



**T.C.  
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZLENMESİ,  
RADİKAL GİDERME AKTİVİTELERİNİN VE İNSAN  
SERUMUNDAN SAFLAŞTIRILAN PARAOKSONAZ-1 ENZİMİ  
ÜZERİNE *İN VİTRO* İNHİBİSYON ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SAMİR ABBAS ALI NOMA**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. MAHMUT ERZENİN**

**AKSARAY, 2016**





**T.C.  
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZLENMESİ,  
RADİKAL GİDERME AKTİVİTELERİNİN VE İNSAN  
SERUMUNDAN SAFLAŞTIRILAN PARAOKSONAZ-1 ENZİMİ  
ÜZERİNE *İN VİTRO* İNHİBİSYON ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SAMİR ABBAS ALI NOMA**

**DANIŞMAN**

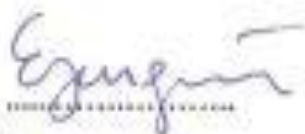
**Doç. Dr. MAHMUT ERZENGİN**

**AKSARAY, 2016**

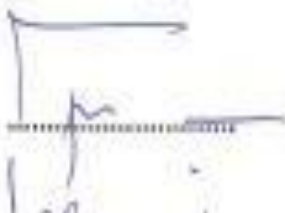
**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**ONAY BELGESİ**

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nden 142305801 numaralı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi, "SAMİR ABBAS ALI NOMA", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "YENİ HIDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZLENMESİ, RADİKAL GİDERME AKTİVİTELERİNİN VE İNSAN SERUMUNDAN SAFLAŞTIRILAN PARAOKSONAZ-1 ENZİMİ ÜZERİNE *IN VITRO* İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri ünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN  
Aksaray Üniversitesi



Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Tuncay TUNÇ  
Aksaray Üniversitesi



Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK  
Balıkesir Üniversitesi



Teslim Tarihi: 22 Aralık 2015

Savunma Tarihi: 20 Ocak 2016

## **DOĞRULUK BEYANI**

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden olduğunu ve bu eserleri her kullanışımda alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

**SAMIR ABBAS ALI NOMA**

## ÖNSÖZ

Hidrazonlar, bir hidrazinin bir keton ya da aldehit ile kondenzasyonu ile elde edilir. Tipik olarak, keskin erime noktalarına sahip kristalin yapılu bileşiklerdir. Hidrozonlar ve türevi bileşikler, kimya alanında bileşiklerden çok amaçlı bir sınıftadır. Son yıllarda hidrazonlar, anti kanser, anti viral, anti-bakteriyel ve anti fungal ajanlar olarak potansiyel uygulamaları nedeniyle genellikle yoğun olarak araştırılmaktadır. Bu bileşikler metal koordinasyonunda çok yönlü özellikler göstermekte ve biyolojik aktiviteleri geçiş metallerine bağlanmalarıyla genellikle artmaktadır. Şelasyon tedavisi, ağır metal zehirlenmesi tedavisinde en başarılı yöntemdir. Endüstrileşme, çevrede ağır metallerin artışına neden olmuş ve sağlık üzerindeki zararlı etkileri sonucunda, ağır metallerin tayininde ve uzaklaştırılmasında bu sonuca bağlı olarak ilgi oluşmuştur.

Bu nedenle, bu çalışmada çeşitli hidrazon türevleri sentezlenmiş ve yapıları X-Işını (XRD), Nükleer Manyetik Rezonans (H-NMR), Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR), Ultraviyole-Görünür spektrofotometre (UV-VIS) taramaları ve elementel analiz ile aydınlatılmıştır. Tüm yeni sentezlenmiş bileşikler, serbest radikal sönmüleme aktivitelerinin 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) metodu ile görüntülenmesi için denenmiştir. Ayrıca, bu yeni bileşiklerin saflaştırılmış insan serum paraoksonaz1 üzerine inhibitör etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir.

Bu yüksek lisans tezi Aksaray Üniversitesi Araştırma Kurulu (proje numarası: 2015-085) tarafından finansal olarak desteklenmiştir. Bu desteği için Aksaray Üniversitesi'ne minnettarız.

## **TEŞEKKÜR**

Çalıőmalarım boyunca maddi ve manevi her konuda destek olan, sabrı ve hoőgörüőüyle fikirlerini, deneyimlerini esirgemedен paylaşan değerli danıőmanım Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN'e,

Çalıőmalarım sırasında desteğinden ve bilgilerinden faydalandığım Doç. Dr. Tuncay TUNÇ'a,

Çalıőmalarımda yardımını esirgemeyen Balıkesir Üniversitesi'nden arkadaőım Beste ŐİPAL'e,

Bütün hayatım boyunca maddi ve manevi fedakarlıkları ile bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, her konuda beni destekleyen ve her zaman da destekleyeceklerine inandığım canım AİLEM'e,

Bu çalışmada bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen bütün arkadaőlarıma SONSUZ teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>i</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Schiff Bazı ve Hidrazon.....	1
1.2 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....	4
1.3 Paraoksanaz Enzimi Hakkında Genel Bilgiler.....	10
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ</b> .....	<b>18</b>
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM</b> .....	<b>25</b>
3.1 Malzeme.....	25
3.1.1 Deneyleerde kullanılan kimyasal maddeler.....	25
3.1.2 Deneyleerde kullanılan alet ve cihazlar.....	25
3.1.3 Deneyleerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.....	26
3.2 Yöntemler.....	29
3.2.1 Hidrazon bileşiklerinin sentezi.....	29
3.2.1.1 1-(5-bromo-2,3-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il) hidrazin (B-2,3-MBPyH) bileşiğinin sentezi.....	29
3.2.1.2 1-(5-bromo-2,4-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (B-2,4-MBPyH) bileşiğinin sentezi.....	29
3.2.1.3 1-(2,4-bis(triflorometil)benziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazi(2,4-FMBPyH) bileşiğinin sentezi.....	30
3.2.1.4 1-(3,5-bis (triflorometil) benziliden)-2-(benzo[d] tiazol-2-il) hidrazin (3,5-FMBThH) bileşiğinin sentezi.....	30
3.2.2 Antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.....	31
3.2.2.1 DPPH radikal giderme aktivitesi.....	31
3.2.3 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile paraoksanaz saflaştırılması.....	32
3.2.3.1 Hidrofobik afinite kolonunun hazırlanışı.....	32
3.2.3.1.1 CNBr ile Sefaroz-4B'deki OH gruplarının aktivasyonu.....	32
3.2.3.1.2 L-tirozin bağlanması.....	32
3.2.3.1.3 1-Naftilamin'in diazotasyonu ve Sepharose-4B-L-tirozin'e bağlanması.....	33
3.2.3.2 Kanın toplanması ve santrifüj.....	33
3.2.3.3 Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi.....	34
3.2.3.4 Hidrofobik etkileşim kromatografisi.....	34
3.2.3.5 Paraoksanaz enzim aktivite tayini.....	35
3.2.3.6 Toplam protein tayini.....	35
3.2.3.7 Optimum şartlarda $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması.....	36



3.2.3.8 Hidrazon bileşiklerinin IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunması.....	36
3.2.3.9 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü.....	36
<b>4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>37</b>
4.1 Hidrazon Türevlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	37
4.1.1 Türev 1: B-2,3-MBPyH.....	37
4.1.1.1 FTIR spektrumu.....	37
4.1.1.2 Elementel analiz verileri.....	38
4.1.1.3 UV-VIS absorpsiyonu.....	39
4.1.1.4 NMR spektrumu.....	40
4.1.1.5 X-Işını kırınım çalışması.....	41
4.1.2 Türev 2: B-2,4-MBPyH.....	47
4.1.2.1 FTIR spektrumu.....	47
4.1.2.2 Elementel analiz verileri.....	48
4.1.2.3 UV-VIS absorpsiyonu.....	49
4.1.2.4 NMR spektrumu.....	50
4.1.2.5 X-Işını kırınım çalışması.....	51
4.1.3 Türev 3: 2,4-FMBPyH.....	57
4.1.3.1 FTIR spektrumu.....	57
4.1.3.2 Elementel analiz verileri.....	58
4.1.3.3 UV-VIS absorpsiyonu.....	59
4.1.3.4 NMR spektrumu.....	60
4.1.3.5 X-Işını kırınım çalışması.....	61
4.1.4 Türev 4: 3,5-FMBThH.....	69
4.1.4.1 FTIR spektrumu.....	69
4.1.4.2 Elementel analiz verileri.....	70
4.1.4.3 UV-VIS absorpsiyonu.....	71
4.1.4.4 NMR spektrumu.....	72
4.1.4.5 X-Işını kırınım çalışması.....	73
4.2 DPPH Radikali Giderme Aktivitesi.....	79
4.3 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile hPON1 saflaştırılması ve saflaştırılan PON1 Aktivitesine Hidrazon Türevlerinin İnhibisyon etkilerinin İncelenmesi.....	83
4.3.1 HEK ile insan serumundan hPON1 enziminin saflaştırılması.....	83
4.3.2 K <sub>m</sub> , V <sub>max</sub> ve V <sub>max</sub> / K <sub>m</sub> değerlerin belirlenmesi.....	84
4.3.3 SDS-PAGE elektroforezi.....	88
4.3.4 hPON1 aktivitesi üzerine, paraokson substratı kullanılarak, hidrazon türevlerinin IC <sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi.....	89
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>102</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>104</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>115</b>

## ÖZET

### YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZLENMESİ, RADİKAL GİDERME AKTİVİTELERİNİN VE İNSAN SERUMUNDAN SAFLAŞTIRILAN PARAOKSONAZ-1 ENZİMİ ÜZERİNE *İN VİTRO* İNHİBİSYONETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, dört yeni hidrazon türevi sentezlenmiş ve yapıları X-Işını (XRD), Nükleer Manyetik Rezonans (H-NMR), Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR), Ultraviyole-Görünür spektrofotometre (UV-VIS) taramaları ve elementel analiz teknikleri ile aydınlatılmıştır. Tüm yeni sentezlenmiş bileşikler, 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) yöntemiyle serbest radikal giderme aktiviteleri için taramaya tabi tutulmuştur. En düşük IC<sub>50</sub> değerine (0,185 mg/mL) sahip B-2,4-MBPyH bileşiği, DPPH için en yüksek serbest radikal giderme aktivitesi göstermiştir.

Paraoksonaz1 (PON1: EC 3.1.8.1) yüksek yoğunluklu lipoproteinlere (HDL) sıkıca bağlı, yapısında kalsiyum içeren bir metalo enzimdir ve memelilerde düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonuna karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır. Bu çalışmada, insan serum paraoksonaz1 (hPON1) enzimi, iki-aşamalı yöntem ile; amonyum sülfat çöktürmesi ve Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde, 43 kDa molekül ağırlığında tek bir band göstermiştir. Saflaştırılan enzim 21,22 U/mg spesifik aktiviteye sahiptir. Kullanılan yöntem ile % 17,484 verim ve 561,375 saflaştırma derecesine ulaşılmıştır. Ayrıca, paraokson substrat olarak kullanılarak, saflaştırılmış enzimin K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri sırayla 0,018496 mM ve 114,96 U/mL olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, sentezlenen yeni bileşiklerin saflaştırılmış hPON1 üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri de incelenmiştir. Sonuçlar, tüm hidrazin türevlerinin hPON1 enzim aktivitesini derişime bağlı olarak inhibe ettiğini göstermiştir. Çalışılan hidrazon türevleri arasında, en düşük IC<sub>50</sub> değerine (0,0138 mg/mL) sahip B-2,3-MBPyH bileşiğinin hPON1 aktivitesi için en etkin inhibitör olduğu bulunmuştur. Bu çalışma, hPON1 aktivitesinin, çalışılan hidrazon türevlerine karşı oldukça yüksek derecede hassas olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Schiff Bazı, Hidrazon Türevleri, DPPH, hPON1, İnhibisyon, Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi.

## ABSTRACT

### SYNTHESIS OF NOVEL HYDRAZONE DERIVATIVES, SCREENING OF THEIR FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITIES AND EVALUATION OF THEIR *IN VITRO* INHIBITORY EFFECTS ON PURIFIED HUMAN SERUM PARAOXONASE-1

In this study, four new hydrazone derivatives were synthesized and their structures have been elucidated by X-Ray Diffraction (XRD), Nuclear Magnetic Resonance (H-NMR), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-VIS) scanning and elemental analysis techniques. All the newly synthesized compounds were subjected to screening for their free radical scavenging activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. Compound B-2,4-MBPyH with the lowest IC<sub>50</sub> value of (0.185 mg/mL) showed the highest free radical scavenging activity of DPPH.

Paraoxonase-1 (PON1: EC 3.1.8.1) is a calcium-dependent enzyme associated with high-density lipoproteins (HDLs) and has a protective effect against oxidation of low-density lipoproteins (LDLs) in mammals. In this study, human serum paraoxonase1 (hPON1) was purified using two-step procedures, namely ammonium sulphate precipitation and Sepharose-4B-L-tyrosine-1-naphthylamine hydrophobic interaction chromatography. SDS–polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme showed a single band with an apparent MW of 43 kDa. The purified enzyme had a specific activity of 21.22 U/mg. The overall purification fold and yield were found to be % 17.484 and 561.375 respectively. Furthermore, using the paraoxon as a substrate, we determined the K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values of the purified enzyme, as 0.018496 mM and 114.955 U/mL, respectively. In this study, *in vitro* inhibition effect of these synthesized novel compounds on purified hPON1 were also investigated by using paraoxon as a substrate. The results showed that all the hydrazone derivatives inhibited the hPON1 enzyme activity in a concentration-dependent fashion. Among the studied hydrazone derivatives, B-2,3-MBPyH was found to be the most effective inhibitor for hPON1 activity, with the lowest IC<sub>50</sub> values of (0.0138 mg/mL). The present study has demonstrated that hPON1 activity is very highly sensitive to studied hydrazone derivatives.

**Key Words:** Schiff Base, Hydrazone Derivatives, DPPH, hPON1, Inhibition, Hydrophobic Interaction Chromatography.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1:	Schiff bazlarının genel yapısı..... 1
Şekil 1.2:	Schiff baz oluşumu..... 2
Şekil 1.3:	Okisjenin indirgenme basamakları..... 6
Şekil 1.4:	Haber-Weiss reaksiyonu..... 6
Şekil 1.5:	Fenton reaksiyonu..... 6
Şekil 1.6:	DPPH' in serbest radikallerle reaksiyonu..... 9
Şekil 1.7:	DPPH'daki mordan sarıya renk değişimi..... 10
Şekil 1.8:	Paraokson, diazokson ve fenil asetatın PON1 tarafından hidrolizi ve sinir ajanları sarin ve somon'un yapıları..... 11
Şekil 1.9:	Paration insektisid metabolizması..... 11
Şekil 1.10:	Siklosarin'in AChE'in aktif bölgesinde yer alan serin amino asidi ile etikleşimi..... 12
Şekil 1.11:	Serum PON1 tarafından OP'ın hidrolizi..... 12
Şekil 1.12:	PON1'in üç boyutlu yapısı..... 14
Şekil 1.13:	HDL partiküllerinin PON1 taşıması..... 15
Şekil 1.14:	PON1'in HDL'ye bağlanması..... 15
Şekil 1.15:	Paraoksonaz'ın katalitik mekanizması..... 16
Şekil 1.16:	PON1 gen polimorfizmi..... 17
Şekil 3.1:	1-(5-bromo-2,3-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (B-2,3-MBPyH) bileşğinin sentezi..... 29
Şekil 3.2:	1-(5-bromo-2,4-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (B-2,4-MBPyH) bileşğinin sentezi..... 30
Şekil 3.3:	1-(2,4-bis (triflorometil) benziliden)-2-(piridin-2-il) hidrazin (2,4-FMBPyH) bileşğinin sentezi..... 30
Şekil 3.4:	1-(3,5-bis (triflorometil) benziliden)-2-(benzo[d] tiazol-2-il) hidrazin (3,5-FMBThH) bileşğinin sentezi..... 31
Şekil 3.5:	Sepharose-4B aktivasyonu..... 32
Şekil 3.6:	L-tirozin bağlanması..... 32
Şekil 3.7:	1-naftilamin bağlanması..... 33
Şekil 3.8:	PON1 ile paraoksan reaksiyonu..... 35
Şekil 4.1:	B-2,3-MBPyH' nın FTIR spektrumu..... 37
Şekil 4.2:	B-2,3-MBPyH için UV-VIS absorpsiyonu..... 39
Şekil 4.3:	B-2,3-MBPyH için NMR spektrumu..... 40
Şekil 4.4:	B-2,3-MBPyH' ın ORTEP çiziminin, % 50 olasılık seviyesinde ve etiketleme şemasında yer değiştirme elipsoidiyle gösterimi..... 41
Şekil 4.5:	B-2,3-MBPyH'ın <i>b</i> -ekseni boyunca kristal paketinin görünümü..... 43
Şekil 4.6:	B-2,3-MBPyH'ın <i>a</i> -ekseni boyunca kristal paketinin görünümü..... 43
Şekil 4.7:	B-2,4-MBPyH için FTIR spektrumu..... 47

<b>Şekil 4.8:</b>	B-2,4-MBPyH için UV-VIS absorpsiyonu.....	49
<b>Şekil 4.9:</b>	B-2,4-MBPyH için NMR spektrumu.....	50
<b>Şekil 4.10:</b>	B-2,4-MBPyH' in ORTEP çiziminin, % 50 olasılık seviyesinde ve etiketleme şemasında yer değiştirme elipsoidiyle gösterimi.....	51
<b>Şekil 4.11:</b>	B-2,4-MBPyH'in <i>b</i> -ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.....	53
<b>Şekil 4.12:</b>	B-2,4-MBPyH'in <i>a</i> -ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.....	53
<b>Şekil 4.13:</b>	2,4-FMBPyH için FTIR spektrumu.....	57
<b>Şekil 4.14:</b>	2,4-FMBPyH için UV-VIS absorpsiyonu.....	59
<b>Şekil 4.15:</b>	2,4-FMBPyH için NMR spektrumu.....	60
<b>Şekil 4.16:</b>	2,4-FMBPyH' in ORTEP çiziminin, % 50 olasılık seviyesinde ve etiketleme şemasında yer değiştirme elipsoidiyle gösterimi.....	61
<b>Şekil 4.17:</b>	2,4-FMBPyH'in <i>b</i> -ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.....	63
<b>Şekil 4.18:</b>	2,4-FMBPyH'in <i>a</i> -ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.....	63
<b>Şekil 4.19:</b>	3,5-FMBThH için FTIR spektrumu.....	69
<b>Şekil 4.20:</b>	3,5-FMBThH için UV-VIS absorpsiyonu.....	71
<b>Şekil 4.21:</b>	3,5-FMBThH için NMR spektrumu.....	72
<b>Şekil 4.22:</b>	3,5-FMBThH' in ORTEP çiziminin, % 50 olasılık seviyesinde ve etiketleme şemasında yer değiştirme elipsoidiyle gösterimi.....	73
<b>Şekil 4.23:</b>	3,5-FMBThH'in <i>b</i> -ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.....	75
<b>Şekil 4.24:</b>	3,5-FMBThH'in <i>a</i> -ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.....	75
<b>Şekil 4.25:</b>	DPPH radikalleri üzerinde B-2,3-MBPyH'nin giderme aktivitesi.....	79
<b>Şekil 4.26:</b>	DPPH radikalleri üzerinde B-2,4-MBPyH'nin giderme aktivitesi.....	80
<b>Şekil 4.27:</b>	DPPH radikalleri üzerinde 2,4-FMBPyH'nin giderme aktivitesi.....	80
<b>Şekil 4.28:</b>	DPPH radikalleri üzerinde 3,5-FMBThH'nin giderme aktivitesi.....	81
<b>Şekil 4.29:</b>	DPPH radikalleri üzerinde BHT'nin (0.1-1.0 mg / mL) giderme aktivitesi.....	81
<b>Şekil 4.30:</b>	DPPH radikaller üzerinde BHT'nin (1,0-5,0 mg / ml) giderme aktivitesi.....	82
<b>Şekil 4.31:</b>	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile insan kanı serumundan PON1'in elüsyon profili.....	83
<b>Şekil 4.32:</b>	hPON1' in Lineweaver-Burk grafiği.....	86
<b>Şekil 4.33:</b>	hPON1 için SDS-PAGE.....	88
<b>Şekil 4.34:</b>	Saflaştırılan hPON1 üzerine B-2,3-MBPyH'nin inhibisyon etkisi.Yüzde aktiviteye karşı B-2,3-MBPyH konsantrasyon Grafiği.....	92
<b>Şekil 4.35:</b>	Saflaştırılan hPON1 üzerine B-2,4-MBPyH'nin inhibisyon etkisi.Yüzde aktiviteye karşı B-2,4-MBPyH konsantrasyon grafiği.....	92
<b>Şekil 4.36:</b>	Saflaştırılan hPON1 üzerine 2,4-FMBPyH'nin inhibisyon etkisi.Yüzde aktiviteye karşı 2,4-FMBPyH konsantrasyon grafiği...	95
<b>Şekil 4.37:</b>	Saflaştırılan hPON1 üzerine 3,5-FMBThH'nin inhibisyon etkisi.Yüzde aktiviteye karşı 3,5-FMBThH konsantrasyon grafiği...	95

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 3.1:</b> SDS-PAGE'de kullanılan jel karışımlarının miktarları.....	28
<b>Çizelge 4.1:</b> B-2,3-MBPyH'nin deneysel verileri.....	38
<b>Çizelge 4.2:</b> B-2,3-MBPyH için kristal verileri ve yapı saflaştırma detayları.....	42
<b>Çizelge 4.3:</b> Hidrojen bağ mesafeleri (°A) ve açıları (°).....	42
<b>Çizelge 4.4:</b> B-2,3-MBPyH'in bağ mesafeleri (°A).....	44
<b>Çizelge 4.5:</b> B-2,3-MBPyH'in bağ açıları (°).....	45
<b>Çizelge 4.6:</b> B-2,3-MBPyH'in torsiyon açıları.....	46
<b>Çizelge 4.7:</b> B-2,4-MBPyH'nin deneysel verileri.....	48
<b>Çizelge 4.8:</b> B-2,4-MBPyH için kristal verileri ve yapı saflaştırma detayları.....	52
<b>Çizelge 4.9:</b> Hidrojen bağ mesafeleri (°A) ve açıları (°).....	52
<b>Çizelge 4.10:</b> B-2,4-MBPyH'in bağ mesafeleri (°A).....	54
<b>Çizelge 4.11:</b> B-2,4-MBPyH'in bağ açıları (°).....	55
<b>Çizelge 4.12:</b> B-2,4-MBPyH'in torsiyon açıları.....	56
<b>Çizelge 4.13:</b> 2,4-FMBPyH'nin deneysel verileri.....	58
<b>Çizelge 4.14:</b> 2,4-FMBPyH için kristal verileri ve yapı saflaştırma detayları.....	62
<b>Çizelge 4.15:</b> Hidrojen bağ mesafeleri (°A) ve açıları (°).....	62
<b>Çizelge 4.16:</b> 2,4-FMBPyH'in bağ mesafeleri (°A).....	64
<b>Çizelge 4.17:</b> 2,4-FMBPyH'in bağ açıları (°).....	65
<b>Çizelge 4.18:</b> 2,4-FMBPyH'in torsiyon açıları (°).....	67
<b>Çizelge 4.19:</b> 3,5-FMBThH'nin deneysel verileri.....	70
<b>Çizelge 4.20:</b> 3,5-FMBThH için kristal verileri ve yapı saflaştırma detayları.....	74
<b>Çizelge 4.21:</b> Hidrojen bağ mesafeleri (°A) ve açıları (°).....	74
<b>Çizelge 4.22:</b> 3,5-FMBThH'in bağ mesafeleri (°A).....	76
<b>Çizelge 4.23:</b> 3,5-FMBThH'in bağ açıları (°).....	77
<b>Çizelge 4.24:</b> 3,5-FMBThH'in torsiyon açıları (°).....	78
<b>Çizelge 4.25:</b> Test edilen hidrazon türevlerinin IC <sub>50</sub> değerleri (radikal giderme deneyleri için) ve standart antioksidan BHT (butillenmiş hidroksitoluen).....	82
<b>Çizelge 4.26:</b> İnsan serum PON1 enzimi için paraokson substratı kullanılarak, K <sub>m</sub> ve V <sub>max</sub> değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S] değerleri.....	85
<b>Çizelge 4.27:</b> hPON1' in kinetik değerleri.....	86
<b>Çizelge 4.28:</b> hPON1'in saflaştırılmasını içeren basamakların özeti.....	87
<b>Çizelge 4.29:</b> hPON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren B-2,3-MBPyH'ır IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	90

<b>Çizelge 4.30:</b>	hPON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren B-2,4-MBPyH'ın IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	91
<b>Çizelge 4.31:</b>	hPON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren B-2,4-FMBPyH'ın IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	93
<b>Çizelge 4.32:</b>	hPON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 3,5-FMBThH'ın IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	94
<b>Çizelge 4.33:</b>	hPON1 üzerinde test edilen hidrazon türevlerinin IC <sub>50</sub> değerleri (mg/mL).....	96

## KISALTMALAR DİZİNİ

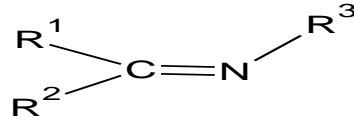
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>RNOS</b>	Reaktif Oksijen Türleri ve Nitrik Oksit
<b>nNOS</b>	Nöronal Nitrik Oksit Sentez
<b>iNOS</b>	İndüklenebilir Nitrik oksit Sentez
<b>eNOS</b>	Endotel Nitrik Oksit Sentez
<b>PON1</b>	Paraoksonaz Enzim
<b>hPON1</b>	Human Serum Paraoksonaz Enzim
<b>HDL</b>	Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler
<b>LDL</b>	Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (Kötü Kolesterol)
<b>TEMED</b>	N,N,N', N' -Tetrametiletildiamin
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>DPPH</b>	2, 2-difenil-1-picrylhydrazyl
<b>BHT</b>	Bütilli Hidroksi Toluen
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>APS</b>	Amonyum Persülfat
<b>rpm</b>	Dakikadaki Devir Sayısı
<b>HEC</b>	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
<b>U</b>	Enzim Ünitesi
<b>IC<sub>50</sub></b>	%50 İnhibisyona Neden Olan İnhibitör Konsantrasyonu
<b>OP</b>	Organo Fosfat Bileşiği
<b>dk</b>	Dakika
<b>mL</b>	Mililitre
<b>°C</b>	Santigrat Derece
<b>g</b>	Gram
<b>UV-VIS</b>	Ultraviyole-Görünür spektrofotometre
<b>FTIR</b>	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre
<b>XRD</b>	X-Işını
<b>H-NMR</b>	Nükleer Manyetik Rezonans



# 1. GİRİŞ

## 1.1 Schiff Bazı ve Hidrazon

Schiff bazlarının ve türevlerinin çok büyük kısmı, oksijene geri dönüşümlü bağlanma yetenekleri [1], olefinlerin hidrojenasyonundaki katalitik aktiviteleri [2], amino grup transferi [3], fotokromik özellikler [4] ve bazı toksik metaller üzerinden kompleks yapabilme yetenekleri [5] gibi ilgi çekici ve önemli özelliklerinden dolayı çalışılmıştır. Schiff bazlarının geçiş metal iyonlarına karşı şelasyonu için yüksek ilgisi, katı komplekslerinin hazırlanmasında değerlendirilmiştir. Schiff bazları primer aminlerin ve karbonil bileşiklerinin kondenzasyon ürünleridir ve Nobel ödüllü Alman kimyacı Hugo Schiff tarafından 1864'te keşfedilmiştir [6]. Schiff baz ligandları, koordinasyon kimyası alanında, özellikle Schiff baz komplekslerinin geliştirilmesinde metal iyonlarıyla potansiyel kararlı kompleksler oluşturma kabiliyetleri nedeniyle önemlidir [7].

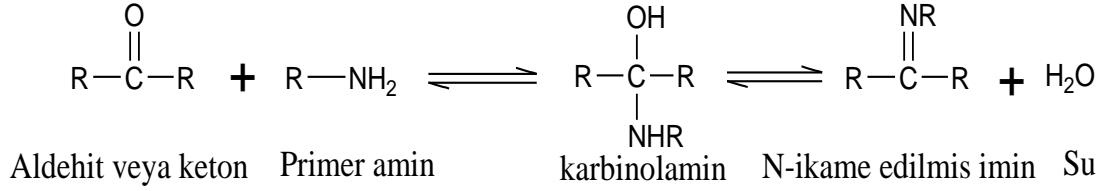


$R^1, R^2,$  ve /veya  $R^3 =$  alkil veya aril

**Şekil 1.1:** Schiff bazlarının genel yapısı.

Schiff bazı, aril ya da alkil grubuna bağlı azot atomu üzerinden azot-karbon çifte bağı içeren fonksiyonel gruba sahip bir bileşiktir. Genel olarak, R grubu organik yan zincir olmak üzere  $R^1R^2C=NR^3$  formülündedir. Schiff bazları, genel yapısı  $RCH=NR$  olan ikincil aldiminlerden küçük farkla (azometinlerde karbon grubuna hidrojen atomu bağlıdır) azometin yapısına benzerdir.  $R^3$  grubunun bir fenil ya da substitüe fenil olduğunda, bir anilinden türetilen Schiff baz anil olarak adlandırılabilir. Schiff bazları ayrıca iminler olarak da ifade edilmektedir. Schiff bazı azotu üzerindeki zincir, biyolojik sistemlerdeki transaminasyon ve rasemizasyon reaksiyonlarının mekanizmalarını açıklamaya yardım eden imin grubunu kararlı hale getirir. İminlerin hazırlanması için en yaygın metot Schiff tarafından keşfedilen özgün reaksiyondur [8].

Schiff bazı, C=O grubunun C=N=R grubuyla yer değiştirdiği aldehitin ya da ketonun azot analogudur. Schiff bazın bir aldehit ya da ketondan oluşunu tersinir bir reaksiyondur ve genellikle asit veya baz katalizi altında ya da ısıtma ile gerçekleşmektedir. Bu oluşum, genellikle ürünün ayrılmasına ya da suyun uzaklaştırılmasına veya her ikisi ile tamamlanmaya sürüklenir. Bazı Schiff bazları aldehitlere veya ketonlara ve aminlere sulu asit veya baz ile, aşağıdaki gibi geri hidrolize edilebilir (şekil 1.2).



**şekil 1.2:**Schiff baz oluşumu.

Schiff bazları, enzimin substratın amino veya karbonil grubu ile etkileşimini içeren bir çok enzimatik reaksiyonda önemli ara ürünlerdir. Katalitik mekanizmanın en önemli türlerinden biri, genellikle bir enzimde lizin kalıntısı üzerinden birincil amin imin ya da Schiff baz oluşturmak için substratın karbonil grubu ile kondenzasyonunu içeren biyokimyasal süreçlerdir. Schiff bazlarının karbon azot ifte bağı, karbon-oksijen ifte bağına benzer olarak metal hidrür kompleksleri tarafından kolayca indirgenir. Bu şekilde indirgenme, amino bileşiklerindeki C=N bağının dönüşümü için büyük olasılıkla en etkili ve uygun yöntemdir. Schiff bazları antimikobakteriyel [9-11], antimikrobiyal [12] ve antikonvülsan [13] gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösterirler[14].

Schiff baz kompleksleri, sentetik esnekliği ve yapısal çeşitliliği nedeniyle geçiş metal koordinasyon kimyasındaki en önemli stereokimyasal modellerden biridir [15]. Schiff baz kompleksleri genellikle koordinasyon kimyasında kataliz, enzimatik reaksiyon, manyetizma ve moleküler yapı ile ilgili ligand olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda, alken epoksidasyonuna karşı verici ve katalitik özellikleri bakımından simetrik olmayan salen tipi ligandlara benzerlikleri nedeniyle hidrazon ligandları da önemlidir [16]. Hidrazon ligandları genellikle analitik kimyada geçiş metal bağlayıcıları [17, 18] ve eser metal iyonlarının tayininde şelatlayıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Çeşitli kimyasal ve fotokimyasal reaksiyonlarda [19, 20], fen ve teknoloji, tıp alanlarında çeşitli endüstriyel uygulamalarda [21] da geniş uygulamalara sahiptir.

Hidrazon türevlerinin bazıları, anemi ve talasemi gibi genetik hastalıkların tedavisinde demir şelatlayıcı ilaçlar olarak uygulanmıştır [22, 23].

Hidrazonlar, hidrazinlerin aldehitler ya da ketonlar ile pH 4-5'te kondenzasyonu [24] sonucu oluşan keskin erime noktasına sahip kristal yapılu bileşiklerdir. Fenilhidrazinler (ya da substitüe halleri), aldehit (ya da substitüe halleri) ve ketonlarla düzenli yoğunlaşarak fenilhidrazonları verir. Bu nedenle, bu bileşikler aldehitlerin ve ketonların hangi hidrazonlardan oluşturulduğunu belirlemek için kullanılabilir. Hidrazonlar, yüksek molekül ağırlıkları çoğu çözücü içerisinde düşük çözünürlüğe neden olduğundan ve bu şekilde daha kolay izole edilebildiklerinden ve tekrar kristallenebildiklerinden bu amaç için çoğu zaman oksimlerden daha uygundur. Hidrazonlar ve metal kompleksleri tıp, teknoloji ve analitik kimya alanlarında, örnek olarak aromatik hidrazon türevlerinin düşük molekül kütleli aldehit ve ketonlar derişimlerinin ölçülmesinde kullanılması, geniş çapta uygulamaları için özel ilgi kazanmıştır. Hidrazonlar, potansiyel uygulamaları ve antimikobakteriyel, antikanser, antiviral ve antifungal ajanlar olarak çok çeşitli biyolojik uygulamaları nedeniyle yoğun olarak incelenmiştir.

Hidrazid ve hidrazon ligandları yapısal esneklikleri nedeniyle şelatlama kabiliyetleri farklıdır, iki dişli veya üç dişli birim olarak görev alabilirler [25]. Hidrazonlar çok yönlü şelatlayıcı davranışları nedeniyle kapsamlı araştırmaların konusu olmuştur, bu nedenle analitik kimyada çeşitli geçiş metallerinin spektroskopik tayininde seçici metal ekstraksiyon ajanı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hidrazonlar, formazanların sentezi için kullanışlıdır. Formazonlar okside olduklarında tetrazolyum tuzlarını oluştururlar [26]. Tetrazolyum tuzları hücrelerde enzimler tarafından tekrar formazonlara dönüştürülür ve dokuyu boyar. Tetrazolyum formazan sistemi canlılığın bir göstergesi olarak kabul edilir [27].

Hidrazonlar çoğu geçiş metal iyonu ile kolayca kararlı kompleksler oluşturduklarından metal komplekslerinin sentezi için kullanışlıdır. Hidrazon temelli kenetleme metodları medikal biyoteknolojide tipi belirli kanser hücrelerine karşı işaretlenmiş antikör ilaçların bağlanması için kullanılmaktadır. Hidrazon-temelli bağlama metodları, belirli bir tip kanser hücrelerine karşı işaretlenmiş antikörlere ilaçların bağlanması için medikal biyoteknolojide kullanılır. Hidrazon temelli bağlar nötral pH değerinde (kanda) kararlıdır, fakat hücre lizozomlarının asidik çevresinde hızlıca kırılır. İlaç etkisini gösterdiği yerde, hücrede salınır. Sulu

çözeltide alifatik hidrazonlar, analogları oksimlere göre hidrolize  $10^2$ - $10^3$  kat daha hassastır.

Yukarıda belirtildiği üzere, hidrazinler hidrazonların sentezi için kullanılmaktadır. Diazan veya tetrahidridodinitrojen (N-N) olarak isimlendirilen hidrazin,  $H_2NNH_2$  ( $N_2H_4$ ) kimyasal formülüne sahip anorganik bir bileşiktir. Renksiz, amonyak benzeri kokuya sahip yanıcı bir sıvıdır. Çözeltide tutulmadığı sürece tehlikeli şekilde kararsız ve oldukça toksiktir [28]. Hidrazin temel olarak polimer köpüklerinin hazırlanmasında köpürtücü ajan olarak kullanılmaktadır, fakat belirgin uygulamaları polimerizasyon katalizörleri ve farmasötikler için öncül olarak kullanımını içerir. Hidrazinler çeşitli roket yakıtlarında ve hava yastıklarında kullanılan gaz öncüllerinin hazırlanmasında kullanılır. Ayrıca, hem nükleer hem de geleneksel elektrik santrali enerji dönüşümlerinde korozyonu azaltmak amacıyla çözünmüş oksijen derişimlerinin kontrolü için oksijen tutucu olarak kullanılır.

## **1.2 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar**

Serbest radikaller son yörüngesinde eşleşmemiş elektron taşıyan moleküllerdir. Bir radikal, bir moleküldeki atomları bir arada tutan kovalent bağın kırılması ile kolayca oluşabilir ve oluşan her bir yeni atom üzerlerinde eşleşmemiş bir elektron bulundurur. Enzimatik bir reaksiyon esnasında enzimin aktif bölgesinde oluşan radikaller, protein molekülünden ayrılıp başka moleküllerle etkileşime geçmediği sürece radikal olarak kabul edilmezler. Radikaller eşleşmemiş elektronları nedeniyle oldukça reaktiftirler. Eşleşmemiş bir elektron varlığı bütün radikallerin ortak özelliğidir. Çoğu radikaller kararlı değildirler ve oldukça reaktiftirler. Diğer moleküllerden elektron alabilmeleri veya elektron verebilmeleri nedeniyle oksitleyici veya indirgeyici olarak davranırlar [29].

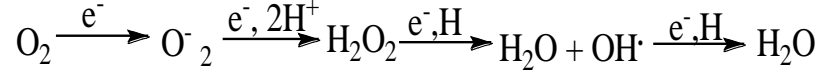
Radikaller oldukça reaktiftirler ve kendi orbitallerini tamamlamak için diğer komşu moleküllerden bir elektron alarak zincir reaksiyonlarını başlatırlar. Geçiş metalleri (Fe, Cu, ve Mo vs.) son yörüngelerinde tek elektron taşımalarına rağmen genellikle serbest radikal olarak kabul edilmezler. Çünkü oldukça kararlıdırlar, zincir reaksiyonlarını başlatmazlar ve hücre içinde proteinlere bağlı olarak bulunurlar. Serbest radikaller hücre içinde önemli moleküllere bağlanmasıyla hemostatik bozulma ve hücre hasarına yol açarlar. Vücuttaki her türlü molekül serbest radikallerin hedefidir. Bunların arasında, lipidler, nükleik asitler ve proteinler başlıca

hedeftirler. Serbest radikallerin çevresel faktörler, sağlıksız yiyecekler, sigara, radyasyon ve buna benzeri nedenlerden dolayı üretildiği düşünülmektedir.

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS) insan vücudunda normal gerekli metabolik süreçler aracılığıyla veya X-ışınları, ozon, sigara dumanı, hava kirliliği ve endüstriyel kimyasallara maruz kalma gibi bir takım dış kaynaklar nedeni ile de üretilmektedir [30]. Hücrelerde serbest radikal dönüşümü hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonların sonucu olarak sürekli oluşmaktadır. Prostaglandinlerin sentezi ve solunum zinciri reaksiyonları serbest radikallerin üretildiği enzimatik reaksiyonlardan bir kaç tanesidir [31]. Serbest radikaller aynı zamanda iyonize reaksiyonlar tarafından başlatılanlarda olduğu gibi oksijenin organik moleküllerle enzimatik olmayan reaksiyonu sonucunda da oluşurlar.

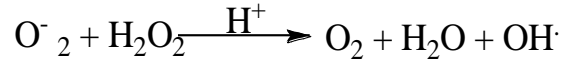
Serbest radikal çevresindeki bir bileşik veya molekülden bir elektron aldığı zaman yeni bir radikal formu oluşur. Yeni oluşan radikal, hücresel yapı veya moleküllerden bir elektron almaya çalışarak eski haline dönmeye çalışır. Böylece zincir reaksiyonları devam eder [32].

Oksijen içeren herhangi bir serbest radikal, reaktif oksijen türü olarak ifade edilir. Oksijen merkezli serbest radikaller dış kabukta eşleşmemiş iki elektron içermektedir. Bir çok hastalıkta etkin olan oksijen içeren en önemli serbest radikaller, hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen, hipoklorit, nitrik oksit radikali ve peroksinitrit radikalidir. Bunlar oldukça reaktif türlerdir proteinler, karbohidratlar ve lipidler gibi biyolojik moleküllere zarar verirler [33]. Oksijen atomu farklı orbitallerde iki tane tek elektrona sahip bir biradikaldir. Bu elektronlar aynı orbitalde hareket edemezler çünkü paralel olarak dönmektedirler (aynı yönde dönerler). Oksijen termodinamik açıdan oldukça reaktiftir ancak, tek elektronları organik moleküllerin kovalent bağında bulunan eşleşmiş elektronlarla kolaylıkla reaksiyon veremeyebilir. Sonuç olarak,  $O_2$ , katalizör gerektiren reaksiyonlarda tek elektronların kabulünde yavaş reaksiyon verir (örneğin metal içeren enzimler).  $O_2$ , ROS oluşturmak için tek elektronları kabul eder. ROS oldukça reaktif oksijen radikalleridir, ya da hücre içerisinde kolaylıkla bu reaktif radikallere dönüşen bileşikleridir.  $O_2$ 'in indirgenmesiyle mitokondride oluşturulan ROS'ler, süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^*$ )'dir (Şekil 1.3).



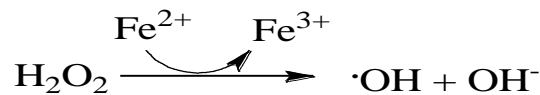
**Şekil 1.3:** Oksijenin indirgenme basamakları.

Oksijenin dört basamakta indirgenmesiyle süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve su oluşur. Bazen, süperoksitin eşleşmemiş elektronu daha iyi belirtilmek için  $\text{O}_2^-$  şeklinde yazılır.  $\text{O}_2^-$ 'nin yarı indirgenmiş formu olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  iki elektron kabul eder bu nedenle bir oksijen radikal değildir. Oluşum oranı herhangi bir zamanda mitokondriden gelen oksijen miktarına bağlıdır. Hidroksil radikali kısa ömürlüdür fakat vücuttaki en zararlı radikaldir. Organik radikalleri ve lipit peroksitleri oluşturan zincir reaksiyonlarını başlatır ve doğrudan bileşiklere ekler. Süperoksit anyonu oldukça reaktif olmakla birlikte lipit çözünürlüğü sınırlıdır uzağa difüze olamaz. Bu tür bir radikal enzimatik olmayan Haber-Weiss reaksiyonları ile  $\text{O}_2^-$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ten oluşabilir (Şekil 1.4).



**Şekil 1.4:** Haber-Weiss reaksiyonu.

Hidrojen peroksit, aslında bir radikal değildir, ROS gibi sınıflandırılan zayıf bir okside edici ajandır, çünkü hidroksil radikali ( $\text{OH}^\bullet$ ) üretir. Aynı zamanda bakır veya demir'in  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile etkileşimi ile  $\text{OH}^\bullet$  oluşur, enzimatik olmayan Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksitten hidroksil radikali oluşumunu katalizlerler (Şekil 1.5). Hidrojen peroksit lipide çözünür olması nedeniyle membrandan difüze olabilir ve mitokondri gibi  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^+$  içeren bölgelerde  $\text{OH}^\bullet$  üretimine sebep olur. Hidrojen peroksit aynı zamanda fagositik hücrelerde endojen ve enzimatik olarak üretilen ve güçlü bir okside edici ajan olan hipoklorik asit ( $\text{HOCl}$ ) için prekürsördür. Bu reaksiyonlar, substratların hücre içerisinde bulunması ve kolayca etkileşime girebilmesi nedeniyle önemlidir.



**Şekil 1.5:** Fenton reaksiyonu.

Nitrik oksit (NO) oksijen içeren bir serbest radikaldır, O<sub>2</sub> gibi yaşam için gerekli olmakla birlikte, toksiktir. NO tek elektrona sahiptir ve bu nedenle Fe<sup>3+</sup> gibi tek elektron içeren diğer bileşiklere bağlanır. Bir gaz olarak, sitozol ve lipid zarlarının içinden geçerek hücre içine girer. Düşük konsantrasyonlarda bir nörotransmitter ve bir hormon gibi davranarak fizyolojik olarak vasodilatasyona (damar genişlemesi) neden olur. NO, Nitrik oksit sentaz enzimleri tarafından arjiniinden sentezlenir. Su ve lipid membranlardan difüze olarak hedef hücre içine girebilme kabiliyeteine sahiptir. Hedef hücrelerde Fe-hem grubu içeren guanilil siklaz enzimine yüksek afinite ile bağlanarak böylelikle bir sinyal ileti kaskatını başlatarak fizyolojik etkisini gösterir. Nitrik oksit birçok moleküle nonspesifik bağlanarak hızlı bir şekilde inaktive edilir bu nedenle NO üreten hücreler hedef hücelere yakın olmalıdırlar. Yüksek konsantrasyonlarda, nörodejeneratif hastalıklarda sebep olabilen, daha reaktif ve daha toksik olan nitrojen ve oksijeni içeren reaktif nitrojen türlerini (RNOS) oluşturmak üzere O<sub>2</sub> veya süperoksite bağlanır.

Vücutta, dokuya özel üç farklı nitrik oksit sentaz (NOS) izoformu vardır. Bunlar nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotelial nitrik oksit sentazdır (eNOS). Nörotransmitter ve hormon fonksiyonu için gerekli küçük miktarlarda NO'nun üretimi için nNOS ve eNOS miktarları Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu tarafından düzenlenir. Bunun aksine iNOS, makrofajlar ve beyin astroglia hücreleri gibi benzer hücre tiplerinde ve çoğu immün sistem hücrelerinde mevcuttur. Nitrik oksit sentazın bu izoformu gen transkripsiyonunun indüklenmesi ile kontrol edilir ve Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonundaki değişimlerden etkilenmez. Mikroorganizmaların öldürülebilmesi için yüksek ve toksik seviyelerde NO üretir. Yüksek konsantrasyonlardaki NO seviyeleri, RNOS üretimi ve NO toksisitesi ile ilişkilidir.

Antioksidanlar, *in vivo* ve *in vitro* olarak, oksidasyondan reaksiyonlarının zincir kırılmasında ve serbest radikallerin giderilmesinde oldukça önemli rol oynarlar. Antioksidanlar diğer moleküllerin oksidasyonunu önlerler [34]. Antioksidanlar vücudu serbest radikallerin zararlı etkilerinden korur. Bir çok bilim adamı bu zararın kanser, ateroskleroz ve diğer hastalıkların gelişimine neden olan bir faktör olduğunu düşünmektedir.

Antioksidan “oksidasyona karşı” anlamına gelmektedir. Antioksidanlar, lipidleri radikallerce oluşturulan peroksidasyondan korurlar. Antioksidanlar elektron vererek serbest radikalleri nötralize için yeterince kararlıdır, böylece serbest radikallerin

hasar oluşturma kapasitesi azalır. Antioksidanlar radikal giderici, hidrojen verici, elektron verici, peroksit parçalayıcı, singlet oksijen giderici, enzim inhibitörü, sinerjist ve metal şelatlayıcı ajan olarak hareket ederler. ROS giderimi için hücre içi ve hücre dışı ortamda hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanlar mevcuttur [35].

Serbest radikal bir antioksidandan elektron aldığında, oksidasyonun zincir reaksiyonu kırılır ve artık hücreye zarar veremez [36]. Elektron verdikten sonra antioksidan bir serbest radikal haline geçer; ancak, antioksidan bu durumdayken elektronlar reaktif hale geçmeden değişime uyum sağlayabilmeleri nedeniyle zararlı değildir. İnsan vücudunda gelişmiş bir antioksidan savunma sistemi vardır. Bu düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar güvenli bir şekilde serbest radikallerle etkileşime girerler ve hayati moleküller zarar görmeden önce zincir reaksiyonunu bitirirler. Glutasyon, ubikinol ve ürik asit gibi bazı antioksidanlar vücutta normal metabolizma sırasında üretilmektedir [37]. Diğer hafif antioksidanlar diyetle bulunur.

- Antioksidan Türleri

- Enzimatik:

1. Süperoksit dismutaz (SOD).
2. Katalaz.
3. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz.

- Enzimatik olmayan:

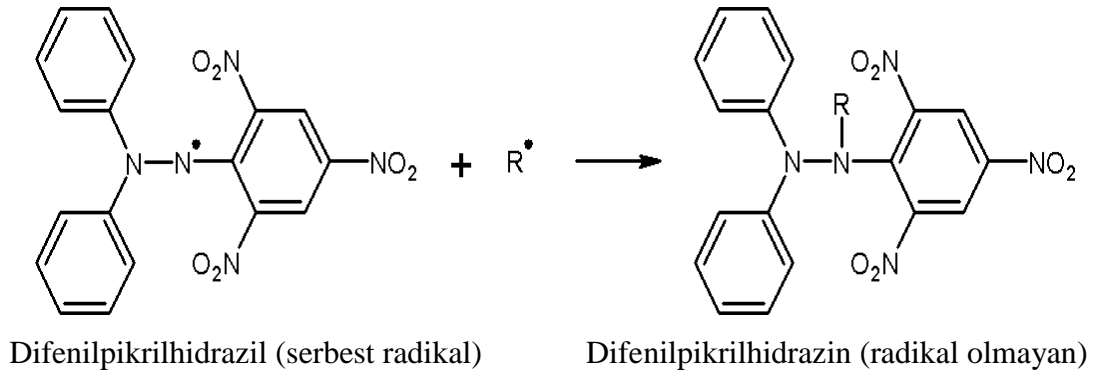
1. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol).
2. Vitamin C (askorbik asit).
3. Karotenoidler.
4. Endojen antioksidanlar (ürik asit, melatonin).
5. Diğer diyet antioksidanları (Flavonoidler).

Radikal giderici aktivitenin tayinini belirlemek için bir takım metodlar geliştirilmiştir. Bunlardan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) en yaygın uygulanan spektrofotometrik metoddur ve güvenilirliği yüksek bir yöntemdir [38]. DPPH kararlı ve ticari olarak temin edilebilen birkaç organik azot radikallerinden birisidir. DPPH metodu, aktif oksijeni türlerini gideren bileşiklerin ön taramasını mümkün kılan örnek bir yöntem olarak ele alınır. DPPH radikalleri serbest oksijen radikallerinden daha kararlı ve çalışılması onlardan daha kolay olduğundan dolayı,



DPPH yöntemi farklı fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin ölçülmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. DPPD kararlı serbest radikal moleküllerden oluşan koyu renkli kristal yapıda bir tozudur. DPPH serbest radikal metodu, etanol içinde mor renkli solüsyon üreten elektron transferine dayalı bir antioksidan yöntemidir. Oda sıcaklığında kararlı olan bu serbest radikal, antioksidan bir molekül varlığında indirgenir, sarı renkli etanol solüsyonu verir.

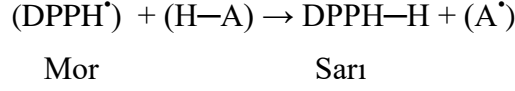
DPPH metodu, antioksidanlarla DPPH'in reaksiyon sonucu, DPPH konsantrasyonundaki değişimlerin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle kolay ve hızlı bir yöntem sağlar [39]. DPPH yöntemi, bitki biyokimyasında, bitki bünyesinde bulunan bileşiklerinin radikal giderici etkilerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.6).



**Şekil 1.6:** DPPH'in serbest radikalle reaksiyonu.

DPPH başlıca iki uygulamaya sahiptir; bunlardan en önemlisi ortak bir antioksidan testi olan, radikalleri de kapsayan kimyasal reaksiyonları görüntüleme [40] ve diğeri ise elektron paramanyetik rezonans sinyallerinin pozisyon ve yoğunluğunun bir standartıdır. DPPH iyi bilinen bir radikaldır ve diğer radikaller için ise temizleyicidir. Bu nedenle, DPPH ilave edilmesine bağlı olarak bir kimyasal reaksiyonun hızının azalması, bu reaksiyonun radikal doğasının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır, çünkü 515-528 nm civarında güçlü absorpsiyon bandı vardır. Test antioksidanın DPPH'a karşı radikal giderme kapasitesinin ölçülmesini temel alır. DPPH'daki azotun tek elektronu, antioksidandaki bir hidrojenin ilgili hidrazine ulaştırılmasıyla indirgenir. DPPH'ın bir antioksidan ile veya indirgen bileşik ile reaksiyonu ilgili hidrazini DPPH-H'ı üretir, bu Şekil 1.7'de gösterildiği gibi mordan sarıya renk değişimi ile takip edilebilir. Bu özellik reaksiyonun görsel olarak izlenmesine olanak verir ve başlangıç radikal miktarı optik absorpsiyondaki değişimden veya DPPH'ın

EPR sinyalinden sayılabilir [41]. DPPH<sup>\*</sup> absorpsiyonu 517 nm de antioksidan varlığında antioksidandan hidrojen transferi nedeni ile düşer, böylece kararlı DPPH-H bileşiği oluşur.



**Şekil 1.7:** DPPH'daki mordan sarıya renk değişimi.

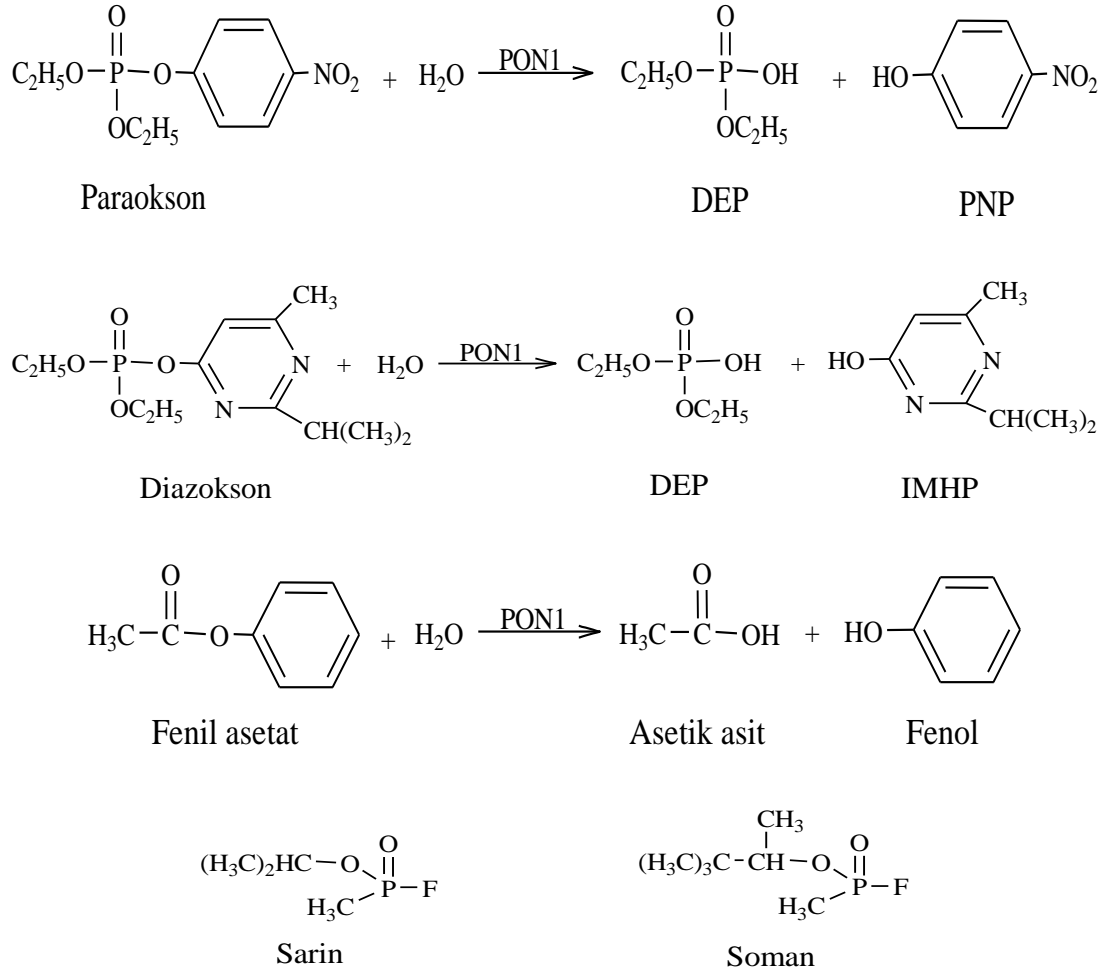
### 1.3 Paraoksonaz Enzimi Hakkında Genel Bilgiler

Enzimler makromoleküler biyolojik katalizörlerdir. Enzimler kimyasal reaksiyonları hızlandırır veya kataliz eder. Sürecinin başında moleküller substratlar olarak adlandırılır ve enzim bunları ürünler olarak adlandırılan farklı moleküller haline dönüştürür. Neredeyse hücredeki tüm metabolik süreçler yaşamı sürdürmek adına yeterince hızlı oranlarda gerçekleşmesi için enzimlere ihtiyaç duyar [42]. Hücrede gerçekleşen metabolik yolları hücrede yapılan enzim grupları belirler.

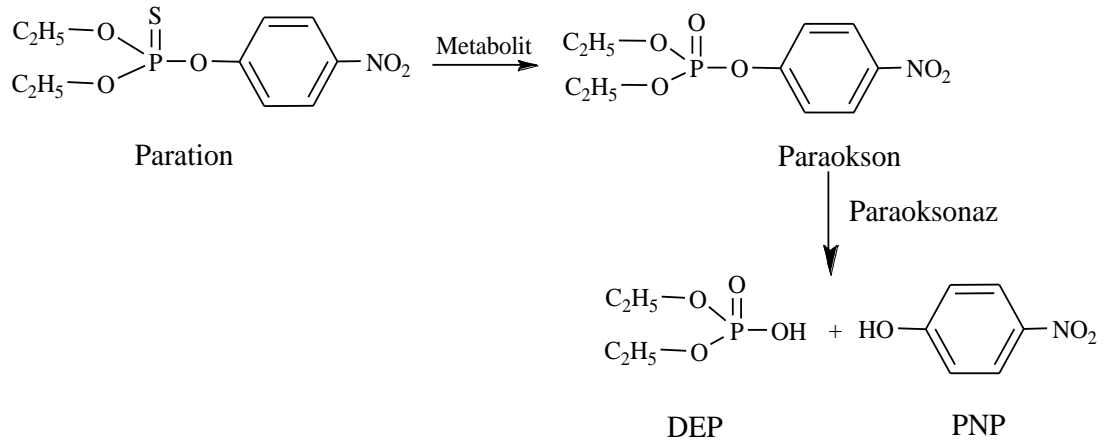
Enzimlerin 5,000'den fazla biyokimyasal reaksiyon tipini katalizlediği bilinmektedir [43]. Enzimlerin çoğunluğu protein yapılı olmakla birlikte bazı RNA molekülleri de tepkimeleri katalizler. Enzimlerin özgüllüğü benzersiz üç boyutlu yapılarından kaynaklanmaktadır. Enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını arttırmaları. Enzim aktivitesi diğer moleküller tarafından etkilenebilir: inhibitörler enzim aktivitesini düşüren moleküllerdir ve aktivatörler ise enzim aktivitesini arttıran moleküllerdir.

Paraoksonaz (PON1; EC 3.1.8.1), esteraz aktivitesi gösteren yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ile ilişkili ve kalsiyum bağımlı bir enzimdir. Organofosfatları, aromatik esterleri ve laktonları hidroliz eder. HDL'yi oksidasyona karşı korur. İlk olarak 1946 yılında Abraham Mazur tarafından hayvan dokularında bu enzimin varlığı bildirilmiştir [44]. Bunu 1950 'lerin başında insan serum Paraoksonaz (hPON1) enziminin tanımlanması takip etmiştir. PON1 ester gruplarını ve enzimin ilk aktivite tayininde substrat olarak kullanılan paraoksonu hidrolize edebilmesi nedeniyle paraoksonaz olarak isimlendirildi.

PON1 esteraz aktivitesine sahiptir ve organofosfat (OP), paraokson, diazokson, ksenobiyotikler, fenilasetat (arilesteraz aktivitesi), aromatik karboksilik asit esterleri ve soman, sarin gibi sinir gazlarını bozunmaya uğratabilir [45] ve insektisidleri hidrolize edebilme yeteneğindedir [46].



**Şekil 1.8:** Paraokson, diazokson ve fenil asetatın PON1 tarafından hidrolizi ve sinir ajanları sarin ve somon'un yapıları.

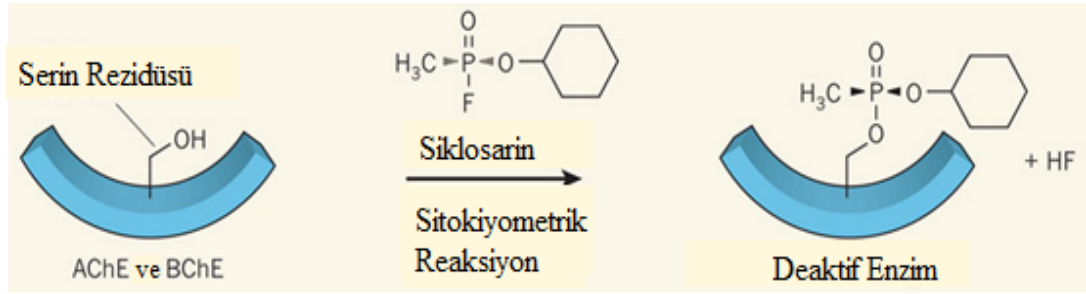


**Şekil 1.9:** Paration insektisid metabolizması.

PON1, OP bileşiklerinin ve diğer suni substratların detoksifikasyonunda önemli rol oynar böylece bu kimyasalların toksisitesine karşı bireyin duyarlılığını önemli ölçüde değiştirebilir [47]. Dolaşımda hPON1 seviyeleri OP'lara dirençle korele olduğu bildirilmiştir [48], PON1, *in vivo* olarak biyotemizleyici olarak hareket eder [49].

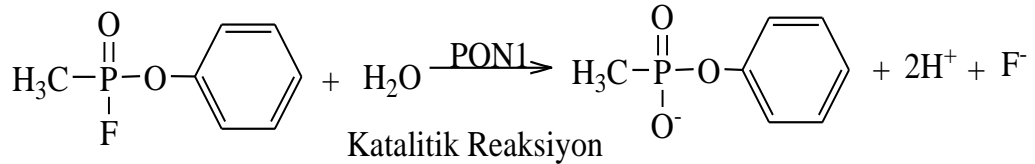
OP'lara yönelik katalitik aktivitesinin doğal olarak düşük seviyeler olmasına rağmen optimizasyon üzerine kullanışlı ve etkili bir katalitik olabilir.

*In vivo*'da siklosarin gibi organofosfat sinir ajanları, asetil kolinesterazın (AChE) aktif bölgesinde yer alan serin aminoasit kalıntısı ile kovalent bağ oluşturmak üzere reaksiyona girer. AChE'ı inaktive ederek bir nörotransmitter olan asetilkolinin hidrolizini önler ve boğularak ölüme yol açar. Bütürikolinesteraz (BChE) organofosfatlarla aynı yolla reaksiyona girer ve sinir maddelerini temizlemek için kan dolaşımına enjekte edilerek konsantrasyonlarının azaltıp toksik olmayan dozlara düşürebilir. Çünkü, BChE stoikiyometrik tutucudur ve terapötik açıdan etkin olabilmesi için büyük konsantrasyonları gerekmektedir.



**Şekil 1.10:** Siklosarin'in AChE'in aktif bölgesinde yer alan serin amino asidi ile etikleşimi.

1994 yılında Gupta ve ark. tarafından, OP'ın hızlı hidrolizini katalizlemek için serum PON1 tasarlanmıştır. Bir PON1 molekülü binlerce hidroliz reaksiyonunu katalizlemektedir ve sonuç olarak organofosfatların konsantrasyonunu toksik-olmayan seviyelere azaltmak için gerekli olan enzim miktarı BChE için gereken miktardan çok daha düşüktür.



**Şekil 1.11:** Serum PON1 tarafından OP'ın hidrolizi.

PON1 bir memeli enzimi olup başlıca karaciğerde sentezlenir ve seruma salgılanır, burada HDL'ler ile birleşir ve düşük-yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) (kötü kolesterol) oksidasyonuna karşı koruyucu etkiye sahiptir [50].

PON1 karaciğer hücrelerindeki kolesterol sentezinde önemli bir denge unsurudur, çünkü aterosklerozun başlangıç ve gelişimini içeren lipid oksidasyon seviyesini düşürür. Salgılanan protein öncül hidrofobik diziyi sürdürür, bu PON1'in HDL ile birleşmesi için yapısal gerekliliktir. [51, 52]. İnsan ve sığır serumunda, diğer memeli serumlarında da olduğu gibi, paraksonazın N-uç yapı bölgeleri (domainleri) HDL'nin apolipoprotein A1'i (Apo A1) ile birleşir [53, 54].

PON1 in doğal fonksiyonu laktonaz ile ilişkilendirilir, ve lipofilik laktonlar öncelikli substratıdır [55]. Diğer taraftan, PON1 organizmanın anti-oksidant sisteminde önemli, bir rol oynamaktadır; yükseltgenmiş fosfolipidleri hidroliz eder ve sinir sistemini, dolaşıma giren organofosfatların nörotoksitesine karşı korur [56]. Her ne kadar önceleri paraoksonaz toksikolojide incelendiyse de, anti-aterojenik, anti-inflamatuvar ve HDLnin antioksidant özellikleri geçtiğimiz yıllarda fazlasıyla çalışılmıştır [57-61]. Birçok çalışma PON1 in antiaterojenik, antiinflamatuvar özelliğe sahip olduğunu göstermiştir.

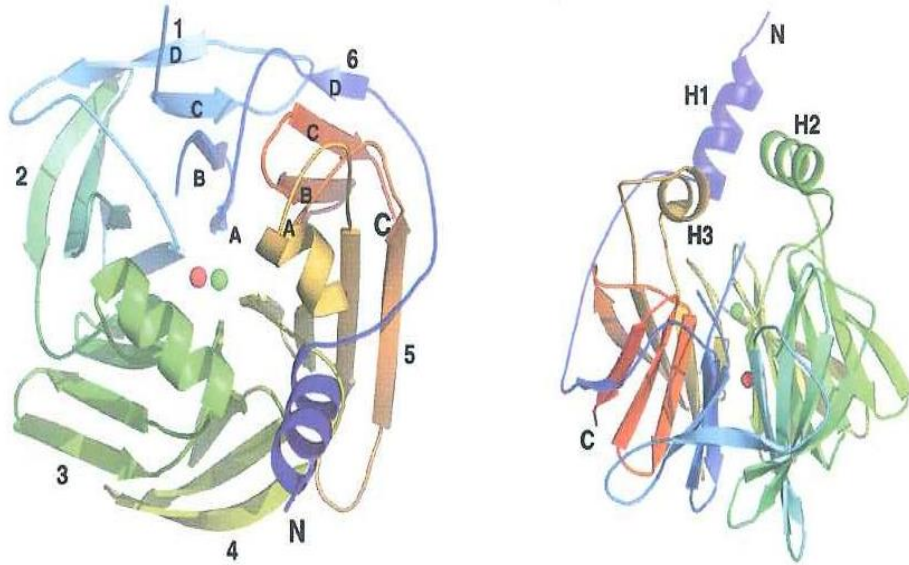
İnsanlardaki PON1 gen ailesi kromozom 7q21.3–22.1'in uzun kolunda yan yana hizalanmış üç üyeye sahiptir; PON1, PON2 ve PON3 [62]. Bu gen büyük yapısal benzerlikler gösteren ve ortak evrimsel kökenden meydana gelen gen eşleşmesi tarafından oluşturulmuştur.

- PON1 karaciğerde sentezlenmektedir plazmada HDL ile birlikte taşınmaktadır. PON1 43 kDa molekül ağırlığında, 354 amino asitten oluşan bir proteindir. Antioksidan olarak fonksiyonu; LDL oksidasyonunu önlemektir. Serum konsantrasyonları, serum okside LDL seviyelerinden ve inflamatuvar değişimlerden etkilenir. Organofosfat substratlara geri dönüşümlü olarak bağlanarak hidroliz eder. Böylece PON1 dolaşıma giren organofosfat nörotoksitesine karşı sinir sisteminde temel korumayı oluşturmaktadır. PON1, PON3 çoğunlukla karaciğerde ve daha düşük seviyelerde böbrekte sentezlenmektedir.
- PON2, hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan çoğunlukla hücre içinde ekspre edilen bir proteindir. Beyin, karaciğer, böbrek, testis de dahil olmak üzere birçok dokuda ifade edilmesi ve birden fazla mRNA formlarına sahip olmasına karşın serumda tespit edilemez.

- PON3, PON1'e benzer aktivite göstermektedir fakat substrat özgüllüğü farklıdır. Serum PON3 aktivitesi PON1'den 100 kat daha düşüktür. PON3 böbrekte düşük seviyelerde bulunmaktadır. Ek olarak, okside lipidler ve inflamasyon tarafından düzenlenmez [63].

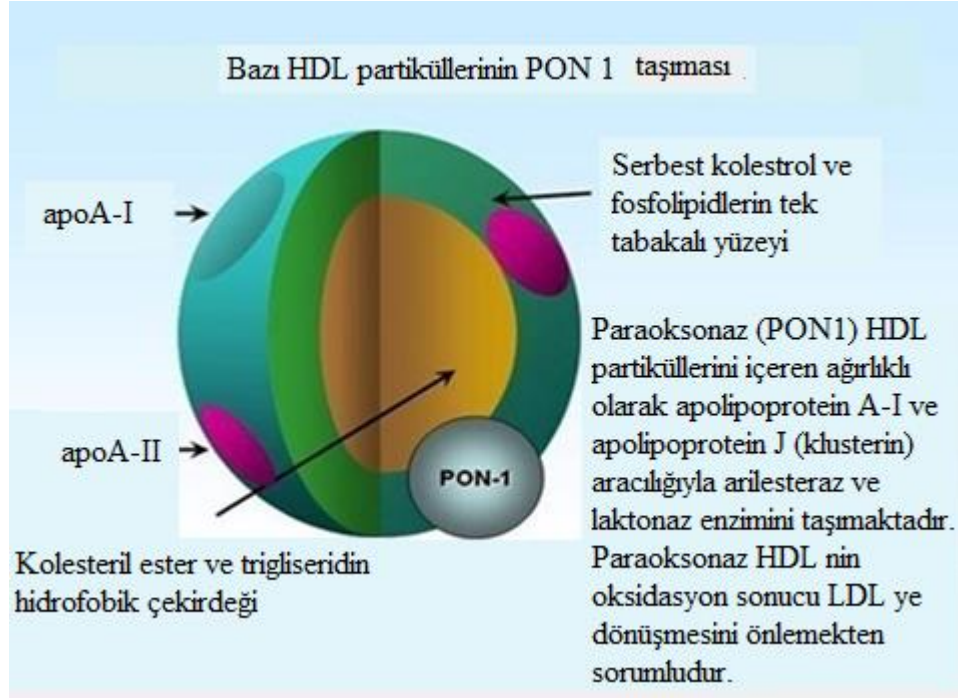
PON1, altı-kanatlı beta-pervane bir yapıdır, her bir yaprak 4 beta-tabakası içerir ve enzimin merkez kısmında yapı ve katalitik aktivitesinin korunması için gerekli olan iki kalsiyum atomu vardır. Kovalent bağlarındaki N terminal ve C terminal uçları enzimlerde daha nadir  $\beta$ -tabaka oluştururlar. Pervanenin en üst kısmına yerleşen üç heliks, HDL parçacığına bağlanır [64].

PON1 43 kDa molekül ağırlığında, 354 amino asitten oluşan bir glikoproteindir. Her molekül toplam ağırlığı % 15.8'ini oluşturan üç karbohidrat zinciri içerir. İzoelektrik noktası 5,1'dir. Amino asit kompozisyonu yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez [65].

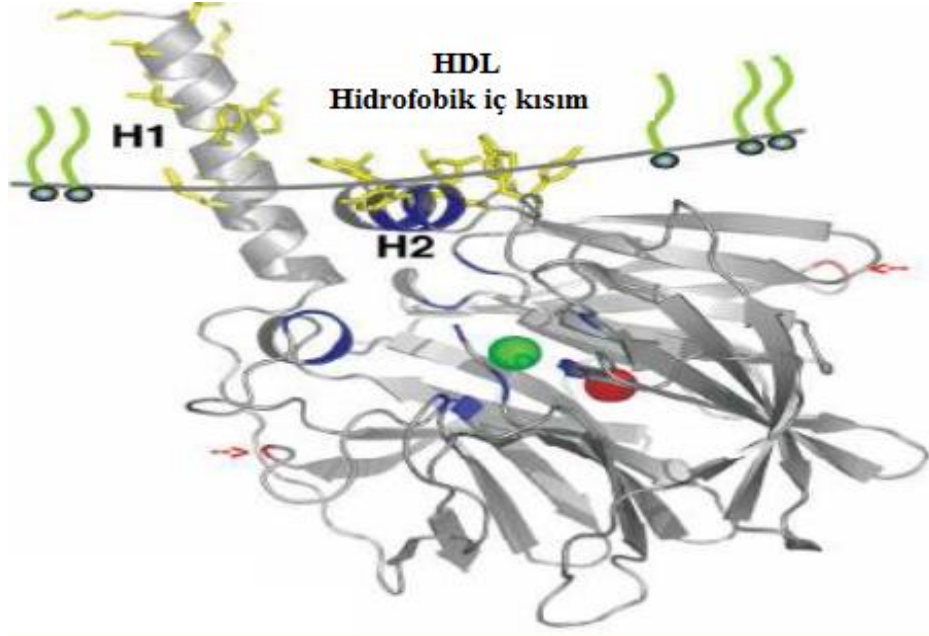


**Şekil 1.12:** PON1'in üç boyutlu yapısı.

PON1 ve PON3 karaciğerde sentezlendikten sonra salınarak HDL'ye bağlı şekilde dolaşımda bulunur. Periferal hücrelerden HDL kolesterol transportunun sağlanması ve platelet aktive edici faktörün bağlanması, LDL'nin PON1 ve PON3 enzimleri tarafından oksidasyonunu önler [66]. HDL yaklaşık 10 nm çapında bir komplekstir. Bileşimindeki ( fosfolipid, kolesterol ve kolesterol esterleri) ana membran bileşeni, Apolipoprotein A1 ve aromatik sarmallar yer alır [67].

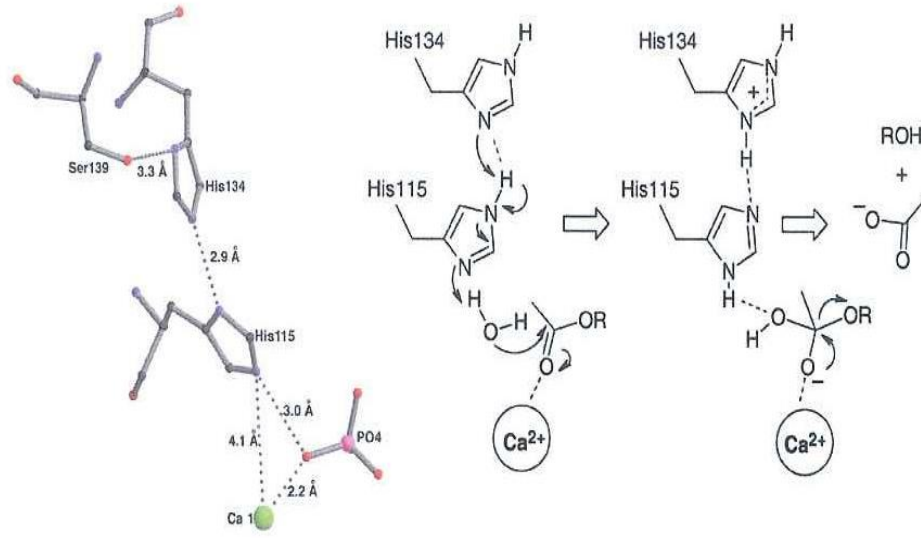


**Şekil 1.13:** HDL partiküllerinin PON1 taşıması.



**Şekil 1.14:** PON1'in HDL'ye bağlanması.

Enzimin aktif bölgesindeki His-His çifti, kalsiyum iyonları ve su molekülleri, esteraz aktivitesinde önemli rol oynar. Aktif bölgede His-His çifti molekülün gücünü nükleofil su molekülleri tarafından bir proton verilmesiyle artırır. Hidroksil iyonları karbonil veya fosfat esterlerine saldırır.



**Şekil 1.15:** Paraoksonaz'ın katalitik mekanizması.

Nükleotid dizisinde herhangi nadir bir değişiklik Mutasyon, genellikle hastalığa neden olurlar fakat her zaman değil [68]. Nükleotid dizisindeki bu değişim fenotipik değişikliklere neden olabildiği gibi olmayabilir de. Mutasyonlar aileden (genetik mutasyonları) aktarılabilir veya bireyin yaşamı boyunca edinilebilir (somatik mutasyonlar) ve kanser gibi insan hastalıklarının başlıca sürücüsüdür.

Polimorfizm, % 1 ya da daha yüksek bir frekansa sahip bir popülasyonda meydana gelen DNA dizisindeki bir varyasyondur. Polimorfizm en yaygın türü tek bir baz çiftindeki varyasyonu içerir. Popülasyondaki yüksek görülme sıklığı, bir polimorfizmin nötr ya da yararlı olacak şekilde doğal olarak meydana geldiğini önermektedir. Polimorfizmler boyut olarak çok büyük olabilir ve DNA'nın uzun dizilerini kapsar, bu tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak adlandırılır [69]. Polimorfizmler ayrıca mutasyonlarda olduğu gibi bir veya daha fazla nükleotid değişimleri olabilmektedir.

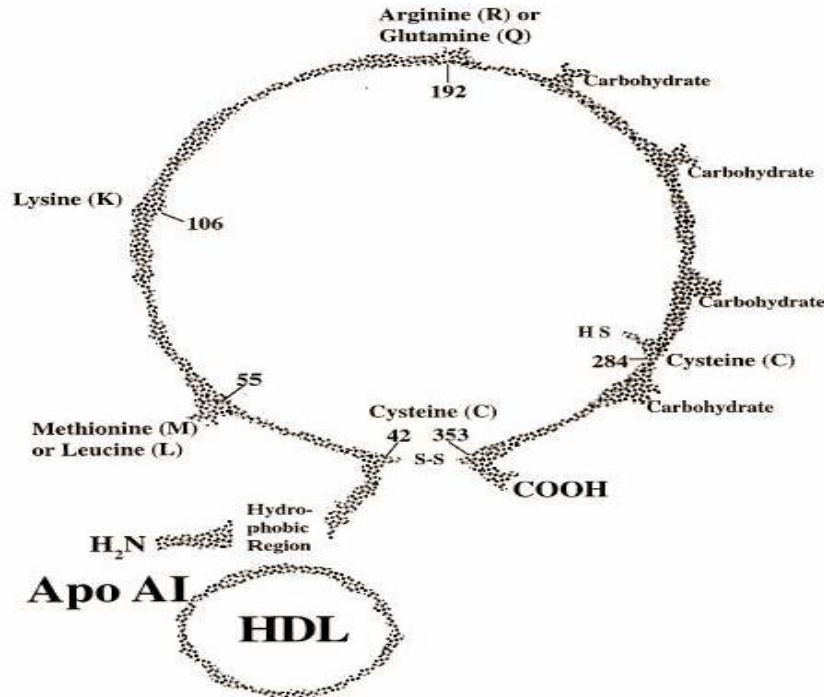
PON1 geninin promotor bölgesinde PON1 ekspresyonunu ve böylece serum PON1 konsantrasyonunu etkileyen dört polimorfizm ( $-107C>T$ ,  $-162A>G$ ,  $-824G>A$ ,  $-907G>C$ ) belirtilmiştir [70].  $-107C>T$  polimorfizmi PON1 düzeylerinin en önemli genetik belirleyicisidir [71]. PON1 geninin kodlama bölgesi iki polimorfik bölge içermektedir; *pozisyon55* de *lösin* (L) ve *metiyonin* (M) ( $55 L>M$ ) transizyonu ve *Pozisyon192* de *glutamin* (Q) ve *arjinin* (R) ( $192Q>R$ ) transizyonu.  $55 L>M$



polimorfizmi, PON1 promotor bölgesinde polimorfizmle bağlantısı nedeniyle enzim konsatrasyonlarını etkiler [72].

55 L>M polimorfizmi PON1'in HDL'ye bağlanmasında önemli rolü olan PON1 N-terminal bölgesinde yer alır. 192Q>R polimorfizmi enzimin hidrolitik aktivitesinde substrat spesifik farklılıklardan sorumludur [73]. Paraokson en etkin olarak 192R izoformu tarafından hidroliz edilir ve diazokson, somon ve sarin en etkin olarak 192Q izoformu tarafından hidroliz edilir [74]. Kandaki paraokson hidroliz (paraoksonaz aktivitesi) kapasitesi genellikle PON1 enzim etkinliği için bir gösterge olarak kullanılır. Bu enzim aktivitesi 192Q>R polimorfizminin ve PON1 enziminin konsantasyonundaki varyasyonun kombine etkilerini yansıtmaktadır. 192. pozisyonda (QR) amino asit dizileri 2 allozime yol açmaktadır. *İn vitro* da Q allozimi LDL'de lipid peroksitlerin birikimine karşı R alloziminden daha fazla koruma sağlar [75]. PON 1 geninin ikinci bir egzonik polimorfizmi amino asit 55 (L M) pozisyonunda meydana gelir.

Bu polimorfizm ayrıca 192 polimorfizm daha az olmasına rağmen PON1 aktivitesini etkiler. İnsan PON1 geninde polimorfizmler koroner arter hastalık riskiyle ilişkilidir, enzimin koruyucu fonksiyonu için kanıt sunar [76,77].



Şekil 1.16: PON1 gen polimorfizmi.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Nobel ödüllü Alman kimyacı Hugo Schiff tarafından 1864 yılında ilk defa keşfedilen Schiff bazları birincil aminler ve karbonil bileşiklerinin kondenzasyonu sonucu oluşan ürünleridir. Schiff bazları koordinasyon kimyasında oldukça etkili olmakla beraber özellikle metal iyonlarının kararlı halde tutulması açısından komplekslerinin elde edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Hidrazonlar, hidrazinler aldehit veya ketonlarla yoğunlaştığında; aldehidlerin fenilhidrazinlerle pH 4-5'de kondenze olduğu zaman oluşmaktadır ve tipik olarak keskin bir erime noktasına sahip kristalin bir bileşiktir. Hidrazonlar ve bu ligantların metal kompleksleri tıp, teknoloji ve analitik kimya alanlarında dikkate değer bir ilgi görmektedir. Ayrıca, aromatik hidrazonlar ve düşük molekül ağırlığına sahip bazı aldehit ve ketonların konsantrasyonlarının ölçülmesinde kullanılmaktadır.

H. Abel-wahab [78], çalışmasında, hidrazon ligandları ve metal komplekslerinin sentezlenmesini ve antimikrobiyal, çürüme ve alev önleyici epoksi formüllerdeki katkıların potansiyel uygulamaları kapsamlı bir şekilde rapor edilmiştir. o-hidroksiasetofenon benzohidrazon (HBH) olarak adlandırılan arilhidrazonların divalent (CoII) ve trivalent (CrIII ve FeIII) metal kompleksleri izole edilmiş ve çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir. İlgili ligandlar ve bu yapıların metal kompleksi epoksi reçinelerine katılmıştır ve laboratuvar koşullarında elde edilen ürünler tahta ve çelik paneller üzerinde bulunan fırçaları kaplamada uygulanmıştır. Bunun neticesinde, oksijen indeksi değerlerinden yola çıkılarak elde edilen ürünlerin alevlenmeye karşı geciktirme özellikleri pozitif bir şekilde rapor edilmiştir. Biyolojik aktivite sonuçları neticesinde HBH ligantlarının ve bunların metal komplekslerinin antimikrobiyal aktiviteleri ile beraber çürümeye karşı dirençlerinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. İlgili yapıların fiziksel özellikleri ayrıca incelenmiştir. Sonuç olarak bu katkıların epoksi reçinesi üzerine esneklik veya sertlik açısından herhangi bir etkisi bulunmamıştır. Buna karşın, yapının parlaklığının aromatik halkalar neticesinde arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, çarpmaya karşı dayanıklılığı metal iyonlarının etkisi ile arttığı saptanmıştır.

T. Tunç ve çalışma arkadaşları [79] tarafından 4-bromobenzaldehit ve 2-hidrazinopiridin yapılarının tepkimesi sonucu sentezlenen N-(4-bromo benziliden)-N-(2-piridil) hidrazin yapısı çeşitli spektroskopik yöntemlerle ( $^1\text{H}$  NMR, ultraviolet–visible (UV–VIS), IR spektroskopileri) ve X-ray difraksiyon yöntemi ile karakterize edilmiştir. UV-VIS çalışmaları sonucunda *p*-Br ve *o*-Py süstitüentleri neticesinde oluşan hipsokromik etki ile  $\lambda_{\text{max}}$  değerinin mavi bölgeye doğru kaydığı tespit edilmiştir. Ayrıca, çözücünün UV-VIS absorpsiyonu üzerine etkisi çalışılmış ve polaritesi yüksek çözücülerin ilgili  $\lambda_{\text{max}}$  değerini batokromik bölgeye kaydıracağı tespit edilmiştir.

D. Sarigol ve çalışma arkadaşları [80] tetrahidrokarbazol hidrazin ve aromatik aldehitlerin tepkimesi sonucu sentezlenen açıl hidrazon yapıları çeşitli spektroskopik yöntemlerle (IR,  $^1\text{H}$  NMR, APT-NMR, kütle spektroskopileri) ve DFT metodu kullanılarak B3LYP/6-311++G(d,p) teori seviyesinden DMSO çözücüsünde yapılan teorik hesaplamalar neticesinde karakterize edilmiştir.

C. Sankar ve çalışma arkadaşları [81] tarafından sentezlenen 2,6-diarilpiperidin-4-on hidrazon yapısı çeşitli spektroskopik yöntemlerle (elemental analiz, IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and 2D NMR spektroskopileri) karakterize edilmiştir. Ayrıca 3,3-dimetil-2r-6c-diarilpiperidin-4-on N-izonikotinoyilhidrazon yapısı X-ray difraksiyon yöntemi ile karakterize edilmiştir.

R. Anbazhagan ve çalışma arkadaşları [82] tarafından 1-(1-(4-izobütilfenil etiliden) tiyosemikarbazid ile 2-bromoasetofenon yapılarının tepkimesi sonucu sentezlenen 1-(1-(4-izobütilfenil)etiliden-2-(4-feniltiyazol-2-il) hidrazin yapısı çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir. Ayrıca, ilgili bileşiklerin *in vitro* antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir.

D. Debnath ve çalışma arkadaşları [83] tarafından sentezlenen 1,3-dimetil-5-(arilazo)-6-amino-urasil yapıları çeşitli spektroskopik yöntemlerle ve X-ray difraksiyon analizi ile karakterize edilmiştir. İlgili yapıların solvakromik ve fotofiziksel özellikleri çeşitli solventler kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak, polar aprotik çözücülerin ilgili yapıda solvakromik özelliklerin artmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

M. V. Pillai ve çalışma arkadaşları [84] tarafından sentezlenen 3-alkil-2,6-diarilpiperidin-4-on bileşiklerinin siyanoasetil hidrazon yapıları çeşitli spektroskopik yöntemlerle (IR, Kütle,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$ NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ve  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  COSY spektroskopileri) karakterize edilmiştir. Bunun yanı sıra sentezlenen bileşiklerin

çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çoğu bileşik *E. aerogenes* bakterisine karşı oldukça yüksek aktivite göstermiştir. Diğer yapılar tüm organizmalara karşı dikkate değer bir aktivite göstermektedir.

V. Meenatchi ve çalışma arkadaşları [85] tarafından sentezlenen 4-benzopiridin izonikotinoyil hidrazon monohidrat yapısı tek kristal olarak yavaş çözücü uçurma tekniği kullanılarak etanol çözeltilisinde elde edilmiştir. İlgili yapı çeşitli spektroskopik yöntemler yardımı ile karakterize edilmiş, ayrıca tek kristal yapısı XRD tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Termal analizleri TG/DTA yardımı ile incelenerek ilgili yapıların termal kararlılıkları belirlenmiştir. Kristal bileşiklerin SEM (Taramalı elektron mikroskopu) çalışmaları sonucunda yüzey morfolojisi araştırılmıştır. Kütle spektroskopisi neticesinde ilgili bileşiklerin moleküler ağırlıkları belirlenmiştir.

P. Davidovich ve çalışma arkadaşları [86] tarafından sentezlenen izatin Schiff baz çeşitleri ilaç kimyası alanında sıklıkla kullanılan endojen doğal bileşikler sınıfına girmektedir. İlgili bileşikler çeşitli spektroskopik yöntemlerle ve X-ray difraksiyon analizi ile karakterize edilmiştir.

A. Fekri ve çalışma arkadaşları [87] tarafından Ni(II), Co(II), Cu(II) ve Vo(II) metalleri ile sentezlenen 2-(2,4-Diklorofenoksi)-N'-(2-hidroksibenziliden) asetohidrazin kompleksleri çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir. Ayrıca elde edilen bileşiklerin manyetik ölçümleri yapılmıştır. Bunun yanı sıra gram pozitif (*Staphylococcus aureus*), gram negatif (*Escherichia coli* ve *Pathogenic fungi*) bakterilerine karşı MIC (Minimum inhibasyon konsantrasyonları) metodu kullanılarak antimikrobiyal aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. Antioksidan ve sitotoksik aktivite testleri çeşitli metotlar (ABTS - Türevlendirilmiş serbest radikal metodu ve *in vitro* Ehrlich Ascites) kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak ilgili kompleks bileşiklerin askorbik asit referans alınarak inhibitör antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Dahası, ilgili kompleks bileşikler ligandlara kıyasla tümör hücrelerini dikkate değer bir oranda inhibe etmiştir.

F. Guntepe ve çalışma arkadaşları [88] tarafından sentezlenen 2-bromo-4-kloro-6-[4-(3-metil-3-fenil-siklobütil)-tiyoazol-2-il]hidrazonometilfenol yapıları çeşitli spektroskopik yöntemlerle ve X-ray difraksiyon analizi ile karakterize edilmiştir.

I. P. Ivanov ve çalışma arkadaşları [89] tarafından sentezlenen 4-hidrazino-N-hekzil-1.8-naftalinimid bileşiklerinin florokromes-aril hidrazon türevleri katı halde elde edilmiştir. Florokromes türevlerinin katı halde edilmeleri materyal biliminde kullanılmaları açısından oldukça önem arz etmektedir. <sup>1</sup>H NMR spektroskopisi sonucu elde edilen pikler üzerine süstitüent etkisi incelenmiştir. İlgili bileşikler için kütle spektroskopisi sonuçlarına göre elektrosprey iyonizasyon metodunun oldukça uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Son olarak elde edilen bileşiklerin *in situ* enzim aktiviteleri irdelenmiş ve elde edilen sonuçlar rapor edilmiştir.

M. B. Ummathur ve çalışma arkadaşları [90] tarafından alifatik diaminler (1,2-diaminoethan, 1,3-diaminopropan ve 1,6-diaminohekzan) ile 3-[2-(1,3-benzotiyazol-2-il)hidraziniliden]pentan-2,4-dione yapılarının tepkimesi sonucu sentezlenen 3-[2-(1,3-benzotiyazol-2-il)hidraziniliden]pentan-2,4-dion yapısı çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir. Netice itibariyle, ilgili yapının keto-imin hidrojen bağları ile oluştuğu ve tepkimeye giren yapılarının birbirlerine göre sırasıyla oranının 2:1 olduğu saptanmıştır. Ni(II), Cu(II) and Zn(II) komplekslerinin analitiksel, fiziksel ve spektroskopik verileri neticesinde imino ve hidrazon yapılarındaki azot atomlarının ilgili metallere koordine olduğu, buna karşın karbonil gruplarının ilgili koordinasyona herhangi bir katkısının olmadığı sonucuna varılmıştır.

T. Tunç ve çalışma arkadaşları [91] tarafından salisilaldehit (5 mmol) ve 2-aminofenol (5 mmol) maddelerinin kaynayan etanol içerisinde tepkimesi sonucu sentezlenen 2-{(E)-[hidroksifenil]imino}metil}fenol yapısı çeşitli spektroskopik yöntemlerle ve X-ray difraksiyon analizi ile karakterize edilmiştir. Elde edilen karışıma uygulanan kristallendirme işlemi CHCl<sub>3</sub>-EtOH çözücülerinin (3:1) oranında karışımıyla gerçekleştirilmiştir. İlgili yapının kristal formu bir birimde birbirine benzer iki molekül olduğunu göstermektedir.

M. A. Ashraf ve çalışma arkadaşları [92] tarafından sentezlenen 2-amino-benzotiyazol, 4-amino-salisilik asit ve 4-aminofenol yapıları çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir. Ayrıca ilgili bileşiklerin ve metal komplekslerinin mantar ve maya bakterilerine karşı *in vitro* biyolojik aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak metal komplekslerinin ligantlara göre aktivitelerinin daha fazla olduğu rapor edilmiştir.

H. Khanmohammadi ve çalışma arkadaşları [93] tarafından 4-amino-3-(4-piridin)-5-merkaptotriazol ile çeşitli aldehit ve dialdehitlerin tepkimesi sonucu sentezlenen Schiff bazlarının yapısı çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize

edilmiştir. Bunun yanı sıra, ilgili bileşiklerin antibakteriyel (*Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*) ve antifungal (*Candida albicans*) aktiviteleri disk difüzyon metodu kullanılarak test edilmiştir.

B. K. Kaymakçioğlu ve çalışma arkadaşları [94] tarafından bazı aktif hidrojen bileşikleri ile 4-amino-3,5-di/1,3,5-trimetilpirazol yapılarının tepkimesi sonucu sentezlenen yeni hidrazon molekülleri çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir. *Mycobakterium tuberculosis* H37Rv bakterisine karşı gerçekleştirilen *in vitro* antitüberküloz aktiviteleri rapor edilmiştir. Edile edilen bileşiklerin *Mycobakterium tuberculosis* bakterisini 30% civarında inhibe ettiği sonucuna varılmıştır.

Antioksidanlar biyolojik sistemlerde serbest radikallerin temizliği açısından oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Genel olarak moleküllerin oksidasyonunun inhibe eden ve bu tip zararlara karşı moleküler sistemi koruyan moleküller olarak bilinirler.

C. Vanucci-bacqu ve çalışma arkadaşları [95] tarafından sübstitüe benzaldehitlerden sentezlenen yeni hidrazon türevleri potansiyel antiaterojenik yapılar olarak bilinmektedir. İlgili bileşiklerin antioksidant ve sitoprotektif özellikleri incelenmiştir. Bununla beraber süperoksit ( $O^{2-}$ ) anyonlarının inhibisyonuna yönelik çeşitli çalışmaları yapılmıştır. Sitoprotektif etki, ortamda sitotoksik oksidize LDL varlığında hücre yaşam süresi baz alınarak değerlendirilmiştir.

O.A. EL-gammal ve çalışma arkadaşları [96] tarafından sentezlenen 2-asetilpiridin- $\alpha$ -naftoksiasetilhidrazon (HA<sub>2</sub>PNA) yapısı ve bu yapının metal kompleksleri (Ni(II), Co(II), Cu(II), Cd(II), Mn(II), Hg(II) and  $UO_2^{2+}$ ) eşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir. Bununla beraber ilgili ligandların ve metal komplekslerinin antibakteriyel, antioksidant, antitümör ve radikal temizleyici (DPPH) *in vitro* aktiviteleri (*Ehrlich ascites*) rapor edilmiştir.

E. Giziroğlu ve çalışma arkadaşları [97] tarafından *o*-hidroksibenzoil hidrazin ve *p*-hidroksibenzoil hidrazinin 1,3-dimetil-5-asetil-barbiturik asit ile etanol içerisinde tepkimesi sonucu sentezlenen tridente ligantları (1,3-dimetil-5-asetilbarbiturik asit *o*-hidroksibenzoil hidrazol ( $H_2L_1$ ) ve 1,3-dimetil-5-asetilbarbiturik asit *p*-hidroksibenzoil hidrazol ( $H_2L_2$ ) eşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir. DMSO ile karalı hale getirilmiş bakır(II) kompleksleri, [Cu(L<sub>1</sub>)(DMSO)] and [Cu(L<sub>2</sub>)(DMSO)], 1:1 oranında (CuCl<sub>2</sub>.5H<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>L<sub>1</sub>/H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) DMSO/Su karışımında tepkimeye sokularak ilgili yapıların metal kompleksleri elde edilmiştir. Bütün yapılar X-ray difraksiyon analizi ile aydınlatılmıştır.

N. Belkheiri ve çalışma arkadaşları [98], tarafından siringaldehit yapılarından sentezlenen yeni hidrazon türevleri ve bu yapıların antioksidan özellikleri yakın bir zamanda rapor edilmiştir. Çeşitli yöntemler uygulanarak 2,2,-difenil-1-pirilhidrazil (DPPH) ve 2,2-azinobis(3-etilbentiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS<sup>+</sup>) radikalleri üzerine ilgili moleküller kullanılarak inhibisyonları test edilmiştir. Ayrıca, süperoksit anyonların oluşumu ve lipoprotein oksidasyonu ile antioksidan özellikleri keşfedilmiştir.

Paraoksonaz birçok memeliden saflaştırılmıştır ancak sadece insan, sıçan ve tavşan PON1 proteinleri kapsamlı olarak karakterize edilmiştir [99-101]. PON1 aktivitelerinin çeşitliliği farklı memelilerde, paraokson substrat olarak kullanılarak Alridge tarafından incelenmiştir [102]. Serumlar içinde en yüksek aktiviteye tavşanın ve en düşüğüne sıçanın sahip olduğunu bulmuştur. Kuşların çok dşek serum paraoksonaz aktivitesine sahiptir [103]. Çok dşek serum PON1 aktivitesine sahip olan balıklar, OP insektisite karşı çok duyarlıdır [104]. Sığırlar için PON1 alışmaları çok kısıtlıdır.

Tuk ve arkadaşları [105,106] hamile, erken laktasyon ve geç laktasyon süt ineklerinde PON1 aktivitesini araştırmıştır. Hemen doğum sonrasın PON aktivitesinde gözlenen azalmasının nedenlerini; 1) yağ mobilizasyonu ve karaciğer hücrelerinde tiğliserid birikimi, karaciğer hasarına veya ölümüne neden olabileceği, 2) kan kolesterol HDL azalması, 3) oksidatif stresin artması, 4) tüm bunların kombinasyonu, olabileceğini önermişlerdir.

Farklı kaynaklardan PON enzimi için farklı saflaştırma protokolleri kullanılmıştır. Miyomote ve arkadaşları sığır PON'un insan ve tavşan homolog proteini olduğunu HDL fraksiyonundaki [107], apolipoproteininde N-terminal aminoasit metodu kullanarak belirlemişlerdir. Sığır PON ayrıca preperatif SDS-PAGE ve immunoblotting kullanılarak serum HDL fraksiyonlarından izole edilmiştir [108].

PON'un dört saflaştırma basamağı, Agaroz Mavi, Sephadex G-200, DEAE-Trisakril M Sephadex G-75 kullanarak, tavşandan 73,1 kat ve insan serumundan 62,1 kat saflaştırıldığı rapor edilmiştir [109]. Koyun serum paraoksonaz etanol, pH ve iyonik şiddet fraksiyonlaması ile 330-385 kat saflaştırılmıştır [110]. Rodrigo ve arkadaşları [111] hidroksiapatit adsorpsiyon kromatografisi ile DEAE-Sefaroz CL-6B zerine, spesifik olmayan afinite kromatografisi ile Sibakron Mavisı F3GA zerine ve anyon değişim kromatografisi ile Mono Q HR 5/5 zerine karaciğer paraoksonaz 415 kat

saflaştırmışlardır. Ayrıca sıçan karaciğeri PON3 yedi basamaktan oluşan bir protokolle 177-kat saflatırılmıştır [100].

Literatür araştırması yapıldığında, hidrazon turevlerinin sentezi ile ilgili birçok çalışma olduğu görülmektedir. Öte yandan, bu bileşiklerin hPON1 üzerine inhibitör etkileri hakkında hiç bir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle biz çalışmamızda yeni hidrazon turevleri sentezledik ve kimyasal yapılarını karakterize ettik. Ve, yeni sentezlenen tüm bileşiklerin serbest radikal temizleme aktivitesi DPPH metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu yeni maddelerin ayrıca saflaştırılmış hPON1 üzerine *in vitro* inhibitör etkileri de değerlendirilmiştir.



### 3. MALZEME ve YÖNTEM

#### 3.1 Malzemeler

##### 3.1.1 Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Bu çalışmada kullanılan 5-bromo-2,3-dimetoksibenzaldehid (%97), 5-Bromo-2,4-dimetoksibenzaldehid (%99), 3,5-Bis (triflorometil) benzaldehit (%97), 2,4-bis (triflorometil) benzaldehit (%98), 2-hidrazino benzotiyazol (%97), 2-hidrazinopiridin (%97), aseton, etanol, metanol, N,N-Dimetil formamid, HCl, NaOH, DPPH, DMSO, Sepharose-4B jel, 1-naftilamin, CNBr, NaHCO<sub>3</sub>, L-tirozin, NaNO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Tris-baz, CaCl<sub>2</sub>, paraokson ve elektroforez için kullanılan kimyasallar Sigma Chem. Co.'dan sağlandı, diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta hem Sigma-Aldrich hem de Merck' ten satın alındı.

##### 3.1.2 Deneylerde kullanılan alet ve cihazlar

Bu çalışmada, aşağıda yer alan alet ve cihazlar kullanıldı:

Buz Makinesi	Fiocchet AF10
Elektroforez Sistemi	Hoefer, HSI
Kromatografik Kolon	Sigma (1.5 × 10 cm)
Magnetik Karıştırıcı	WiseStir MSH-20A
Otomatik Pipet	Transferpet, Nichipet EX
pH metre	Hana pH 211 Microprocessor
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3K15
UV Spektrofotometre	CARY 1E, UV-Visible Spectrophotometer-VARIAN
Vorteks	Fisons Whirl Mixer
Terazi	Precise XB 220A
Gradient Mikser	Atta magnetic stirrer and the gradient tube
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)

### 3.1.3. Deneylerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

- DPPH radikali giderme aktivitesinde kullanılan çözelti;

0,1 mM DPPH çözeltisi: 3,9432 mg DPPH 100 mL saf etil alkolde yaklaşık 30 dakika manyetik karıştırıcı kullanılarak çözüldü. Her bir deney için taze çözelti hazırlandı. Deney esnasında çözeltinin bulunduğu balon joje alüminyum folyo ile sarılarak karanlık bir ortamda muhafaza edildi.

- Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar;

0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10,0): 8,401 g (0,1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH' sı 10,0' a getirildi ve son hacim distile su ile 1L' ye tamamlandı.

0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 8,8): 8,401 g (0,1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 450 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH' sı 8,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL' ye tamamlandı.

0,01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 6,0): 1,42 g (0,01 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 ml distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH 'sı 6,0 'a getirildi ve son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlandı.

- Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon;

1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0): 14,2g (0,1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132,14 gr (1 mol) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

- Hidrofobik jele bağlanmış PON enziminin elüsyonu için kullanılan tamponu;

0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0): 14,2g (0,1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

- Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu;

2 mM CaCl<sub>2</sub> içeren, 100 mM Tris-baz tamponu (pH 8,0): 3,0285 g (25 mmol) Tris-Baz, 200 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8,0'e getirildi. 0,0555 g (0,5 mmol) CaCl<sub>2</sub> katılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

Substrat çözeltisi (2mM paraoksan çözeltisi): 10,8 µl paraoksan, 1 ml asetonda iyice çözüldükten sonra üzerine 1 mL bazal aktivite tamponu eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanıldı.

- Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon;  
0,1 M Tris-baz tamponu (pH 8,0): 1,211 g (0,01 mol) Tris-Baz 95 ml distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'ı 8,0'a getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti: 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 ml etanol de çözüldü. Bu çözeltiye 100 ml %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1L'ye tamamlandı.

- SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu;

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 mL
% 10'luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
$\beta$ -merkaptoetanol	1,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile su	0,5 mL

- SDS-PAGE'de kullanılan tank tamponu;

Tris-HCl	3,0 g
Glisin	14,4 g
SDS	1,0 g

Distile su ile çözeltinin son hacmi 1 L' ye tamamlanır.

- SDS-PAGE'de kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

SDS-PAGE'de kullanılan renklendirme çözeltisi; 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

SDS-PAGE'de kullanılan renk açma çözeltisi; % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

**Çizelge 3.1** SDS-PAGE'de kullanılan jel karışımlarının miktarları.

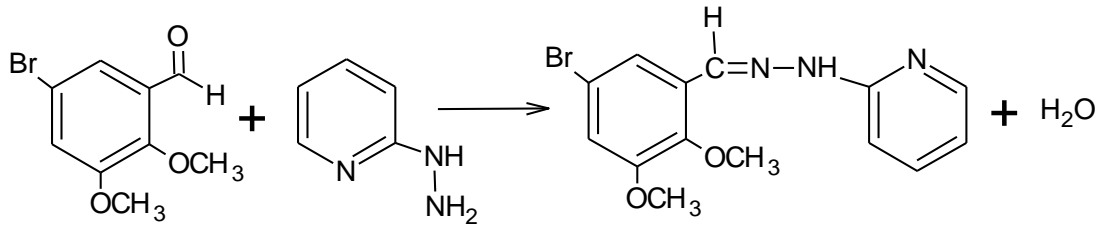
	Ayrırma Jeli	Yığıma Jeli
	%10	%3
<u>Akril amid/Bis</u> Akril amid 15 g Bis 0,4 g Alınarak son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16,65 mL	2,6 mL
Destile su	20,1 mL	12,2 mL
<u>1,5 M tris-HCL (pH 8,8)</u> Tris-HCl 11,82 Alınarak pH 8,8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12,5 mL	-
<u>0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)</u> Tris-HCl 3,94 g Alınarak pH 6,8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	-	5,0 mL
<u>% 10 'luk SDS</u> SDS 1g Alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0,5 µL	200 µL
TEMED	25 µL	20 µL
<u>% 10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1g alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 Hidrazon bileşiklerinin sentezi

#### 3.2.1.1 1-(5-bromo-2,3-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (B-2,3-MB PyH) bileşiğinin sentezi:

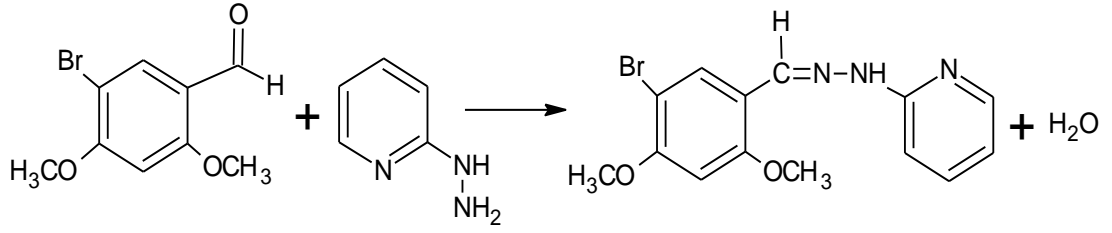
B-2,3-MBPyH bileşiği, Şekil 3.1'de görüldüğü gibi hazırlandı. Sıcak metanol (20 mL) içerisinde hazırlanmış 2-hidrazinopiridin (0,546 g, 0,005 mol) çözeltisi, sabit karıştırma ile, sıcak metanol (30 mL) içerisinde hazırlanmış olan 5-Bromo-2,3-dimetoksibenzaldehyd (1,225 g, 0,005 mol) çözeltisine yavaş yavaş eklendi. Kondensasyon reaksiyonu asidik koşullarda gerçekleştiğinden sentez pH 4-5'te yapıldı. Reaksiyon yaklaşık olarak 30 dakikada gerçekleştirildi. Oluşan soluk sarı renkli kristal üzeri kapatılarak 3 gün süreyle çeker ocakta bırakıldı ve süzüldü. Açık sarı renkli çökelti sıcak metanol içinde çözüldü, 3 saat süreyle geri soğutucuda refluks edilerek tekrar kristallenmesi için 2 gün süreyle çeker ocakta bırakıldı ve süzüldü.



Şekil 3.1: 1-(5-bromo-2,3-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (B-2,3-MBPyH) bileşiğinin sentezi.

#### 3.2.1.2 1-(5-bromo-2,4-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (B-2,4-MB PyH) bileşiğinin sentezi:

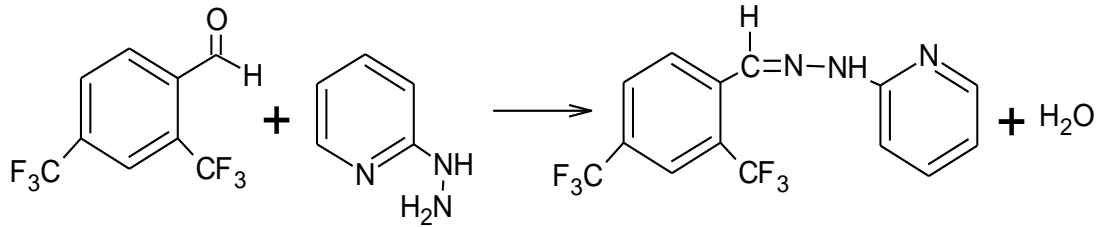
B-2,4-MBPyH bileşiği, Şekil 3.2'de görüldüğü gibi hazırlandı. Sıcak metanol (20 mL) içerisinde hazırlanmış 2-hidrazinopiridin (0,546 g, 0,005 mol) çözeltisi, sabit karıştırma ile, 25-30 °C, sıcak aseton çözeltisinde (30 mL) hazırlanmış olan 5-Bromo-2,4-dimetoksibenzaldehyd (1,225 g, 0,005 mol) çözeltisine yavaş yavaş eklendi. Kondensasyon reaksiyonu asidik koşullarda gerçekleştirildi. Sentez pH 4-5'te yapıldı. Reaksiyon yaklaşık 30 dakikada tamamlandı. Soluk sarı renkteki kristal 3 gün süreyle üzeri kapatılarak çeker ocakta bırakıldı ve bu süre sonunda süzüldü. Elde edilen açık sarı çökelti sıcak metanol içinde çözüldü, 3 saat süreyle geri soğutucuda refluks edildi, tekrar kristallenmesi için 2 gün süreyle çeker ocakta bekletildi ve süzüldü.



**Şekil 3.2:** 1-(5-bromo-2,4-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (B-2,4-MBPYH) sentezi.

### 3.2.1.3 1-(2,4-bis(triflorometil)benziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (2,4-FMBPYH) bileşiğinin sentezi:

2,4-FMBPYH bileşiği, Şekil 3.3'te de görüldüğü gibi hazırlandı. Sıcak metanolde (20 mL) içerisinde hazırlanan 2-hidrazinopiridin(0,546 g, 0,005 mol) çözeltisi sabit karıştırma ile, 25-30 °C, sıcak metanol(25 mL) içerisinde hazırlanmış olan 5-Bromo-2,4-Bis(triflorometil) benzaldehid (1,21 g, 0,005 mol) çözeltisine yavaş yavaş eklendi. Kondensasyon reaksiyonu asidik koşullarda, pH 4-5'te, gerçekleştirildi. Reaksiyon yaklaşık 30 dakikada tamamlandı. Soluk sarı renkteki kristal 3 gün süreyle üzeri kapatılarak çeker ocakta bırakıldı ve süzüldü. Açık sarı renkli çökelek sıcak metanol içinde çözüldü, 3 saat süreyle geri soğutucuda refluks edilerek tekrar kristallenmesi için 2 gün süreyle çeker ocakta bekletildi ve süzüldü.

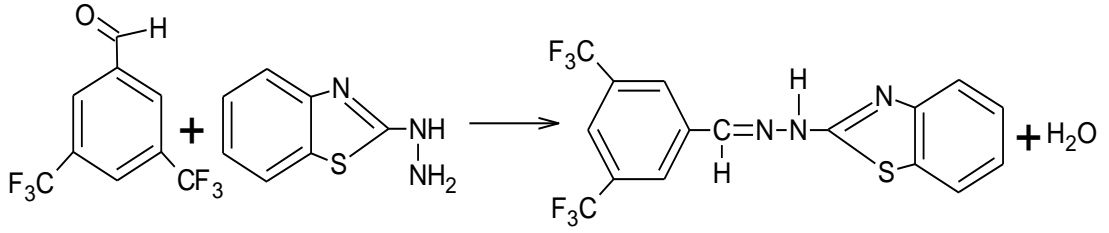


**Şekil 3.3:** 1-(2,4-bis (triflorometil) benziliden)-2-(piridin-2-il) hidrazin (2,4-FMBPYH) sentezi.

### 3.2.1.4 1-(3,5-bis (triflorometil) benziliden)-2-(benzo[d] tiazol-2-il) hidrazin (3,5-FMBThH) bileşiğinin sentezi:

3,5-FMBThH bileşiği, Şekil 3.4'te de görüldüğü gibi hazırlandı. Sıcak metanol (25 mL) içerisinde hazırlanmış olan 2-hidrazinobenzotiazol (0,826 g, 0,005 mol) çözeltisi sabit karıştırma ile, sıcak metanolde (25 mL) hazırlanmış olan 3,5-Bis (triflorometil) benzaldehid (1,21 g, 0,005 mol) çözeltisine yavaş yavaş eklendi. Kondensasyon reaksiyonu asidik koşullarda gerçekleştiğinden sentez pH 4-5'te yapıldı. Reaksiyon yaklaşık 30 dakikada tamamlandı. Soluk sarı renkli kristal 3 gün süreyle üzeri kapatılarak çeker ocakta bırakıldı ve süzüldü. Soluk sarı renkli çökelti

sıcak metanol içinde çözüldü, 3 saat süreyle geri soğutucuda refluks edildi, tekrar kristallenmesi için 2 gün boyunca çeker ocakta bekletildi ve süzüldü.



**Şekil 3.4:** 1-(3,5-bis (triflorometil) benziliden)-2-(benzo[d] tiazol-2-il) hidrazin (3,5-FMBThH) sentezi.

### 3.2.2 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

#### 3.2.2.1 DPPH radikal giderme aktivitesi

Hidrazon türevlerinin radikal giderme yeteneği Blois (1958), metodu kullanılarak etanol çözeltisindeki DPPH' in (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) indirgenmesine bakılarak spektrofotometrik yöntemle tespit edildi. Hidrazon türevi bileşikler DMSO' da çözüldü ve her bir bileşik farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 3, 4 ve 5 mg/mL) hazırlandı. BTH'ın (bütillenmiş hidroksitoluen) aynı konsantrasyonları pozitif kontrol olarak kullanıldı. Daha sonra, toplam hacim etanolle 1,5 mL'ye tamamlandı. Son olarak, 0,1 mM DPPH radikal çözeltisinin 0,5 mL'si test tüplerinin herbirine ilave edildi ve karışım vorteks edildi. Karanlıkta oda sıcaklığında 30 dak inkübasyondan sonra, spektrofotometre yardımıyla, kör olarak etanole karşı, absorbanstaki azalma 570 nm'de ölçüldü. Radikal giderme aktivitesi aşağıdaki denklemden hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderme Aktivitesi (\%)}: [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.1)$$

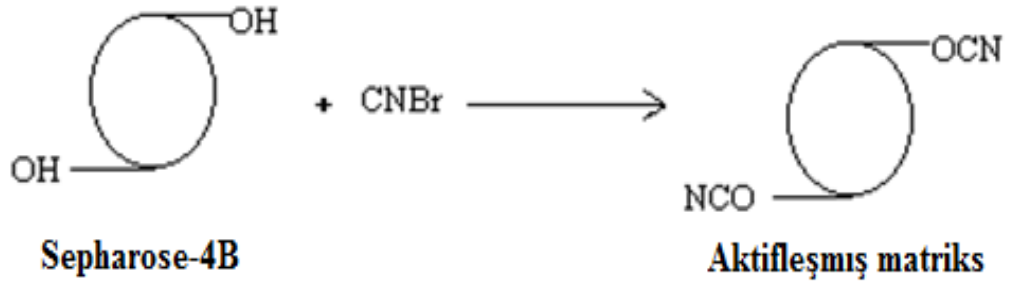
Burada,  $A_{\text{kontrol}}$ , kontrol reaksiyonunun absorbanansı ve  $A_{\text{örnek}}$ , hidrazon türevi bileşikler/standart antioksidan (BTH gibi), varlığındaki absorbanstır.  $IC_{50}$  değeri, test edilen hidrazon türevi bileşiğinin % 50 DPPH giderme konsantrasyonudur ve bu değer hidrazon türevlerinin konsantrasyonuna karşı DPPH giderme yüzdesi grafiklerinden yararlanarak hesaplandı.

### 3.2.3 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile paraoksonaz saflaştırılması

#### 3.2.3.1 Hidrofobik afinite kolonunun hazırlanışı

##### 3.2.3.1.1 CNBr ile Sepharose-4B'deki OH gruplarının aktivasyonu

10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeyene kadar devam edildi (10-15 dk). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir bunher hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğuk 0.1M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10.00) ile yıkandı.

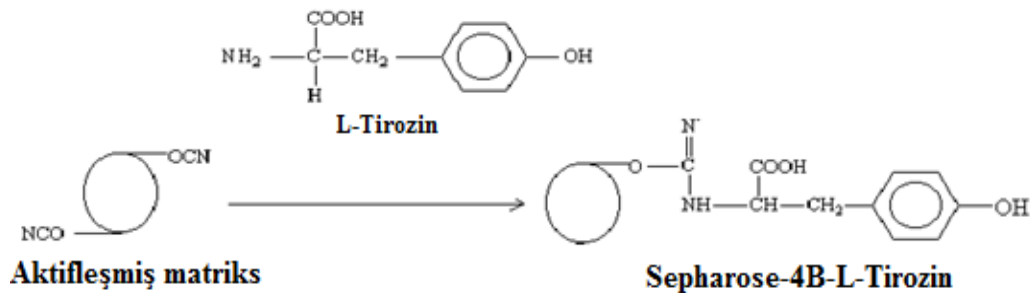


Şekil 3.5: Sepharose-4B aktivasyonu.

##### 3.2.3.1.2 L-tirozin bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4 °C'de bekletildi.

Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 8,8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

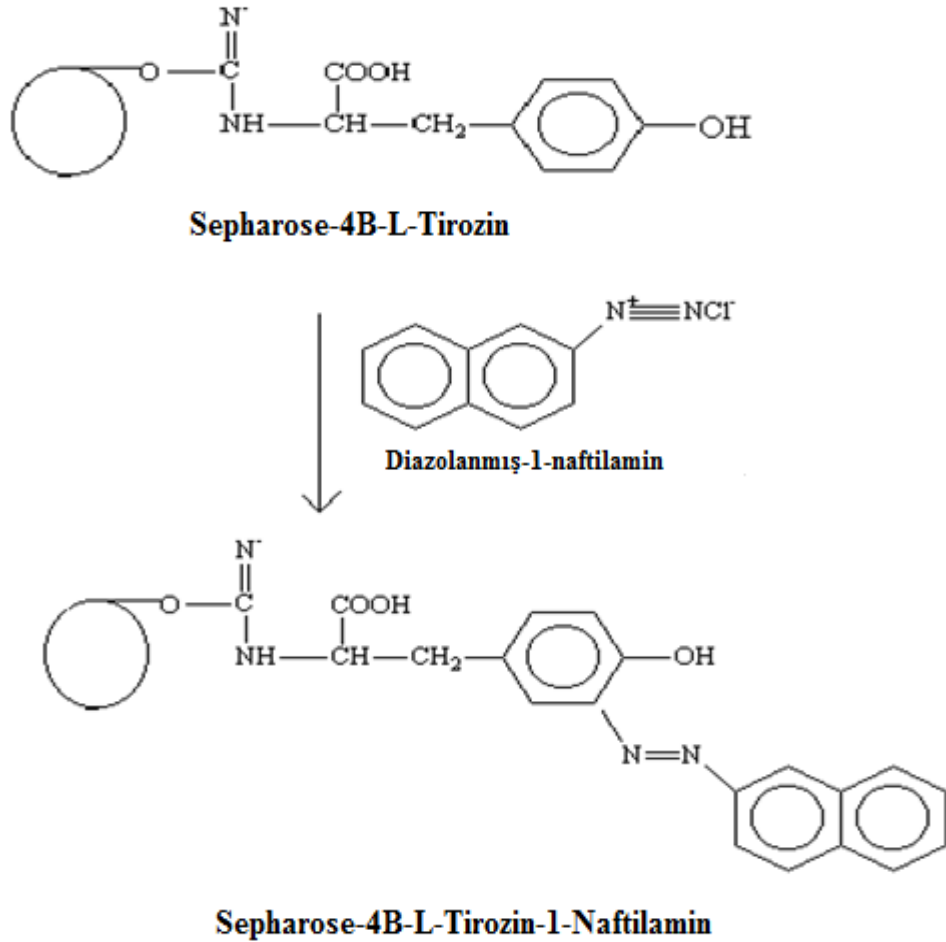


Şekil 3.6: L-tirozin bağlanması.



### 3.2.3.1.3 1-Naftilamin'in diazotasyonu ve Sepharose-4B-L-tirozin'e bağlanması

25 mg 1-naftilamin 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, 1-Naftilamin çözeltisine damla damla katıldı. (1-Naftilamin çözeltisi hazırlanırken etanol ilave edildi ve ısıtıldı) 10 dk reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 1-Naftilamin, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0,01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6,0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi.



Şekil 3.7: 1-naftilamin bağlanması.

### 3.2.3.2 Kanın toplanması ve santrifüj

İnsan serumu 34 mL taze insan kanından izole edildi ve kuru tüplere konuldu. Kan numuneleri 40 dk boyunca 5000 rpm'de santrifüj edildi ve 24 mL serum ayrıldı. İlk olarak, serum PON1 enzimi amonyum sülfat çöktürmesiyle izole edildi.

### 3.2.3.3 Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi

Amonyum sülfat çöktürmesi, çözünürlüklerin değiştirilmesi ile proteinleri saflaştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu metod, salting-out olarak da bilinen daha genel tekniğin spesifik durumudur. Amonyum sülfat çözünürlülüğünün oldukça yüksek olmasından dolayı yüksek iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin hazırlanmasında sıklıkla kullanılır. Amonyum sülfat çöktürme işlemi ilk saflaştırma aşaması basamağı olarak seçildi. Öncelikle, farklı amonyum sülfat aralıkları serum PON1 enzimi için incelendi.

Çöktürme aralığı serum PON1 enzimi için % 0-60 olarak bulundu. Çökelek, 40 dak boyunca 15000 rpm'de santrifüj ile elde edildi, 100 mM pH 8,0 Tris-baz tamponunda tekrar çözüldü ve kromatografik işlemlerde kullanıldı. Kullanılan amonyum sülfatın uygun konsantrasyonlar aşağıdaki formülle belirlenmiştir:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2} \quad (3.2)$$

V: Serum hacmi

S<sub>1</sub>: Başlangıçtaki % doygunluk

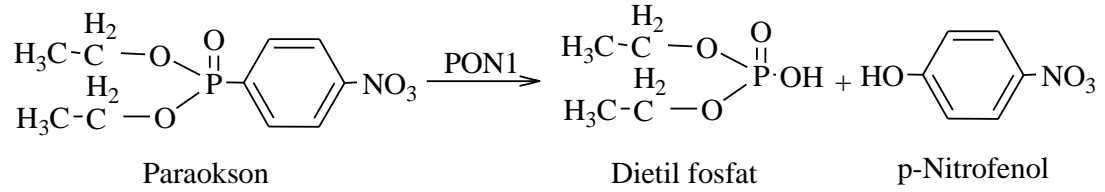
S<sub>2</sub>: Finaldeki % doygunluk

### 3.2.3.4 Hidrofobik etkileşim kromatografisi

Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen çökelek 4 mL denge tamponunda (pH 8,0) tekrar çözüldü ve hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonuna yüklenmek için hazırlandı. Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin yapısına sahip hidrofobik kolona yüklenmeden önce çökeltinin nihai tuz konsantrasyonu 1 M amonyum sülfata ayarlandı. Hidrofobik kolon laboratuvarımızda sentezlendi. Kolon 1 M amonyum sülfat içeren 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponuyla (pH 8,0) dengelendi. Paraoksonaz enzimi kolondan amonyum sülfat içeren ve içermeyen 0,1 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0) vasıtasıyla amonyum sülfat gradienti ile elue edildi.

### 3.2.3.5 Paraoksonaz enzim aktivite tayini

Paraoksonaz aktivitesi, Gan ve arkadaşları (1991) tarafından açıklanan metoda göre, substrat olarak paraoksan kullanılarak, p-nitrofenol oluşumundan dolayı absorbanstaki artışın spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle nicel olarak belirlenmiştir. Enzim aktivite tayini, 412 nm'de p-nitrofenol değerine bakılarak yapılmaktadır. p-nitrofenolün molar ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 17,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  pH 10,5) enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmıştır. PON1 aktivitesinin birimi analiz koşulları altında dakika başına oluşturulan 1  $\mu\text{mol}$  4-nitrofenol olarak tanımlanmaktadır. Reaksiyonda, p-nitrofenolün görüntüsü 37 °C'de 2 dk boyunca otomatik kaydeden spektrofotometre (Biotek automated recording ) yardımıyla 412 nm' de takip edildi. Nihai 2 mM substrat konsantrasyonu enzim analizi boyunca kullanıldı ve tüm ölçümler iki defa yapıldı.



Şekil 3.8: PON1 ile paraoksan reaksiyonu.

Paraoksonaz enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$EU, \text{ Aktivite (V)} = [T_v(\text{mL}) \times (\text{OD}) \times (1000)] / [(\epsilon_{412}) \times (E_v) \times (d/\text{cm})] \quad (3.3)$$

Burada;

$T_v$ : Toplam hacim

OD: Dakika başına absorbanstaki değişim

$\epsilon$ :  $17,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$E_v$ : Enzim hacmi

### 3.2.3.6 Toplam protein tayini

280 nm'deki absorban ölçümü, amonyum sülfat çöktürmesi ve kolondan alınan eluatlardaki proteinleri izlemek için kullanıldı. Kantitatif protein tayini ise, Bradford'a (Bradford, 1976) göre ,standart olarak sığır serum albümini kullanarak 595 nm'deki absorban ölçümleriyle belirlendi.

### **3.2.3.7 Optimum şartlarda $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması**

$K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda (37 °C'de ve 0,1 M pH 8 Tris-baz tamponunda) paraokson substratının sekiz farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

### **3.2.3.8 Hidrazon bileşiklerinin $IC_{50}$ değerlerinin bulunması**

Hidrazon türevlerinin inhibisyon çalışmaları için, farklı konsantrasyonlardaki hidrazon türevleri reaksiyon ortamına eklenmiştir. 2mM sabit paraokson substrat konsantrasyonunda çalışıldı. Paraoksonaz aktivitesi, hidrazon türevlerinin mevcudiyetinde, paraokson substratının hidrasyonunun izlenmesiyle tespit edilmiştir. Herbir hidrazon türevinin farklı konsantrasyonları için % aktivite değerleri, Microsoft Office 2010 kullanılarak regrasyon analiziyle tespit edilmiştir. Hidrazon türevleri içermeyen PON1 enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak kabul edilmiştir. Hidrazon türevleri için % 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonları ( $IC_{50}$  değerleri) grafiklerden elde edilmiştir.

### **3.2.3.9 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü**

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla yapılmıştır. Bu yöntem Laemmli'ye göre, sırasıyla, % 3 ve % 12 akrilamid konsantrasyonlarında, 0,1 SDS içeren, yığma ve yürütme jelleri hazırlanarak yapılmıştır [112]. Örnek (20 µg) elektroforez ortamına uygulanmıştır. Elektroforez jeli % 0,1'lik Commassie brillant blue R-250, % 50 metanol ve % 10 asetik asit içeren çözelti içinde 1 buçuk saat süre ile boyandı ve daha sonra boya içermeyen aynı çözeltide birkaç defa taze çözelti değiştirilerek boya uzaklaştırıldı. Elektroforetik örnek fotoğraflanmıştır.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

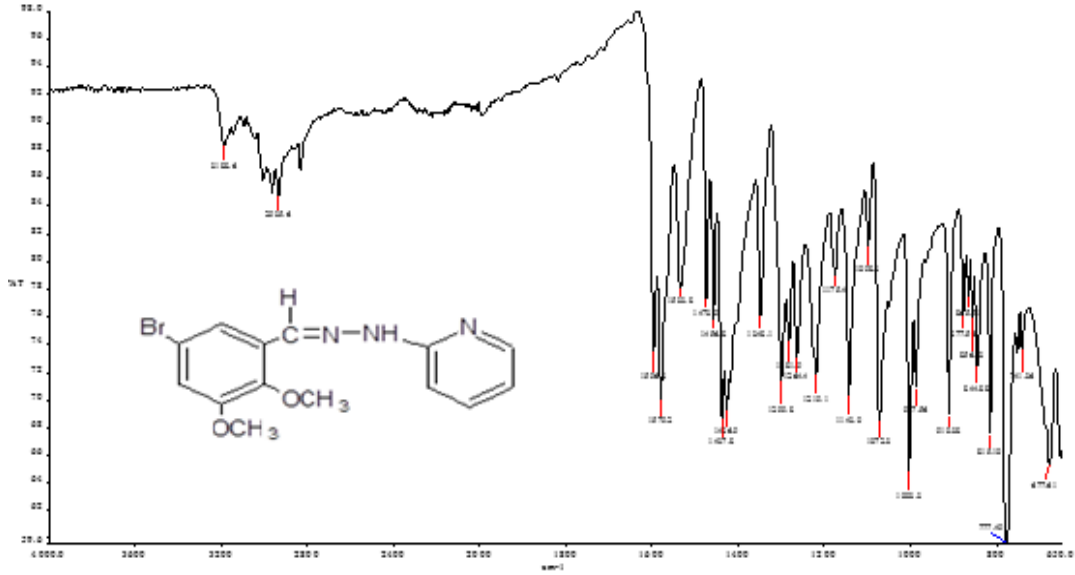
### 4.1 Hidrazon Türevlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Bu çalışma kapsamında dört farklı hidrazon türevi sentezlendi ve yapıları NMR, UV-VIS, FTIR, X-ışını ve elemental analiz metodları ile karakterize edildi. Sentezlenen hidrazon türevlerinin (Türev 1: B-2,3-MBPyH; Türev 2: B-2,4-MBPyH; Türev 3: 2,4-FMBPyH; Türev 4: 3,5-FMBThH) deneysel sonuçları aşağıda verilmiştir.

#### 4.1.1 Türev 1: B-2,3-MBPyH

Bu hidrazon türevini hazırlamak için 2-hidrazinopiridin çözeltisi 5-bromo-2,3-dimetoksibenzaldehit çözeltisine yavaş yavaş eklendi ve ürün olarak soluk sarı renkli bir kristal elde edildi.

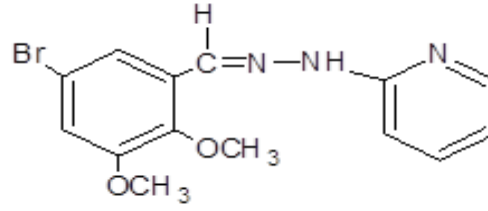
##### 4.1.1.1 FTIR spektrumu



Şekil 4.1: B-2,3-MBPyH'nin FTIR spektrumu.

IR spektrumunda, Schiff bazının N-H bandı yaklaşık 3188,6'de ve aromatik C-H bantları zayıf ve geniş bantlar şeklinde 2935,6  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. İmin grubu üzerindeki hidrojen 1596,8  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. C = N ve C = C aromatik gerilmeleri 1579,2-1533,8  $\text{cm}^{-1}$  'de gözlemlendi. CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, pikleri 1473,9-1426,9  $\text{cm}^{-1}$  'de gözlemlendi. C-O grubu 1072,3 $\text{cm}^{-1}$  'de gözlemlendi. IR spektrumunda yaklaşık olarak 815,10  $\text{cm}^{-1}$  'deki bant C- Br gerilimini göstermektedir.

#### 4.1.1.2 Elementel analiz verileri



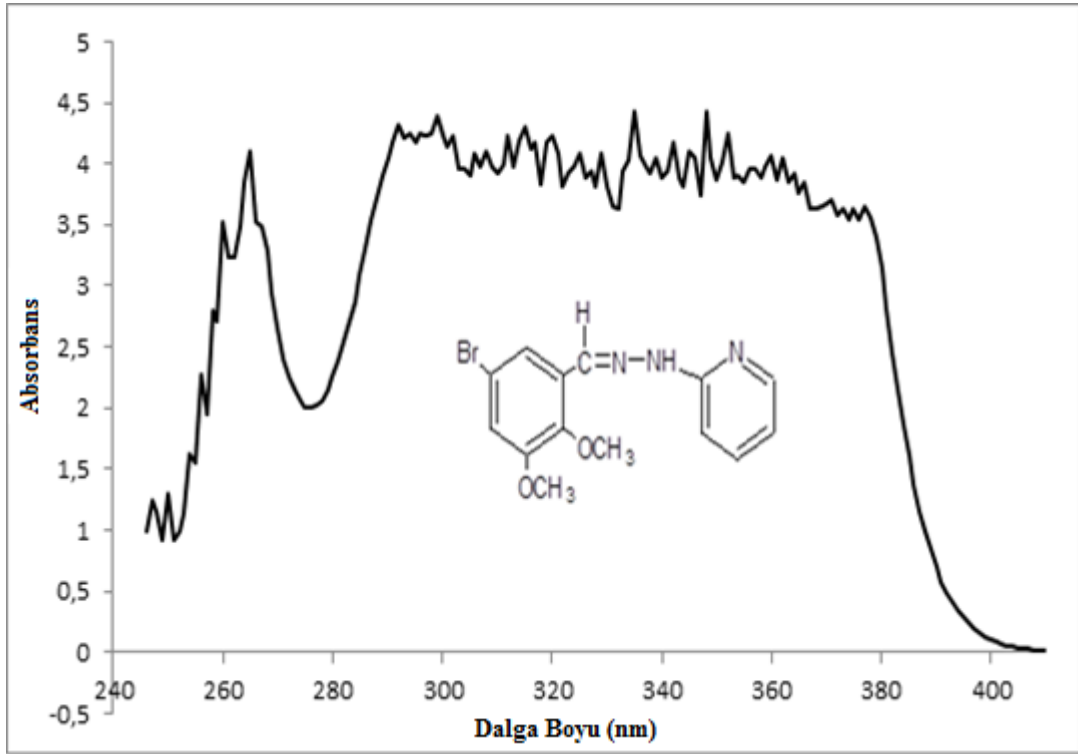
**Çizelge 4.1:** B-2,3-MBPyH'nin deneysel verileri.

#### Elementel Analiz

Kısaltma	Moleküler Formül	Moleküler Ağırlık	Renk	Verim %	% C		% N		% H	
					Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan
B-2,3-MBPyH	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> BrO <sub>2</sub>	335,898	Soluk sarı	75,25	50,015	47,345	12,504	11,354	4,168	3,975

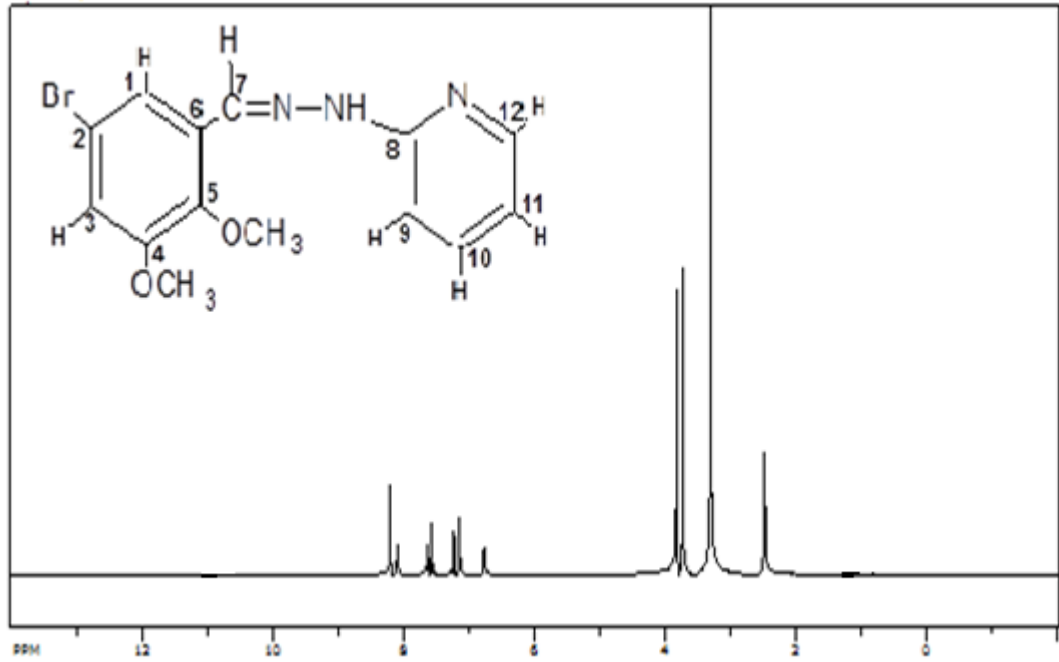
#### 4.1.1.3 UV-VIS absorpsiyonu

Ultraviyole-görünür (UV-VIS) absorpsiyonunda Schiff bazının yapısına bağlı olarak  $\lambda_{\max}$  pik değerleri genellikle 250-450 nm'de gözlemlenmiştir. Pikler moleküldeki HC=N ve aromatik C=C gruplarına bağlı n- $\pi^*$  ve  $\pi$ - $\pi^*$  geçişlerinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada DMSO'da  $\lambda_1=335$  nm ve  $\lambda_2=348$  nm'de gözlenen iki tane  $\lambda_{\max}$  vardır, absorbans değerleri 4,437'dir.  $\lambda_{\max}$  değerlerindeki kaymada toplamda iki etki vardır. Birincisinde, Br, indüktif olarak elektron çekicidir, fakat rezonans aracılığıyla, elektron verici etkileri birbiri üzerine karşıt yönde yüklemektedir. İkincisinde piridin halkasındaki N atomu üzerindeki eşleşmemiş elektron, rezonans yüzünden elektron verici grup olarak davranmamaktadır. N'in eşleşmemiş elektronları yüzünden, piridin formları güçlü moleküller arası hidrojen bağları ve elektron-verici etkisiyle o-konumunda söndürülmektedir.



Şekil 4.2: B-2,3-MBPyH için UV-VIS absorpsiyonu.

#### 4.1.1.4 NMR spektrumu



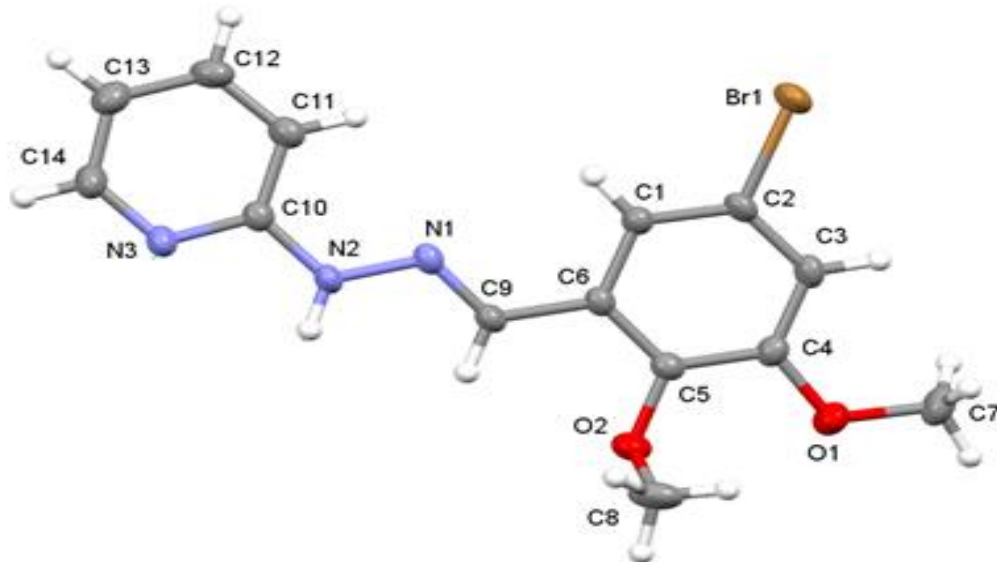
Şekil 4.3: B-2,3-MBPyH için NMR spektrumu.

$^1\text{H}$ -NMR verileri 8,205 ppm'de görülen tek pikin C7 imin protonu üzerindeki hidrojene ait ve 8,093 ppm'de görülen ikili pikin piridin halkasındaki C12 üzerinde bulunan hidrojene ait ve 7,626 ppm'de görülen üçlü pikin piridin halkasındaki C10 üzerinde bulunan hidrojene ait olduğunu, 7,57 ppm'deki tek pikin C1 üzerindeki yani Br'a bağlı komşu karbonun üzerindeki hidrojene ait olduğunu, 7,24 ppm'de görülen pikin C9 aromatik halka üzerinde bulunan hidrojene ait olduğunu, 7,14 ppm'deki pikin C3 üzerindeki hidrojene ait olduğunu, 6,76 ppm'de görülen üçlü pikin C11 üzerindeki hidrojene ait olduğunu, 3,827 ppm ve 3,73 ppm'de görülen piklerin C4, C5 üzerindeki  $\text{OCH}_3$  grubundaki hidrojene ait ve 3,3 ppm ile 2,48 ppm'de görülen piklerin DMSO çözücüsüne ait olduğunu göstermektedir.



#### 4.1.1.5 X-Işını kırınım çalışması

Birim hücre tespitinde ve veri toplamada kullanılan kristal ve enstrümantal parametreler Çizelge 4.2’de özetlendi. Kırınım ölçümleri, Bruker SMART BREEZE CCD difraktometresi üzerinde oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Görüntü almak için grafit monokromatikleştirici *MoK $\alpha$*  ışına ( $\lambda = 0,71073$  °Å) ve  $\Delta\omega = 5^\circ$  ile salınım taramaları tekniği veri toplamada kullanıldı. Kafes parametreleri  $F^2 > 2\sigma(F^2)$  ile tüm yansımaların temeli en küçük kareler metoduyla belirlendi. Yoğunlukların entegrasyonu, Lorentz için düzeltme, polarizasyon etkileri ve hücre arıtma (saflaştırma) Crystal Clear (Rigaku/MSK, Inc., The Woodlands, Teksas) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılar SHELXS-97 kullanılarak doğrudan yöntemlerle çözüldü ve SHELXL-97 programı kullanarak tam matrisin en küçük kareler prosedürü ile arındırıldı (saflaştırıldı). Tüm hidrojeniz atomlar anizotropik yer değiştirme parametreleri kullanılarak H8B, H8C ve H2 haricinde idealize edilmiş pozisyonlarda yer alan hidrojen atomları ise izotropik olarak saflaştırıldı. Molekülün çizimi % 50 olasılık ile ORTEP (Oak Ridge Termal Elipsoid Parsel Programı)’te gerçekleştirildi, yer değiştirme termal elipsoidleri ve atom-etiketleme şeması şekil 4.4’te gösterildi. H8B, H8C ve H2 haricindeki, H atomları C–H = 0,93 °Å ile geometrik olarak konumlandı ve  $U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C)$  ile kendi ana atomu üzerine binmeye zorlandı.



Şekil 4.4: B-2,3-MBPYH’ in ORTEP çiziminin, % 50 olasılık seviyesinde ve etiketleme şemasında yer değiştirme elipsoidiyle gösterimi.

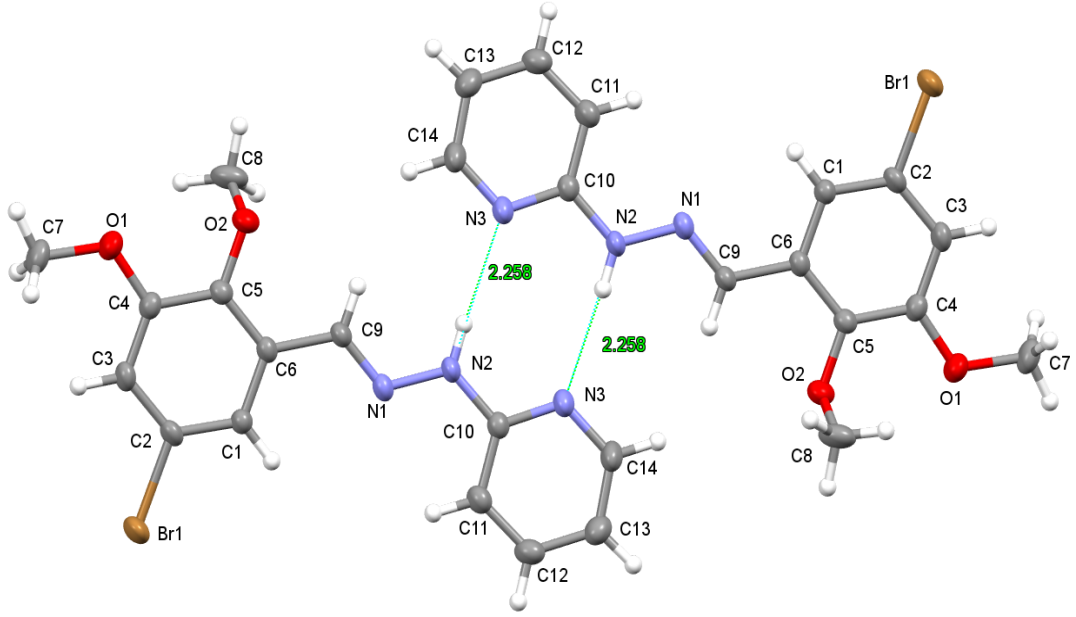
**Çizelge 4.2:** B-2,3-MBPyH için kristal verileri ve yapı saflaştırma detayları.

Kimyasal formül	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> BrO <sub>2</sub>
Molekül ağırlığı	336,19
Kristal sistem	Triklinik
Uzay grubu	P-1
Z	2
Kristal rengi	Soluk sarı
a,b,c	7,4810(3), 10,2720(4), 10,8102(5)
$\alpha$	117,203(2)
$\beta$	103,823(2)
$\gamma$	93,051(2)
V	704,62(5)
$D_x$	1,585 g cm <sup>-3</sup>
Işınım, $\lambda$	MoK $\alpha$ , 0,71073 °A
$\mu$	2,922 mm <sup>-1</sup>
T	293(2) K
T <sub>min</sub> , T <sub>max</sub>	0,128, 0,449
Tarama modu	$\omega/2\theta$
Tarama aralığı	-9 $\leq$ h $\leq$ 9, -13 $\leq$ k $\leq$ 13, -14 $\leq$ l $\leq$ 14
Kristal boyutu	1,195 x 0,965 x 0,326
$\theta_{min}$ , $\theta_{max}$	2,218, 28,232
I > 2 $\sigma$ (I) ile yansıma sayısı	3395
Saflaştırma parametresinin sayısı	184
S	1,066
Son R endeksleri [I > 2 $\sigma$ (I)]	2576
wR (I)	0,1010
$\Delta\rho_{max}$ , $\Delta\rho_{min}$	0,896, -0,420

B-2,3-MBPyH'nin yapısı uzay grubu P-1 ile triklinik kafes içine kristalize olmaktadır. Asimetrik birimin ORTEP görünümü Şekil 4.5'te gösterilmekte ve seçilen bağ mesafeleri, açıları ve torsiyon açısı Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da sunulmaktadır. Asimetrik birim bir Schiff bazı molekülü içermektedir. Molekülde, benzen ve piridin halkaları ve hidrazon köprüsü pratikte aynı düzlemedir. Başlıktaki bileşiğin molekülleri azometin C=N çiftli bağ etrafında 178,81(19)°'lik bir N2-N1-C9-C6 torsiyon açısı ile, bir E-konfigurasyonunu benimsemektedir. N2–C10 ve N1–N2 bağ mesafeleri sırasıyla 1,372(3) °A ve 1,362(3) °A arasındadır. N1–C9 çift bağ 1,272(3) °A 'dır (değerindedir).

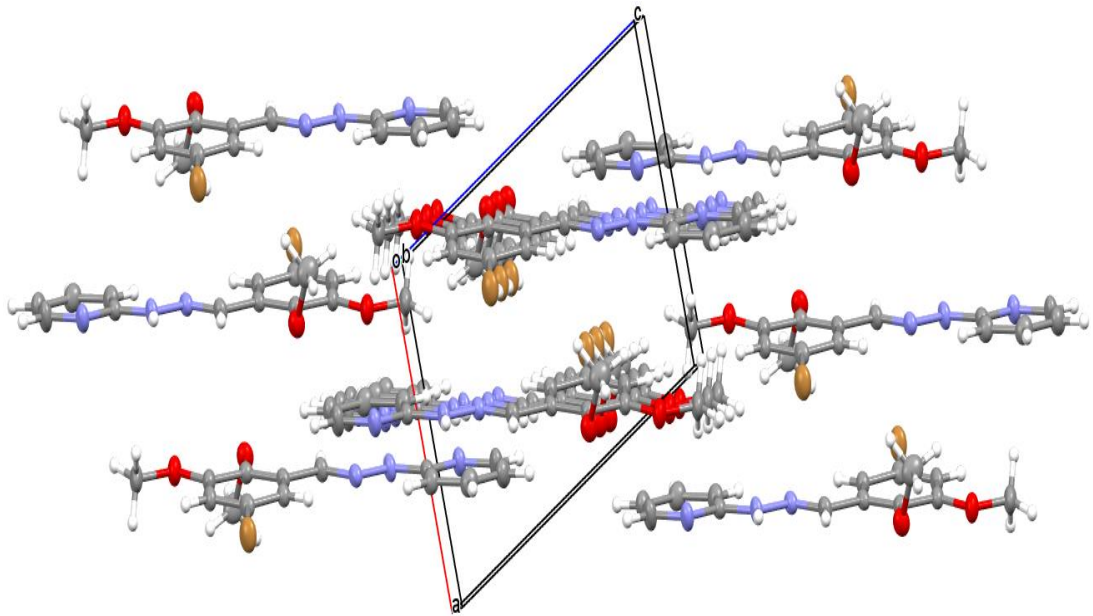
**Çizelge 4.3:** Hidrojen bağ mesafeleri (°A) ve açıları (°).

D–H...A	d(D–H) (°A)	d(H ..A) (°A)	d(D ..A) (°A)	D–H ..A (°)
C8–H8B–Br1	0,96	3,02	3,744(3)	133,8
C8–H8C–O1	0,96	2,47	3,012(4)	115,5
N2–H2–N3	0,86	2,26	3,097(3)	133,8



**Şekil 4.5:** B-2,3-MBPYH'nin *b*-ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, her bir enantiomer baş-kuyruk moleküler çiftleri oluşturmaktadır. Moleküller arası hidrojen bağı, hidrojen köprüsünün N atomuna (N2) bağlı H atomu arasında ve komşu molekülün [N2 H2 ... N3] piridin halkalarının N atomu (N3) arasında gözlenmiştir. Moleküller arası hidrojen bağı mesafeleri ve bağ açıları Çizelge 4.3'te listelenmiştir. Ayrıca,  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri paketleme diyagramından (Şekil 4.6) görülebilmektedir. Moleküller arası  $\pi$ - $\pi$  ve hidrojen bağlayıcı etkileşimler molekülleri bağlayabilmekte ve bu etkileşimler, kristal yapısının stabilizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.



**Şekil 4.6:** B-2,3-MBPYH'nin *a*-ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.

**Çizelge 4.4:** B-2,3-MBPyH'ın bağ mesafeleri (°A).

Bağ mesafeleri (°A)	
Br1–C2	1,900(2)
O2–C5	1,378(3)
O2–C8	1,424(3)
O1–C4	1,360(3)
O1–C7	1,432(3)
N1–C9	1,272(3)
N1–N2	1,362(3)
N2–C10	1,372(3)
N2–H2	0,8600
N3–C10	1,335(3)
N3–C14	1,345(3)
C6–C5	1,387(3)
C6–C1	1,391(3)
C6–C9	1,466(3)
C9–H9	0,9300
C1–C2	1,372(3)
C1–H1	0,9300
C4–C3	1,372(3)
C4–C5	1,404(3)
C10–C11	1,393(4)
C3–C2	1,383(4)
C3–H3	0,9300
C11–C12	1,366(4)
C11–H11	0,9300
C14–C13	1,366(4)
C14–H14	0,9300
C12–C13	1,388(4)
C12–H12	0,9300
C7–H7A	0,9600
C7–H7B	0,9600
C7–H7C	0,9600
C13–H13	0,9300
C8–H8A	0,9600
C8–H8B	0,9600
C8–H8C	0,9600

**Çizelge 4.5:** B-2,3-MBPyH'ın bağ açıları (°).

Bağ açıları (°)	
C5–O2–C8	113,36(19)
C4–O1–C7	117,4(2)
C9–N1–N2	117,2(2)
N1–N2–C10	118,8(2)
N1–N2–H2	120,6
C10–N2–H2	120,6
C10–N3–C14	116,6(2)
C5–C6–C1	119,2(2)
C5–C6–C9	120,2(2)
C1–C6–C9	120,6(2)
N1–C9–C6	120,3(2)
N1–C9–H9	119,9
C6–C9–H9	119,9
C2–C1–C6	119,0(2)
C2–C1–H1	120,5
C6–C1–H1	120,5
O1–C4–C3	124,6(2)
O1–C4–C5	115,7(2)
C3–C4–C5	119,7(2)
O2–C5–C6	119,7(2)
O2–C5–C4	119,5(2)
C6–C5–C4	120,7(2)
N3–C10–N2	115,0(2)
N3–C10–C11	122,9(2)
N2–C10–C11	122,1(2)
C4–C3–C2	118,7(2)
C4–C3–H3	120,6
C2–C3–H3	120,6
C1–C2–C3	122,6(2)
C1–C2–Br1	118,86(19)
C3–C2–Br1	118,53(17)
C12–C11–C10	118,7(3)
C12–C11–H11	120,6
C10–C11–H11	120,6
N3–C14–C13	124,6(3)
N3–C14–H14	117,7
C13–C14–H14	117,7
C11–C12–C13	119,5(3)
C11–C12–H12	120,2
C13–C12–H12	120,2
O1–C7–H7A	109,5
O1–C7–H7B	109,5
H7A–C7–H7B	109,5
O1–C7–H7C	109,5
H7A–C7–H7C	109,5
H7B–C7–H7C	109,5
C14–C13–C12	117,6(3)
C14–C13–H13	121,2
C12–C13–H13	121,2
O2–C8–H8A	109,5
O2–C8–H8B	109,5
H8A–C8–H8B	109,5
O2–C8–H8C	109,5
H8A–C8–H8C	109,5
H8B–C8–H8C	109,5

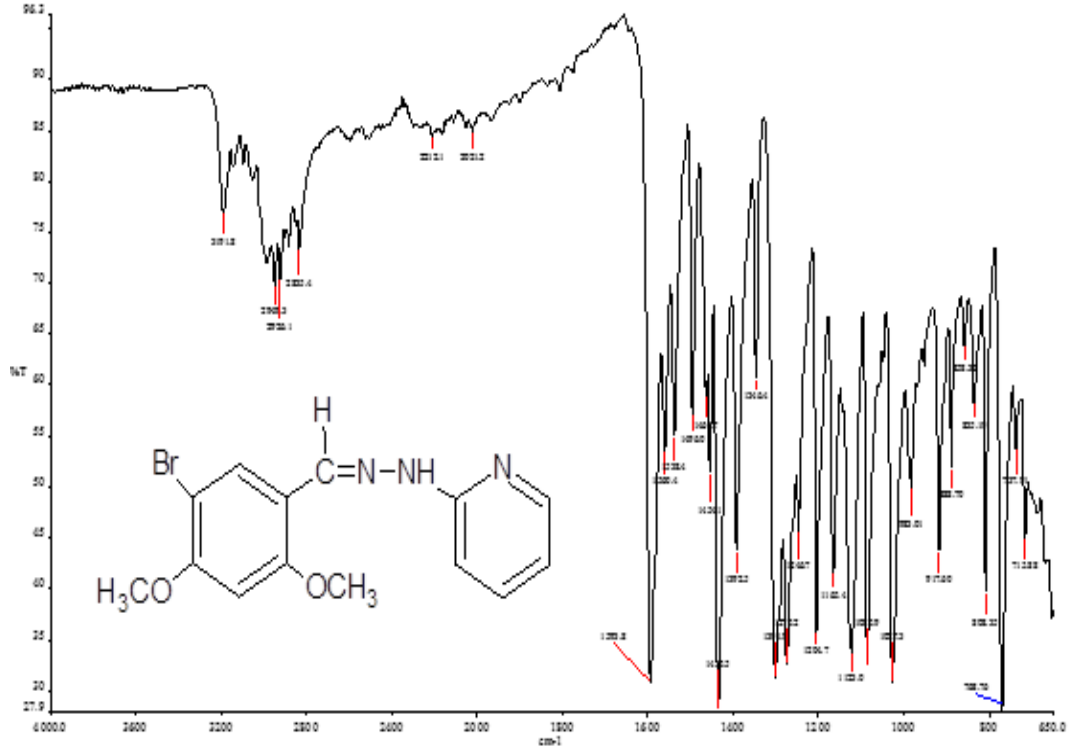
**Çizelge 4.6:** B-2,3-MBPyH'ın torsiyon açıları.

Torsiyon açıları (°)	
C9–N1–N2–C10	176,3(2)
N2–N1–C9–C6	178,81(19)
C5–C6–C9–N1	-179,4(2)
C1–C6–C9–N1	-1,0(3)
C5–C6–C1–C2	0,8(3)
C9–C6–C1–C2	-177,6(2)
C7–O1–C4–C3	0,0(3)
C7–O1–C4–C5	179,7(2)
C8–O2–C5–C6	107,4(3)
C8–O2–C5–C4	-74,9(3)
C1–C6–C5–O2	179,8(2)
C9–C6–C5–O2	-1,8(3)
C1–C6–C5–C4	2,1(3)
C9–C6–C5–C4	-179,5(2)
O1–C4–C5–O2	-0,7(3)
C3–C4–C5–O2	178,9(2)
O1–C4–C5–C6	177,0(2)
C3–C4–C5–C6	-3,3(3)
C14–N3–C10–N2	179,7(2)
C14–N3–C10–C11	-0,4(4)
N1–N2–C10–N3	-179,8(2)
N1–N2–C10–C11	0,3(3)
O1–C4–C3–C2	-178,7(2)
C5–C4–C3–C2	1,7(3)
C6–C1–C2–C3	-2,5(3)
C6–C1–C2–Br1	175,10(16)
C4–C3–C2–C1	1,2(4)
C4–C3–C2–Br1	-176,35(17)
N3–C10–C11–C12	0,9(4)
N2–C10–C11–C12	-179,2(2)
C10–N3–C14–C13	-0,6(4)
C10–C11–C12–C13	-0,4(4)
N3–C14–C13–C12	0,9(5)
C11–C12–C13–C14	-0,4(4)

#### 4.1.2 Türev 2: B-2,4-MBPyH

Bu hidrazon türevini hazırlamak için 2-hidrazinopiridin çözeltisi 5-Bromo-2,4-dimetoksibenzaldehit çözeltisine yavaş yavaş eklendi ve ürün olarak soluk sarı renkli bir kristal elde edildi.

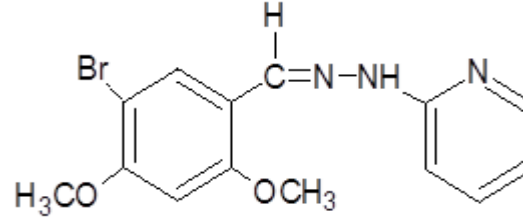
##### 4.1.2.1 FTIR spektrumu



Şekil 4.7: B-2,4-MBPyH için FTIR spektrumu.

Bu yapı sayesinde, Schiff bazının IR spektrumunda, N-H bandı yaklaşık  $3191,8 \text{ cm}^{-1}$ 'de ve aromatik C-H bantları zayıf ve geniş bantlar şeklinde  $2949,3 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. İmin grubu üzerindeki hidrojen  $1593,8 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. C = N ve C = C aromatik gerilmeleri  $1560,4-1538,4 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, pikleri  $1496,0-1435,5 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. C-O grubu  $1085,9 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. IR spektrumundaki bant yaklaşık olarak  $808,35 \text{ cm}^{-1}$ 'de C- Br gerilme moduna tahsis edilebildi.

#### 4.1.2.2 Elementel analiz verileri



Çizelge 4.7: B-2,4-MBPyH'nin deneysel verileri.

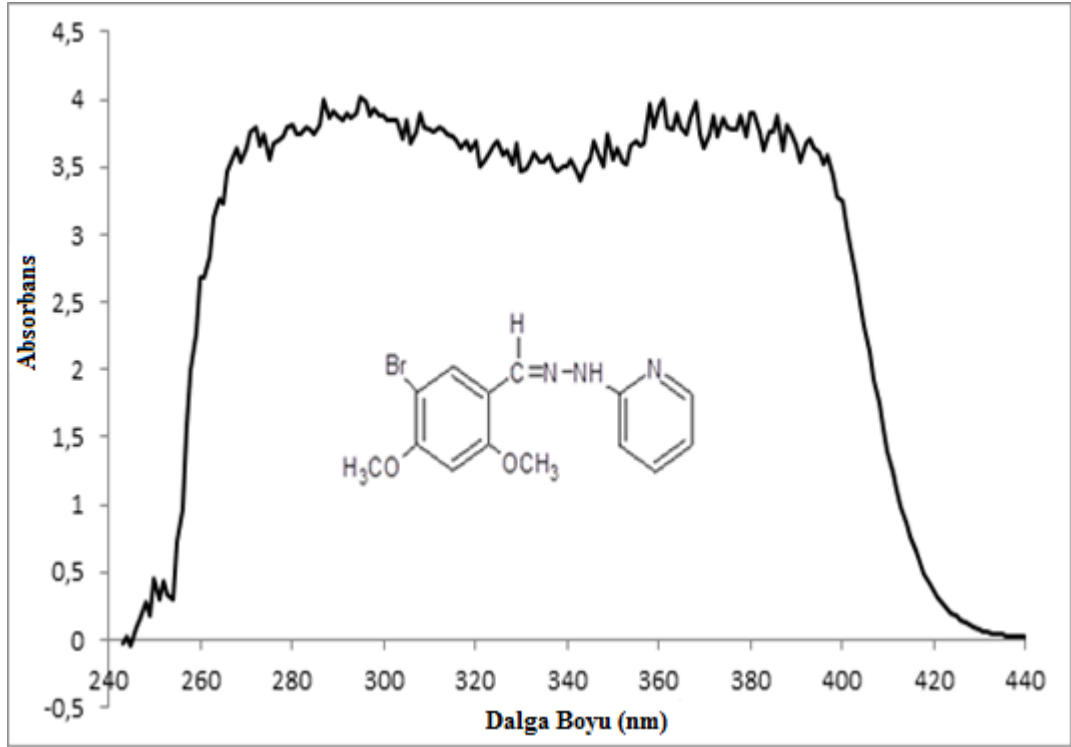
48

Kısaltma	Moleküler Formül	Moleküler Ağırlık	Renk	Verim %	Elementel Analiz					
					% C		% N		% H	
					Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan
B-2,4-MBPyH	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> BrO <sub>2</sub>	335,898	Soluk sarı	81,884	50,015	55,874	12,504	12,99	4,168	4,88



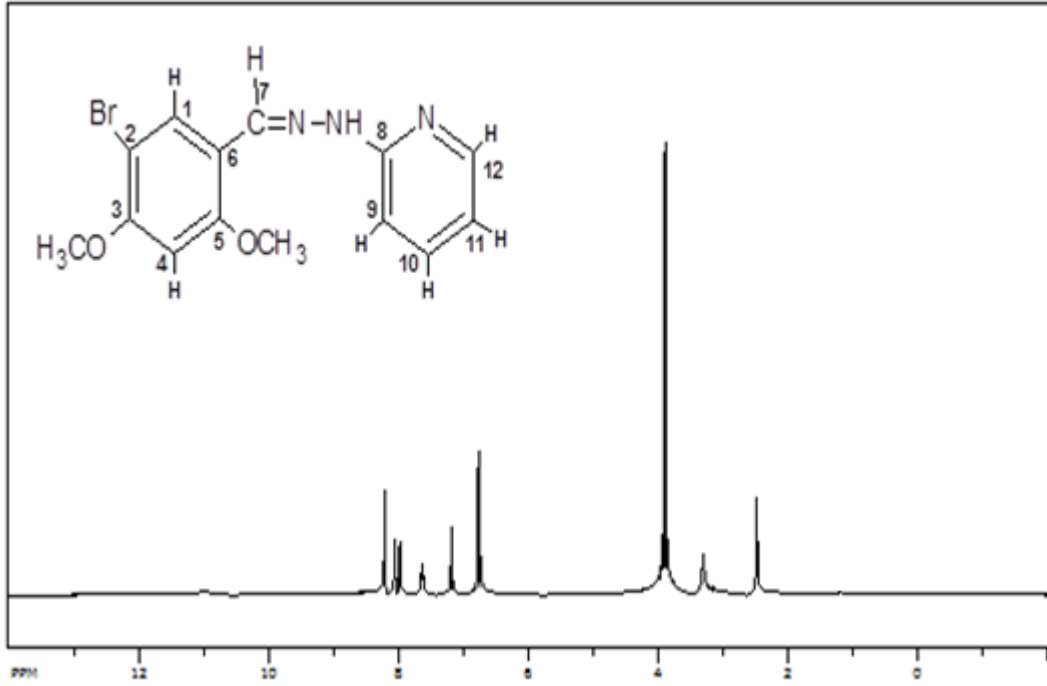
#### 4.1.2.3 UV-VIS absorpsiyonu

Ultraviyole-görünür (UV-VIS) absorpsiyonunda  $\lambda_{\max}$  pik değerleri Schiff bazının yapısına bağlı olarak genellikle 250-450 nm'de gözlemlenmiştir. Pikler moleküldeki HC=N ve aromatik C=C gruplarına bağlı n- $\pi^*$  ve  $\pi$ - $\pi^*$  geçişlerinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada DMSO'da  $\lambda_1=295$  nm ve  $\lambda_2=360$  nm'de gözlenen iki tane  $\lambda_{\max}$  vardır, absorbans değerleri 4,018 ve 3,944'dir.  $\lambda_{\max}$  değerlerindeki kaymada toplamda iki etki vardır. Birincisinde, Br, indüktif olarak elektron çekicidir, fakat rezonans aracılığıyla, elektron verici etkileri birbiri üzerine karşıt yönde yüklemektedir. İkincisinde piridin halkasındaki N atomu üzerindeki eşleşmemiş elektron rezonans yüzünden elektron verici grup olarak davranmamaktadır. N'in eşleşmemiş elektronları yüzünden, piridin formları güçlü moleküller arası hidrojen bağları ve elektron-verici etkisiyle o-konumunda söndürülmektedir.



Şekil 4.8: B-2,4-MBPYH için UV-VIS absorpsiyonu.

#### 4.1.2.4 NMR spektrumu

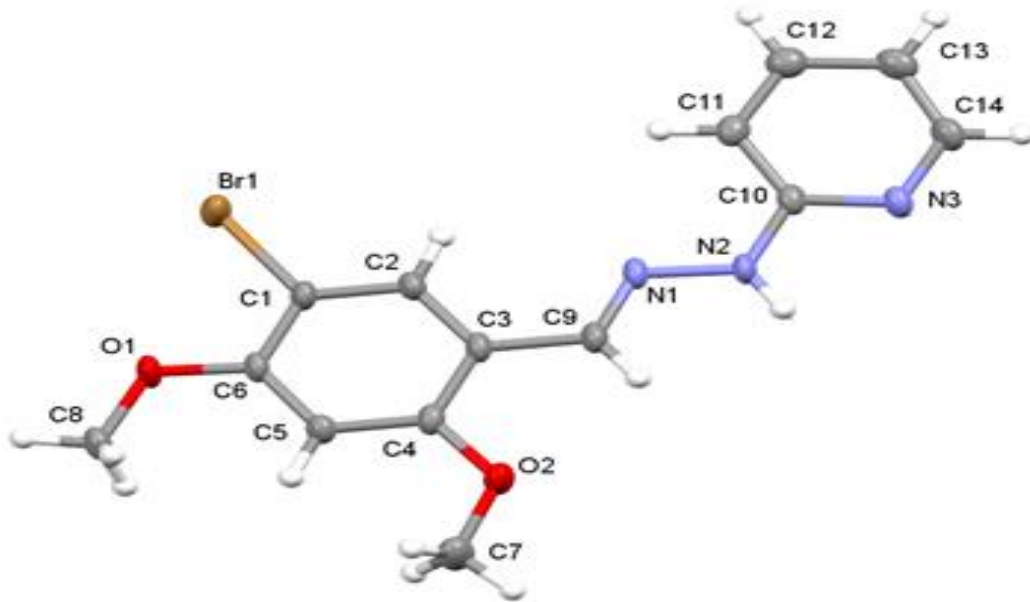


Şekil 4.9: B-2,4-MBPyH için NMR spektrumu.

<sup>1</sup>H-NMR verileri 8,217 ppm'de görülen kaymadaki tek pikin C7 imin grubu üzerindeki hidrojene ait, 8,056 ppm'de görülen ikili kayma pikinin piridin halkasındaki C12 üzerinde bulunan hidrojene ait, 7,982 ppm'de görülen tek pikin C1 üzerindeki hidrojene ait olduğunu, 7,637 ppm'de görülen kaymadaki üçlü pikin piridin halkasındaki C10 üzerinde bulunan hidrojene ait olduğunu göstermekte, 7,183 ppm'deki ikili pik C9 üzerindeki hidrojene ait olduğunu göstermekte, 6,77 ppm'de görülen tek pikin C4 üzerinde bulunan hidrojene ait, 6,741 ppm'de görülen üçlü piklerin C11 üzerindeki hidrojene ait, 3,906 ppm ve 3,886 ppm'de görülen piklerin C3 ve C5 üzerindeki OCH<sub>3</sub> grubundaki hidrojenlere ait olduğunu ve 3,308 ppm ile 2,482 ppm'de görülen piklerin DMSO çözücüsü ile ilgili olduğunu göstermektedir.

#### 4.1.2.5 X-Işını kırınım çalışması

Birim hücre tespitinde ve veri toplamada kullanılan kristal ve enstrümantal parametreler Çizelge 4.8’de özetlendi. Kırınım ölçümleri, Bruker SMART BREEZE CCD difraktometresi üzerinde oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Görüntü almak için grafit monokromatikleştirici *MoK $\alpha$*  ışına ( $\lambda = 0,71073$  °Å) ve  $\Delta\omega = 5^\circ$  ile salınım taramaları tekniği veri toplamada kullanıldı. Kafes parametreleri  $F^2 > 2\sigma(F^2)$  ile tüm yansımaların temeli en küçük kareler metoduyla belirlendi. Yoğunlukların entegrasyonu, Lorentz için düzeltme, polarizasyon etkileri ve hücre arıtma (saflaştırma) Crystal Clear (Rigaku/MSK, Inc., The Woodlands, Teksas) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılar SHELXS-97 kullanılarak doğrudan yöntemlerle çözüldü ve SHELXL-97 programı kullanarak tam matrisin en küçük kareler prosedürü ile saflaştırıldı. Tüm hidrojen atomları anizotropik yer değiştirme parametreleri kullanılarak H8B, H2 ve H13 haricinde idealize edilmiş pozisyonlarda yer alan hidrojen atomları ise izotropik olarak saflaştırıldı. Molekülün çizimi % 50 olasılık ile ORTEP (Oak Ridge Termal Elipsoid Parsel Programı)’te gerçekleştirildi, yer değiştirmetermal elipsoidleri ve atom-etiketleme şeması Şekil 4.10’da gösterildi. H8B, H2 ve H13 haricindeki, H atomları C–H = 0,93 °Å ile geometrik olarak konumlandı ve  $U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C)$  ile kendi ana atomu üzerine binmeye zorlandı.



Şekil 4.10: B-2,4-MBPYH’ ın ORTEP çiziminin, % 50 olasılık seviyesinde ve etiketleme şemasında yer değiştirme elipsoidiyle gösterimi.

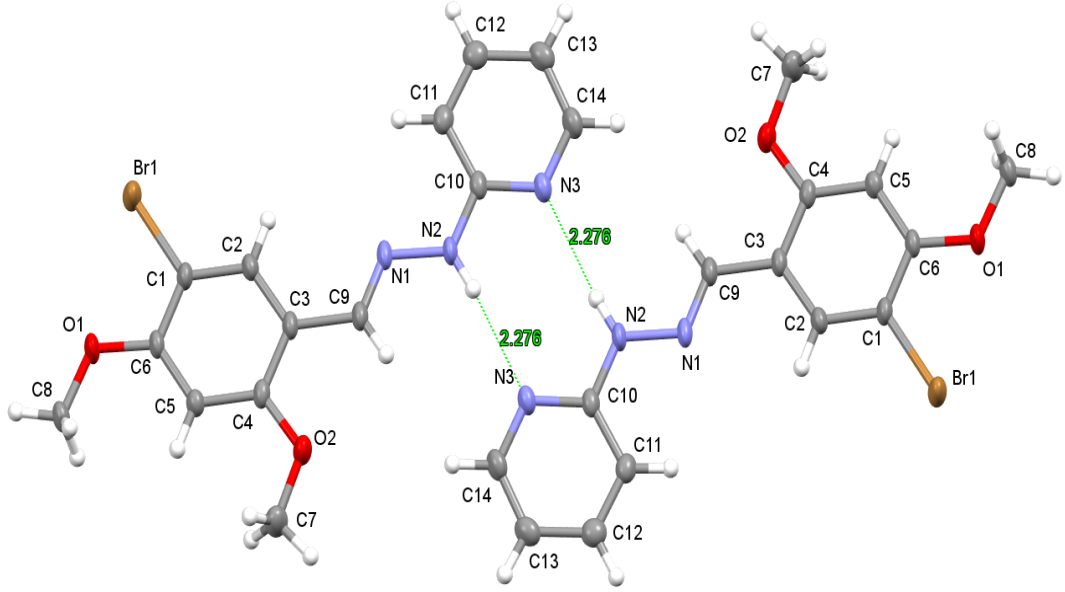
**Çizelge 4.8:** B-2,4-MBPyH için kristal verileri ve yapı saflaştırma detayları.

Kimyasal formül	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> BrO <sub>2</sub>
Molekül ağırlığı	336,19
Kristal sistem	Monoklinik
Uzay grubu	P 21/c
Z	2
Kristal rengi	Sarı
a,b,c	11,0126(6), 15,9440(9), 8,2463(5)
$\alpha$	90
V	1423,17(14)
$D_X$	1,569 g cm <sup>-3</sup>
Işınım, $\lambda$	MoK $\alpha$ , 0,71073 °A
$\mu$	2,922 mm <sup>-1</sup>
T	293(2) K
T <sub>min</sub> , T <sub>max</sub>	0,166, 0,745
Tarama modu	$\omega/2\theta$
Tarama aralığı	-14 $\leq$ h $\leq$ 14, -21 $\leq$ k $\leq$ 21, -10 $\leq$ l $\leq$ 10
Kristal boyutu	0,968 x 0,633 x 0,108
$\theta_{min}$ , $\theta_{max}$	1,881, 28,377
I > 2 $\sigma$ (I) ile yansıma sayısı	3525
Saflaştırma parametresinin sayısı	184
S	1,061
Son R endeksleri [I > 2 $\sigma$ (I)]	2158
wR (I)	0,1289
$\Delta\rho_{max}$ , $\Delta\rho_{min}$	0,853, -0,358

B-2,4-MBPyH'nin yapısı uzay grubu P 21/c ile monoklinik kafes içine kristalize olmaktadır. Asimetrik birimin ORTEP görünümü Şekil 4.11'de gösterilmekte ve seçilen bağ mesafeleri, açıları ve torsiyon açısı Çizelge 4.10, Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12'de sunulmaktadır. Asimetrik birim bir Schiff bazı molekülü içermektedir. Molekülde, benzen ve piridin halkaları ve hidrazon köprüsü pratikte aynı düzlemdedir. Başlıktaki bileşiğin molekülleri azometin C=N çiftli bağ etrafında 178,3(3)°'lik bir N2-N1-C9-C3 torsiyon açısı ile, bir E-konfigurasyonunu benimsemektedir. N2-C10 ve N1-N2 bağ mesafeleri sırasıyla 1,362(4) °A ve 1,373(3) °A arasındadır. N1-C9 çift bağ 1,277(4) °A değerindedir.

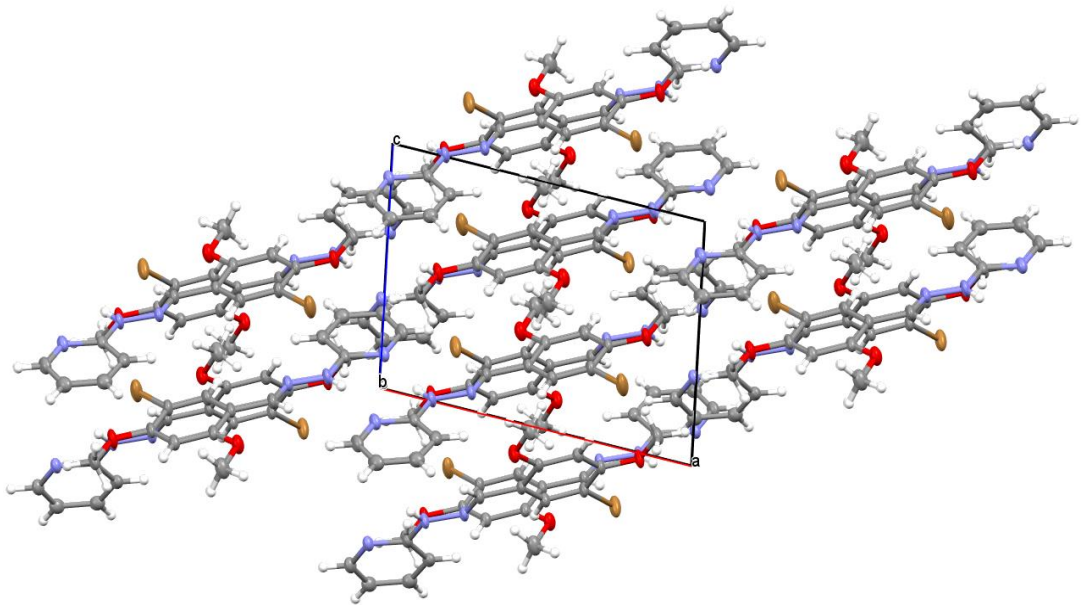
**Çizelge 4.9:** Hidrojen bağ mesafeleri (°A) ve açıları (°).

D—H...A	d(D—H) (°A)	d(H...A) (°A)	d(D...A) (°A)	D—H...A (°)
C8—H8B—O1	0,96	2,63	3,409(4)	138,9
N2—H2—N3	0,86	2,28	3,122(4)	167,8
C13—H13—Br1	0,93	3,05	3,534(4)	114,1



**Şekil 4.11:** B-2,4-MBPYH'nin *b*-ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.

Şekil 4.11'de görüldüğü gibi, her bir enantiomer baş-kuyruk moleküler çiftleri oluşturmaktadır. Moleküller arası hidrojen bağı, hidrojen köprüsünün N atomuna (N2) bağlı H atomu arasında ve komşu molekülün [N2 H2 ... N3] piridin halkalarının N atomu (N3) arasında gözlenmiştir. Moleküller arası hidrojen bağı mesafeleri ve bağı açılı Çizelge 4.9'da listelenmiştir. Ayrıca,  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri paketleme diyagramından (Şekil 4.12) görülebilmektedir. Moleküller arası  $\pi$ - $\pi$  ve hidrojen bağlayıcı etkileşimler molekülleri bağlayabilmekte ve bu etkileşimler, kristal yapısının stabilizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.



**Şekil 4.12:** B-2,4-MBPYH'nin *a*-ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.

**Çizelge 4.10:** B-2,4-MBPyH'in bağ mesafeleri (°A).

Bağ mesafeleri (°A)	
Br1-C1	1,886(3)
O1-C6	1,356(3)
O1-C8	1,418(4)
O2-C4	1,370(4)
O2-C7	1,413(5)
N3-C10	1,343(4)
N3-C14	1,344(5)
N1-C9	1,277(4)
N1-N2	1,373(3)
N2-C10	1,362(4)
N2-H2	0,8600
C10-C11	1,397(5)
C6-C5	1,384(4)
C6-C1	1,384(4)
C3-C2	1,383(5)
C3-C4	1,396(5)
C3-C9	1,466(4)
C4-C5	1,393(4)
C5-H5	0,9300
C9-H9	0,9300
C2-C1	1,375(4)
C2-H2	0,9300
C11-C12	1,369(5)
C11-H11	0,9300
C8-H8A	0,9600
C8-H8B	0,9600
C8-H8C	0,9600
C14-C13	1,363(6)
C14-H14	0,9300
C12-C13	1,388(6)
C12-H12	0,9300
C13-H13	0,9300
C7-H7A	0,9600
C7-H7B	0,9600
C7-H7C	0,9600

**Çizelge 4.11:** B-2,4-MBPyH'nin bağ açıları (°).

Bağ açıları (°)	
C6-O1-C8	118,7(3)
C4-O2-C7	118,4(3)
C10-N3-C14	116,9(3)
C9-N1-N2	116,8(3)
C10-N2-N1	118,7(3)
C10-N2-H2	120,6
N1-N2-H2	120,6
N3-C10-N2	115,1(3)
N3-C10-C11	122,6(3)
N2-C10-C11	122,3(3)
O1-C6-C5	124,3(3)
O1-C6-C1	116,9(3)
C5-C6-C1	118,8(3)
C2-C3-C4	117,4(3)
C2-C3-C9	121,1
C4-C3-C9	121,4(3)
O2-C4-C5	122,9(3)
O2-C4-C3	116,0(3)
C5-C4-C3	121,0(3)
C6-C5-C4	120,3(3)
C6-C5-H5	119,9
C4-C5-H5	119,9
N1-C9-C3	119,7(3)
N1-C9-H9	120,1
C3-C9-H9	120,1
C1-C2-C3	121,8(3)
C1-C2-H2	119,1
C3-C2-H2	119,1
C12-C11-C10	118,7(3)
C12-C11-H11	120,6
C10-C11-H11	120,6
C2-C1-C6	120,6(3)
C2-C1-Br1	120,5(3)
C6-C1-Br1	118,8(2)
O1-C8-H8A	109,5
O1-C8-H8B	109,5
H8A-C8-H8B	109,5
O1-C8-H8C	109,5
H8A-C8-H8C	109,5
H8B-C8-H8C	109,5
N3-C14-C13	124,2(4)
N3-C14-H14	117,9
C13-C14-H14	117,9
C11-C12-C13	119,3(4)
C11-C12-H12	120,4
C13-C12-H12	120,4
C14-C13-C12	118,3(4)
C14-C13-H13	120,9
C12-C13-H13	120,9
O2-C7-H7A	109,5
O2-C7-H7B	109,5
H7A-C7-H7B	109,5
O2-C7-H7C	109,5
H7A-C7-H7C	109,5
H7B-C7-H7C	109,5

**Çizelge 4.12:** B-2,4-MBP<sub>y</sub>H'ın torsiyon açıları.

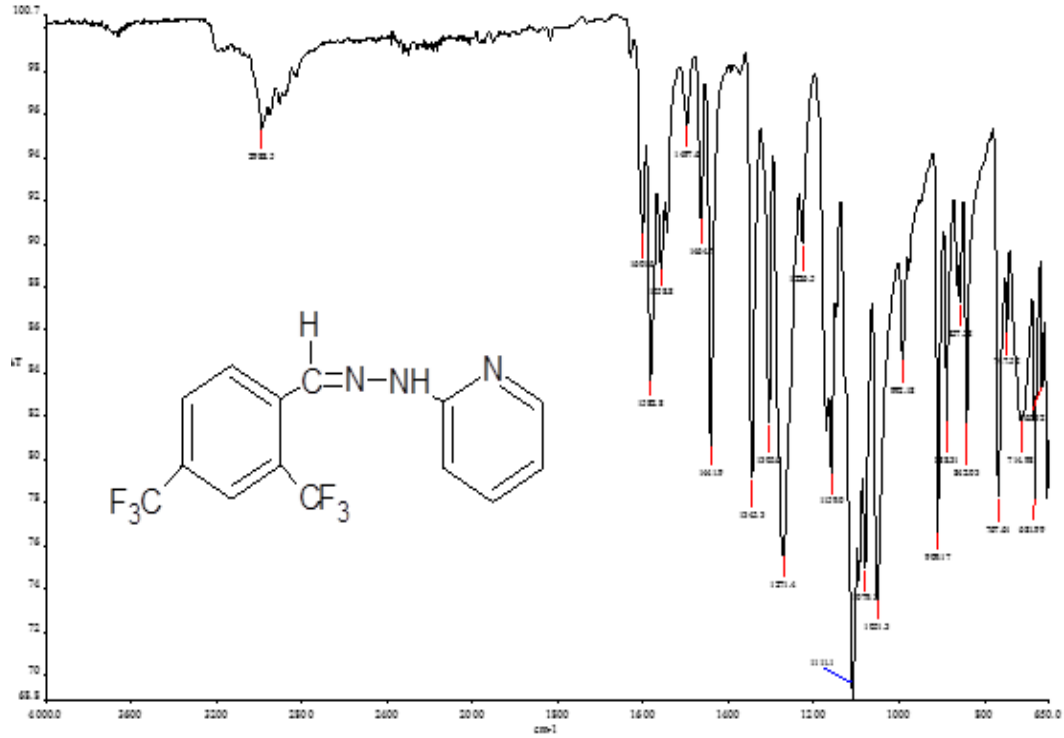
Torsiyon açıları (°)	
C9–N1–N2–C10	175,8(3)
C14–N3–C10–N2	177,4(3)
C14–N3–C10–C11	-1,1(5)
N1–N2–C10–N3	174,2(3)
N1–N2–C10–C11	-7,3(5)
C8–O1–C6–C5	-1,1(5)
C8–O1–C6–C1	179,1(3)
C7–O2–C4–C3	178,1(3)
C2–C3–C4–O2	179,6(3)
C9–C3–C4–O2	-2,2(5)
C2–C3–C4–C5	-0,9(5)
C9–C3–C4–C5	177,3(3)
O1–C6–C5–C4	-179,2(3)
C1–C6–C5–C4	0,6(5)
O2–C4–C5–C6	179,1(3)
C3–C4–C5–C6	-0,4(5)
N2–N1–C9–C3	178,3(3)
C2–C3–C9–N1	4,5(5)
C4–C3–C9–N1	-173,6(3)
C4–C3–C2–C1	1,9(5)
C9–C3–C2–C1	-176,2(3)
N3–C10–C11–C12	0,0(5)
N2–C10–C11–C12	-178,4(3)
C3–C2–C1–C6	-1,7(5)
C3–C2–C1–Br1	179,1(3)
O1–C6–C1–C2	-179,8(3)
C5–C6–C1–C2	0,4(5)
O1–C6–C1–Br1	-0,6(4)
C5–C6–C1–Br1	179,6(2)
C10–N3–C14–C13	1,0(5)
C10–C11–C12–C13	1,2(5)
N3–C14–C13–C12	0,2(6)
C11–C12–C13–C14	-1,3(5)



### 4.1.3 Türev 3: 2,4-FMBPyH

Bu hidrazon türevini hazırlamak için 2-hidrazinopiridin çözeltisi (0,005 mol) civarında yavaş yavaş 2,4-bis(triflorometil) benzaldehit çözeltisine (0,005 mol) eklendi. Sonuçta sarı renkli Schiff bazı elde edildi.

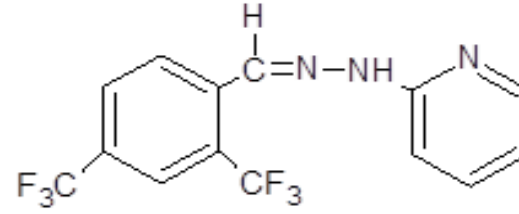
#### 4.1.3.1 FTIR spektrumu



Şekil 4.13: 2,4-FMBPyH için FTIR spektrumu.

Bu yapı sayesinde, Schiff bazının IR spektrumunda, N-H bandı yaklaşık  $3200\text{cm}^{-1}$ 'de ve C-H grubu zayıf ve geniş bantlar şeklinde  $2988,5\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. İmin grubu üzerindeki hidrojen  $1601,6\text{ cm}^{-1}$  'de gözlemlendi. C=N ve C=C aromatik gerilmeleri  $1582,8\text{-}1558,8\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, pikleri  $1497,6\text{-}1305,6\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi.

#### 4.1.3.2 Elementel analiz verileri



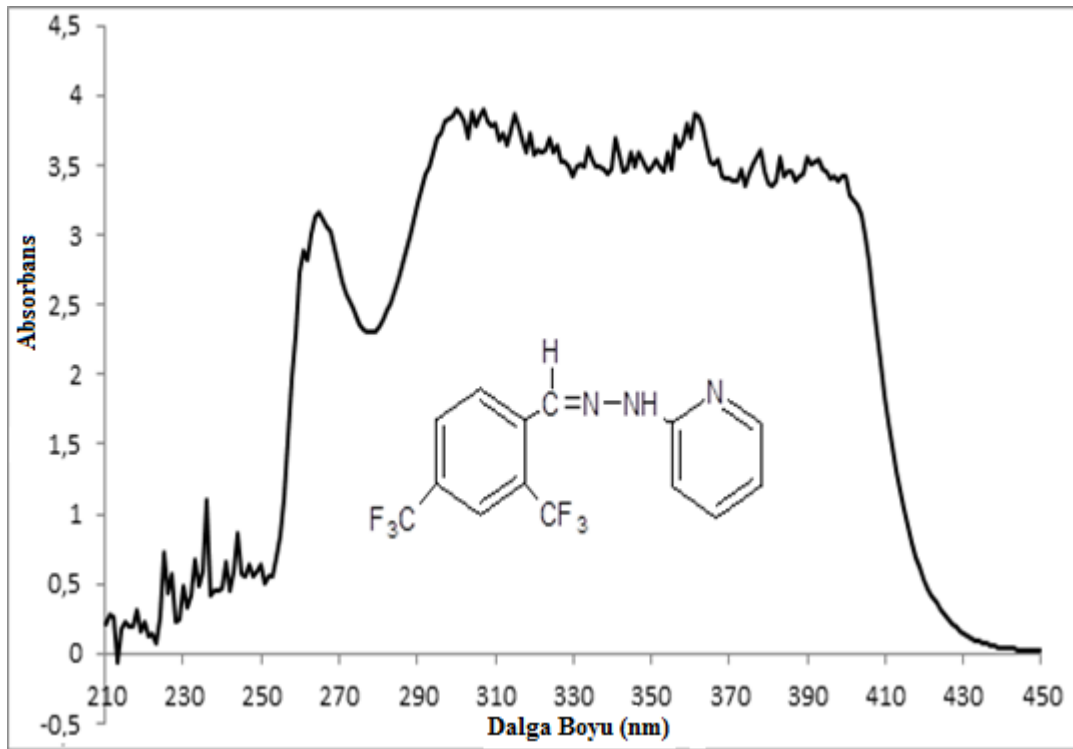
**Çizelge 4.13:** 2,4-FMBPyH'nin deneysel verileri.

58

Kısaltma	Moleküler Formül	Moleküler Ağırlık	Renk	Verim %	Elementel Analiz					
					% C		% N		% H	
					Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan
2,4-FMBPyH	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> F <sub>6</sub>	332,988	Sarı	71,896	50,452	35,827	12,613	8,77	2,703	2,071

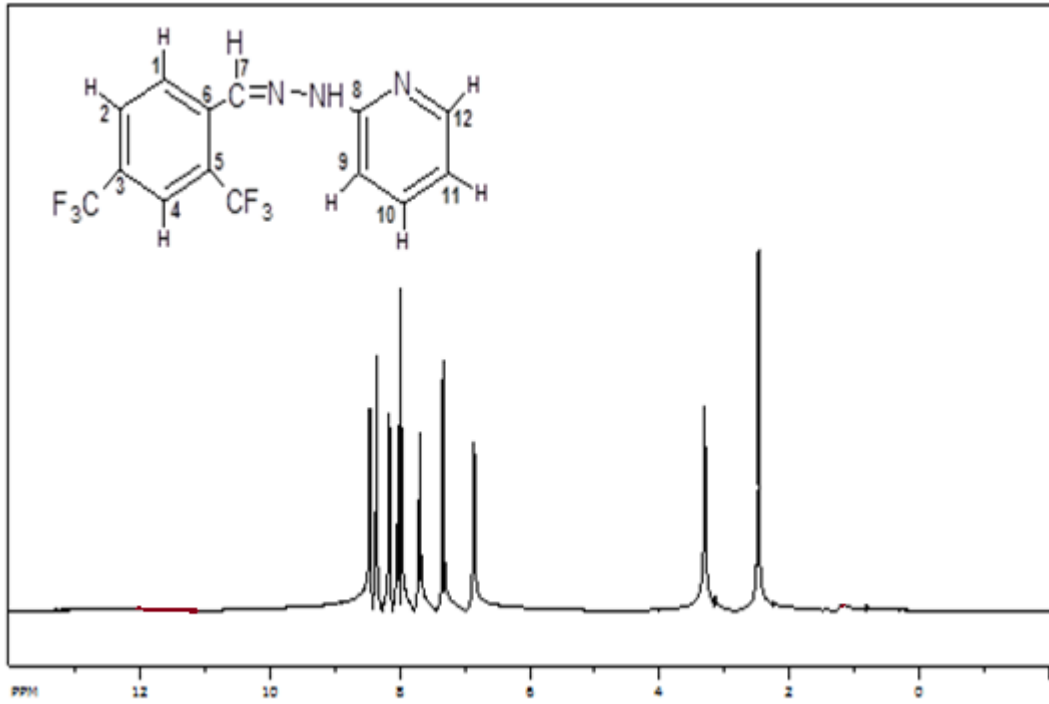
#### 4.1.3.3 UV-VIS absorpsiyonu

Ultraviyole-görünür (UV-VIS) absorpsiyonunda Schiff bazının yapısına bağlı olarak  $\lambda_{\max}$  pik değerleri genellikle 250-450 nm'de gözlemlenmiştir. Pikler moleküldeki HC=N ve aromatik C=C gruplarına bağlı n- $\pi^*$  ve  $\pi$ - $\pi^*$  geçişlerinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada DMSO'da  $\lambda_1=298$  nm ve  $\lambda_2=359$  nm'de gözlenen iki tane  $\lambda_{\max}$  vardır, absorbans değerleri 3,835 ve 3,803'dir.  $\lambda_{\max}$  değerlerindeki kaymada toplamda iki etki vardır. Birincisinde, CF<sub>3</sub>, indüktif olarak elektron çekicidir, fakat rezonans aracılığıyla, elektron verici etkileri birbiri üzerine karşıt yönde yüklemektedir. İkincisinde piridin halkasındaki N atomu üzerindeki eşleşmemiş elektron rezonans yüzünden elektron verici grup olarak davranmamaktadır. N'in eşleşmemiş elektronları yüzünden, piridin formları güçlü moleküller arası hidrojen bağları ve elektron-verici etkisiyle o-konumunda söndürülmektedir.



Şekil 4.14: 2,4-FMBPyHiçin UV-VIS absorpsiyonu.

#### 4.1.3.4 NMR spektrumu

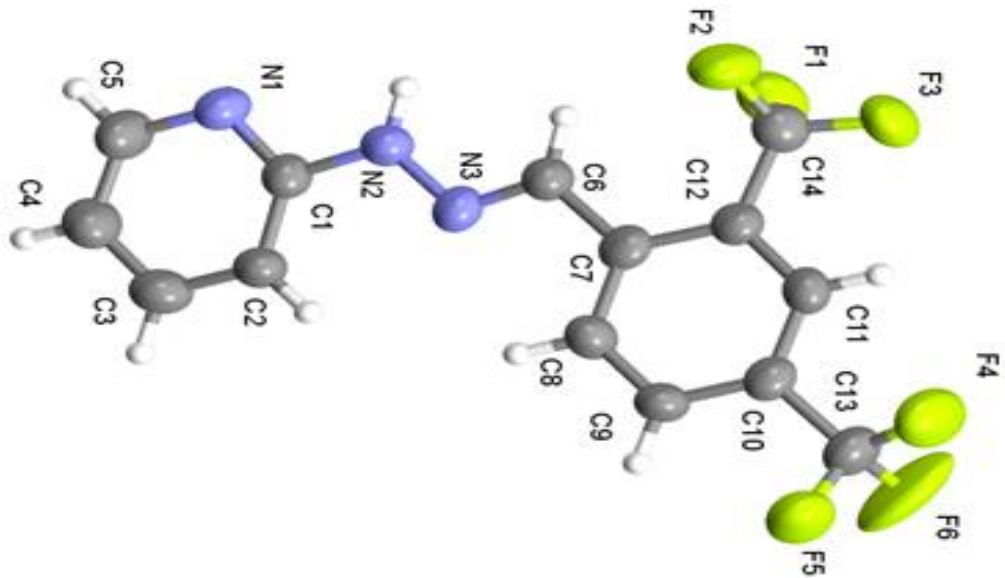


Şekil 4.15: 2,4-FMBPyHiçin NMR spektrumu.

<sup>1</sup>H-NMR verileri 8,355 ppm'de görülen kaymadaki tek pikin C7 imin grubu üzerindeki hidrojene ait, 8,449 ppm'de görülen ikili kayma pikinin piridin halkasındaki C12 üzerinde bulunan hidrojene ait, 8,157 ppm'de görülen ikili pikin C1 üzerindeki hidrojene ait ve 8,017 ppm'de görülen ikili pikin C2 üzerindeki hidrojene ait olduğunu göstermektedir. 7,978 ppm'de görülen tek pikin C4 üzerindeki hidrojene ait olduğunu göstermektedir. 7,691 ppm'de görülen kaymadaki üçlü pikin C10 üzerinde bulunan hidrojene ait, 7,325 ppm'deki ikili pik C9 üzerindeki hidrojene ait olduğunu göstermekte ve 6,855 ppm'de görülen üçlü pikler C11 üzerindeki hidrojene ait, 3,306 ppm ve 2,481 ppm'de görülen pikler onların DMSO çözücüsüne ait olduğunu göstermektedir.

#### 4.1.3.5 X-Işını kırınım çalışması

Birim hücre tespitinde ve veri toplamada kullanılan kristal ve enstrümantal parametreler Çizelge 4.14’te özetlendi. Kırınım ölçümleri, Bruker SMART BREEZE CCD difraktometresi üzerinde oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Görüntü almak için grafit monokromatikleştirici  $MoK\alpha$  ışına ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ) ve  $\Delta\omega=5^\circ$  ile salınım taramaları tekniği veri toplamada kullanıldı. Kafes parametreleri  $F^2 > 2\sigma(F^2)$  ile tüm yansımaların temeli en küçük kareler metoduyla belirlendi. Yoğunlukların entegrasyonu, Lorentz için düzeltme, polarizasyon etkileri ve hücre arıtma (saflaştırma) Crystal Clear (Rigaku/MSK, Inc., The Woodlands, Teksas) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılar SHELXS-97 kullanılarak doğrudan yöntemlerle çözüldü ve SHELXL-97 programı kullanarak tam matrisin en küçük kareler prosedürü ile saflaştırıldı. Tüm hidrojeniz atomlar anizotropik yer değiştirme parametreleri kullanılarak H2, H6, H5, H2A ve H18 haricinde idealize edilmiş pozisyonlarda yer alan hidrojen atomları ise izotropik olarak saflaştırıldı. Molekülün çizimi % 50 olasılık ile ORTEP (Oak Ridge Termal Elipsoid Parsel Programı)’te gerçekleştirildi, yer değiştirme termal elipsoidleri ve atom-etiketleme şeması Şekil 4.16’da gösterildi. H2, H6, H5, H2A ve H18 haricindeki, H atomları C—H = 0,96, 0,86 ve 0,93  $\text{\AA}$ , ile geometrik olarak konumlandı ve  $U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C)$  ile kendi ana atomu üzerine binmeye zorlandı.



Şekil 4.16: 2,4-FMBPyH’ ın ORTEP çiziminin, % 50 olasılık seviyesinde ve etiketleme şemasında yer değiştirme elipsoidiyle gösterimi.

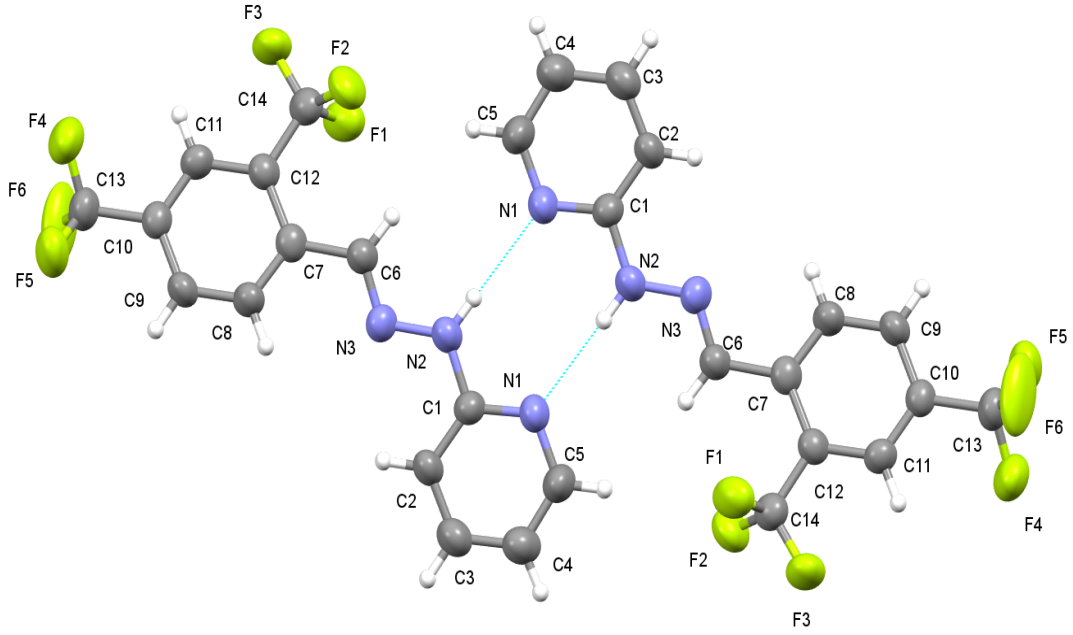
**Çizelge 4.14:** 2,4-FMBPyH için kristal verileri ve yapı saflaştırma detayları.

Kimyasal formülü	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> F <sub>6</sub>
Molekül ağırlığı	333,24
Kristal sistem	Monoklinik
Uzay grubu	P21/n
Z	2
Kristal rengi	Sarı
a,b,c	4,758(5), 10,749(5), 28,283(5)
$\alpha$	90,000(5)
V	1420,6(17)
$D_x$	1,558 g cm <sup>-3</sup>
Işınım, $\lambda$	MoK $\alpha$ , 0,71073 °A
$\mu$	0,150 mm <sup>-1</sup>
T	293(2) K
T <sub>min</sub> , T <sub>max</sub>	0,868, 0,988
Tarama modu	$\omega/2\theta$
Tarama aralığı	-6 $\leq$ h $\leq$ 5, -14 $\leq$ k $\leq$ 14, -38 $\leq$ l $\leq$ 38
Kristal boyutu	0,970 x 0,124x 0,082
$\theta_{min}$ , $\theta_{max}$	1,440, 28,683
I > 2 $\sigma$ (I) ile yansıma sayısı	7266
Saflaştırma parametresinin sayısı	416
S	0,943
Son R endeksleri [I > 2 $\sigma$ (I)]	1913
wR (I)	0,2656
$\Delta\rho_{max}$ , $\Delta\rho_{min}$	0,499, -0,422

2,4-FMBPyH'nin yapısı uzay grubu P21/n ile monoklinik kafes içine kristalize olmaktadır. Asimetrik birimin ORTEP görünümü Şekil 4.17'de gösterilmekte ve seçilen bağ mesafeleri, açıları ve torsiyon açısı Çizelge 4.16, Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18'de sunulmaktadır. Asimetrik birim bir Schiff bazı molekülü içermektedir. Molekülde, benzen ve piridin halkaları ve hidrazon köprüsü pratikte aynı düzlemedir. Başlıktaki bileşiğin molekülleri azometin C = N çiftli bağ etrafında 179,9(9)°'lik bir N2-N3-C6-C7 torsiyon açısı ile, bir E-konfigurasyonunu benimsemektedir. N2–C5 ve N3–N2 bağ mesafeleri sırasıyla 1,368(13) °A ve 1,349(11) °A arasındadır. N3–C6 çift bağ 1,265(12) °A değerindedir.

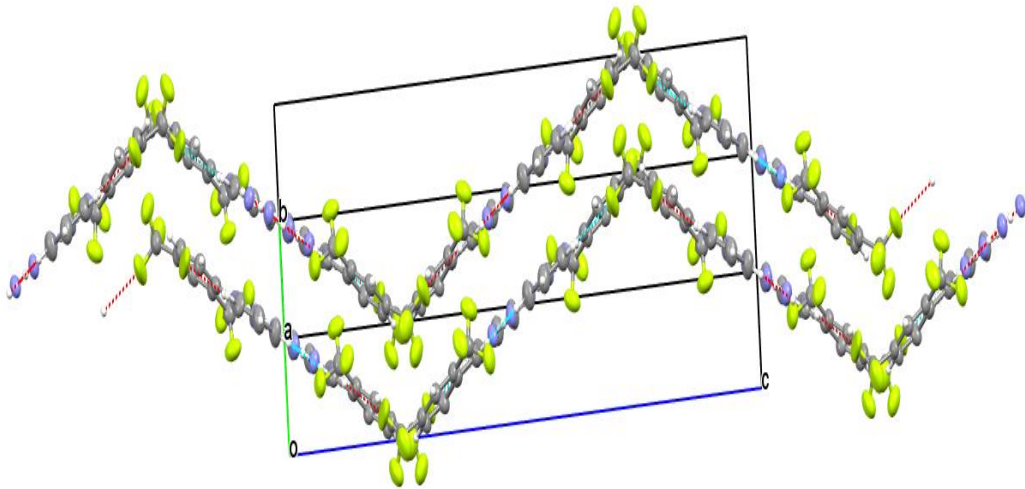
**Çizelge 4.15:** Hidrojen bağ mesafeleri (°A) ve açıları (°).

D–H...A	d(D–H) (°A)	d(H...A) (°A)	d(D...A) (°A)	D–H...A (°)
N2–H2–N1	0,86	2,20	3,061(8)	178,2
C6–H6–F2	0,93	2,55	3,083(9)	116,6
N5–H5–N4	0,86	2,19	3,050(8)	178,8
C2–H2A–F8	0,93	2,60	3,418(8)	146,4
C18–H18–F6	0,93	2,59	3,407(8)	147,3



**Şekil 4.17:** 2,4-FMBPyH'nin *b*-ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.

Şekil 4.17'de görüldüğü gibi, her bir enantiomer baş-kuyruk moleküler çiftleri oluşturmaktadır. Moleküller arası hidrojen bağı, hidrojen köprüsünün N atomuna (N2) bağlı H atomu arasında ve komşu molekülün [N2 H2 ... N3] piridin halkalarının N atomu (N3) arasında gözlenmiştir. Moleküller arası hidrojen bağı mesafeleri ve bağı açıları Çizelge 4.15'te listelenmiştir. Ayrıca,  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri paketleme diyagramından (Şekil 4.18) görülebilmektedir. Moleküller arası  $\pi$ - $\pi$  ve hidrojen bağlayıcı etkileşimler molekülleri bağlayabilmekte ve bu etkileşimler, kristal yapısının stabilizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.



**Şekil 4.18:** 2,4-FMBPyH'nin *a*-ekseni boyunca kristal paketinin görünümü.

**Çizelge 4.16:** 2,4-FMBPyH'ın bağ mesafeleri (°A).

Bağ mesafeleri (°A)	
F11–C27	1,318(9)
F1–C14	1,332(8)
F3–C14	1,324(8)
F10–C27	1,321(8)
F4–C13	1,324(9)
F7–C28	1,352(9)
F2–C14	1,323(8)
F9–C28	1,304(9)
F5–C13	1,338(9)
N3–C6	1,270(8)
N3–N2	1,361(7)
F12–C27	1,317(8)
N1–C1	1,335(8)
N1–C5	1,357(9)
N2–C1	1,392(8)
N2–H2	0,8600
N6–C20	1,279(8)
N6–N5	1,352(7)
F8–C28	1,310(9)
C6–C7	1,476(9)
C6–H6	0,9300
C11–C10	1,361(9)
C11–C12	1,387(9)
C11–H11	0,9300
N4–C15	1,332(9)
N4–C19	1,337(8)
C21–C22	1,389(9)
C21–C26	1,393(9)
C21–C20	1,471(9)
F6–C13	1,288(9)
N5–C19	1,380(8)
N5–H5	0,8600
C25–C24	1,367(9)
C25–C26	1,377(9)
C25–H25	0,9300
C12–C7	1,420(9)
C12–C14	1,494(10)
C20–H20	0,9300
C9–C8	1,365(8)
C9–C10	1,378(9)
C9–H9	0,9300
C1–C2	1,373(9)
C26–C27	1,529(10)
C10–C13	1,506(9)
C24–C23	1,387(9)
C24–C28	1,484(10)
C22–C23	1,368(9)
C22–H22	0,9300
C23–H23	0,9300
C19–C18	1,396(9)
C7–C8	1,380(9)
C2–C3	1,363(9)
C2–H2A	0,9300
C3–C4	1,385(11)
C3–H3	0,9300
C8–H8	0,9300
C15–C16	1,381(10)



C15–H15	0,9300
C18–C17	1,345(9)
C18–H18	0,9300
C17–C16	1,388(11)
C17–H17	0,9300
C16–H16	0,9300
C4–C5	1,356(10)
C4–H4	0,9300
C5–H5	0,9300

**Çizelge 4.17:** 2,4-FMBPyH'in bağ açıları (°).

Bağ açıları (°)	
C6–N3–N2	116,8(6)
C1–N1–C5	116,3(6)
N3–N2–C1	118,2(5)
N3–N2–H2	120,9
C1–N2–H2	120,9
C20–N6–N5	118,0(6)
N3–C6–C7	117,3(7)
N3–C6–H6	121,4
C7–C6–H6	121,4
C10–C11–C12	121,1(6)
C10–C11–H11	119,4
C12–C11–H11	119,4
C15–N4–C19	117,1(6)
C22–C21–C26	117,4(7)
C22–C21–C20	118,9(7)
C26–C21–C20	123,6(6)
N6–N5–C19	117,9(6)
N6–N5–H5	121,1
C19–N5–H5	121,1
C24–C25–C26	121,0(7)
C24–C25–H25	119,5
C26–C25–H25	119,5
C11–C12–C7	119,5(6)
C11–C12–C14	119,3(6)
C7–C12–C14	121,1(6)
N6–C20–C21	120,0(6)
N6–C20–H20	120,0
C21–C20–H20	120,0
C8–C9–C10	119,9(6)
C8–C9–H9	120,1
C10–C9–H9	120,1
N1–C1–C2	123,9(6)
N1–C1–N2	113,8(6)
C2–C1–N2	122,3(6)
C25–C26–C21	120,6(6)
C25–C26–C27	119,1(7)
C21–C26–C27	120,3(7)
C11–C10–C9	119,8(6)
C11–C10–C13	119,5(7)
C9–C10–C13	120,5(7)
C25–C24–C23	119,3(7)
C25–C24–C28	119,6(7)
C23–C24–C28	121,0(7)
C23–C22–C21	121,9(7)
C23–C22–H22	119,0
C21–C22–H22	119,0

---

C22–C23–C24	119,7(6)
C22–C23–H23	120,1
C24–C23–H23	120,1
N4–C19–N5	114,2(6)
N4–C19–C18	122,9(7)
N5–C19–C18	122,8(7)
C8–C7–C12	117,2(6)
C8–C7–C6	121,1(6)
C12–C7–C6	121,7(6)
C3–C2–C1	118,6(7)
C3–C2–H2A	120,7
C1–C2–H2A	120,7
F2–C14–F3	107,1(6)
F2–C14–F1	105,1(6)
F3–C14–F1	106,6(6)
F2–C14–C12	114,2(7)
F3–C14–C12	112,4(6)
F1–C14–C12	110,9(7)
C2–C3–C4	119,2(7)
C2–C3–H3	120,4
C4–C3–H3	120,4
F9–C28–F8	106,9(8)
F9–C28–F7	103,7(7)
F8–C28–F7	104,8(7)
F9–C28–C24	114,9(7)
F8–C28–C24	112,4(8)
F7–C28–C24	113,3(7)
F12–C27–F11	107,3(7)
F12–C27–F10	107,9(6)
F11–C27–F10	106,9(7)
F12–C27–C26	111,7(7)
F11–C27–C26	111,3(6)
F10–C27–C26	111,6(7)
C9–C8–C7	122,4(7)
C9–C8–H8	118,8
C7–C8–H8	118,8
N4–C15–C16	123,7(8)
N4–C15–H15	118,1
C16–C15–H15	118,1
F6–C13–F4	106,8(7)
F6–C13–F5	106,3(7)
F4–C13–F5	104,2(7)
F6–C13–C10	113,5(7)
F4–C13–C10	112,8(7)
F5–C13–C10	112,6(7)
C17–C18–C19	118,5(7)
C17–C18–H18	120,7
C19–C18–H18	120,7
C18–C17–C16	120,1(7)
C18–C17–H17	120,0
C16–C17–H17	120,0
C15–C16–C17	117,6(8)
C15–C16–H16	121,2
C17–C16–H16	121,2
C5–C4–C3	118,7(8)
C5–C4–H4	120,6
C3–C4–H4	120,6
N1–C5–C4	123,4(7)
N1–C5–H5	118,3
C4–C5–H5	118,3

---

**Çizelge 4.18:** 2,4-FMBPyH'ın torsiyon açıları.

Torsiyon açıları (°)	
C6–N3–N2–C1	-179,0(6)
N2–N3–C6–C7	-179,9(6)
C20–N6–N5–C19	179,7(6)
C10–C11–C12–C7	1,6(10)
C10–C11–C12–C14	-179,9(7)
N5–N6–C20–C21	179,8(6)
C22–C21–C20–N6	13,3(10)
C26–C21–C20–N6	-167,4(6)
C5–N1–C1–C2	1,1(11)
C5–N1–C1–N2	179,4(6)
N3–N2–C1–N1	179,0(6)
N3–N2–C1–C2	-2,7(9)
C24–C25–C26–C21	-0,1(10)
C24–C25–C26–C27	178,1(7)
C22–C21–C26–C25	-0,8(9)
C20–C21–C26–C25	179,8(6)
C22–C21–C26–C27	-179,0(7)
C20–C21–C26–C27	1,6(10)
C12–C11–C10–C9	-0,8(10)
C12–C11–C10–C13	173,6(7)
C8–C9–C10–C11	-1,5(10)
C8–C9–C10–C13	-175,8(7)
C26–C25–C24–C23	0,8(10)
C26–C25–C24–C28	-175,7(7)
C26–C21–C22–C23	1,1(10)
C20–C21–C22–C23	-179,5(7)
C21–C22–C23–C24	-0,5(11)
C25–C24–C23–C22	-0,5(10)
C28–C24–C23–C22	176,0(7)
C15–N4–C19–N5	-179,8(6)
C15–N4–C19–C18	0,7(11)
N6–N5–C19–N4	-179,4(6)
N6–N5–C19–C18	0,1(10)
C11–C12–C7–C8	-0,3(9)
C14–C12–C7–C8	-178,7(7)
C11–C12–C7–C6	179,8(6)
C14–C12–C7–C6	1,4(10)
N3–C6–C7–C8	-12,5(10)
N3–C6–C7–C12	167,4(6)
N1–C1–C2–C3	-0,9(11)
N2–C1–C2–C3	-179,0(7)
C11–C12–C14–F2	-115,9(7)
C7–C12–C14–F2	62,5(9)
C11–C12–C14–F3	6,4(10)
C7–C12–C14–F3	-175,2(6)
C11–C12–C14–F1	125,6(7)
C7–C12–C14–F1	-56,0(9)
C1–C2–C3–C4	0,7(11)
C25–C24–C28–F9	-30,2(11)
C23–C24–C28–F9	153,3(7)
C25–C24–C28–F8	92,3(9)
C23–C24–C28–F8	-84,1(10)
C25–C24–C28–F7	-149,1(7)
C23–C24–C28–F7	34,4(10)
C25–C26–C27–F12	116,7(8)
C21–C26–C27–F12	-65,1(9)
C25–C26–C27–F11	-123,4(7)

---

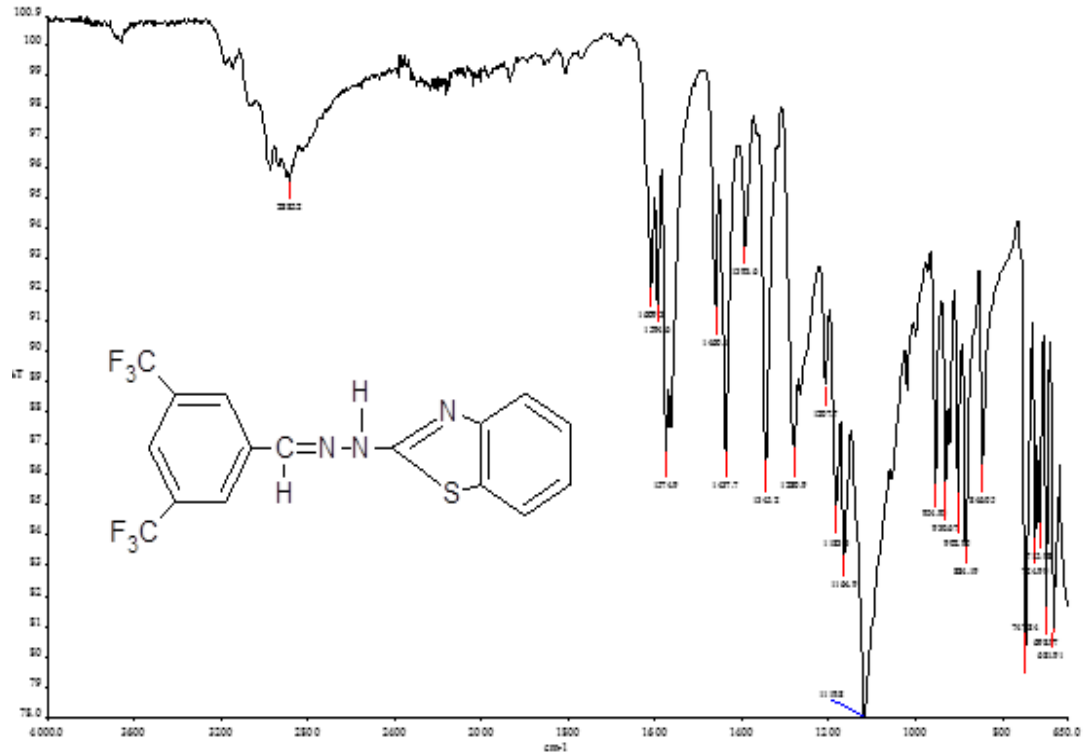
C21–C26–C27–F11	54,8(9)
C25–C26–C27–F10	-4,2(10)
C21–C26–C27–F10	174,1(6)
C10–C9–C8–C7	2,9(11)
C12–C7–C8–C9	-2,0(10)
C6–C7–C8–C9	177,9(7)
C19–N4–C15–C16	-1,8(12)
C11–C10–C13–F6	-90,5(10)
C9–C10–C13–F6	83,9(10)
C11–C10–C13–F4	31,2(11)
C9–C10–C13–F4	-154,5(7)
C11–C10–C13–F5	148,8(7)
C9–C10–C13–F5	-36,9(11)
N4–C19–C18–C17	0,8(11)
N5–C19–C18–C17	-178,7(7)
C19–C18–C17–C16	-1,2(12)
N4–C15–C16–C17	1,4(14)
C18–C17–C16–C15	0,2(13)
C2–C3–C4–C5	-0,9(13)
C1–N1–C5–C4	-1,3(12)
C3–C4–C5–N1	1,2(14)

---

#### 4.1.4 Türev 4: 3,5-FMBThH

Bu hidrazon türevini hazırlamak için 2-hidrazinobenzotiyazol çözeltisi (0,005 mol) pcivarında yavaş yavaş 3,5-bis (triflorometil) benzaldehid çözeltisine (0,005 mol) eklendi. Sonuçta soluk sarı renkli Schiff bazı elde edildi.

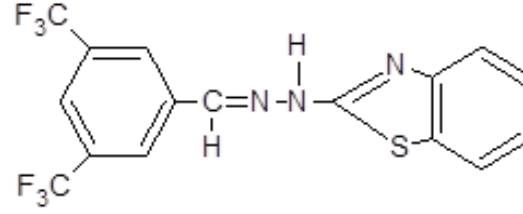
##### 4.1.4.1 FTIR spektrumu



Şekil 4.19: 3,5-FMBThH için FTIR spektrumu.

Bu yapı sayesinde, Schiff bazının IR spektrumunda, N-H bandı yaklaşık  $3200 \text{ cm}^{-1}$  'de ve C-H grubu zayıf ve geniş bantlar şeklinde  $2885,2 \text{ cm}^{-1}$  'de gözlemlendi. İmin grubu üzerindeki hidrojen  $1609,3 \text{ cm}^{-1}$  'de gözlemlendi. C=N ve C=C aromatik gerilmeleri  $1594,6-1574,9 \text{ cm}^{-1}$  'de gözlemlendi. CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, pikleri  $1460,1-1437,7 \text{ cm}^{-1}$  'de gözlemlendi.

#### 4.1.4.2 Elementel analiz verileri



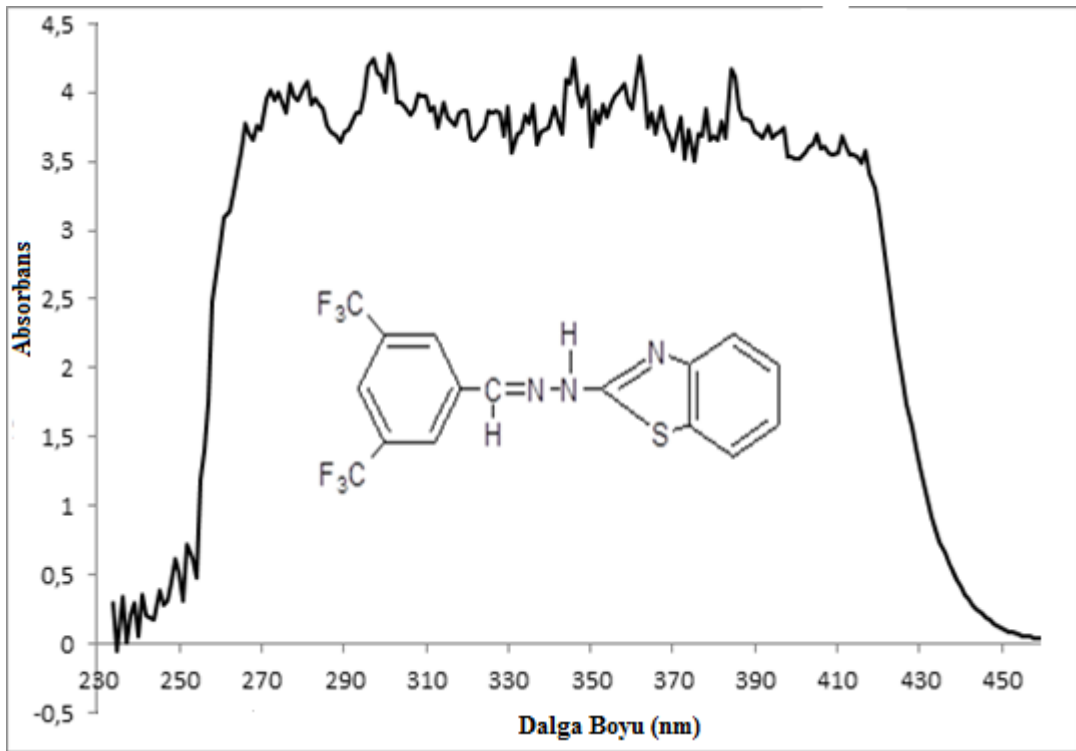
Çizelge 4.19: 3,5-FMBThH'nin deneysel verileri.

70

Kısaltma	Moleküler Formül	Moleküler Ağırlık	Verim %	Elementel Analiz								
				% C		% N		% H		% S		
				Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan	
3,5-FMB			Soluk									
ThH	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> F <sub>6</sub> S	389,053.	sarı	94,965	49,351	49,093	10,795	10,346	2,313	0,614	8,242	8,454

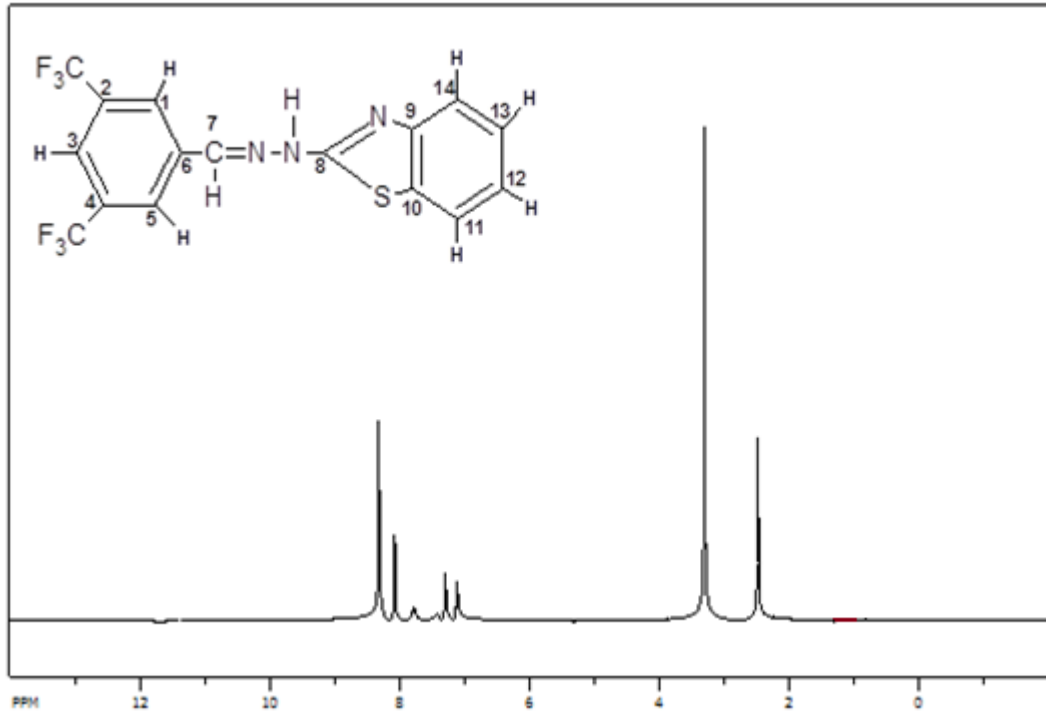
#### 4.1.4.3 UV-VIS absorpsiyonu

Ultraviyole-görünür (UV-VIS) absorpsiyonunda  $\lambda_{\max}$  pik değerleri Schiff bazının yapısına bağlı olarak genellikle 250-450 nm’de gözlemlenmiştir. Pikler moleküldeki HC=N ve aromatik C=C gruplarına bağlı n- $\pi^*$  ve  $\pi$ - $\pi^*$  geçişlerinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada DMSO’da  $\lambda_1=296$  nm,  $\lambda_2=346$  nm,  $\lambda_3=362$  nm ve  $\lambda_4=384$  nm’de gözlenen dört tane  $\lambda_{\max}$  vardır, absorpsiyon değerleri 4,18, 4,242, 4,263 ve 4,165’dir.  $\lambda_{\max}$  değerlerindeki kaymada toplamda iki etki vardır. Birincisinde, CF<sub>3</sub>, indüktif olarak elektron çekicidir, fakat rezonans aracılığıyla, elektron verici etkileri birbirini üzerine karşıt yönde yüklemektedir. İkincisinde piridin halkasındaki N atomu üzerindeki eşleşmemiş elektron rezonans yüzünden elektron verici grup olarak davranmamaktadır. N’in eşleşmemiş elektronları yüzünden, piridin formları güçlü moleküller arası hidrojen bağları ve elektron-verici etkisiyle o-konumunda söndürülmektedir.



Şekil 4.20: 3,5-FMBThH için UV-VIS absorpsiyonu.

#### 4.1.4.4 NMR spektrumu



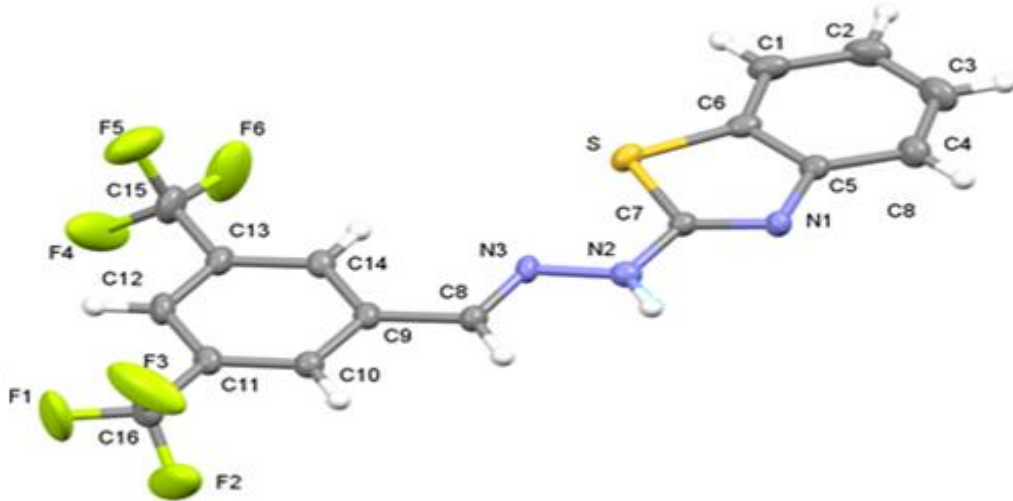
Şekil 4.21: 3,5-FMBThH için NMR spektrumu.

<sup>1</sup>H-NMR verileri 8,321 ppm'de görülen kaymadaki tek pikin C7 imin grubu üzerindeki hidrojene ait, 8,076 ppm'de görülen tek pikin C1 ve C5 üzerindeki hidrojene ait olduğunu, 7,782 ppm'de görülen tek kayma pikinin C3 üzerindeki hidrojene ait, 7,293 ppm'de görülen üçlü pikin C13 üzerinde bulunan hidrojene ait olduğunu, 7,113 ppm'de görülen kaymadaki üçlü pikin C12 üzerindeki hidrojene ait, 3,304 ppm ve 2,481 ppm'de görülen piklerin DMSO çözücüsü ile ilgili olduğunu göstermektedir.



#### 4.1.4.5 X-Işını kırınım çalışması

Birim hücre tespitinde ve veri toplamada kullanılan kristal ve enstrümantal parametreler Çizelge 4.20’de özetlendi. Kırınım ölçümleri, Bruker SMART BREEZE CCD difraktometresi üzerinde oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Görüntü almak için grafit monokromatikleştirici  $MoK\alpha$  ışına ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ) ve  $\Delta\omega = 5^\circ$  ile salınım taramaları tekniği veri toplamada kullanıldı. Kafes parametreleri  $F^2 > 2\sigma(F^2)$  ile tüm yansımaların temeli en küçük kareler metoduyla belirlendi. Yoğunlukların entegrasyonu, Lorentz için düzeltme, polarizasyon etkileri ve hücre arıtma (saflaştırma) Crystal Clear (Rigaku/MSK, Inc., The Woodlands, Teksas) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılar SHELXS-97 kullanılarak doğrudan yöntemlerle çözüldü ve SHELXL-97 programı kullanarak tam matrisin en küçük kareler prosedürü ile saflaştırıldı. Tüm hidrojeniz atomlar anizotropik yer değiştirme parametreleri kullanılarak H2A haricinde idealize edilmiş pozisyonlarda yer alan hidrojen atomları ise izotropik olarak saflaştırıldı. Molekülün çizimi % 50 olasılık ile ORTEP (Oak Ridge Termal Elipsoid Parsel Programı)’te gerçekleştirildi, yer değiştirme termal elipsoidleri ve atom-etiketleme şeması Şekil 4.22’de gösterildi. H8A haricindeki, H atomları C–H = 0,93  $\text{\AA}$ , ile geometrik olarak konumlandı ve  $U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C)$  ile kendi ana atomu üzerine binmeye zorlandı.



Şekil 4.22: 3,5-FMBThH' ın ORTEP çiziminin, % 50 olasılık seviyesinde ve etiketleme şemasında yer değiştirme elipsoidiyle gösterimi.

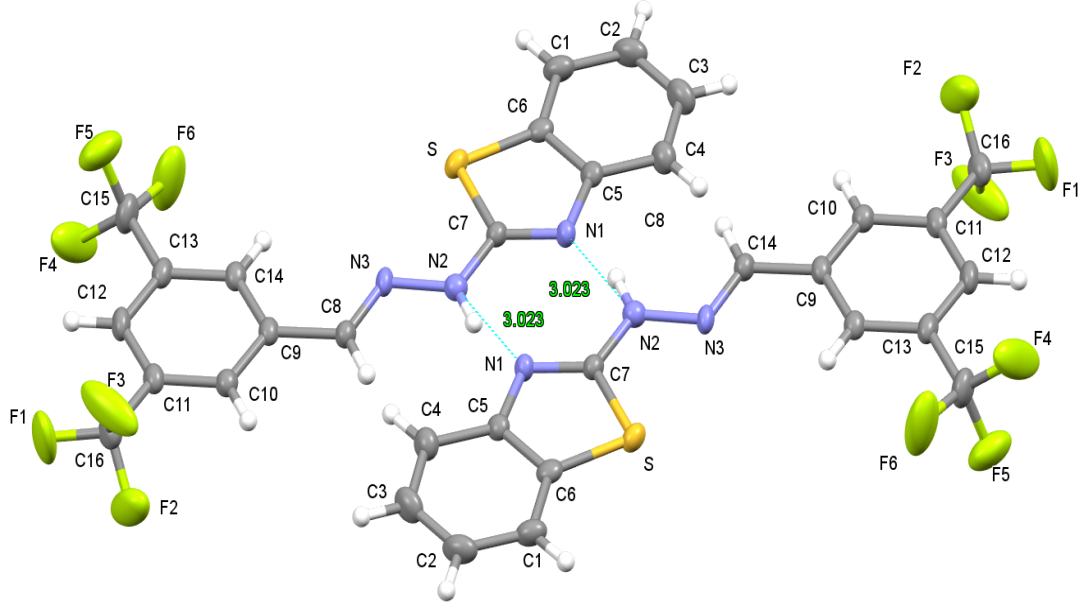
**Çizelge 4.20:** 3,5-FMBThHiçin kristal verileri ve yapı saflaştırma detayları.

Kimyasal formül	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> S
Molekül ağırlığı	389,32
Kristal sistem	Monoklinik
Uzay grubu	P 21/n
Z	4
Kristal rengi	Soluk sarı
a,b,c	15,7792(7), 4,6929(2), 21,7949(9)
$\alpha$	90
V	1612,99(12)
$D_x$	1,603 g cm <sup>-3</sup>
Işınım, $\lambda$	MoK $\alpha$ , 0,71073 °A
$\mu$	0,270 mm <sup>-1</sup>
T	293(2) K
T <sub>min</sub> , T <sub>max</sub>	0,728, 0,973
Tarama modu	$\omega/20$
Tarama aralığı	-21 $\leq h \leq$ 21, -6 $\leq k \leq$ 6, -27 $\leq l \leq$ 29
Kristal boyutu	1,257, 0,142, 0,100
$\theta_{min}$ , $\theta_{max}$	1,568, 28,338
I > 2 $\sigma$ (I) ile yansıma sayısı	4027
Saflaştırma parametresinin sayısı	231
S	1,051
Son R endeksleri [I > 2 $\sigma$ (I)]	2113
wR (I)	0,2302
$\Delta\rho_{max}$ , $\Delta\rho_{min}$	0,865, -0,459

3,5-FMBThH'nin yapısı uzay grubu P21/n ile monoklinik kafes içine kristalize olmaktadır. Asimetrik birimin ORTEP görünümü Şekil 4.23'te gösterilmekte ve seçilen bağ mesafeleri, açıları ve torsiyon açısı Çizelge 4.22, Çizelge 4.23 ve Çizelge 4.24'te sunulmaktadır. Asimetrik birim bir Schiff bazı molekülü içermektedir. Molekülde, benzen ve piridin halkaları ve hidrazon köprüsü pratikte aynı düzlemedir. Başlıktaki bileşiğin molekülleri azometin C = N çiftli bağ etrafında -178,7(3)°'lik bir N2-N3-C8-C9 torsiyon açısı ile, bir E-konfigürasyonunu benimsemektedir. C7– N2ve N3–N2 bağ mesafeleri sırasıyla 1,352(5) °A ve 1,361(5) °A arasındadır. N3–C8 çift bağ 1,277(5) °A değerindedir.

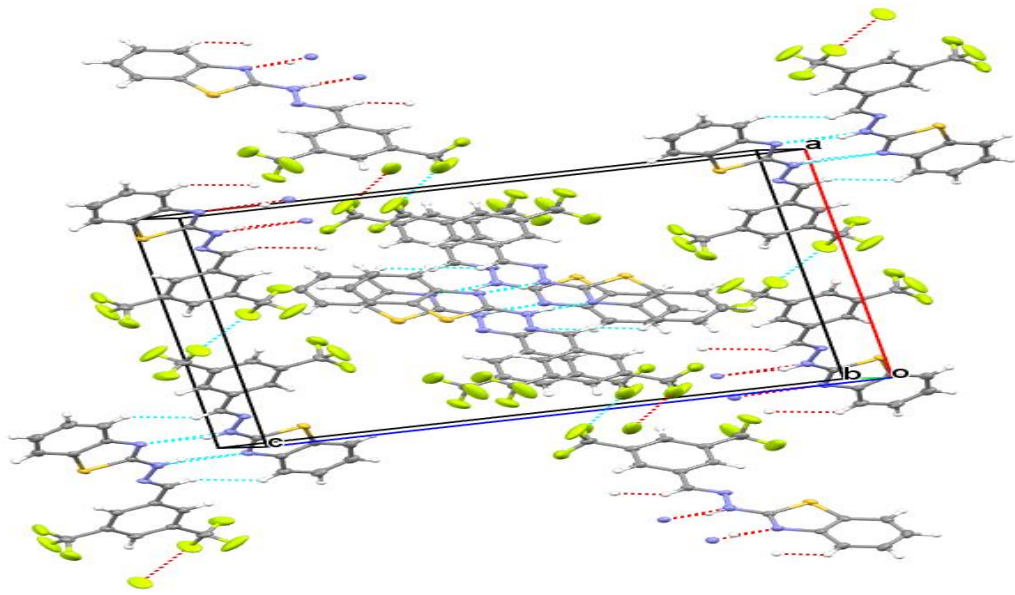
**Çizelge 4.21:** Hidrojen bağ mesafeleri (°A) ve açıları (°).

D—H...A	d(D—H) (°A)	d(H ..A) (°A)	d(D ..A) (°A)	D—H ..A (°)
N2—H2A—N1	0,86	2,21	3,023(5)	156,5



**Şekil 4.23:** 3,5-FMBThH'nin *b*-ekseniboyunca kristal paketinin görünümü.

Şekil 4.23'te görüldüğü gibi, her bir enantiomer baş-kuyruk moleküler çiftleri oluşturmaktadır. Moleküller arası hidrojen bağı, hidrojen köprüsünün N atomuna (N2) bağlı H atomu arasında ve komşu molekülün [N2 H2 ... N3] piridin halkalarının N atomu (N3) arasında gözlenmiştir. Moleküller arası hidrojen bağı mesafeleri ve bağ açıları Çizelge 4.21'da listelenmiştir. Ayrıca,  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri paketlenme diyagramından (Şekil 4.24) görülebilmektedir. Moleküller arası  $\pi$ - $\pi$  ve hidrojen bağlayıcı etkileşimler molekülleri bağlayabilmekte ve bu etkileşimler, kristal yapısının stabilizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.



**Şekil 4.24:** 3,5-FMBThH'nin *a*-ekseniboyunca kristal paketinin görünümü.

**Çizelge 4.22:** 3,5-FMBThH'ın bağ mesafeleri (°A).

Bağ mesafeleri (°A)	
S—C6	1,733(5)
S—C7	1,745(4)
N3—C8	1,277(5)
N3—N2	1,361(5)
N1—C7	1,304(5)
N1—C5	1,395(5)
F6—C16	1,287(7)
C7—N2	1,352(5)
C9—C10	1,389(6)
C9—C14	1,397(6)
C9—C8	1,454(6)
C5—C6	1,393(6)
C5—C4	1,404(6)
C6—C1	1,389(6)
C8—H8	0,9300
C10—C11	1,381(6)
C10—H10	0,9300
C14—C13	1,383(6)
C14—H14	0,9300
F5—C15	1,311(7)
C11—C12	1,383(7)
C11—C16	1,496(7)
C13—C12	1,385(7)
C13—C15	1,481(7)
F1—C16	1,297(7)
F6—C15	1,280(7)
C12—H00I	0,9300
C4—C3	1,373(7)
C4—H4	0,9300
F4—C15	1,274(7)
F3—C16	1,260(7)
C1—C2	1,380(8)
C1—H1	0,9300
C3—C2	1,374(8)
C3—H3	0,9300
C2—H2	0,9300
N2—H2A	0,8600

**Çizelge4.23:** 3,5-FMBThH'ın bağ açıları (°).

Bağ açıları (°)	
C6-S-C7	88,1(2)
C8-N3-N2	117,1(4)
C7-N1-C5	109,0(3)
N1-C7-N2	123,5(4)
N-1C7-S	117,3(3)
N2-C7-S	119,2(3)
C10-C9-C14	118,5(4)
C10-C9-C8	119,8(4)
C14-C9-C8	121,7(4)
C6-C5-N1	115,5(4)
C6-C5-C4	119,2(4)
N1-C5-C4	125,3(4)
C1-C6-C5	121,4(5)
C1-C6-S	128,5(4)
C5-C6-S	110,0(3)
N3-C8-C9	120,4(4)
N3-C8-H8	119,8
C9-C8-H8	119,8
C11-C10-C9	120,9(4)
C11-C10-H10	119,5
C9-C10-H10	119,5
C13-C14-C9	120,4(4)
C13-C14-H14	119,8
C9-C14-H14	119,8
C10-C11-C12	120,4(4)
C10-C11-C16	119,3(4)
C12-C11-C16	120,3(4)
C14-C13-C12	120,6(4)
C14-C13-C15	120,3(5)
C12-C13-C15	119,1(4)
C11-C12-C13	119,2(4)
C11-C12-H00I	120,4
C13-C12-H00I	120,4
C3-C4-C5	118,6(5)
C3-C4-H4	120,7
C5-C4-H4	120,7
F4-C15-F6	108,9(6)
F4-C15-F5	103,2(5)
F6-C15-F5	101,5(6)
F4-C15-C13	114,1(6)
F6-C15-C13	114,7(4)
F5-C15-C13	113,1(5)
F3-C16-F2	106,6(6)
F3-C16-F1	105,6(5)
F2-C16-F1	102,5(5)
F3-C16-C11	113,5(5)
F2-C16-C11	113,9(4)
F1-C16-C11	113,7(5)
C2-C1-C6	118,2(5)
C2-C1-H1	120,9
C6-C1-H1	120,9
C4-C3-C2	121,7(5)
C4-C3-H3	119,2
C2-C3-H3	119,2
C3-C2-C1	120,8(5)
C3-C2-H2	119,6
C1-C2-H2	119,6

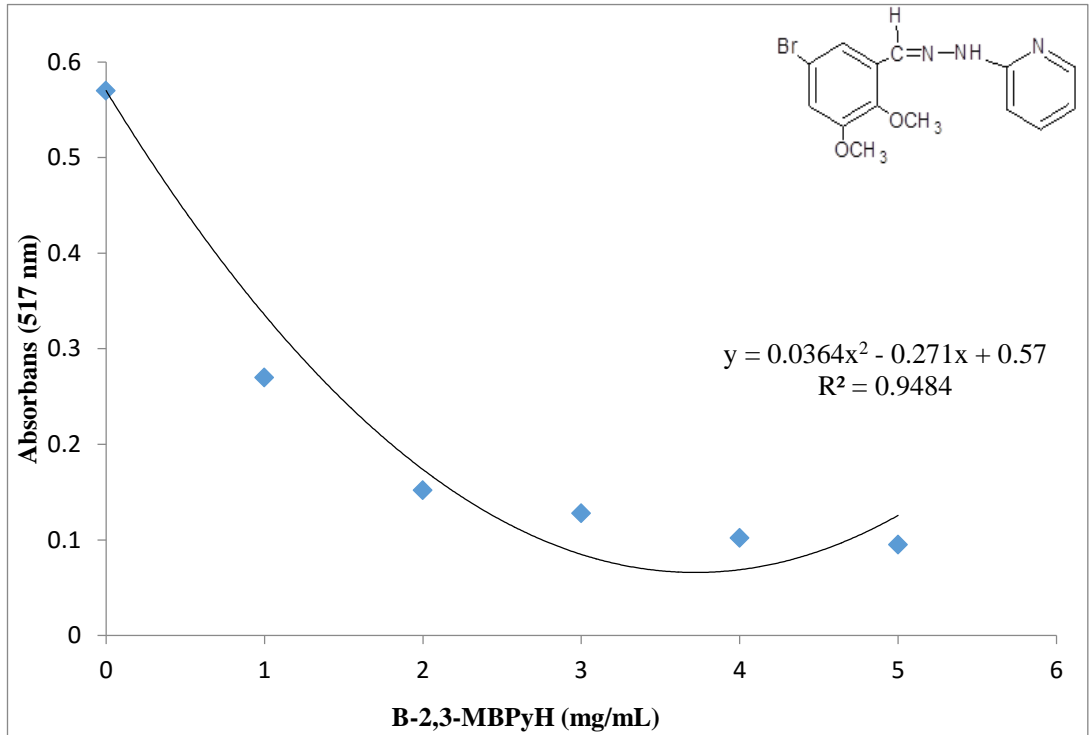
C7-N2-N3	116,7(4)
C7-N2-H2A	121,7
N3-N2-H2A	121,7

**Çizelge 4.24:** 3,5-FMBThH'ın torsiyon açıları.

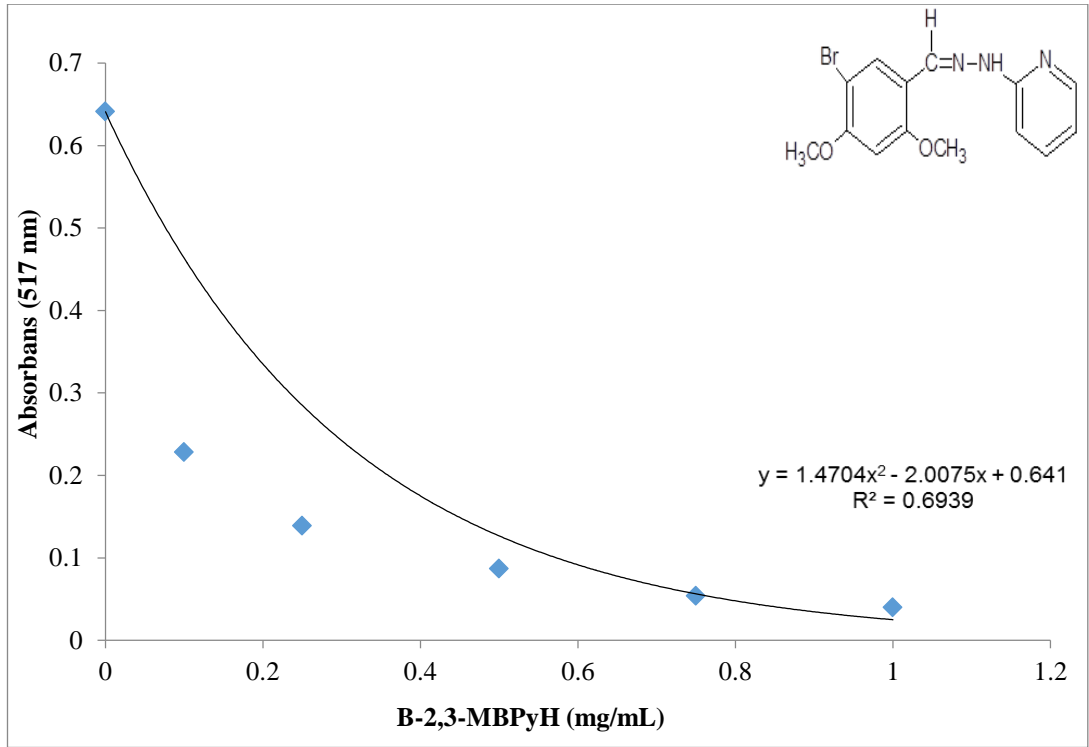
Torsiyon açıları (°)	
C5-N1-C7-N2	-177,5(4)
C5-N1-C7-S	1,0(5)
C6-S-C7-N1	-0,6(3)
C6-S-C7-N2	177,9(3)
C7-N1-C5-C6	-0,9(5)
C7-N1-C5-C4	178,1(4)
N1-C5-C6-C1	180,0(4)
C4-C5-C6-C1	0,9(7)
N1-C5-C6-S	0,4(5)
C4-C5-C6-S	-178,6(3)
C7-S-C6-C1	-179,4(4)
C7-S-C6-C5	0,1(3)
N2-N3-C8-C9	-178,7(3)
C10-C9-C8-N3	173,0(4)
C14-C9-C8-N3	-5,1(6)
C14-C9-C10-C11	1,3(6)
C8-C9-C10-C11	-176,9(4)
C10-C9-C14-C13	-0,4(6)
C8-C9-C14-C13	177,7(4)
C9-C10-C11-C12	-1,3(7)
C9-C10-C11-C16	176,6(4)
C9-C14-C13-C12	-0,4(7)
C9-C14-C13-C15	-178,9(5)
C10-C11-C12-C13	0,3(7)
C16-C11-C12-C13	-177,5(4)
C14-C13-C12-C11	0,5(7)
C15-C13-C12-C11	179,0(5)
C6-C5-C4-C3	-1,4(7)
N1-C5-C4-C3	179,7(5)
C14-C13-C15-F4	-138,4(6)
C12-C13-C15-F4	43,1(8)
C14-C13-C15-F6	-11,8(9)
C12-C13-C15-F6	169,7(6)
C14-C13-C15-F5	103,9(6)
C12-C13-C15-F5	-74,6(7)
C10-C11-C16-F3	-74,6(7)
C12-C11-C16-F3	103,3(7)
C10-C11-C16-F2	47,6(7)
C12-C11-C16-F2	-134,5(6)
C10-C11-C16-F1	164,6(5)
C12-C11-C16-F1	-17,5(7)
C5-C6-C1-C2	0,5(7)
S-C6-C1-C2	180,0(4)
C5-C4-C3-C2	0,5(8)
C4-C3-C2-C1	1,0(9)
C6-C1-C2-C3	-1,5(8)
N1-C7-N2-N3	178,3(4)
S-C7-N2-N3	-0,2(5)
C8-N3-N2-C7	-176,8(4)

#### 4.2 DPPH Radikali Giderme Aktivitesi

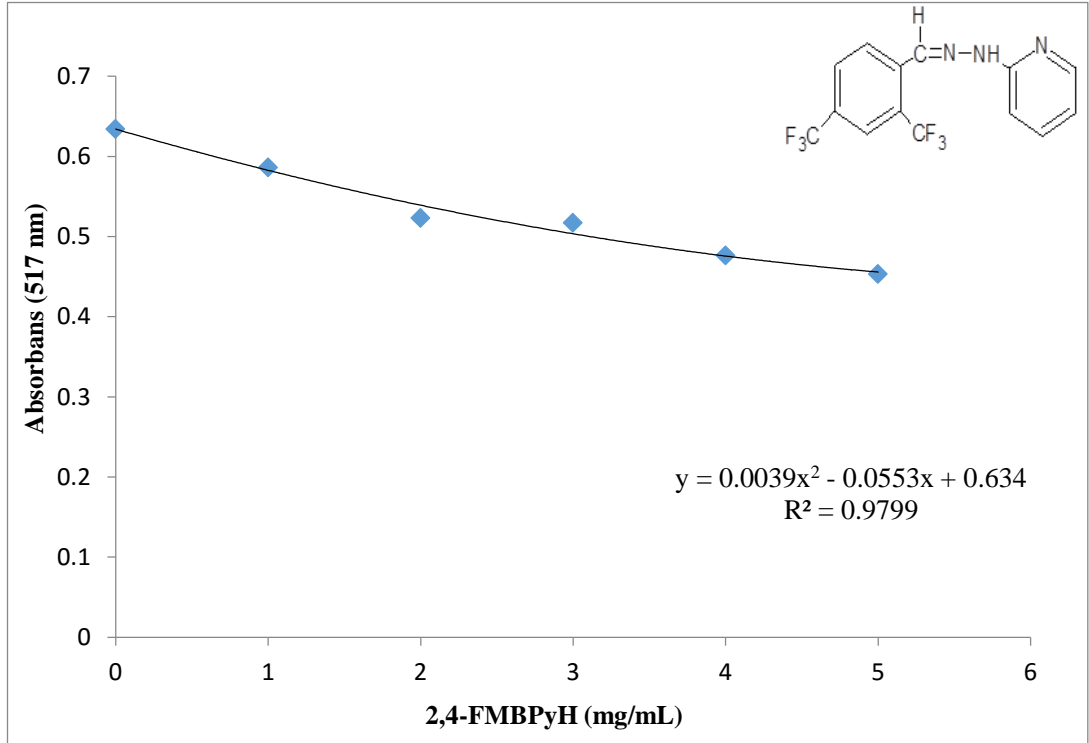
1958 yılında Blois metodu kullanılarak, hidrazon türevlerinin radikal giderme aktivitesi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) etanol çözeltisinin azaltılmasına dayalı olarak spektrofotometrik metotla tespit edilmiştir. Hidrazon bileşikleri DMSO ve çeşitli konsantrasyonlarda çözülmüştür her bir (1, 2, 3, 4 ve 5 mg / mL) bileşik belirtilen konsantrasyonda hazırlanmıştır. BHT (butillenmiş hidroksitoluen), benzer bir konsantrasyonu, bir referans olarak kullanılmıştır. % 50 inhibisyon (IC<sub>50</sub>) sağlayan hidrazon türevi bileşikleri kontrol edilen hidrazon türevi konsantrasyonuna karşı grafiğin çizim inhibisyon yüzdesinden hesaplanmıştır. Hidrazon türevi bileşiklerinin referansı olarak karşılaştırmak için, BHT antioksidan aktivitesi araştırılmıştır.



Şekil 4.25: DPPH radikalleri üzerinde B-2,3-MBPYH'nın giderme aktivitesi.

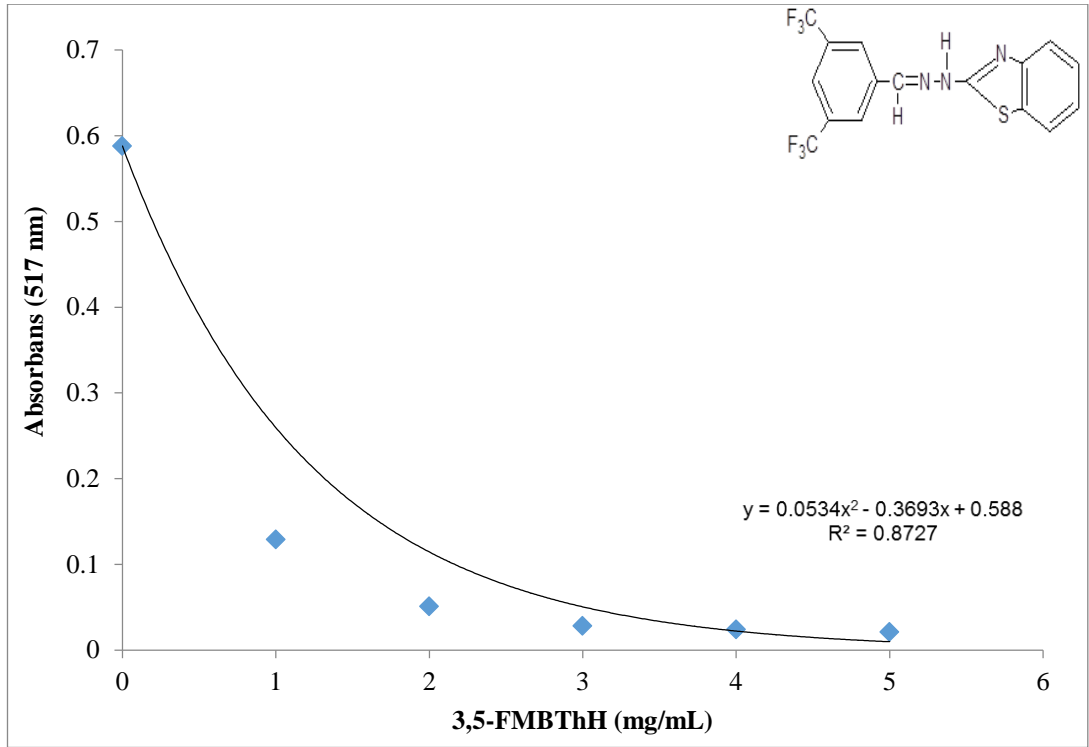


Şekil 4.26: DPPH radikalleri üzerinde B-2,4-MBPyH'ın giderme aktivitesi.

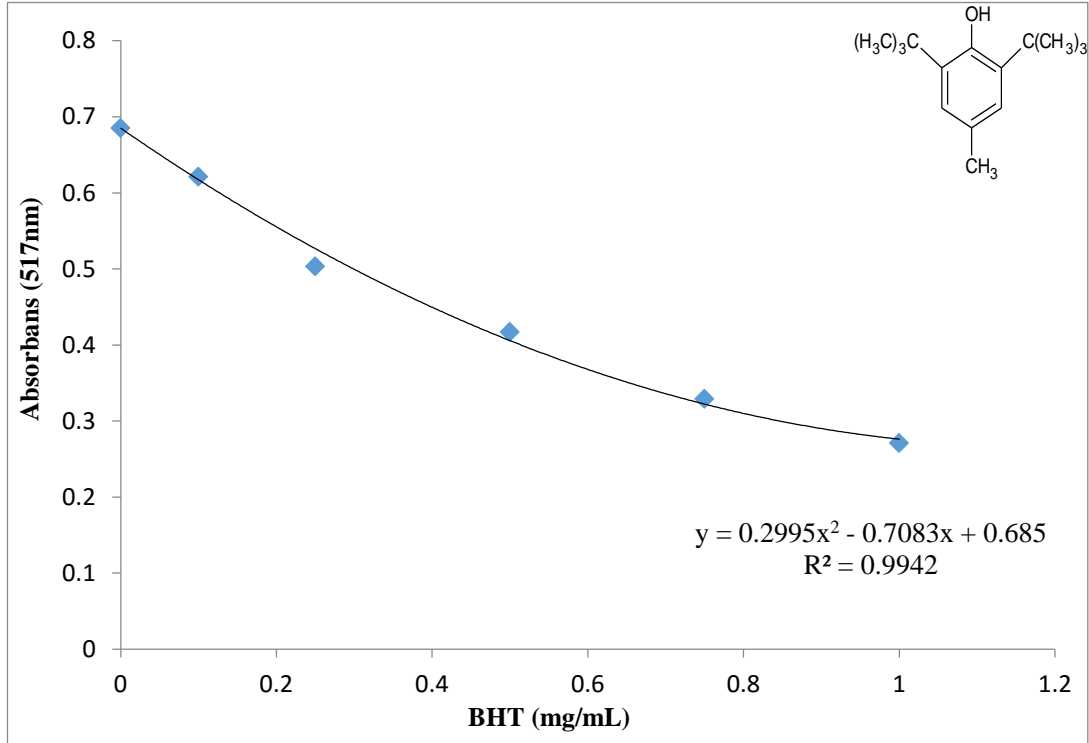


Şekil 4.27: DPPH radikalleri üzerinde 2,4-FMBPyH'nın giderme aktivitesi.

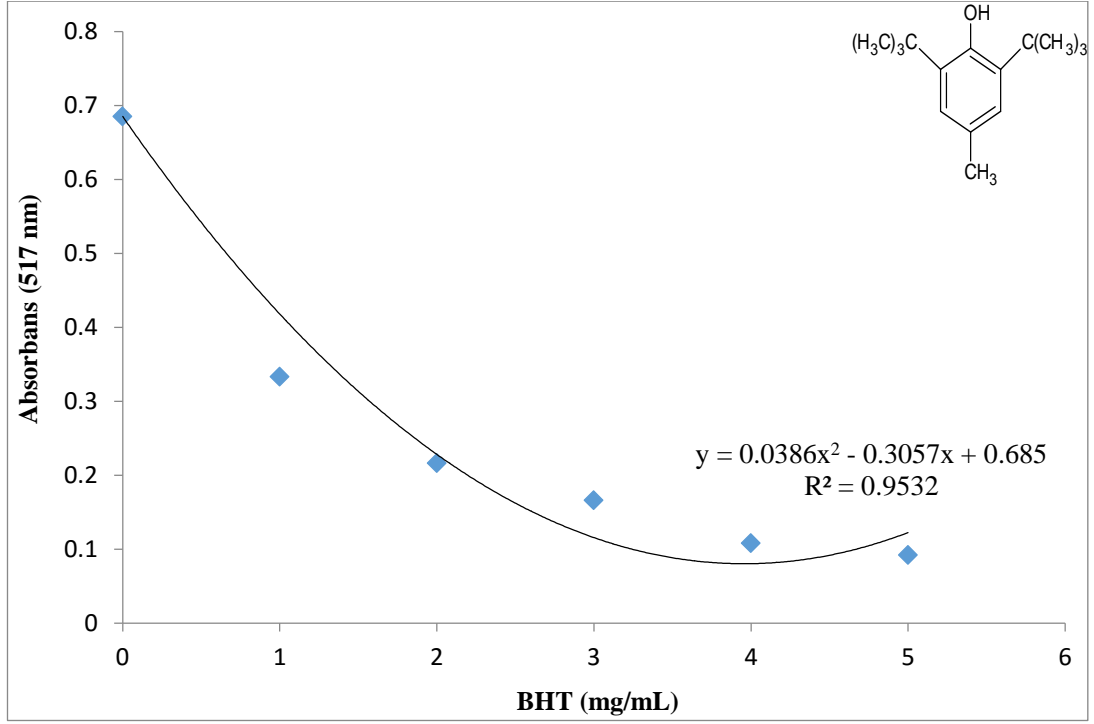




Şekil 4.28: DPPH radikalleri üzerinde 3,5-FMBThH'nin giderme aktivitesi.



Şekil 4.29: DPPH radikaller üzerinde BHT'nin (0.1-1.0 mg / mL) giderme aktivitesi.



Şekil 4.30: DPPH radikalleri üzerinde BHT'nin (1,0-5,0 mg / ml) giderme aktivitesi.

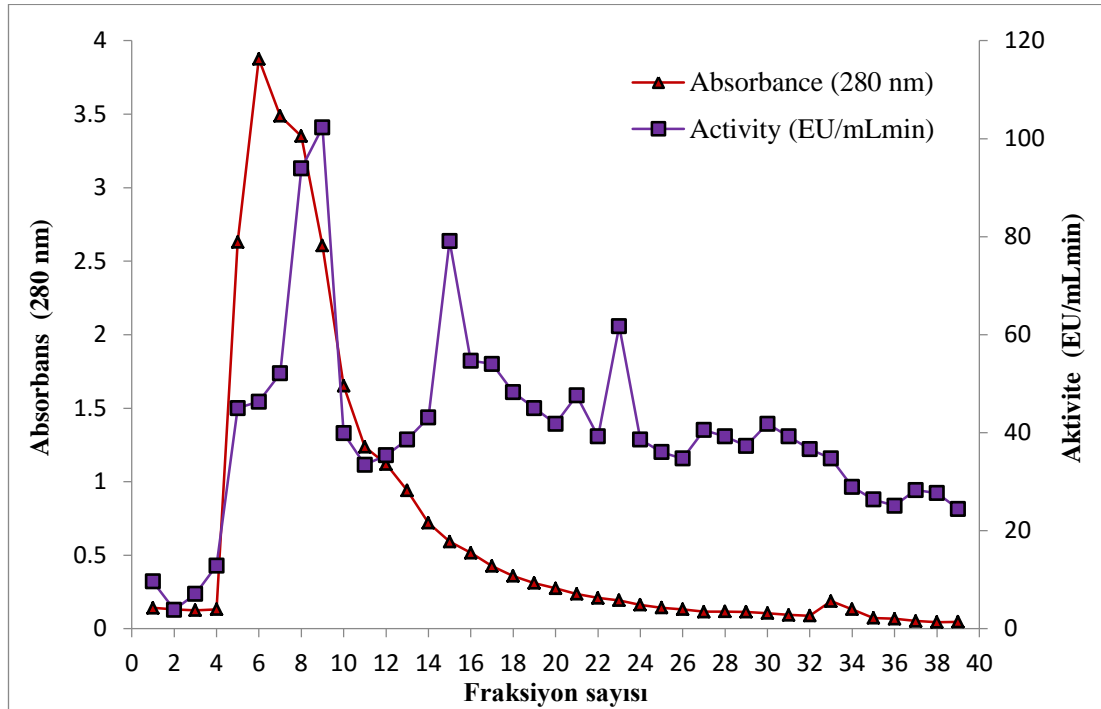
Çizelge 4.25: Test edilen hidrazon türevlerinin IC<sub>50</sub> değerleri (radikal giderme aktiviteleri için) ve standart antioksidan BHT.

Hidrazon türevleri	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
B-2,3-MBPyH	1,273
B-2,4-MBPyH	0,185
2,4-FMBPyH	12,654
3,5-FMBThH	0,970
BHT(0.1-1.0 mg/mL)	0,677
BHT(1.0-5.0 mg/mL)	1,706

### 4.3 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile hPON1 Saflaştırılması ve Saflaştırılan PON1 Aktivitesine Hidrazon Türevlerinin İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

İlk olarak, amonyum sülfat yardımı ile çöktürülen hPON1 enzimi izole edilmiştir (0-60 %). Çökelti 15,000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilerek toplanmıştır ve 100 mM Tris-HCl tamponunda pH 8,00 tekrar çözülmüştür. İnsan serumundan elde edilen toplanmış çökelti amonyum sülfat çökeltilmesi ile HEK'e tabi tutulmuştur. Hidrofobik etkileşim kolonuna yükleme yapmadan önce, hidrofobik jele etkili bağlanmasını geliştirme için çökelti 1 M amonyum sülfat ile doyurulup kolon pH 8.00 1 M amonyum sülfat içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu ile dengelenmiştir. hPON1 enzimi, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponunda (pH 8,00) amonyum sülfatın 1,0 M'dan 0,0 M'a doğrusal gradiyent uygulanarak elüe edilmiştir. Saflaştırılan hPON1 enzimi aktivitesini devam ettirmesi için 2 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında + 4 °C'de saklanmıştır [113].

#### 4.3.1 HEK ile insan serumundan hPON1 enziminin saflaştırılması



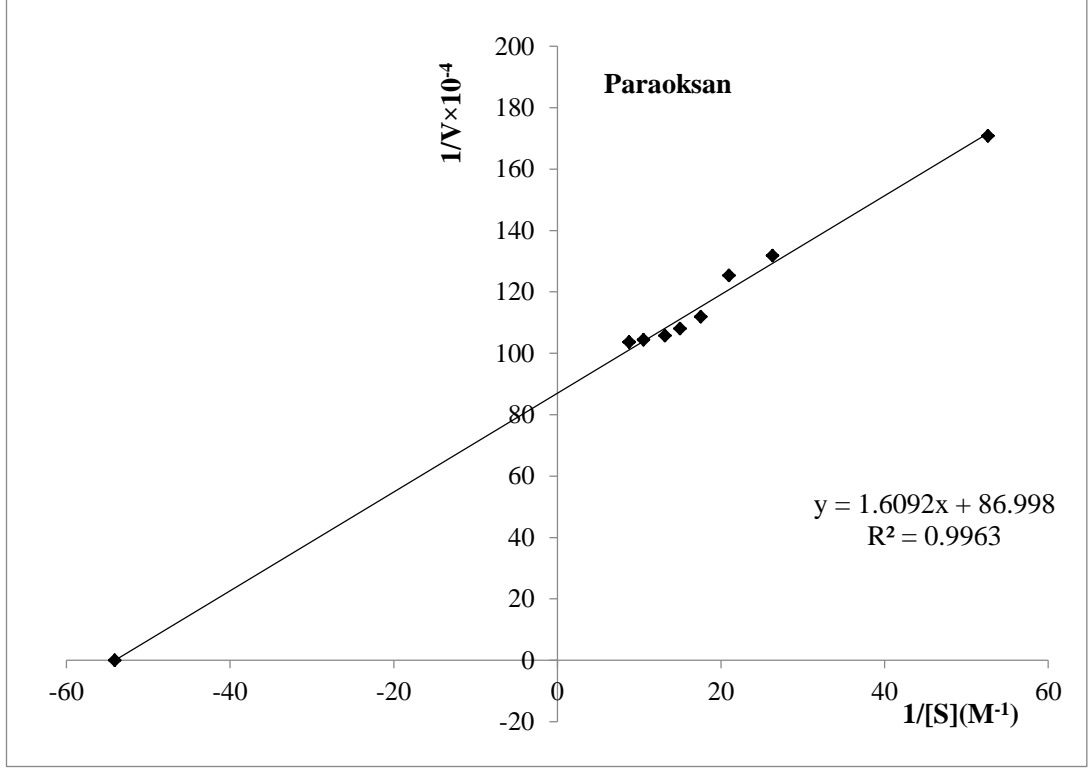
**Şekil 4.31:** Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile insan kan serumundan PON1'in elüsyon grafiği. Her bir fraksiyon, hem protein miktarı (280 nm) hem de enzim aktivitesi (412 nm) için analiz edildi. Enzim aktivitesine sahip tüpler diğer kinetik çalışmalar için birleştirildi. Paraoksonaz aktivitesi "Materyal ve Metod" bölümünde açıklandığı gibi belirlenmiştir.

#### 4.3.2 $K_m$ , $V_{max}$ ve $V_{max} / K_m$ değerlerin belirlenmesi

hPON1 için, Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir, hPON1' in  $K_m$ ,  $V_{max}$ , ve  $V_{max}/K_m$  değerleri paraokson substrat konsantrasyonu için (0,01–1 mM),  $1/V$ 'ye karşı  $1/[S]$  (Çizelge 4.26, Şekil 4.32) grafiğinden hesaplanmıştır.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri saflaştırılan enzimden sırası ile paraoksonaz enzim aktivitesi için 0,018496 mM, hPON1 için 114,955 U/mL'dir. "Katalitik güç" olarak adlandırılan  $V_{max}/K_m$  oranı en etkili substrat bulma parametresidir.  $V_{max}/K_m$  değeri (paraokson substratı ) hPON1 için 6215,127 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.27).

**Çizelge 4.26:** İnsan serum PON1 enzimi için paraokson substratı kullanılarak,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri.

100 Mm Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM)	$\Delta$ OD (412 nm)	Aktivite (U/mL min)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
990	50	10	1050	0,019	0,091	58,54	170,82	52,63
980		20		0,038	0,118	75,9	131,75	26,31
975		25		0,0476	0,124	79,77	125,36	21,01
970		30		0,057	0,139	89,41	111,84	17,54
965		35		0,0666	0,144	92,63	107,96	15,02
960		40		0,076	0,147	94,56	105,75	13,16
950		50		0,095	0,149	95,85	104,33	10,53
940		60		0,114	0,150	96,49	103,64	8,77



**Şekil 4.32:** hPON1' in Lineweaver-Burk grafiği.

**Çizelge 4.27:** hPON1' in kinetik değerleri.

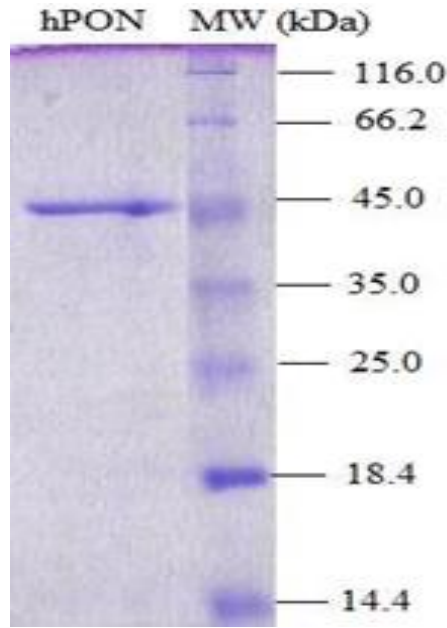
	$K_m(mM)$	$V_{max} (U/mL)$	$V_{max}/ K_m$
hPON1	0,018496	114,955	6215,127

**Çizelge 4.28:** hPON1'in saflaştırılmasını içeren basamakların özeti.

Adımlar	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Toplam aktivite (U)	Protein miktarı (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Toplam verim (%)	Toplam saflaştırma (Toplam)
Serum	34	51,94	1765,96	1372,33	46659,22	0,0378	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	25	65,471	1636,775	1032,4	25810	0,0634	92,685	1,67
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	3	102,923	308,769	4,85	14,55	21,22	17,484	561,375

### 4.3.3 SDS-PAGE elektroforezi

Şekil 4.33 hPON1 enziminin moleküler ağırlığı ve saflığını belirlemek için yapılan SDS-poliakrilamid jel elektroforezini göstermektedir. Yüksek bir saflıkta enzim elde edilmiş durumdadır. hPON1 ve standart proteinler için,  $R_f$  değerleri hesaplanmıştır ve Laemmli [112] prosedürüne göre  $R_f$  değerine karşı log MW grafiği elde edilmiştir. hPON1 için moleküler ağırlık 43 kDa olarak görülmektedir.



Şekil 4.33: hPON1 için SDS-PAGE.

Toplanmış fraksiyonlar amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (Sephrose 4B-L-tirozin, 1-naftilamin) ile SDS-PAGE yaparak analiz edildi (% 12 ve % 13) ve Coomassie Blue boyaması ile belirlenmiştir. Deneysel şartlar method kısmında anlatılmıştır. 1.kolon hPON1, 2.kolon 3 µg moleküler ağırlığa sahip farklı standartlar; BSA (66,2 kDa), yumurta albümini (45,0 kDa), laktat dehidrogenaz (35 kDa), Rease Bsp981 (*E. coli*) (25 kDa), β-laktoglobulin (18,4 kDa), lizozim (14,4 kDa). Saflaştırılan hPON1 (çizgi 1), görünür bir hareketle 43,0 kDa' na karşılık gelen bir yürüme işleminde bulunmuştur.



#### **4.3.4 hPON1 aktivitesi üzerine, paraokson substratı kullanılarak, hidrazon türevlerinin IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi**

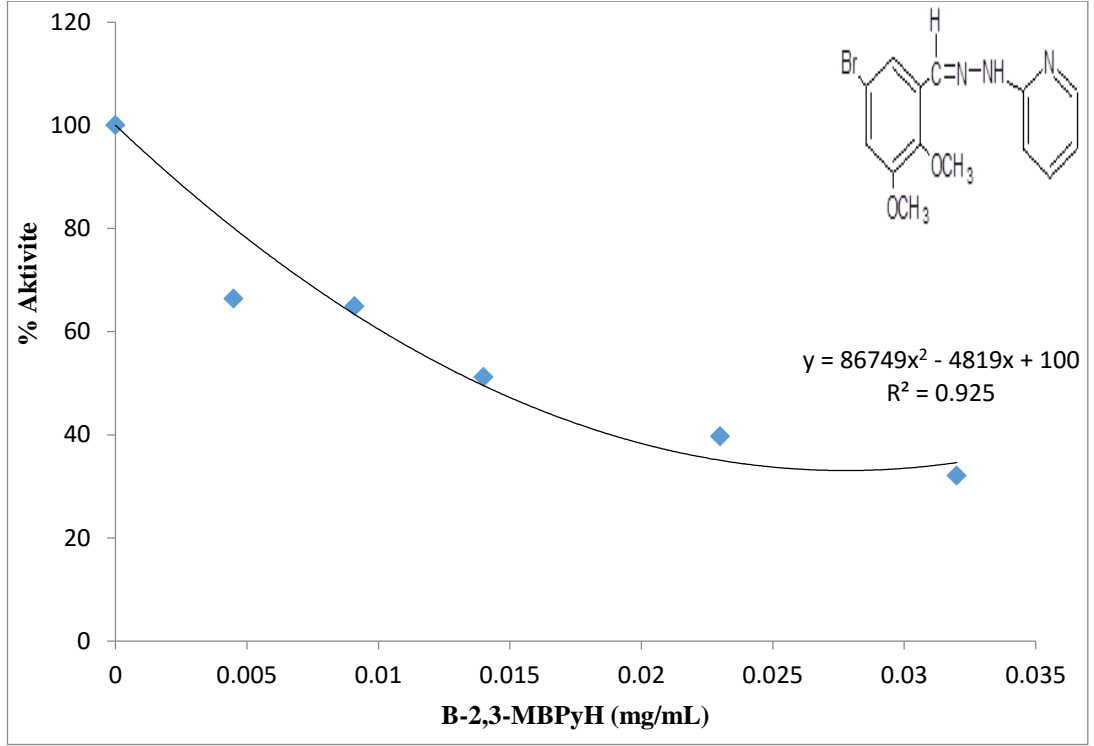
hPON1 enzim aktiviteleri her hidrazon türevinin farklı küvetteki konsantrasyonlarının varlığında ölçülmüştür. Kontrol aktivitesi % 100 hidrazon türevinin varlığında olduğu farzedilip, her bir hidrazon türevi için, her bir yüzde aktiviteye karşı hidrazon türevi konsantrasyon grafikleri çizilmiştir. IC<sub>50</sub> değerleri B-2,3-MBPyH, B-2,4-MBPyH, 2,4-FMBPyH ve 3,5-FMBThH için sırası ile 0,0138, 0,0215, 0,0353 ve 0,0320 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Bütün test edilen hidrazon türevleri mg/mL seviyesinde hPON1 enziminin inhibe ettiği ve çalışılan hidrazon türevleri arasında , en düşük IC<sub>50</sub> değeri B-2,3-MBPyH için 0,0138 mg/mL olup hPON1 için en kuvvetli inhibitör olarak belirlenmiştir (Şekil 4.34, Çizelge 4.29).

**Çizelge 4.29:** hPON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren B-2,3-MBPyH'nin IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

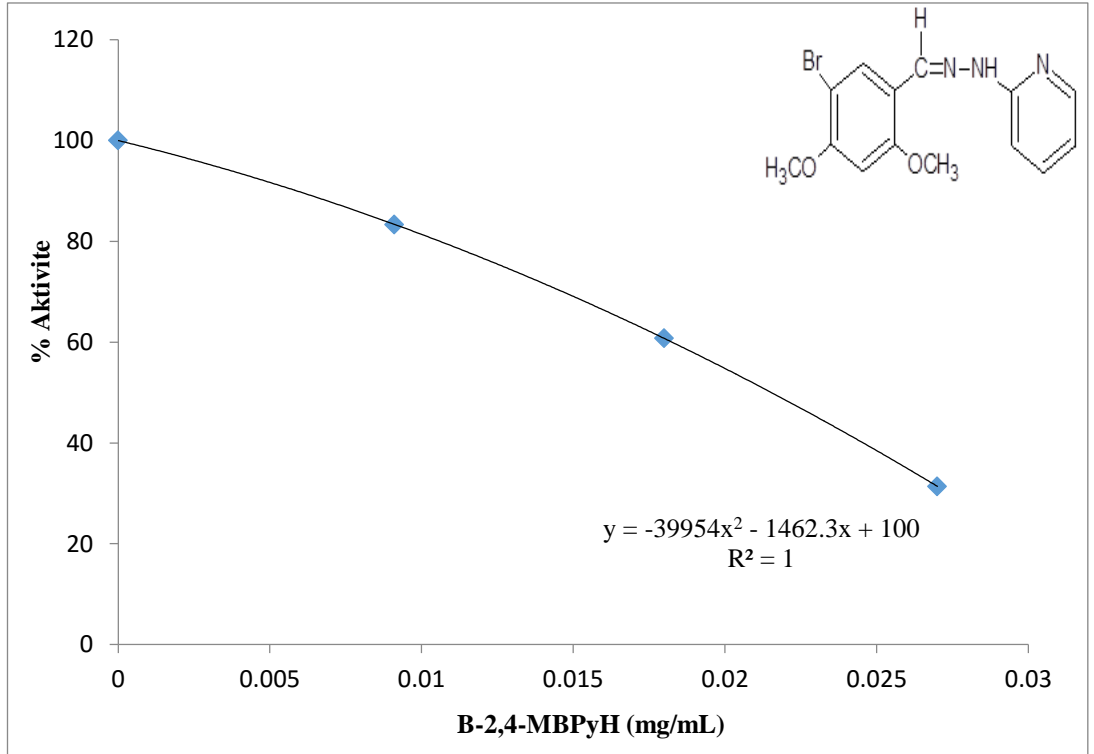
100mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	İnhibitör	Enzim çözeltilisinin hacmi ( $\mu$ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi ( $\mu$ l)	İnhibitör çözeltilisinin hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu [I](mg/mL)mM	$\Delta$ OD (412 nm)	Aktivite (U/mL min)	% Aktivite
950	B-2,3-MBPyH	100	50	—	—	0,131	84,268	100
945				5	0,0045	0,087	55,964	66,412
940				10	0,0091	0,085	54,678	64,886
935				15	0,014	0,067	43,099	51,145
925				25	0,023	0,052	33,450	39,695
915				35	0,032	0,042	27,017	32,061
900				50	0,045	0,037	23,801	28,244
880				70	0,064	0,012	7,719	9,160

**Çizelge 4.30:** hPON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren B-2,4-MBPyH'nin IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µl)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µl)	Substrat çözeltisi hacmi (µl)	İnhibitör çözeltisinin hacmi (µl)	Küvetteki inhibitörün konsantrasyonu [I] (mg/mL)mM	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL min)	% Aktivite
950	B-2,4-MBPyH	100	50	—	—	0,102	64,614	100
940				10	0,0091	0,085	54,678	83,333
930				20	0,018	0,062	39,883	60,784
920				30	0,027	0,032	20,585	31,373



**Şekil 4.34:** Saflaştırılan hPON1 üzerine B-2,3-MBPyH'nin inhibisyon etkisi. Yüzde aktiviteye karşı B-2,3-MBPyH konsantrasyon grafiği.



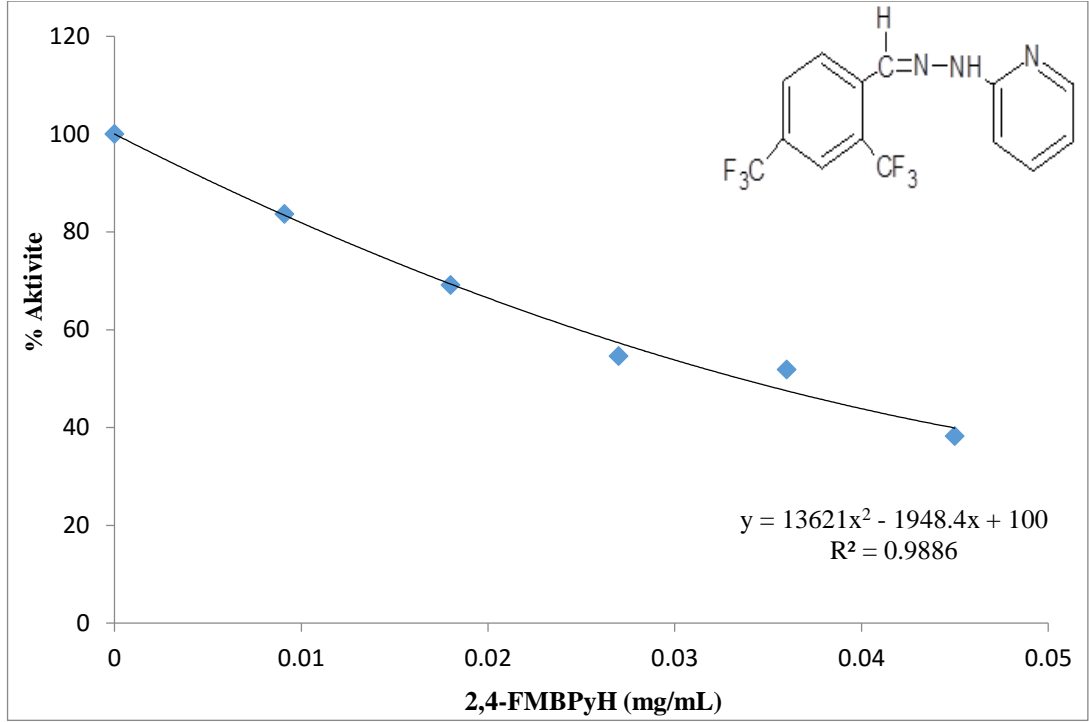
**Şekil 4.35:** Saflaştırılan hPON1 üzerine B-2,4-MBPyH'nin inhibisyon etkisi. Yüzde aktiviteye karşı B-2,4-MBPyH konsantrasyon grafiği.

**Çizelge 4.31:** hPON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren B-2,4-FMBPyH'nın IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

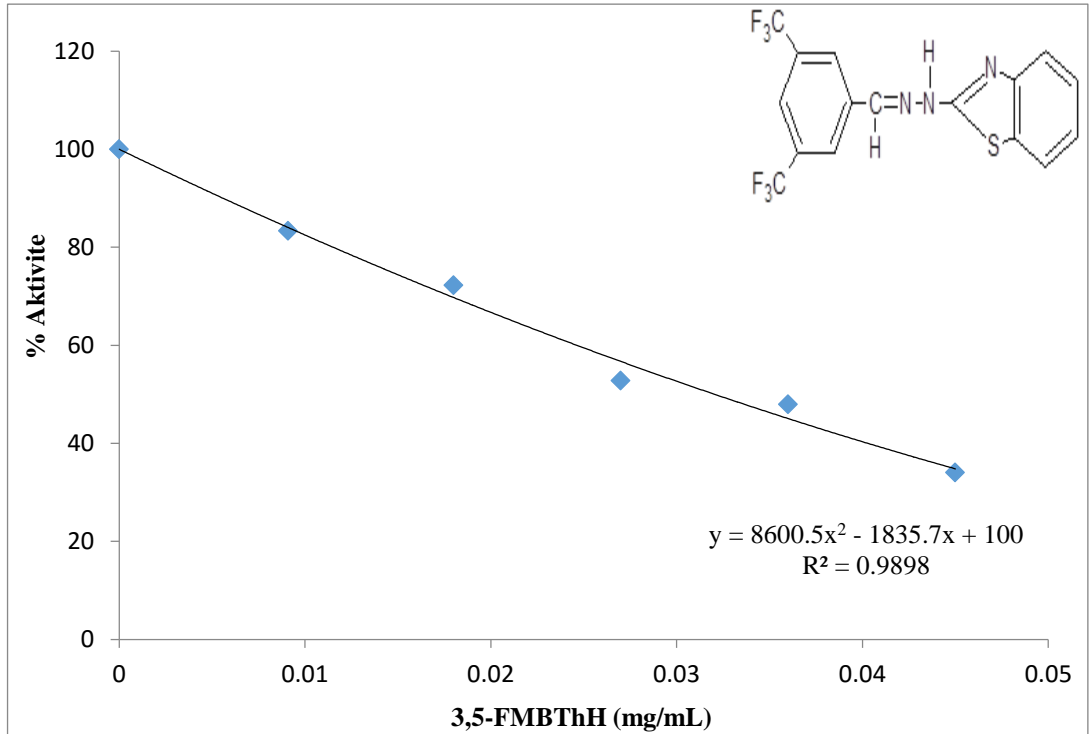
100 mM Tris tamponu (µl)	İnhibitör	Enzim çözeltilisinin hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µl)	İnhibitör çözeltilisinin hacmi (µl)	Küvetteki inhibitörün konsantrasyonu [I] (mg/mL)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL min)	% Aktivite
950	2,4-FMB PyH	100	50	—	—	0,110	70,760	100
940				10	0,0091	0,092	59,181	83,636
930				20	0,018	0,076	48,889	69,091
920				30	0,027	0,060	38,596	54,545
910				40	0,036	0,057	36,666	51,817
900				50	0,045	0,042	27,017	38,181

**Çizelge 4.32:** hPON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 3,5-FMBThH'nin IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µl)	İnhibitör	Enzim çözeltisinin hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	İnhibitör çözeltisinin hacmi (µl)	Küvetteki inhibitörün konsantrasyonu [I] (mg/mL)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/mL min)	% Aktivite
950	3,5-FMB ThH	100	50	—	—	0,144	92,631	100
940				10	0,0091	0,120	77,192	83,333
930				20	0,018	0,104	66,900	72,222
920				30	0,027	0,076	48,888	52,777
910				40	0,036	0,069	44,386	47,917
900				50	0,045	0,049	31,520	34,027



**Şekil 4.36:** Saflaştırılan hPON1 üzerine 2,4-FMBPyH'in inhibisyon etkisi.Yüzde aktiviteye karşı 2,4-FMBPyH konsantrasyon grafiği.



**Şekil 4.37:** Saflaştırılan hPON1 üzerine 3,5-FMBThH'in inhibisyon etkisi.Yüzde aktiviteye karşı 3,5-FMBThH konsantrasyon grafiği.

**Çizelge 4.33:** hPON1 üzerinde test edilen hidrazon türevlerinin IC<sub>50</sub> değerleri (mg/mL).

Hidrazon türevleri	IC <sub>50</sub> ( mg/mL)
B-2,3-MBPyH	0,0138
B-2,4-MBPyH	0,0215
2,4-FMBPyH	0,0353
3,5-FMBThH	0,0320

Bu tezde yeni hidrazon türevleri sentezlenmiştir. Daha sonra, <sup>1</sup>H NMR, FTIR, UV-VIS, X-ray ve elementel analiz kullanarak karakterize edilmiştir. Ardından antioksidan giderme aktivitesi araştırılmış ve hPON1 üzerindeki etkisinin ölçümü yapılmıştır.

Bu çalışmanın ilk bölümü; 5-bromo-2,3-dimetilbenzaldehyd (0,005 mol) içindeki bir çözeltiye 2-hidrazinopiridin (0,005 mol), 5-bromo-2,4-dimetilbenzaldehyd (0,005 mol) çözeltisine 2-hidrazinopiridin (0,005 mol), 2,4-bis (triflorometil) benzaldehyd çözeltisine (0,005 mol) 2-hidrazinopiridin (0,005 mol) eklenerek 25-30 °C ve 3,5-bis (triflorometil) benzaldehyd (0,005 mol) çözeltisine 2-hidrazinobenzotiazol (0,005 mol) eklenmiştir. 1- (5-bromo-2,3-dimetoksibenziliden) -2- (piridin-2-il) hidrazin (B-2,3-MBPyH), soluk sarı kristal, 1- (5-bromo-2,4-dimetoksibenziliden) -2- (piridin-2-il) hidrazin (B-2,4-MBPyH) sarı kristal, 1- (2,4-bis (triflorometil) benziliden) -2- (piridin-2-il) hidrazin (2,4-FMBPyH) sarı kristal ve 1-(3,5-bis(triflorometil) benziliden) -2- (benzo [*d*] tiyazol-2-il) hidrazin (3,5-FMBThH) soluk sarı bir kristal elde edilmiştir. Hidrazon türevleri sentezlendikten sonra daha büyük boyuta, daha saf elde etmek ve biyolojik aktivitede kullanmak için ( DPPH giderici aktivitesi gibi) yeniden kristallendirilmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde; Antioksidanlar, ROS üretimini ve lipid peroksidasyonu ile oluşan yapıyı inhibe etmiştir. Böylece hem oksidatif hem de karbonil stresin engellenmesi sağlanmıştır. Çoğu antioksidanlar, hücreye bağımlı ve hücreden bağımsız sistemlerde LDL oksidasyonunu önler ve aterosklerotik oluşumunu geciktirir. İnsanlarda ateroskleroza karşı etkinliği hakkında farklılıklar vardır; bu en azından kısmen elde edilen biyolojik plak içerisindeki RCC' yi gidermek için doğal kimyasal ve kabiliyetinden yoksun olması nedeni ile bir kez adüktler proteinler üzerinde oluşturulmuştur. Ancak antioksidanlar erken aterosklerotik lezyonların önlenmesinde çok etkili kalır. İnflamatuvar olaylar daha gelişmiş lezyonların gelişiminde rol oynar [114,115].



DPPH giderici aktivitesi antioksidan aktivite deneyi için yöntemlerden biridir. DPPH' çözeltisi koyu bir mor renge sahiptir. Antioksidant bileşiklerinin radikal giderme aktivitesi 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Tüm test edilen hidrazonlar, 230 ve 350 nm arasındaki mevcut UV absorbandsıdır ve 517 nm'de DPPH absorbandsının azalması kinetik ölçümü etkilemez. BHT pozitif referans antioksidan olarak kullanılmıştır. DPPH radikal 517 nm'de absorbands gösteren radikal tarafından mor renkli etanol çözeltisi indirgeme üzerine ağartılması bir antioksidan veya hidrojeni atomu radikali yada DPPH' in tek elektronunun transferi sayesinde olup koyu sarı radikal olmayan formun üretimini azaltır. Bu azalma, DPPH'ın radikal olmayan formlarının artışı ile orantılıdır [116].

Hidrazon türevlerinin antioksidan aktivitesine bakıp, standart antioksidan BHT ile karşılaştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda her bileşiğin farklı konsantrasyonları ve BHT' nin aynı konsantrasyonları (0,1-5 mg / mL); her örnek etanoldeki DMSO' nun 0,1 mM' ının eşit hacimleri (1,0 mL) hazırlanarak 517 nm'de 1 dakika boyunca spektrofotometrik olarak farklı absorbandslarda ölçülerek hazırlanmıştır.

IC<sub>50</sub> değerleri B-2,3-MBPyH, B-2,4-MBPyH, 2,4-FMBPyH, ve 3,5-FMBThH için sırası ile 1,273, 0,185, 12,654, ve 0,970 mg/mL'dir. BHT (0,1-1,0 mg/mL) için 0,677, BHT (1,0-5,0 mg/mL) için 1,706 olarak elde edilmiştir. Eğer hidrazon türevlerinin IC<sub>50</sub> değerleri ve BHT arasında karşılaştırma yaparsak, B-2,4-MBPyH hidrazon türevi DPPH'a karşı en yüksek etki gösteren antioksidan olduğu görülür. Eğer BHT ile karşılaştırırsak, DPPH için 0,677 değerindeki BHT (0,1-1,0 mg/mL)'den daha fazladır. Diğer 1,706 değerindeki BHT (1,0-5,0 mg/mL) için daha etkili olduğu bulunur. Karşılaştırmamız neticesinde IC<sub>50</sub> için sentezlenen hidrazon türevleri antioksidan olarak kullanılabilir. Fakat diğer biyolojik aktiviteler için de denenmelidir. Literatürden alınan hidrazon üzerine antioksidan aktivitesi çalışmaları sınırlı olsa da, hidrazon türevlerinin serbest radikale karşı iyi bir antioksidan olduğu kanıtlanmıştır.

N. Belkheiri vd., [98] hidralazin gibi hidrazon türevlerinin antiaterojenik aktivite aracılığı karbonil grupları tarafından giderme aktivitesinin etkili olduğu ve DPPH çalışmaları için piridin halkasının sahip karbonil grubuna komşu bileşiklerin en düşük IC<sub>50</sub> değerine sahip hidrazonlar arasında 17 ve 18 µM için (E) -N '(4Hidroksi-3,5-dimetoksibenziliden) izonikotinohidrazid ve (E) -N' (4-Hidroksi-3,5-dimetoksi benziliden) izonikotinohidrazid olduğunu bulmuştur.

C. Vanucci-bacqué vd., [95], fenolik hidrazonların bazılarının oksidatif stresi engelleyip engellemediğini araştırmışlardır. DPPH üzerine fizikokimyasal özellikleri ve radikal süperoksit anyon giderme aktivitelerini araştırmışlardır. Fenolik yapı nedeni ile sentezlenen hidrazonlar 10 µM' de yüksek güçte antioksidan özelliği sergilemişlerdir. Hidrazonlar dışında çok iyi radikal giderme yetenekleri olduğunu göstermektedir.

Çalışmanın üçüncü bölümünde ise hPON1enzimin hidrofobik etkileşim kromatografisine ile saflaştırılıp ve hPON1 üzerine hidrazon türevlerinin inhibitör etkileri araştırılmıştır. Paraokson substratı kullanılarak IC<sub>50</sub>, K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri belirlenmiştir.

Taze insan kanından 34 mL insan serumu izole edilip ve kuru bir tüpe alınmıştır. 1,500 rpm' de 20 dakika santrifüj edilen kan örneklerinden 25 mL serumu uzaklaştırılmıştır. İlk olarak hPON1 enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ile izole edilmiştir. hPON1 için çökelti aralığı % 0–60 [117]. Çökelti 40 dakika 15,000 rpm' de santrifüj edilerek toplanmıştır. Yeniden 100 mM Tris–HCl tamponunda pH 8.00' de çözülmüştür. İnsan serumundan toplanan çökelti amonyum sülfat çökeltisi tabi tutulup ardından hPON1 enziminin saflaştırma adımlarını azaltmak için hidrofobik bir jel kullanılmıştır. N-terminali hidrofobik karakterli peptid sinyali olan jel PON1 için dizayn edilmiştir. hPON1 enzimi pH 8,0' de amonyum sülfat bulunmayan 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu varlığında elüe edilmiştir.

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) proteinlerin birbirinden hidrofobik özellikleri ile ayrılması için kullanılan ayırma tekniğidir. Fenil, oktil yada butil gibi hidrofobik gruplar (ligandlar) sabit kolana takılır. Kolon boyunca geçen proteinler alanin, metiyonin, triptofan, ve fenilalanin gibi hidrofobik aminoasit zincir tarafı sadece hidrofobisitesi protein konformasyonun sabit kalmasına yardım etmez. Aynı zamanda hidrofobik gruplar (ligand) kolon boyunca spesifik etkileşimlere de katkıda bulunur. Bir çözeltideki protein molekülü bir su filmini üzerinde tutar. Hidrofobik etkileşim kromatografisinden önce yüzey alanındaki düzenli yapıdan iyonik olmayan yapılardan arındırılmalıdır [118].

Hidrofobik etkileşim kromatografisi genellikle iyon değişim kromatografisinin şartlarına karşı düzenlenir. Adsorpsiyon adımı genellikle salting-out varlığını (sodyum klorür yada amonyum sülfat gibi) gerektirir. Salting-out iyonlarının azalışı çözeltideki su moleküllerinin kullanımını azaltırken, yüzey alanı gerginliğini azaltır ve hidrofobik etkileşim kromatografisini arttırır. Buna karşın, salting-in yada

katropik iyonlar (sodium tiyosiyanat gibi) yapıya su alarak iyonik olmayan etkileşimleri önler. Bu teknik, amonyum sülfat gibi yüksek güçteki iyonik tamponların kolona başlangıcında uygulanır. Tampondaki tuz solvent örneklerinin çözünmesini azaltır böylece çözünme azalır, hidrofobik bölgeler ortam tarafından adsorplanmaya maruz kalır.

Daha fazla hidrofobik molekül [119], daha az tuz bağlanmasını ister. Proteinleri elüe etmek için, tuz konsantrasyonu, giderek artan hidrofobisite sırasına göre azaltılır. Buna ek olarak, aynı zamanda, hafif elüsyon organik düzenleyici veya deterjanın kullanımını yoluyla elde edilebilir. Sabit faz, diğer moleküller ile hidrofobik etkileşimler oluşturmak için tasarlanmıştır. Bu etkileşimler suda çok zayıf olup ancak tampon tuzları ilavesi ile hidrofobik etkileşimlere neden olur. Protein ve adsorban yükü de hidrofobik adsorpsiyon derecesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir. Net bir yükü olmayan protein (izoelektrik noktasında) ile maksimum hidrofobikliğe sahip olacaktır [120].

Gan ve arkadaşları tarafından paraoksone yönelik hPON1 aktivitesi spektrofotometrik olarak tanımlanmıştır [121]. Enzim deneyi, 412 nm'de, p-nitrofenol tahminine dayanmaktadır. P-nitrofenol molar tükenme katsayısı ( $\epsilon = 017, 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  pH 10,5), enzim aktivitesinin hesaplanması için kullanılmıştır. Reaksiyon otomatik kayıttaki bir spektrofotometrede 412 nm'de p-nitrofenol görüntüsü izlenerek 37 ° C 'de 1 dakika boyunca takip edilmiştir.

Hidrazon türevleri ile hPON1 inhibisyonu çalışmaları için hidrazon türevleri, farklı konsantrasyonlarda, reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. Hidrazon türevleri ile hPON1 aktivitesi paraokson hidrasyonunu izlenerek analiz edilmiştir. Hidrazon türevlerinin her biri farklı konsantrasyonları için hPON1 aktivite yüzde değerleri, Microsoft Office 2010 excel kullanarak regresyon analizi ile belirlenmiştir. Hidrazon türevi olmayan hPON1 enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak kabul edilmiştir. Hidrazon türevleri için inhibitör konsantrasyonunun % 50 inhibisyona ( $IC_{50}$  değerleri) kadar neden olan grafik ile belirlendi. hPON1 enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini elde etmek için, substrat olarak paraokson kullanılıp pH 8,00 ve 37 ° C'de ölçülmüştür. Lineweaver-Burk grafikleri yoluyla  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile 0,018496 mM ve 114,955 U/mL olarak belirlenmiştir.  $V_{max}/K_m$  ise 6215,127 olarak bulunmuştur. Hidrazon türevi ile hPON1 için  $IC_{50}$  ve inhibisyon etkisini ölçmeye başlamak için SDS-PAGE elektroforez ile hPON1 karakterize edildi ve 43 kDa'da bant elde edildi.

SDS-PAGE proteinler (enzim) ayrılması ve karakterize etmek için kullanılan en yaygın analitik tekniklerdendir. Akrilamid ve bisakrilamid polimerleştirilir. Akrilamid, tek başına doğrusal polimerler oluşturur. Bisakrilamid poliakrilamid zincirleri arasındaki çapraz bağları tanımladı. Bisakrilamidin yüksek bir oranı akrilamide ve yüksek akrilamid konsantrasyonu düşük elektroforetik hareketliliği neden olur. Akrilamid polimerizasyonu ve bisakrilamid monoerleri amonyum persülfat (APS) tarafından uyarılır ve kendiliğinden serbest radikalleri oluşturur parçalanır. Bir serbest radikal sabitleyicisi olan TEMED genellikle polimerizasyonu geliştirmek için dahil edilir.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) amfipatik bir deterjandır. Anyonik bir baş grubu ve lipofilik kuyruğu vardır. İki amio asit arasına bir SDS molekülü stokiyometrik olarak kovalent olmayan bir şekilde bağlanır. SDS proteinleri denatüre eder ve proteinleri birbirinden ayırır (kovalent çapraz bağlanma hariç). Aynı zamanda negatif yük kazandırır. SDS varlığında bir proteinin yükü maskelenir. SDS-PAGE sırasında tüm proteinler anota doğru göç eder (pozitif yüklü elektrot). SDS ile muamele edilen proteinler benzer yük-kütle oranına ve benzer şekillere sahip olurlar. PAGE sırasında, SDS ile muamele edilmiş proteinlerin yer değiştirme oranı, moleküler ağırlık ve yük tarafından belirlenmektedir [122].

Hidrazon türevleri ile hPON1 inhibasyonu için farklı konsantrasyonlarda hidrazon türevleri reaksiyon ortamına eklenmiştir ve 37 °C 'de ve 1 dakika boyunca etkisi spektrofotometre ile ölçülmüştür ve bütün hidrazon türevlerini hPON1 inhibasyon etkisini göstermiştir. Hidrazon türevlerinin IC<sub>50</sub> değerleri hPON1 üzerinde test edilerek aşağıdaki sonuçlar sırasıyla bulunmuştur: 0,0138, 0,0215, 0,0353 ve 0,0320 için B-2,3-MByH, B-2,4-MBPyH, 2,4-FMBPyH ve 3,5-FMBThH. B-2,3-MBPyH hidrazon türevinin en yüksek IC<sub>50</sub> değeri 0,0138'tir.

M. Erzengin vd., [46], iki aşamalı prosedürlerle amonyum sülfat çöktürmesini kullanarak hPON1 enzimini saflaştırmıştır ve Sepharose-4B-tirozin-1-naftilamin, hidrofobik etkileşim kromatografisi, özellikle PON1 enzimi tutan N-terminal hidrofobik sinyal peptidi için tasarlanmıştır. Amonyum sülfat saflaştırılması hPON1 enziminin % 60-80 aralığında başlangıç saflaştırma aşaması için seçilmiştir. V<sub>max</sub> ve K<sub>m</sub> değerleri sırasıyla 0,666 mM ve 11,76 U/ml olarak bulunmuştur. Sonra, paraoksan substratı kullanarak saflaştırılmış hPON1 üzerinde dihidroksi kumarin bileşiklerinin etkisini araştırmışlar ve IC<sub>50</sub> değerini 0,012, 0,022 ve 0,003 mM olarak bulmuşlardır.

S. Sinan vd., [123], hPON1 saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 227,27 U/ml ve 4,16 mM olarak belirlenmiştir. Saflaştırılmış hPON1 SDS-PAGE üzerinde 43 kDa'luk bir MW ile tek bir bant vermiştir.

H. A. Alici vd., [124], Amonyum sülfat çöktürmesinden DEAE-Sephadex anyon değiştirme kromatografisi, Sephadex 200 jel kromatografisi ile saflaştırılan hPON1 , *in vitro* ve *in vivo* olarak hPON1 üzerine yaygın olarak kullanılan damardan içeri verilen anestetiklerin etkisi incelemişlerdir. Amonyum sülfat çökeltmesi, % 60-80, hPON1 enzimi için başlangıç saflaştırma aşaması için seçilmiştir ve molekül ağırlığı olan 43 kDa olan son saflaştırılmış hPON1 ile SDS-PAGE üzerinde tek bir protein bandı olduğu bulunmuştur.

D. Ekinci vd., [125], amonyum sülfat çöktürmesinden, DEAE-Sephadex anyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış hPON1 aktivitesine yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere etkisini incelemişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen hPON1 enzimi, % 60-80 aralığında başlangıç saflaştırma aşaması için seçilmiştir. Son saflaştırılmış hPON1 43 kDa'lık bir molekül ağırlığında ve SDS-PAGE üzerinde tek bir protein bandı vardı.

Z.Q. Samra vd., [126] kolesterol-konjuge manyetik nanopartiküller ve Sephadex G75-kromatografik yöntemleri kullanarak hPON1'i saflaştırmışlardır. Süpernatantı ayırıp % 60-70 amonyum sülfat çökeltmesi ile karıştırmışlardır. Substrat olarak paraoksonun  $K_m$  değerini 1.3 olarak bulmuşlardır. Saflaştırdıkları enzimin, SDS-PAGE'de 45 kDa'da tek bir bant ile analiz edilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma üç ana bölüme ayrılmıştır; ilk bölümde, dört yeni hidrazon türevi sentezlenmiş ve yapıları XRD, H-NMR, FTIR, UV-VİS taramaları ve elementel analiz teknikleri ile aydınlatılmıştır. İkinci bölümde, tüm yeni sentezlenen bileşikler DPPH metodu ile serbest radikal giderme aktivitelerinin belirlenmesi için incelenmiştir. Üçüncü bölümde ise, insan serum paraoksonaz 1 (hPON1) enzimi iki aşamalı yani amonyum sülfat çöktürmesi ve Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik etkileşim kromatografisi işlemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı SDS-PAGE ile incelenmiştir. Paraokson substrat olarak kullanılarak, saflaştırılan enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir. Son olarak, sentezlenen yeni bileşiklerin saflaştırılan hPON1 üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri substrat olarak paraokson kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları kısaca sıralanırsa;

- Bu çalışmada, 1-(5-bromo-2,3-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (B-2,3-MBPyH), 1-(5-bromo-2,4-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il) hidrazin (B-2,4-MBPyH), 1-(2,4-bis(triflorometil)benziliden)-2-(piridin-2-il) hidrazin (2,4-FMBPyH) ve 1-(3,5-bis(triflorometil)benziliden)-2-(benzo [d]tiazol-2-il) hidrazin (3,5-FMBThH) olarak adlandırılan dört yeni hidrazon türevi sentezlenmiştir.
- Yapıları XRD, H-NMR, FTIR, UV-VIS taramaları ve elementel analiz teknikleri ile aydınlatılmıştır.
- Tüm yeni sentezlenen bileşiklerin serbest radikal giderme aktiviteleri DPPH metodu ile incelenmiştir. 0,185 mg/mL ile en düşük  $IC_{50}$  değerine sahip B-2,4-MBPyH bileşiği, DPPH için en yüksek serbest radikal giderme aktivitesi göstermiştir.
- hPON1, iki aşamalı yani amonyum sülfat çöktürmesi ve Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik etkileşim kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır.
- Saflaştırılan hPON1 enziminin SDS-PAGE 'de 43 kDa molekül ağırlığında tek bir bant gözlenmiştir.

- Saflaştırılan hPON1 enzimi 21,22 U/mg spesifik aktiviteye sahiptir.
- hPON1 için saflaştırma oranı 561,38-kat olarak bulunmuştur.
- Substrat olarak paraokson kullanılarak, saflaştırılan enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırayla 0,018496 mM ve 114,96 U/mL olarak belirlenmiştir.
- Sentezlenen yeni bileşiklerin saflaştırılan hPON1 üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri paraokson substrat olarak kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar, tüm hidrazon türevlerinin derişime bağımlı olarak hPON1 enzim aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir. Çalışılan hidrazon türevleri arasında B-2,3-MBPyH bileşiğinin 13,8 µg/mL ile en düşük  $IC_{50}$  değerine sahip olduğu, hPON1 aktivitesi için en etkili inhibitör olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında sentezlenen tüm yeni hidrazon türevlerinin serbest radikalleri giderebilme yeteneğine sahip oldukları ortaya konmuştur. Bu nedenle, test edilen hidrazon türevleri besin ve/veya farmasötik endüstri için biyoaktif bileşik olarak ümit verici kaynak olarak değerlendirilebilir. Paraoksonaz1 (PON1: EC 3.1.8.1) HDL'ye bağılı yapısında kalsiyum içeren bir enzimdir ve memelilerde LDL oksidasyonuna karşı koruyucu etkiye sahiptir.

Ayrıca bu çalışma, hPON1 aktivitesinin çalışılan hidrazon türevlerine karşı oldukça hassas olduğunu göstermiştir. Tüm test edilen bileşikler hPON1 enzimine karşı derişime bağımlı olarak çok iyi inhibisyon aktiviteleri göstermiştir.

Yapı aktivite ilişkisi (SAR) çalışmaları, 1-(5-bromo-2,3-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (B-2,3-MBPyH) ve 1-(5-bromo-2,4-dimetoksibenziliden)-2-(piridin-2-il)hidrazin (B-2,4-MBPyH) bileşiklerinin yan halka üzerindeki dimetoksi substitüentinin, hPON1 aktivitesini inhibe edici temel faktör olabileceğini söyleyebiliriz. Bu bileşiklerin hPON1 aktivitesi üzerindeki etkileri oldukça açıktır.

Sonuç olarak, hidrazon türevleri ile farklı kaynaklardan paraoksonaz üzerine inhibisyon çalışmalarının yoksunluğu nedeniyle, sonuçlarımızı karşılaştıracak yeterli veri bulunmamakta ve dolayısıyla, paraoksonazlar arasındaki belirli benzerlikler ve farklılıkları tespit etmek mümkün değildir. Bu çalışma paraoksonazın biyokimyasal özellikleri hakkındaki bilgilerin arttırılmasına katkı sağlamasına rağmen, hidrazon türevlerinin farklı kaynaklardan elde edilen paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkilerinin analiz edilmesi için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Jones, R.D., Summerville, D.A. ve Basolo, F., 1979. Synthetic oxygen carriers related to biological systems. *Chemical Reviews*, 79(2), 139-179.
2. Olie, G.H. ve Olive, S., 1984. *The Chemistry of the Catalyzes Hydrogenation of carbon Monoxide*, Springer, Berlin, Germany.
3. Dugas, H. ve Penney, C., 1981. *Bioorganic Chemistry*, Springer, New York, USA.
4. Margerum, J.D. ve Miller, L.J., 1971. *Photochromism*, Wiley Interscience, New York, USA.
5. Sawodny, W.J. ve Riederer, M., 1977. Addition Compounds with Polymeric chromium (II)-Schiff Base Complexes. *Angewandte Chemie International edition in English*, 16, 859.
6. Ashraf, M. A., Mahmood, K. ve Wajid, A., 2011. Synthesis, Characterization and Biological Activity of Schiff Bases. *International Conference on chemistry and Chemical Process IPCBEE*, 10, 1–7.
7. Souza, P., Garcia-Vazquez, J.A. ve Masaguer J. R., 1985. Synthesis and characterization of copper (II) and nickel (II) complexes of the Schiff base derived from 2-(2-aminophenyl)benzimidazole and salicylaldehyde. *Transition Metal Chemistry*, 10 (11), 410-412.
8. Schiff, H., 1864. Mitteilungen aus dem universitatlaboratorium in Pisa: Eineneue reihe organischer basen, in German. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 131 (1), 118–119.
9. Bedia, K.K., Elcin, O., Seda, U. Fatma, K. Nathaly, S., Selvim, R. ve Dimoglo, A., 2006. Synthesis and characterization of novel hydrazide–hydrazones and the study of their structure–antituberculosis activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41 (11), 1253–1261.
10. Kucukguzel, S.G., Rollas, S., Kucukguzel, I. ve Kiraz, M., 1999. Synthesis and antimycobacterial activity of some coupling products from 4-aminobenzoic acid hydrazones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 34 (12), 1093-1100.



11. Maccari, R., Ottana, R. ve Vigorita, M.G., 2005. In vitro advanced antimycobacterial screening of isoniazid-related hydrazones, hydrazides and cyanoboranes: Part 14. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15 (10), 2509–2513.
12. Rollas, S., Gulerman, N. ve Erdeniz, H., 2002. Synthesis and antimicrobial activity of some new hydrazones of 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines. *Il Farmaco*, 57 (2), 171–174.
13. Parmar, S.S., Gupta, A.K., Gupta, T.K., Stenberg, V.I. ve Pharm, J., 1975. Synthesis of substituted benzylidinohydrazines and their monoamine oxidase inhibitory and anticonvulsant properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64 (1), 154–157.
14. Panneerselvam, P., Nair, R., Vijayalakshmi, G., Subramanian, E.H. ve Sridhar, S.K., 2005. Synthesis of Schiff bases of 4-(4-aminophenyl)-morpholine as potential antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal chemistry*, 40 (2), 225–229.
15. Sousa, A., Bermejo, M.R., Fondo, M., Ana, G-D., Antonio, S-P. ve Piro, O., 2001. Structural characterisation of metal complexes containing 1-[(4-methyl phenyl)sulfonamido]-2-[(2-pyridylmethylene)amino]benzene. *New Journal of chemistry*, 25 (4), 647-654.
16. Pouralimardan, O., Chamayou, A.C., Janiak, C. ve Monfared, H.H., 2007. Hydrazone Schiff base-manganese (II) complexes: Synthesis, crystal structure and catalytic reactivity. *Inorganica Chimica Acta*, 360(5), 1599-1608.
17. Suez, I.H.A., Pehkonen, S.O. ve Hoffmann, M.R., 1994. Stability, Stoichiometry, and Structure of Fe (II) and Fe (III) Complexes with Di-2-pyridyl Ketone Benzoylhydrazone: Environmental Applications. *Sci Technol* 28 (12), 2080-2086.
18. Terra, L.H., Areias, A.M.C., Gaubeur, I. ve Suez-Iha, M.E.V., 1999. Solvent Extraction-Spectrophotometric Determination of Nickel (II) in Natural Waters Using DI-2-Pyridyl Ketone Benzoylhydrazone. *Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication*, 32 (2), 257.
19. Fujita, E., Brunschwig, B.S., Ogata, T. ve Yanagida, S., 1994. Toward photochemical carbon dioxide activation by transition metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 132, 195-200.
20. Kimura, E., Wada, S., Shionoya, M. ve Okazaki, Y., 1994. New Series of Multifunctionalized Nickel (II)-Cyclam (Cyclam=1,4,8,11- Tetraaza cyclote tradecane) Complexes. Application to the Photoreduction of Carbon Dioxide. *Inorganic Chemistry*, 33 (4), 770-778.
21. Grekov, A.P., 1996. *Organic chemistry Hirdazina. Technology*, Kiev.

22. Rodríguez-Argüelles, M.C., Ferrari, M. B., Bisceglie, F., Pelizzi, C., Pelosi G., Pinelli, S. ve Sassi, M., 2004. Synthesis, characterization and biological activity of Ni, Cu and Zn complexes of isatin hydrazones. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98 (2), 313-321.
23. Sreeja, P.B., Sreekanth, A., Nayar, C.R., Prathapachandra Kurup, M.R., Usman, A., Razak, I.A., Chantrapromma, S. ve Fun, H.K., 2003. Synthesis, spectral studies and structure of 2-hydroxyacetophenone nicotinic acid hydrazone. *Journal of Molecular Structure*, 645 (2-3), 221-226.
24. McMurry, J. E., 2004. *Organic Chemistry*. Missouri, USA.
25. Shit, S., Chakraborty, J., Samanta, B., Slawin, A. M. Z., Gramlich, V. ve Mitra, S., 2009. Three new coordination complexes of cobalt (III), manganese (II), and copper(II) with N,N,O-donor hydrazone ligands: syntheses and structural characterizations. *Structural Chemistry*, 20(4) ,633-642.
26. Schiele, V.C., 1964. IR- und UV-VIS-spektroskopische Untersuchungen am System Tetrazoliumsalz/Formazan. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 69 (4), 308.
27. Mattson, A. M., Jensen, C. O. ve Dutcher, R. A., 1947. Triphenyltetrazolium chloride as a dye for vital tissues. *Science*, science. sciencemag.org, 5, 294.
28. NIOSH Guide-Hydrazine. Centers for Disease Control. Retrieved 16 August 2012, (<http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0329.html>).
29. Cheeseman, K.H. ve Slater, T.F., 1993. An introduction to free radicals chemistry. *British Medical Bulletin*, 49 (3), 481–493.
30. Bagchi, K. ve Puri, S., 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4, 350–360.
31. Liu, T., Stern, A. ve Roberts, L.J., 1999. The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *Journal of biomedical science*, 6, 226–235.
32. Goldfarb, A. H., 1999. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 24 (3), 249-266.
33. Young, I.S. ve Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54, 176–86.
34. Ebrahimabadi, A.H., Ebrahimabadi, E.H., Djafari-Bidgoli, Z., Jookar Kashi, F., Mazoochi, A. ve Batooli, H., 2010. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. *Food Chemistry*, 119, 452-458.

35. Frie, B., Stocker, R. ve Ames B.N., 1988. Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 37, 569–571.
36. Dekkers, J. C., Lorenz, J. P., Doornen, V. ve Kemper, H.C.G., 1996. The Role of Antioxidant Vitamins and Enzymes in the Prevention of Exercise-Induced Muscle Damage. *Sports Medicine*, 21 (3), 213-238.
37. Shi, H., Noguchi N. ve Niki N. 1999. Comparative study on dynamics of antioxidative action of  $\alpha$ -tocopheryl hydroquinone, ubiquinol ve  $\alpha$ -tocopherol, against lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(3-4), 334–346.
38. Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
39. Huang, D., Ou B. ve Prior R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
40. Sharma, O.P. ve Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113 (4), 1202–1205.
41. Mark, S. ve Alger, M., 1997. *Polymer science dictionary*. Springer. p. 152. ISBN 0-412-60870-7.
42. Stryer, L., Berg, J.M. ve Tymoczko, J.L., 2002. *Biochemistry* (5<sup>th</sup> ed.). San Francisco: W.H. Freeman. ISBN 0-7167-4955-06.
43. Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto, C., Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M. ve Schomburg, D., 2013. BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Research*, 41 (Database issue), D764–72. 10.1093/nar/gks1049.
44. Mazur, A., 1946. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorusfluorine bond of alkyl fluorophosphates. *Journal of Biological Chemistry*, 164, 271–289.
45. Camps, J., Marsillach, J. ve Joven, J., 2009. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Critical Reviews in clinical Laboratory Sciences*, 46 (2), 83–106.
46. Van Himbergen, T.M., Van Tits, L.J.H., Roest, M. ve Stalenhoef, A.F.H., 2006. The story of PON1: how an organophosphate hydrolyzing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Netherlands Journal of Medicine*, 64 (2), 34–38.

47. Erzenin, M., Basaran, I., Cakir, U., Aybey, A. ve Sinan, S., 2012. In vitro inhibition effect of some dihydroxy coumarin compounds on purified human serum paraoxonase 1 (PON1). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, 1540–1548.
48. Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., Shih, D.M., Lysis, A. ve Furlong, C.E., 1999. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxification of organophosphates and its human polymorphism. *Chemico-Biological Interactions*, 119–120, 429-438.
49. Lenz, D.E., Broomfield, C.A., Maxwell, D.M. ve Cerasoli, D.M., 2001. Nerve Agent Bioscavengers: Protection against High- and Low-Dose Organophosphorus Exposure, in: J. Romano, S. Somani (Eds.), *Chemical Warfare Agents: Toxicity at Low Levels*, CRC Press LLC, Boca Raton, 245–260.
50. Arslan, M., Erzenin, M. ve Demir, D., 2011. Comparison of serum paraoxonase 1 (PON1) activities among different sheep breeds in Turkey. *J Anim Vet Adv* 10(4), 489–494.
51. Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J. ve Furlong, C.E., 1991. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry*, 30, 10141–10149.
52. Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. ve La Du, B.N., 1999. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with high density lipoproteins by binding phospholipids: apolipoprotein A-1 stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 2214–2225.
53. Mackness, M.I. ve Walker, C.H., 1988. Multiple forms of sheep serum Aesterase activity associated with the high-density lipoprotein. *Biochemical Journal*, 250 (2), 539–545.
54. Mackness, B. ve Durrington, P.N. ve Mackness, M.I., 1998. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*, 31, 329–336.
55. Khersonsky, O. ve Tawfik, D., 2005. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*, 44(16), 6371–6382.
56. Aviram, M. ve Rosenblat, M., 2004. Paraoxonases 1, 2, ve 3, oxidative stress, ve macrophage cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9), 1304–1316.
57. La Du, B.N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R.C. ve Standiford, T.J., 1999. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chemico-Biological Interactions*, 119–120, 379–388.

58. Mackness, M.I., 1989. Possible medical significance of human serum A-esterases. In, Reiner E, Aldridge WN, Hoskin FCG (eds) *Enzymes hydrolysing organophosphorus compounds*. Ellis Horwood, Chichester, 203–213.
59. Mackness, M.I., 1989. A-esterases: enzymes looking for a role. *Biochemical Pharmacology*, 38 (3), 385–390.
60. Mackness, M.I. ve Durrington, P.N., 1995. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 115 (2), 243–253
61. Stein, O. ve Stein, Y., 1999. Atheroprotective mechanisms of HDL. *atherosclerosis*, 144 (2), 285–301.
62. La Du, B.N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R.C. ve Standiford, T.J., 1999. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chemico-Biological Interactions*, 119–120, 379–388.
63. Humbert, R., Adler, D.A., Disteché, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J. ve Furlong, C.E., 1993. The molecular basis of the human paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genetics*, 3, 73–76.
64. Reddy, S.T., Wadleigh, D.J., Grijalva, V., Ng, C., Hama, S., Gangopadhyay, A., Shih, M.D., Lusic, J.A., Navab, M. ve Fogelman, M.A., 2001. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Atherosclerosis and Lipoproteins*, 21, 542–547.
65. Gan, K.N., Smolen A., Eckerson H.W. ve La Du B.N., 1991. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug metabolism disposition*, 19 (1), 100-106.
66. Lund-Katz, S., Liu, L.J., Thuahnai, S.T. ve Philips, M.C., 2003. High Density Lipoprotein Structure, *Frontiers in Bioscience*, 8, 1044-1054.
67. Borhani, D.W., Rogers, D.P. ve Engler, J.A., 1997. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid bound conformation. *proc. National Academy Sciences*, 94, 12291-12296.
68. Condit, C.M., Achter, P.J., Lauer, I. ve Sefcovic, E., 2002. The changing meanings of mutation a contextualized study of public discourse. *Human mutation*, 19, 69-75.
69. Brookes, A.J., 1999. The essence of SNPs. *Gene*, 234 (2), 177-186.
70. Leviev, I. ve James, R.W., 2000. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene ve serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20:516–521.

71. Deakin, S., Leviev, I., Brulhart-Meynet, M.C. ve James, R.W., 2003. Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position -107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochemical Journal*, 372 (2), 643–649.
72. Adkins, S., Gan, K.N., Mody, M. ve La Du, B.N., 1993. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet*, 52 (3), 598–608.
73. Leviev, I., Deakin, S. ve James, R.W., 2001. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum Paraoxonase concentrations. *Journal of lipid research*, 42, 528–535.
74. Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J. ve Furlong, C.E., 1996. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature Genetics* 14, 334 – 336
75. Mackness, M.I., Arrol, S., Mackness, B. ve Durrington, P.N., 1997. The alloenzymes of paraoxonase determine the effectiveness of high-density lipoprotein in protecting low density lipoprotein against lipid-peroxidation. *Lancet*, 349, 851–852.
76. Mackness, M., Mackness, B., Durrington, P.N., Fogelman, AM., Berliner, J., Lusis, A.J., Mohamad, N., Diana, S. ve Gregg, C., 1998. Paraoxonase and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology*, 9 (4), 319–324.
78. Abd El-Wahab, H., 2015. The synthesis and characterization of the hydrazone ligand and its metal complexes and their performance in epoxy formulation surface coatings. *Progress in Organic Coatings*, 89, 106-113.
79. Tunc, T., Tezcan, H., Ahin, E. ve Dilek, N., 2012. Synthesis, Crystal Structure, and Spectroscopic Studies of N-(4-Bromobenzylidene)-N'-(2-Pyridyl) Hydrazine Schiff Base Molecule. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 552(1), 194-208.
80. Sarigol, D., Yuksel, D., Okay, G. ve Uzgoren-Baran, A., 2015. Synthesis and structural studies of acyl hydrazone derivatives having tetrahydrocarbazole moiety. *Journal of Molecular Structure*, 1086, 146-152.
81. Sankar C., Umamatheswar S. ve Pandiarajan K., 2015. Conformational analysis of 2,6-diarylpiperidin-4-one hydrazones by X-ray diffraction and NMR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 1083, 27-38.
82. Anbazhagan R. ve Sankaran K.R., 2015. Design, synthesis, computational calculation and biological evaluation of some novel 2-thiazolyl hydrazones. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, 984-993.

83. Debnath D., Roy S., Li, B. H., Lin, C. H. ve Kumar M.T., 2015. Synthesis, structure and study of azo-hydrazone tautomeric equilibrium of 1,3-dimethyl-5-(arylo)-6-amino-uracil derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 140,185-197.
84. Velayutham P. M., Rajeswari K. ve Vidhyasagar T., 2014. Stereoselective synthesis, spectral and antimicrobial studies of some cyanoacetyl hydrazones of 3-alkyl-2,6-diarylpiperidin-4-ones. *Journal of Molecular Structure*, 1076, 174-182.
85. Meenatchi V., Muthu K., Rajasekar M. ve Meenakshisundaram SP., 2014. Synthesis, structure, spectral, thermal ve first-order molecular hyperpolarizability of 4-benzoylpyridine isonicotinyl hydrazone monohydrate single crystals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 124, 423-428.
86. Davidovich P., Novikova D., Tribulovich V., Smirnov S., Gurzhiy V., Melino G. ve Garabadzhiu A., 2014. First X-ray structural characterization of isatin Schiff base derivative. NMR and theoretical conformational studies. *Journal of Molecular Structure*, 1075, 450-455.
87. Fekri A. ve Zaky R., 2014. Facile solid state ball milling as a green strategy to prepare 2-(2,4-dichlorophenoxy)-N'-(2-hydroxybenzylidene) acetohydrazone complexes. *spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 132, 846-853.
88. Guntepe F., Saracoglu H., Caliskan N., Yuksektepe C. ve Cukurovali A., 2012. Synthesis, molecular and crystal structure analysis of 2-bromo-4-chloro-6-[[4-(3-methyl-3-phenyl-cyclobutyl)-thiazol-2-yl]hydrazonomethyl]-phenol by experimental methods and theoretical calculations. *Journal of Molecular Structure*, 1022, 204-210.
89. Ivanov P. I., Dimitrova B. M., Tasheva N. D., Cheshmedzhieva V. D., Lozanov S. V. ve Ilieva V. S., 2013. Synthesis, structural analysis and application of a series of solid-state fluorochromes diaryl hydrazones of 4-hydrazino-N-hexyl-1,8-Naphthalimide. *Tetrahedron*, 69 (2), 712-721.
90. Ummathur B. M., Sayudevi P. ve Krishnankutty K., 2009. Schiff bases of 3-[2-(1,3-benzothiazol-2-yl)hydrazinylidene] pentane-2,4-dione with aliphatic diamines and their metal complexes. *The Journal of the Argentine Chemical Society*, 97 N° 2, 31-39.
91. Tunc T., Sarı M., Sadıkoğlu M. ve Buyukgungor O., 2009. Synthesis, Crystal Structure and Spectroscopic Studies of 2-((E)-[2-Hydroxyphenyl]imino)methyl} Phenol Schiff Base Molecule. *Journal of Chemical Crystallography*, 39, 672-676.
92. Ashraf A. M., Mahmood K. ve Wajid A., 2011. Synthesis, Characterization and Biological Activity of Schiff Bases. *International Conference on Chemistry ve Chemical Process IPCBEE*, 10, IACSIT Press, Singapore.

93. Khanmohammadia H., Abnosib H. M., Hosseinzadeha A. ve Erfantalaba M., 2008. Synthesis, biological and computational study of new Schiff base hydrazones bearing 3-(4-pyridine)-5-mercapto-1,2,4-triazole moiety. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(4), 1474-1480.
94. Kaymakcioğlu K. B. ve Rollas S., 2002. Synthesis, characterization and evaluation of antituberculosis activity of some hydrazones. *Il Farmaco* 57 (7), 595-599.
96. Bacqué V. C., Carayon C., Bernis C., Camare C., Salvayre N. A., Belval B. F. ve Baltas M., 2014. Synthesis, antioxidant and cytoprotective evaluation of potential antiatherogenic phenolic hydrazones, A structure–activity relationship insight. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22, 4269-4276.
96. El-Gammal A.O., Bekheit M.M. ve Tahoon M., 2015. Synthesis, characterization and biological activity of 2-acetylpyridine- $\alpha$ -naphthoxyacetyl hydrazone its metal complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 135, 597–607.
97. Giziroglu E., Aygün M., Sarikurkcu C., Kazar D., Orhan N., Firinci E., Soyleyici C. H. ve Gokcen C., 2013. Synthesis, characterization and antioxidant activity of new dibasic Tridentate ligands: X-ray crystal structures of DMSO adducts of 1,3-dimethyl-5-acetyl-barbituric acid o-hydroxybenzoyl hydrazone Copper(II) complex. *Inorganic Chemistry Communications* 36, 199-205.
98. Belkheiri N., Bouguerne B., Belval B. F., Duran H., Bernis C., Salvayre R., Salvayre N. A. ve Baltas M., 2010. Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45, 3019-3026.
99. Kuo, C.L. ve La Du, B.N. 1998. Calcium Binding by Human and Rabbit Serum Paraoxonases Structural Stability and Enzymatic Activity. *Drug Metabolism and Disposition*, 26, 653-660.
100. Gil, F., Pla, A., Gonzalvo, M.C., Hernández, A.F. ve Villanueva, E., 1993. Partial purification of paraoxonase from rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 87 (1-3), 69-75.
101. Erzençin, M., Başaran, I., Çakir, U., Aybey, A. ve Sinan, S. 2012. In Vitro Inhibition Effect of Some Dihydroxy Coumarin Compounds on Purified Human Serum Paraoxonase-1 (PON1). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168 (6), 1540-1548.
102. Aldridge W.N., 1953. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochemical Journal*, 53 (1):117–124.



103. Brealey, C.J., Walker, C.H. ve Baldwin, B.C., 1980. A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals. *Pesticide Science*, 11 (5), 546-554.
104. Furlong, C.E., Li, W.F., Shih, D.M., Lusisc, A. J., Richtera, R. J. ve Costab, L. G., 2002. Genetic Factors in Susceptibility: Serum PON1 Variation Between Individuals and Species. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8(1), 31-43.
105. Turk, R., Juretic, D., Geres, D., Turk, N., Rekić, B., Simeon-Rudolf, V. ve Svetina, A., 2004. Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 76, 57-61.
106. Turk, R., Juretic, D., Geres, D., Turk, N., Rekić, B., Simeon-Rudolf, V., Robić, M. ve Svetina, A., 2005. Serum paraoxonase activity in dairy cows during pregnancy. *Research in Veterinary Science*, 79 (1), 15-18.
107. Miyamoto, T., Takahashi, Y., Oohashi, T., Sato, K. ve Oikawa, S., 2005. Bovine Paraoxonase 1 Activities in Serum and Distribution in Lipoproteins. *Journal of Veterinary Medicine*, 67(3), 243-248.
108. Miyamoto, T., Takahashi, Y., Oohashi, T., Sato, K. ve Oikawa, S., 2005. Bovine Paraoxonase 1 Activities in Serum and Distribution in Lipoproteins. *Journal of Veterinary Medicine*, 67(3), 243-248.
109. Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. ve Crabb, J.W., 1991. Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochemistry*, 30 (42), 10133-10140.
110. Mackness, M.I., Halam, S.D., Peard, T., Warner, S. ve Walker, C.H., 1985. The separation of sheep and human serum a-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 82 (4), 675-677.
111. Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, Antonio, F., LOPEZ, O. ve Pla, A., 2003. Identification of paraoxonase 3 in rat liver microsomes: purification and biochemical properties. *Biochemical Journal*, 15, 261-268.
112. Laemmli, D. K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259),680–683.
113. Erzenin M., Basaran I., Cakir U., Aybey A. ve Sinan S., 2012. In vitro inhibition effect of some dihydroxy coumarin compounds on purified human serum paraoxonase 1 (PON1). *Appl Biochem Biotechnol* 168:1540–1548.
114. Stocker. R., 1999. Dietary and pharmacological antioxidants in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*. 10(6), 589-597.

115. Brigelius-Flohe, R., Kluth, D. ve Banning, A., 2005. Future for antioxidant in atherogenesis. *Molecular Nutrition & Food Research*,49,1083-1089.
116. Molyneux, P. ve Songklanakarin, J., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Science technology*, 26, 211-219.
117. Sinan, S., Kockar, F. ve Arslan, O., 2006. Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie*, 88, 565–574.
118. Bio-Rad Hydrophobic Interaction & Products.
119. GE Healthcare Hydrophobic Interaction Chromatography Animation, Introduction to Hydrophobic Interaction & Products.
120. [https://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein\\_Separations\\_-\\_Chromatography/Hydrophobic\\_Interaction\\_Chromatography\\_\(HIC\)](https://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein_Separations_-_Chromatography/Hydrophobic_Interaction_Chromatography_(HIC)).
121. Gan, K. N., Smolen, A., Eckerson, H. W. ve La Du, B. N., 1991. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metabolism ve Disposition*, 19, 100–106.
122. [ww2.chemistry.gatech.edu/lw26/bCourse\\_Information/4581/technique/gel\\_elect/page-protein.html](http://ww2.chemistry.gatech.edu/lw26/bCourse_Information/4581/technique/gel_elect/page-protein.html).
123. Sinan S., Kockar F. ve Arslan O., 2006. Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie* 88, 565-574.
124. Alici A. H., Ekinci D. ve Beydemir Ş., 2008. Intravenous anesthetics inhibit human paraoxonase-1 (PON1) activity in vitro and in vivo. *Clinical Biochemistry* 41, 1384-1390.
125. Ekinci D. ve Beydemir Ş., 2009. Evaluation of the impacts of antibiotic drugs on PON 1; a major bioscavenger against cardiovascular diseases. *European Journal of Pharmacology* 617; 84-89.
126. Samra Q. Z., Shabir S., Rehmat Z., Zaman M., Nazir A., Dar N. ve Athar A., M., 2010. Synthesis of Cholesterol-Conjugated Magnetic Nanoparticles for Purification of Human Paraoxonase 1. *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 671-686.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Samir abbas ali NOMA

**Doğum Tarihi ve Yeri** : 09.05.1990 - Bağdat, Irak

**E-posta adresi** : samir.abaas@yahoo.com

### EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

**Lisans** : Duhok Üniversitesi, 2009-2013

**Yüksek Lisans** : Aksaray Üniversitesi, 2014-

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Azadi Hastanesi Merkezi Laboratuvarı, Duhok, Irak / Yaz Stajı.

### TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

1. 2015 Biyokimya Yaz Okulu (20-23 Ağustos 2015, Aksaray).