısıyla aktif bölgede inhibisyona neden olan en potansiyel molekül olduğu belirlendi. Buna göre, üreaz için en potansiyel aktif bölge inhibitör molekülünün B16 molekülü olduğu tespit edildi (Tablo 8).

Bu sonuçtan anlaşılacağı üzere üreaz için deneysel olarak en potansiyel bulunan inhibitör molekülü teorik olarak potansiyel bulunanla örtüşmemektedir. Bunun başlıca sebebi moleküler docking çalışmalarında inhibisyon potansiyeli büyüklüğünün inhibitör molekülleriyle serbest enzimin aktif bölgede etkileştirilerek aktif bölge bağlanma enerjilerinin belirtilmesinden dolayıdır. Oysaki inhibisyon türünün belirlendiği deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlardan kolayca anlaşılacağı gibi söz konusu üreaz nonkompetitif olarak inhibe olmuştur. Bu durumda çalışılan moleküller varlığında gözlenen inhibisyon türünde üreaz için inhibitör molekülü aktif bölge dışında bir bölgede ve genelde serbest enzime değil enzim-substrat kompleksine bağlanmıştır. Bunun yanında gaussian programı ile optimize edilen inhibitör moleküllerinin yaklaşık 100 farklı konformasyonu içerisinde gaz fazında en düşük enerjili 10 tanesi seçilerek enzimle aktif bölgede etkileştirilmiştir. Dolayısıyla programın önerdiği diğer konformasyonların enzimle etkileşimi durumunda deneysel sonuçlarla uyumlu bulguların elde edilebilmesi ihtimal dahilindedir. Ayrıca bu konformasyonların gaz fazındaki kararlı hallerinin çözelti içerisinde farklı davranışa sebep olabileceği de söylenebilir. Üreaz hidrolaz sınıfı bir enzim olup aktivitesi için suyun varlığı gereklidir. Oysa moleküler docking çalışmalarında suyun varlığı dikkate alınmayıp yukarıda belirtildiği gibi gaz fazındaki molekül ile enzimin etkileşmesi sağlanmıştır.

## 5. ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen bulgular neticesinde varılan sonuçlar değerlendirildiğinde aşağıda sunulan önerilerin ileri bir çalışma olarak dikkate alınabileceği söylenebilir.

1. Organik moleküllerin suda çözünür formları (tuzları) sentezlenerek deneysel çalışmalarda moleküllerin çözünürlük problemlerinden kaynaklanan olumsuzluklar bertaraf edilebilir.
2. Organik molekülleri, enzimlerle, aktif bölge dışında allosterik bölge veya diğer bağlanma bölgelerine bağlanmak üzere de etkileştirip eşlik eden bağlanma enerjilerinin belirlenmesi yoluna gidilebilir.
3. Üreazın hidrolitik mekanizmasında suyun gerekli olduğu dikkate alınarak enzimle inhibitör molekülünün su varlığında teorik etkileşimi incelenebilir.
4. Enzimin aktif bölge ve bağlanma bölgesi topolojileri detaylı bir şekilde ele alınarak inhibitör üzerindeki hangi grupların protein yapısındaki hangi aminoasit yan zinciri ile etkileştiği belirlenebilir ve böylece enzim aktivitesi için kritik aminoasitler belirlenerek aktivite ve inhibisyon için uygun mekanizmalar önerilebilir.
5. Bu tür çalışmalar deneysel inhibisyon çalışmalarıyla desteklenerek yapısal olarak optimize edilmiş daha efektif inhibitör moleküllerinin tasarlanması ve sentezlenmesinin yolu açılabilir.
6. Elde edilen verilerin gerek *in vitro* hücre kültürü çalışmaları gerekse *in vivo* deneysel hayvan çalışmaları ile desteklenmesi durumunda inhibitörlerin klinik kullanımlarının gündeme gelebileceği öngörülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Acar, D., 2009. Üreaz Enziminin Ca-Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Aehle, W., 2007. Enzymes in Industry; Production and Applications, German.
- Ahmed, G. ve Vulphson, E.N., 1994. Facile synthesis of L-DOPA esters by the combined use of tyrosinase and  $\alpha$ -chymotrypsin, Biotechnology Letters, 16, 367-372.
- Ajay, A., Walters, W.P. ve Murcko, M.A., 1998. Can We Learn To Distinguish between “Drug-like” and “Nondrug-like” Molecules?, Journal of Medicinal Chemistry, 18, 3314-3324.
- Akhtar, T., Khan, M.A., Iqbal, J., Jones, P.G. ve Hameed, S.A., 2014. Facile One-Pot Synthesis of 2-Arylamino-5-Aryloxyalkyl-1,3,4-Oxadiazoles and Their Urease Inhibition Studies, Chemical Biology Drug Design, 84, 92-98.
- Alonso, A., Almendral, M.J., Baez, M.D., Porras, M.J. ve Alonso, C., 1995. Enzyme immobilization on an epoxy matrix. Determination of L-arginine by flow-injection techniques, Analytical Chimica Acta, 308, 164-169.
- Amtul, Z., Atta-ur-Rahman, Siddiqui, R.A. ve Choudhary, M.I., 2002. Chemistry and Mechanism of Urease Inhibition, Current Medicinal Chemistry, 9, 1323-1348.
- Amtul, Z., Rasheed, M. ve Choudhary, M.I., 2004. Kinetics of novel competitive inhibitors urease enzymes by a focused library of oxadiazoles/thiadiazoles and triazoles, Biochemical and Biophysical Research Communications, 319, 1053-1063.
- Arayne, M.S., Sultan, N., Gul, S. ve Khan, A., 2014. Novel derivatives of 5-amino-1-cyclopropyl-7-[(3R,5S)3,5-dimethylpiperazine-1-yl]-6,8-difluoro-4-oxo-quinoline-3-carboxylic acid: their synthesis, antimicrobial, antifungal, and urease inhibitory studies, Medicinal Chemistry Research, 23, 1248-1256.
- Balasubramanian, A., Balaji, N., Gautham, N. ve Ponnuraj, K., 2013. Molecular Dynamics simulation and molecular modelling studies on the insecticidal domain from jack bean urease, Molecular Simulation, 39, 357–366.
- Balasubramanian, A. ve Ponnuraj, K., 2010. Crystal structure of the first plant urease from Jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure, Journal of Molecular Biology, 400, 274–83.
- Barakat, A., A-Majid, A.M., Lotfy, G., Arshad, F., Yousuf, S., Choudhary, M.I., Ashraf, S. ve U-Haq Z., 2015. Synthesis and dynamics studies of barbituric acid derivatives as urease inhibitors, Barakat et al. Chemistry Central Journal, 9, 63.



- Bayerdörffer, E. ve Ottenjann, R., 1988. The role of antibiotics in *Campylobacter pylori* associated peptic ulcer disease, Scandinavian Journal of Gastroenterology, 23, 93–100.
- Becke, A.D., 1993. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, Journal of Chemical Physics, 98, 1372-1377.
- Becker-Ritt, A.B., Martinelli, A.H.S., Mitidieri, S., Feder, V., Wassermann, G.E., Santi, L., Vainstein, M.H., Oliveria, J.T.A., Fiuza, L.M., Pasquali, G. ve Carlini, C.R., 2007. Antifungal activity of plant and bacterial ureases, Toxicon, 50, 971-983.
- Bekircan, O. ve Gümrükçüoğlu, N., 2005. Synthesis of some 3,5-diphenyl-4H-1,2,4-triazole derivatives as antitumor agents, Indian Journal of Chemistry, 44B, 2107-2113.
- Bekircan, O., Kahveci, B. ve Küçük, M., 2006. Synthesis and Anticancer Evaluation of Some New Unsymmetrical 3,5-Diaryl-4H-1,2,4-Triazole Derivatives, Turkish Journal of Chemistry, 30, 29-40.
- Bekircan, O., Mentеше, E., Ülker, S. ve Kucuk, C. 2014. Synthesis of Some New 1,2,4-Triazole Derivatives Starting from 3-(4-Chlorophenyl)-5-(4-methoxybenzyl)-4H-1,2,4-triazol with Anti-Lipase and Anti-Urease Activities, Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences, 347, 387-397.
- Bektas, H., Ceylan, S., Demirbas, N., Karaoglu, S.A. ve Sökmen, B.B., 2013. Antimicrobial and antiurease activities of newly synthesized morpholine derivatives containing an azole nucleus, Medicinal Chemistry Research, 22, 3629-3639.
- Bele, D. ve Singhvi, İ., 2011. A review on 1,2,4-triazole, Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research, 1, 88-100.
- Benjamin, S. ve Pandey, A., 2000. Panorama of lipases in bioindustry, Biotech International, 5, 11-13.
- Blakeyand, R.L. ve Zerner, B., 1984. Jack bean urease: the first nickel enzyme, Journal of Molecular Catalysis, 23, 263-292.
- Bryce, D.W., Fernandez-Romero, J.M. ve Castro, M.D., 1994. Fluorometric determination of mercury (II), based on the inhibition of the enzymatic activity of urease, Analytical Letters, 27, 867-878.
- Carter, E.L., Flugga, N., Boer, J.L., Mulrooney, S.B. ve Hausinger, R.P., 2009. Interplay of metal ions and urease, Metallomics, 1, 207-221.
- Crance, J.M., Scaramozzino, N., Jouan, A. ve Garin, D., 2003. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses, Antiviral Research, 58, 73-79.

- Chang, T.M.S., 1979. Artificial cells containing multienzyme systems for the sequential conversion of urea into ammonia, glutamate then alanine, Artificial Organs, 3, 284-287.
- Chang, T.M.S. ve Malouf, C., 1979. Effect of glucose dehydrogenase in converting urea and ammonia into amino acid using artificial cells, Artificial Organs, 3, 38-41.
- Chang, T.M.S., 1966. Semipermeable aqueous microcapsules (artificial cells) with emphasis on experiments in extracorporeal shunt systems, Transamerican Society of Artificial Internal Organs, 12, 13-19.
- Chang, T.M.S., 1964. Semipermeable microcapsules, Science, 146, 524-525.
- Ciurli, S., Benini, S., Rypiewski, W.R., Wilson, K.S., Miletto, S. ve Mangani, S., 1999. Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms, Coordination Chemistry Reviews, 190-192, 331-355.
- Copeland, R.A., 2000. Enzymes: a practical Introduction to structure, mechanism, and data analysis, New York.
- Copeland, R.A., 2005. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, New Jersey.
- Cousineau, J. ve Chang, T.M.S., 1977. Formation of amino acid from urea and ammonia by sequential enzyme reaction using a microencapsulated multienzyme system, Biochemical and Biophysical Research Communications, 79, 24-31.
- Cullen, D.C., Sethi, R.S. ve Lowe, C.R., 1990. Multi-analyte miniature conductance biosensor, Analytical Chimica Acta, 231, 33-40.
- Demirbas, N., Demirbas, A. ve Karaoglu, S.A., 2005. Synthesis and biological activities of new 1,2,4-triazol-3-one derivatives, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 31, 387-397.
- Demirbas, N., Ugurluoglu, R. ve Demirbas, A., 2002. Synthesis of 3-alkyl(aryl)-4-alkylidenamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones and 3-alkyl-4-alkylamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones as antitumor agents, Bioorganic Medicinal Chemistry, 10, 3717-3723.
- Devesa, S.S., Blot, W.J. ve Fraumeni J.F., 1998. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. Cancer, Esophageal and Gastric Carcinoma Incidence, 83, 2049–2053.
- Did, E.J., Hail, L.R. ve Romero, A., 1994. An explanation for enhanced gastric response to meal in patients with H. Pylori infection, Gastroenterology, 106, 70.
- Dinç, Y., 2009. Üreaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Dixon, N.E., Riddles, P.W., Gazzola, C., Blakeley, R.L. ve Zerner, B., 1980. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. on the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea and related compounds, Canadian Journal of Biochemistry, 58, 1335-1344.
- Dunn, B.E., Campbell, G.P., Perez-Perez, G.L. ve Blaser, M.J., 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*, The Journal of Biological Chemistry, 265, 9464-9469.
- Finnegan, M.G., Kowal, A.T., Werth, M.T., Clark, P.A., Wilcox, D.E. ve Johnson, M.K., 1991. Variable-temperature magnetic circular dichroism spectroscopy as a probe of the electronic and magnetic properties of nickel in jack bean urease, Journal of the American Chemical Society, 113, 4030-4032.
- Gasser, J.K.R., 1964. Urea as a fertilizer, Soil Fertility, 27, 175-180.
- Gordon, A., Popovtzer, M., Greenbaum, M.A., Marantz, C.B., McArthur, M., Palma, J.R. ve Maxwell, M.H., 1969. Zirconium Phosphate - a potentially useful adsorbent in the treatment of chronic uremia, Dialysis Rental Transplant, 5, 86-96.
- Gori, S., Morelli, N., Bellini, G., Bonanni, E., Manca, L., Orlandi, G., Iudice, A. ve Murri, L., 2005. Rizatriptan does not change cerebral blood flow velocity during migraine attacks, Brain Research Bulletin, 65, 297-300.
- Gu, K.F. ve Chang, T.M.S., 1989. Conversion of ammonia or urea into essential amino acids L-Leu, L-Val, L-Ile using artificial cells containing an immobilized multienzyme system and dextran-NAD<sup>+</sup> part IV. Malate dehydrogenase for coenzyme recycling, Journal of Molecular Catalysis, 62, 331-339.
- Gu, K.F. ve Chang, T.M.S., 1988. Conversion of ammonia or urea into essential L-leucine, L-valine, and L-isoleucine using an artificial cell immobilizing multienzyme system and dextran-NADH<sup>+</sup>. I. Glucose dehydrogenase for cofactor recycling, ASAIO-Off, Journal American Society Artificial Internal Organs, 11, 24-28.
- Gu, K.F. ve Chang, T.M.S., 1990. Production of essential L-branched chain amino acids in bioreactors containing artificial cells immobilized multi enzyme systems and dextran-NAD<sup>+</sup>, Biotechnology and Bioengineering, 36, 263-268.
- Guex, N. ve Peitsch, M.C., 1997. Swiss-Model and the Swiss-PDBViewer: an environment for comparative protein modeling, Electrophoresis, 18, 2714-2723.
- Gülerman, N., Rollas, S., Kiraz, M., Ekinçi, A.C. ve Vidin, A., 1997. Evaluation of antimycobacterial and anticonvulsant activities of new 1-(4-fluorobenzoyl)-4-substitutedthiosemicarbazide and 5-(4-fluorophenyl)-4-substituted-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3- thione derivatives, Farmaco, 52, 691-695.
- Hadvary, P., Lengsfeld, H. ve Wolfer, H., 1988. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydropipstatin, Biochemical Journal, 256, 357-61.

- Haijian, S., Zhongyi, W. ve Haoxina, S., 1998. Study on the intramolecular Mannich reaction of 4-amino-3-aryl-2,3-dihydrogen-5-mercapto-1,2,4-triazoles, Synthetic Communications, 28, 3973-3982.
- Hehre, W.J., Ditchfield, R. ve Pople, J.A., 1972. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules, Journal of Chemical Physics, 56, 2257-2261.
- Herbrecht, R., 2004. Posaconazole: a potent, extended-spectrum triazole anti-fungal for the treatment of serious fungal infections, International Journal of Clinical Practice, 58, 612-624.
- Hopkins, A.L. ve Groom, C.R., 2002. The druggable genome, Nature Reviews Drug Discovery, 1, 727-730.
- Howson, C.P., Hiyama, T. ve Wynder, E.L., 1986. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph, Epidemiol Reviews, 8, 1-27.
- Jabri, E., Carr, M.B., Hausinger, R.P. ve Karplus, P.A., 1995. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*, Science, 268, 998-1004.
- Kahveci, B., Bekircan, O. ve Alpay-Karaoğlu, Ş., 2005. Synthesis and antimicrobial activity of some 3-alkyl-4-(arylmethyleneamino)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones, Indian Journal of Chemistry, 44, 2614-2617.
- Kakimoto, S., Sumino, Y., Kawahara, K., Yamazaki, E. ve Nakatsui, İ., 1990. Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*, Applied Microbiology and Biotechnology, 32, 538-543.
- Karplus, P.A., Pearson, M.A. ve Hausinger, R.P., 1997. 70 years of crystalline urease: what have we learned?, Accounts of Chemical Research, 30, 330-337.
- Karthikeyan, M.S., Prasad, D.J., Poojary, B., Subrahmanya Bhat, K., Holla, B.S. ve Kumari, N.S., 2006. Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety, Bioorganic Medicinal Chemistry, 14, 7482.
- Kauffman, C.A. ve Carver, P.L., 1997. Antifungals in the 1990s, Drugs, 53, 539-549.
- Kayastha, A.M. ve Das, N., 1999. A simple laboratory experiment for teaching enzyme immobilization with urease and its application in blood urea estimation, Biochemical Education, 27, 114-117.
- Khan, A., Ali, S. ve Choudhary, M.İ., 2010. Synthesis, antioxidant activities and urease inhibition of some new 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 45, 5200-5207.
- Kot, M., Zaborska, W. ve Juszkiwicz, A., 2000. Inhibition of jack bean urease by thiols calorimetric studies, Thermochimica Acta, 354, 63-69.

- Kömürcü, Ş.G., Rollas, S., Yılmaz, N. ve Çevikbaş, A., 1995. Synthesis of 3-Methyl-4-[(2,4-Dihydro-4-Substituted-3H-1,2,4-Triazole-3-Thione-5-yl)Phenylhydrazono]-5-Isoxazolone and Evaluation of their Antimicrobial Activities, Drug Metabolism and Personalized Therapy, 12, 161-169.
- Krajewska, B., Zaborska, W. ve Leszko, M., 2001. İnhibition of chitosan- immobilized urease by slow- binding inhibitors, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 14, 101-109.
- Krajewska, B. ve Zaborska, W., 2007. Jack bean urease: The effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups, Bioorganic Chemistry, 35, 355-365.
- Krajewska, B., 2009. Ureasases I. functional, catalytic and kinetic properties: review, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 59, 9-21.
- Küçükgülzel, İ., Küçükgülzel, Ş.G., Rollas, S., Ötük-Saniş, G., Özdemir, O., Bayrak, İ., Altuğ, T. ve Stables, J.P., 2004. Synthesis of some 3-(arylkalkylthio)-4-alkyl/aryl-5-(4-aminophenyl)-4H-1,2,4-triazole derivatives and their anticonvulsant activity, II Farmoca, 59, 893-901.
- Laskowski, R.A. ve Swindells, M.B., 2011. LigPlot: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery, Journal of Chemical Information and Modeling, 51, 2778-2786.
- Lee, C., Yang, W. ve Parr, R.G., 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, Physical Review B, 37, 785-789.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constant, Journal of American Chemical Society, 56, 658-661.
- Lipinski, C.A., 2001. Lombardo, F., Dominy, B. W. ve Feeney, P., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Advanced Drug Delivery Reviews, 46, 3-26.
- Lodhi, M.A., Ashiq, U., Jamal, R.A. ve Khan, M.K., 2015. Study of Vanadium Complexes as Novel İnhibitors of Bacillus Pasteurii and Canavalia Ensiformis Urease Enzyme, Journal of the Chemical Society of Pakistan, 37, 549-558.
- Lopez-Munoz, F., Ucha-Udabe, R. ve Alamo, C., 2005. The history of barbiturates a century after their clinical introduction, Neuropsychiatric Disease and Treatment, 1, 329-343.
- Maddila, S., Pagadala, R. ve Jonnalagadda, S.B., 2013. 1,2,4-Triazoles: A Review of Synthetic approaches and the biologicalactivity, Letters Organic Chemistry, 10, 693-714.

- Malbec, F., Milcent, R., Vicart, P. ve Bure, A.M., 1984. Synthesis of new derivatives of 4-amino-2,4-dihydro-1,2,4-triazol-3-one as potential antibacterial agents, Journal of Heterocyclic Chemistry, 21, 1769-1775.
- Marchetti, M., Arico, B., Burrioni, D., Figura, N., Rappuoli, R. ve Ghira, P., 1995. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori*, Science, 267, 1655-1658.
- Martinelli, A.H.S., Kappaun, K., Ligabue-Braun, R., Defferrari, M.S., Piovesan, A.R., Stanisçuaski, F., Demartini, D.R., Dal Belo, C.A., Almeida, C.G.M., Follmer, C., Verli, H., Carlini, C.R. ve Pasquali, G., 2014. Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease, Biochimica et Biophysica Acta, 1840, 935–944.
- Matsumoto, K., 1993. Removal urea from alcoholic beverages by immobilized acid urease, Bioprocess Technology, 16, 255-273.
- Mayer, A.M., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review, Phytochemistry, 7, 2318-2331.
- Miyazawa, M., Oshima, T., Koshio, K., Itsuzaki, Y. ve Anzai, J., 2003. Tyrosinase inhibitor from black rice bran, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6953-6956.
- Mobley, H.L.T. ve Hausinger, R.P., 1989. Microbial ureases: Significacance, regulation and molecular characterization, Microbiological Reviews, 53, 85-108.
- Mobley, H.L., Island, M.D. ve Hausinger, R.P., 1995. Molecular biology of microbial üreases, Microbiol Reviews, 59, 451–480.
- Modzelewska, B. ve Kalabun, J., 1999. Synthesis and biological action of 5-oxo-1,2,4-triazine derivatives, Pharmazie, 54, 503.
- Muhammad, N., Saeed, M., Khan, A., Adhikari, A., Wadood, A., Khan, K.M. ve De Feo, V., 2014. A New Urease İnhibitor from *Viola betonicifolia*, Molecules, 19, 16770-16778.
- Nichols, M.L. ve Willits, C.O., 1934. Reactions of Nessler’s Solution, Journal of American Chemical Society, 56, 769-774.
- Ough, C.S. ve Trioli, G., 1988. Urea removal from wine by an acid urease, American Journal of Enology and Viticulture, 39, 303-307.
- Parkin, D.M., Bray, F.İ. ve Devesa, S.S., 2001. Cancer burden in the year 2000. The global Picture, European Journal of Cancer, 37, 4–66.
- Patzer, J.F., Yao, S.J. ve Wolfson, S., 1995. Ammonia transport across hydrophobic membranes: *ASAİO, Journal*, 41, 132-136.

- Peters, G.E., Radel, R.J., Medina, R.J. ve Agric, J., 1988. Synthesis of Phenoxyaminocyclotriphosphazatrienes, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36, 384-390.
- Polacco, J.C. ve Holland, M.A., 1993. Roles of urease in plant cells, 47, 1189–1195, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, A. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa, Polonya.
- Prakash, S. ve Chang, T.M.S., 1995. Preparation and in vitro analysis of microencapsulated genetically engineered *E. Coli* DH5 cells for urea and ammonia removal, Biotechnology and Bioengineering, 46, 621-626.
- Preininger, C., 1999. The enzymatic determination of mercury and copper using acid urease. The effect of buffers, Microchimica Acta, 130, 209-214.
- Rajesh, Bisht, V., Takashima, B. ve Kaneto, K., 2005. An amperometric urea biosensor onto an electrochemically prepared copolymer poly (*N*-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film, Biomaterials, 26, 3683-3690.
- Ringsdorf, H., Simon, J.F. ve Winnik, M., 1992. Hydrophobically-modified poly(*N*-isopropylacrylamides) in water: probing of the microdomain composition by nonradiative energy transfer, Macromolecules, 25, 5353–5361.
- Rollas, S., Kalyoncuoglu, N., Sur-Altiner, D. ve Yegenoglu, Y., 1993. 5-(4-Aminophenyl)-4-substituted-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4- triazole-3-thiones: Synthesis and antibacterial and antifungal activities, Pharmazie, 48, 308-309.
- Sanchez-Amat, A. ve Solano, F., 1997. A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine alteromonas shares catalytic capabilities, Biochemical and Biophysical Research Communications, 240, 787-79.
- Sansubrino, A. ve Mascini, M., 1994. Development of an optical fiber sensor for the ammonia, urea, urease and IgG, Biosensors Bioelectron, 9, 207-216.
- Seeliger, D. ve Groot, B.L., 2010. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina, Journal of Computer-Aided Molecular Design, 24, 417–422.
- Serwar, M., Akhtar, T., Hameed, S. ve Khan, K.M., 2009. Synthesis, urease inhibition and antimicrobial activities of some chiral 5-aryl-4-(1-phenylpropyl)-2*H*-1,2,4-triazole-3(4*H*)-thiones, Arkivoc, 7, 210–221.
- Shah, M.R. ve Soomro, Z.H., 2012 Enzyme Inhibition and Bioapplications, 303, Sharma, R. R., Pakistan.
- Singhal, R., Gambhir, A. ve Pandey, M.K., 2002. Immobilization of urease on poly (*N*-vinyl carbazole)/stearic acid Langmuir-Blodgett films application to urea biosensor, Biosensors and Bioelectronics, 17, 697-703.

- Sirko, A. ve Brodzik, R., 2000. Review: Plant ureases: Roles and regulation, Acta Biochimica Polonica, 47, 1189-1195.
- Stefano, B., 2000. Structure and function relationship of urease and cytochrome c-553 from *Bacillus Pasteurii*, A thesis the degree of doctor of philosophy, Doktora Tezi, York Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İngiltere.
- Suckling, C.J., 1991. Molecular recognition in applied enzyme chemistry, Experimentia, 47, 11-39.
- Todoulou, O.G., Papadaki-Valiraki, A.E., Ikeda, S. ve Clercq, E.D., 1994. Synthesis and antiviral activity of some new 1H-1,2,4-triazole derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 29, 611-620.
- Tomlinson, T.E., 1970. Urea: Agronomic applications, Proceeding of the Fertiliser Society, 113, 1-76.
- Trott, O. ve Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, Journal of Computational Chemistry, 30, 455-61.
- URL-1, [http://www.enzymeassociation.org/wp-content/uploads/2013/09/benefits\\_paper.pdf](http://www.enzymeassociation.org/wp-content/uploads/2013/09/benefits_paper.pdf)  
Enzyme Technical Association. 9 Ocak 2013.
- Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W. ve Kopple, K.D., 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, Journal of Medicinal Chemistry, 45, 2615-23.
- Wang, S., Lee, M.H., Hausinger, R.P., Clark, P.A., Wilcox, D.E. ve Scott, R.A., 1994. Structure of the Dinuclear Active Site of Urease. X-ray Absorption Spectroscopic Study of Native and 2-Mercaptoethanol-Inhibited Bacterial and Plant Enzymes, Inorganic Chemistry, 33, 1589-1593.
- Wang, W., Köhler, B., Cao, F. ve Liu, L., 2008. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants, Plant Science, 175, 467-477.
- Wakale, V.S., Pattan, S.R. ve Tambe, V., 2013. Therapeutic Importance of 1, 2, 4-Triazole: A Review İtern, International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4, 985-001.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonia, Analytical Chemistry, 39, 971-974.
- Weber, M., Jones, M.J. ve Ulrich, J., 2008. Optimisation of isolation and purification of the jack bean enzyme urease by extraction and subsequent crystallization, Food and Bioproducts Processing, 86, 43-52.



- Winqvist, F., Lundstroem, L. ve Danielsson, B., 1988. Trace level analysis for mercury using urease in combination with an ammonia gas sensitive semiconductor structure, Analytical Letters, 21, 1801-1816.
- Wittekindt, E., Werner, M., Reinicke, A., Herbert, A. ve Hansen, P., 1996. A microtiter-plate urease inhibition assay-sensitive, rapid and cost-effective screening for heavy metal in water, Environmental Technology, 17, 597-603.
- Xu, Y.P., Chen, Y.H., Chen, Z.J., Qin, J., Qian, S.S. ve Zhu, H.L., 2015. Synthesis, Crystal Structures, Molecular Docking, and Urease Inhibitory Activities of Transition-Metal Complexes with a 1,2,4-Triazolecarboxylic Acid Derived Ligand, European Journal of Inorganic Chemistry, 2076-2084.
- Zaborska, W., Kot, M. ve Superata, K., 2015. Inhibition of Jack Bean Urease by 1,4-benzoquinone and 2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone. Evaluation of the Inhibition Mechanism, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 17, 247-253.
- Zhang, L., Mulrooney, S.B., Leung, A.F.K., Zeng, Y., KO, B.B.C., Hausinger, R.P. ve Sun, H., 2006. Inhibition of urease by bismuth (III): Implications for the mechanism of action of bismuth drugs, Bimedical and Life Sciences, 19, 503-511.
- Zonia, L.E., Stebbins, N.E. ve Polacco J.C., 1995. Essential Role of Urease in Germination of Nitrogen-Limited A rabidopsis thaliana Seeds, Plant Physiol, 107, 1097-1103.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1989 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2008-2009 yılları arasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı ve 2013 yılında bu bölümden mezun oldu. 2014 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.