

Yeni *N*-benzilbenzimidazol-gümüş(I) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu, karbonik anhidraz ve polifenol oksidaz enzimleri üzerindeki inhibitör özellikleri

Adem ERGÜN¹, Mert Olgun KARATAŞ²

ÖZET: Gümüş komplekslerinin biyolojik özellikleri çok iyi bilinmesine rağmen enzim inhibisyonu özelliklerine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Diğer taraftan benzimidazol türevlerinin anti-kanser etki mekanizmalarından birinin enzim inhibisyonu olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, beş yeni *N*-benzilbenzimidazol-gümüş(I) kompleksi sentezlendi, ¹H NMR, ¹³C NMR, IR ve kütle spektroskopik yöntemleri ve elementel analiz sonuçları ile tamamen karakterize edildi. Elde edilen komplekslerin insan karbonik anhidraz I - II ve polifenol oksidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi ve komplekslerin bu enzimlerin aktivitelerini sırasıyla 29.58-32.65 µM, 21.05-23.65 µM ve 30.38-44.45 µM'lık IC₅₀ değerleri ile inhibe ettiği gözlemlendi. Gümüş bileşiklerinin insan vücudunda düşük konsantrasyonlarda toksik etki göstermediği de göz önüne alınırsa, bu çalışmada test edilen kompleksler karbonik anhidraz inhibitörü olarak glokom tedavisinde ve polifenol oksidaz inhibitörü olarak ise hiper-pigmentasyon hastalığı tedavisinde kullanılmak için umut verici adaylardır.

Anahtar Kelimeler: Benzimidazol, gümüş, karbonik anhidraz, polifenol oksidaz.

Synthesis, characterization, and inhibitory properties of novel *N*-benzylbenzimidazole-silver(I) complexes on carbonic anhydrase and polyphenol oxidase enzymes

ABSTRACT: The biological properties of silver complexes are well known but the studies about the enzyme inhibitory properties of them are very rare. On the other hand, it is known that one of the anticancer mechanisms of action of benzimidazole derivatives is enzyme inhibition. Therefore, in this study, five novel *N*-benzylbenzimidazole-silver(I) complexes were synthesized and fully characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, mass spectroscopic methods and elemental analyses. The inhibitory properties of the synthesized complexes were tested on the activity of human carbonic anhydrase I - II and polyphenol oxidase, and it was observed that the complexes inhibited the activity of these enzymes with the IC₅₀ values of 29.58-32.65 µM, 21.05-23.65 µM and 30.38-44.45 µM, respectively. We suggest that by also considering the low toxicity of silver compounds to human body at low concentrations, the evaluated complexes in this study are promising agents in the treatment of glaucoma and hyperpigmentation as carbonic anhydrase and polyphenol oxidase inhibitors.

Keywords: Benzimidazole, silver, carbonic anhydrase, polyphenol oxidase.

¹ Adem ERGÜN (Orcid ID: 0000-0003-4647-6058), Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Balıkesir, Türkiye

² Mert Olgun KARATAŞ (Orcid ID: 0000-0001-8500-2088), İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Malatya, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mert Olgun KARATAŞ, e-mail: mert.karatas@inonu.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 09-04-2019

Kabul tarihi / Accepted: 03-09-2019

GİRİŞ

Benzimidazol, imidazol halkasının 4 ve 5 numaralı karbon atomlarının benzen halkasıyla kaynaşması sonucu meydana gelen oldukça önemli bir *N*-heterosiklik bileşiktir. En çok bilinen benzimidazol türevi, B12 vitamininin yapısında ligand olarak görev yapan *N*-ribosil-5,6-dimetilbenzimidazol bileşiğidir ve benzimidazol türevlerinin biyolojik etkilerinin incelenmesi bu bileşiğinin keşfinden sonra önem kazanmıştır (Barker ve ark., 1960). Benzimidazol türevlerinin en çok bilinen biyolojik özelliği tarımda anti-helmantik (parazit öldürücü) olarak kullanılmalarıdır (Yadav ve Ganguly, 2015). Buna ek olarak birçok benzimidazol türevi ticari olarak anti-kanser ve anti-ülser ilaç olarak kullanılmaktadır (Gaba ve Mohan, 2016). Son yıllarda gerçekleştirilen bazı çalışmalar, benzimidazol türevlerinin anti-kanser etki mekanizmalarından bazılarının topoizomera I, topoizomera II ve protein kinaz gibi enzimlerin inhibisyonu olduğunu göstermiştir (Singla ve ark., 2014).

Benzimidazol bileşiklerinin biyolojik özelliklerinin yanında en önemli kullanım alanlarından biri de *N*-heterosiklik karben komplekslerinin sentezinde karben öncülü olarak kullanılmalarıdır. Bu amaçla birçok 1,3-disübstitüe benzimidazolyum tuzu sentezlenmiş, bu ligand öncüllerinin farklı metaller ile kompleksleri sentezlenmiştir (Herrmann, 2002). Elde edilen komplekslerin katalitik etkilerinin yanı sıra biyolojik özellikleri de incelenmiştir (Oehninger ve ark., 2013). Buna ek olarak son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda benzimidazolyum tuzlarının anti-kanser (Liu ve ark., 2015), anti-bakteriyel (Elie ve ark., 2015), enzim inhibisyonu (Karataş ve ark., 2013) özellikleri olduğu gösterilmiştir.

Gümüş metalinin anti-mikrobiyal özellikleri binlerce yıldır bilinmektedir. Gümüş nitrat bileşiği uzun yıllar boyunca yara ve ülser tedavisinde kullanılmıştır (Klasen, 2000). II. Dünya Savaşı esnasında keşfedilen penisilin türevi anti-mikrobiyal ilaçlar gümüş bileşiklerinin kullanımını sınırlandırmış olsa da 1965 yılında %0.5'lik gümüş nitrat çözeltisinin geniş insan yaralarının tedavisinde kullanılabileceğinin Moyer ve ark. tarafından gösterilmesi gümüş bileşiklerinin yeniden tıp alanında araştırılmasına neden olmuştur. Bu gelişmeden üç yıl sonra Fox gümüş sülfadiazin bileşiğinin yanıkların tedavisinde kullanılabileceği göstermiştir (Hindi ve ark., 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalar farklı gümüş komplekslerinin anti-mikrobiyal ve anti-kanser özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Gümüş bileşiklerinin anti-kanser etki mekanizması henüz net olarak bilinmemektedir ancak anti-mikrobiyal etki mekanizmaları için bazı çalışmalar yapılmıştır. Gümüş bileşiklerinin bakteri hücre duvarında veya zarında bulunan bazı proteinler ile etkileşerek hücre duvarının veya zarının yapısını ve geçirgenliğini bozduğu tespit edilmiştir. Bunun dışında bazı çalışmalar, gümüş metalinin hücre zarından geçiş yaparak bazı hayati enzimlerin yapısını bozarak veya aktivitelerini engelleyerek bakterilerin ölümüne neden olduğunu ortaya koymuştur (Medici ve ark., 2016). Gümüş metalinin etki mekanizmalarından birisinin de enzim inhibisyonu olmasına rağmen literatürde gümüş bileşiklerinin enzim inhibisyonu özelliklerine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır (Özdemir ve ark., 2017).

Yukarıda belirtildiği gibi, enzim inhibisyonu anti-kanser ve anti-mikrobiyal etki mekanizmalarında önemli roller oynamaktadır. Bazı enzimlerin inhibitörleri ise bazı hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Örneğin; sülfonamid türevleri en iyi bilinen karbonik anhidraz inhibitörleridir ve glokom tedavisinde uzun yıllardır ticari ilaç olarak kullanılmaktadır. Karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) aktif bölgesinde çinko içeren, vücutta karbonik asit-bikarbonat denge tepkimesini katalizleyerek fizyolojik pH değerinin kontrol edilmesini sağlayan oldukça önemli bir enzimdir (Supuran, 2010). CA enziminin aktivitesinin anormal seviyelerde olması glokom hastalığına ek olarak epilepsi (Aggarwal ve ark., 2013), obezite (Scozzafava ve ark., 2013) ve kanser (Monti ve ark., 2013) hastalıkları ile de ilişkilidir ve bu nedenle CA enzimi için düşük toksisiteye sahip seçici

inhibitörlerin geliştirilmesi hala oldukça önemli bir hedeftir. Diğer taraftan, polifenol oksidaz enzimi (PPO, EC 1.14.18.1) aktif bölgesinde bakır içeren, melanin oluşumunun ilk iki basamağını katalizleyen enzimatik kararmadan sorumlu bir enzimdir. Gerek insan derisinde gerekse de gıda endüstrisinde enzimatik kararma istenen bir durum değildir ve bu nedenle PPO inhibitörleri tıp ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Chang, 2009). İnsan vücuduna karşı toksik özellik göstermeyen PPO inhibitörlerinin geliştirilmesi de bilim insanları için önemli bir çalışma alanıdır.

Yukarıda verilen bilgiler ışığında, bu çalışmada, CA ve PPO enzimleri üzerinde inhibisyon özelliklerinin incelenmesi amacıyla beş yeni *N*-benzilbenzimidazol-gümüş(I) kompleksi sentezlendi, karakterize edildi ve inhibisyon özellikleri incelendi.

MATERYAL VE YÖNTEM

Benzil klorür, 2-metilbenzil klorür, 2,4,6-trimetilbenzil klorür, 2-klorbenzil klorür, 2,6-diklorbenzil klorür ve gümüş nitrat bileşikleri ticari olarak temin edildi ve ileri bir saflaştırma yapılmadan kullanıldı. Kullanılan tüm çözücüler ticari olarak temin edildi ve kurutma işlemi yapılmadan kullanıldı. Gümüş komplekslerinin sentezi için gerçekleştirilen tüm tepkimeler oksijene açık ortamda ancak alüminyum folyo kullanılarak ışıksız ortamda gerçekleştirildi. Sentezlenen komplekslerin erime noktaları Barnstead marka Electrothermal 9200 model erime noktası tayin cihazı ile tayin edildi. Elementel analiz ölçümleri LECO marka CHNS-932 model elementel analiz cihazında gerçekleştirildi. Kırmızı ötesi (IR) spektrumları Perkin Elmer marka Spectrum 100 model FT-IR cihazında ATR ünitesi kullanılarak ölçüldü. LC-MS spektrumları Agilent marka 1100 LC/MSD SL kütle spektrometresinde ölçüldü. NMR ölçümleri Bruker Ascend™ 400 Avance III HD cihazında gerçekleştirildi. Çözücü olarak DMSO-d₆ kullanıldı. Kimyasal kayma değerleri ppm olarak ve TMS (tetrametilsilan) referans alınarak verildi. NMR sinyalleri; singlet = s, multiplet = m olarak kısaltıldı.

Komplekslerin (2a-e) Sentezi ve Karakterizasyon Verileri

Hedeflenen gümüş komplekslerinin sentezi için ilk olarak *N*-benzilbenzimidazol türevleri (**1a-e**) literatüre uygun bir şekilde sentezlendi (Özdemir ve ark., 2005). Gümüş kompleksleri, 170 mg (1 mmol) AgNO₃ ve karşılık gelen *N*-benzilbenzimidazol bileşiğinin (2 mmol) etanol içerisinde 50 °C'de 6 saat tepkimeye sokulması ile elde edildi. Reaksiyon süresinin sonunda karışım oda sıcaklığına soğutuldu ve çöken ham ürün süzülerek ayrıldı, dietil eter ile üç kere (3x10 mL) yıkandı ve vakum altında kurutuldu. Gümüş komplekslerinin elde edilmesi ve saklanması sürecinde yapılan tüm işlemler alüminyum folyo yardımı ile ışıksız ortamda gerçekleştirildi.

Bis(*N*-benzilbenzimidazol)gümüş(I) nitrat, 2a. Beyaz katı, verim: 490 mg (%84), erime noktası: 165-166 °C. IR (cm⁻¹): 3099, 1613, 1483, 1466, 1454, 1437. C₂₈H₂₄AgN₅O₃ için elementel analiz: Hesaplanan: C, 57.35; H, 4.13; N, 11.94; Bulunan: C, 57.27; H, 4.09; N, 11.81. LC-MS; [Ag(C₁₄H₁₂N₂)₂]⁺ için *m/z*; hesaplanan, 523.1; bulunan, 523.2. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.85 (s, 1H, NCHN), 7.91-7.86 (m, 1H, ArH), 7.74-7.69 (m, 1H, ArH), 7.42-7.30 (m, 7H, ArH), 5.67 (s, 2H, NCH₂Ph). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 146.2 (NCHN), 142.1, 136.7, 133.1, 129.3, 128.5, 128.1, 124.3, 123.6, 119.8, 112.1, 48.7 (NCH₂Ph).

Bis(*N*-(2-metilbenzil)benzimidazol)gümüş(I) nitrat, 2b. Beyaz katı, verim: 440 mg (%72), erime noktası: 226-227 °C. IR (cm⁻¹): 3102, 1511, 1484, 1467, 1440. C₃₀H₂₈AgN₅O₃ için elementel analiz: Hesaplanan: C, 58.64; H, 4.59; N, 11.40; Bulunan: C, 58.54; H, 4.51; N, 11.31. LC-MS; [Ag(C₁₅H₁₄N₂)₂]⁺ için *m/z*; hesaplanan, 551.3; bulunan, 551.2. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.61 (s, 1H, NCHN), 7.92-7.85 (m, 1H, ArH), 7.63-7.56 (m, 1H, ArH), 7.42-7.12 (m, 5H, ArH), 6.95-6.87

(m, 1H, ArH), 5.64 (s, 2H, NCH₂Ph), 2.32 (s, 3H, ArCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 146.1 (NCHN), 142.1, 136.5, 134.4, 133.5, 131.1, 128.6, 127.8, 126.7, 124.3, 123.6, 119.8, 111.9, 47.0 (NCH₂Ph), 19.2 (ArCH₃).

Bis(*N*-(2,4,6-trimetilbenzil)benzimidazol)gümüş(I) nitrat, 2c. Beyaz katı, verim: 540 mg (%81), erime noktası: 248-249 °C. IR (cm⁻¹): 3095, 1613, 1509, 1464. C₃₄H₃₆AgN₅O₃ için elementel analiz: Hesaplanan: C, 60.90; H, 5.41; N, 10.44; Bulunan: C, 60.82; H, 5.34; N, 10.40. LC-MS; [Ag(C₁₇H₁₈N₂)₂]⁺ için *m/z*; hesaplanan, 607.2; bulunan, 607.3. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.07 (s, 1H, NCHN), 7.87-7.85 (m, 1H, ArH), 7.74 (m, 1H, ArH), 7.44-7.36 (m, 2H, ArH), 6.99 (s, 2H, ArH), 5.51 (s, 2H, NCH₂Ph), 2.27 (s, 3H, ArCH₃-*p*), 2.23 (s, 6H, ArCH₃-*o*). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 144.8 (NCHN), 141.8, 138.5, 138.2, 133.6, 129.9, 128.2, 124.3, 123.6, 119.7, 111.8, 43.8 (NCH₂Ph), 21.1 (ArCH₃-*p*), 19.8 (ArCH₃-*o*).

Bis(*N*-(2-klorbenzil)benzimidazol)gümüş(I) nitrat, 2d. Beyaz katı, verim: 450 mg (%69), erime noktası: 195-196 °C. IR (cm⁻¹): 3098, 1596, 1512, 1471, 1436. C₂₈H₂₂AgCl₂N₅O₃ için elementel analiz: Hesaplanan: C, 51.32; H, 3.38; N, 10.69; Bulunan: C, 51.20; H, 3.31; N, 10.56. LC-MS; [Ag(C₁₄H₁₁ClN₂)₂]⁺ için *m/z*; hesaplanan, 593.0; bulunan, 593.1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.70 (s, 1H, NCHN), 7.90-7.86 (m, 1H, ArH), 7.66-7.62 (m, 1H, ArH), 7.58-7.54 (m, 1H, ArH), 7.43-7.33 (m, 4H, ArH), 7.23-7.19 (m, 1H, ArH), 5.75 (s, 2H, NCH₂Ph). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 146.4 (NCHN), 142.1, 133.8, 133.3, 133.0, 130.6, 130.4, 130.2, 128.2, 124.3, 123.6, 119.9, 111.9, 46.8 (NCH₂Ph).

Bis(*N*-(2,6-diklorbenzil)benzimidazol)gümüş(I) nitrat, 2e. Beyaz katı, verim: 470 mg (%65), erime noktası: 264-265 °C. IR (cm⁻¹): 3104, 1563, 1510, 1485, 1467, 1438. C₂₈H₂₀AgCl₄N₅O₃ için elementel analiz: Hesaplanan: C, 46.44; H, 2.78; N, 9.67; Bulunan: C, 46.33; H, 2.72; N, 9.53. LC-MS; [Ag(C₁₄H₁₀Cl₂N₂)₂]⁺ için *m/z*; hesaplanan, 660.9; bulunan, 661.0. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.47 (s, 1H, NCHN), 7.87-7.85 (m, 1H, ArH), 7.68-7.63 (m, 3H, ArH), 7.55-7.51 (m, 1H, ArH), 7.42-7.34 (m, 2H, ArH), 5.81 (s, 2H, NCH₂Ph). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 145.9 (NCHN), 141.9, 136.3, 133.3, 132.4, 130.4, 129.9, 124.4, 123.5, 120.0, 111.5, 45.1 (NCH₂Ph).

Karbonik Anhidraz (CA) İnhibisyon Çalışmaları

Enzimlerin saflaştırılması. İnsan kanından elde edilen kan örneği, 1500 rpm de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen kırmızı kısım %0.9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra soğuk su ile eritrositler hemolize edildi. Hücre zarları +4°C de 15000 rpm de santrifüj edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hemolizat katı tris base kullanılarak pH'ı 8.5'a getirildi. pH'ı ayarlanmış hemolizat, dengeleme tamponu (25 mM Tris-HCl/0.1 M Na₂SO₄, pH 8.5) ile dengelenmiş Sepharose 4B-L-tyrosine-sülfanilamid afinite kolonuna yüklendi. CA-I (1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄, pH 6.3) ve CA-II de (0.1 M CH₃COONa/0.5 M NaClO₄) elüsyon tamponlarıyla elüe edildi (Arslan, 1994). Söz konusu enzimlerin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi.

CA esterez aktivitesi. Enzimlerin aktivite tayininde substrat olarak *p*-nitrofenil asetat kullanılmış olup 348 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Aktivite ölçümü için 1 mL substrat, 1.3 mL aktivite tamponu (0.05 M Tris-SO₄, pH=7.4), 0.6 mL su ve 0.1 mL enzim konulmasından 3 dakika sonra 25°C'de 348 nm'de absorbans okunarak aktivite hesaplandı (Armstrong ve ark., 1966; Kandel ve ark. 1970).

IC₅₀ değerlerinin hesaplanması. IC₅₀ değerlerini hesaplamak için komplekslerin eklenmediği ortamda bulunan enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve ardından 5 farklı kompleks konsantrasyonuna karşılık gelen absorbanslar 348 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen aktivite

değerleri ile % aktiviteler hesaplandı ve % aktivite-[kompleks] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden faydalanılarak her bir inhibitör için IC₅₀ değerleri bulundu (Çizelge 1).

Polifenol Oksidaz (PPO) İnhibisyon Çalışmaları

PPO enziminin saflaştırılması. Enzim kaynağı olarak kullandığımız muzdan ekstrakt hazırlamak için 50 g alıp 100 mL ekstraksiyon tamponu (%0.5 PEG, 10 mM askorbik asit, 0.5 M fosfat tamponu, pH 7.30) ile karıştırıp, 2 dakika boyunca ev tipi blender ile homojenize edildi. Oluşan karışım süzildikten sonra süzüntü soğutmalı santrifüjde +4°C'de 15000 rpm'de 45 dakika boyunca santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı. %80 doygunlukta amonyum sülfat ile çöktürme işlemi yapılarak kısmi olarak saflaştırıldı. Oluşan çökelek 5 mM fosfat tamponunun (pH 6.3) çözünmediği en az miktarında çözülüp aynı tampon kullanılarak diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Diyaliz işleminden sonra Arslan ve grubu tarafından sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak PPO enzimi saf olarak elde edildi (Arslan ve ark., 2004).

PPO enziminin aktivite tayini. Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi substrat olarak katekol kullanılıp 420 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Aktivite ölçümü için 40 µL enzim çözeltisi, 880 µL aktivite tamponu (0.1 M Na₂HPO₄ tamponu, pH 6.80) ve 80 µL substrat (0.1 M katekol) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de köre karşı bir dakikada absorbansda meydana gelen değişim okunarak aktivite hesaplandı.

IC₅₀ değerlerinin hesaplanması. Sentezlenen komplekslerin IC₅₀ değerlerini bulmak için önce komplekslerin eklenmediği ortamda enzim aktivitesi bulundu ve bu değer %100 aktivite değeri olarak kullanıldı. Daha sonra farklı inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 420 nm'de köre karşı okunarak elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı ve % Aktivite-[kompleks] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için IC₅₀ değerleri hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 1'de verildi.

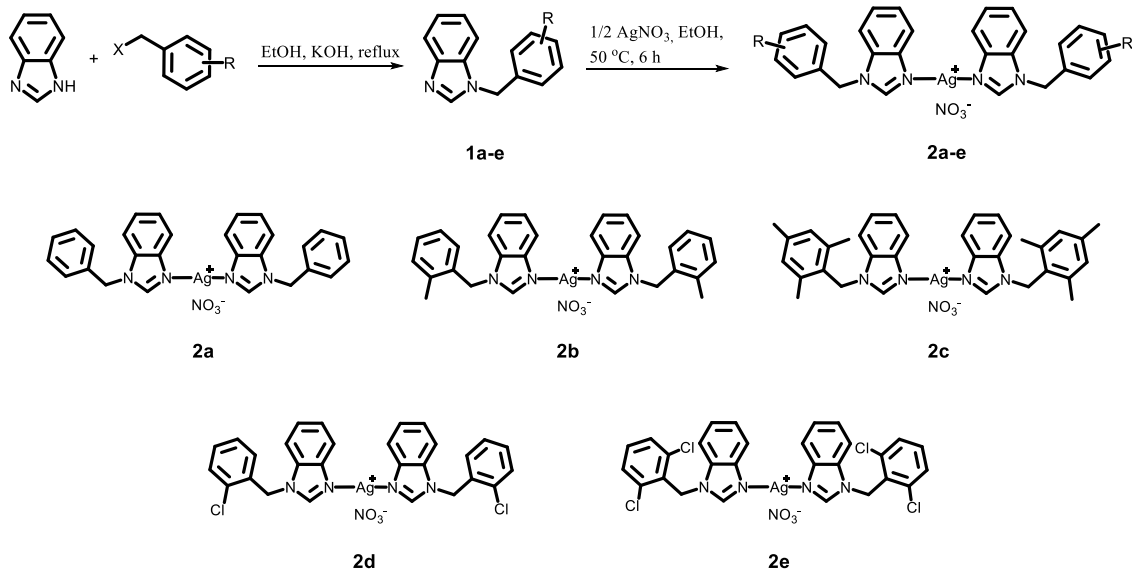
BULGULAR VE TARTIŞMA

Sentez ve Karakterizasyon

Hedeflenen komplekslerin sentezi için ilk olarak *N*-benzilbenzimidazol türevleri literatüre göre sentezlendi (Özdemir ve ark., 2005). Gümüş kompleksleri, bu ligandların gümüş nitrat ile etanol içerisinde reaksiyonu sonucu %65-84 verim aralığında sentezlendi. Komplekslerin sentez şartları ve yapıları Şekil 1'de verilmiştir. Elde edilen tüm kompleksler havanın nemine ve oksijenine karşı kararlı iken, gün ışığı ile gümüş metalinin indirgeniyor olmasından dolayı tüm kompleksler karanlıkta saklandı.

Sentezlenen komplekslerin karakterizasyonu ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, kütle spektroskopik yöntemlerinin ve elementel analiz sonuçlarının birlikte yorumlanması ile gerçekleştirilmiştir. Komplekslere ait bazı fiziksel ve spektroskopik veriler Çizelge 1'de verilmiştir. Komplekslerin ¹H NMR spektrumları incelendiğinde, benzimidazolün 2-konumunda bulunan imin karbonlarına bağlı hidrojenlerin 8.07-8.85 ppm aralığında rezonans oldukları görülmektedir ve bu değerler literatür ile uyum içindedir (Karlık ve ark., 2018). Bu sinyal süstitüent bulundurmeyen **2a** kompleksinde 8.85 ppm'de gözlenirken, benzil grubunun 2-,4- ve 6- konumlarında üç metil içeren **2c** kompleksinde 8.07 ppm'de gözlenmiştir. Burada metil gruplarının elektron verici özelliği imin hidrojenin asidik karakterinde ciddi bir değişikliğe neden olmuş ve sinyali yaklaşık 0,8 ppm yüksek alana kaydırmıştır. Benzilik metilen hidrojenlerine ait sinyaller 5.51-5.81 ppm aralığında gözlenirken, aromatik hidrojenler beklenen integral değerlerinde aromatik bölgede rezonans olmuştur. Komplekslerin ¹³C NMR spektrumları incelendiğinde, benzimidazolün 2-konumunda bulunan imino karbonlarının 144.8-146.4

ppm aralığında, benzilic metilen karbonlarının ise 43.8-48.7 ppm aralığında rezonans oldukları gözlenmektedir. Bu değerler literatürde sentezlenen benzer komplekslerin spektrumlarında gözlenen değerler ile uyum içindedir (Karlık ve ark., 2018). Daha ileri karakterizasyon için tüm komplekslerin LC-MS spektrumları ölçüldü. **2a-e** Kompleksleri için elde edilen sırasıyla 523.2, 551.2, 607.3, 593.1 ve 661.0 *m/z* değerleri komplekslerin katyonik $[Ag(\text{benzimidazol})_2]^+$ kısımlarının kütlesi ile uyum sağlamaktadır. Komplekslerin IR spektrumlarında 1464-1471 cm^{-1} aralığında gözlenen keskin pikler gümüş metale azot üzerinden koordine olmuş imin grubuna ait piklerdir ve bu değerler de literatür ile uyum içindedir (Wu ve ark., 2014). ^1H NMR, ^{13}C NMR, LC-MS ve IR spektroskopik analizlerinin sonucunda bileşiklerin yapılarının Şekil 1'de gösterildiği gibi olduğunu önermekteyiz. Elementel analiz sonuçları da önerilen yapılar ile uyum içindedir.



Şekil 1. *N*-Benzilbenzimidazol-gümüş(I) komplekslerinin sentezi ve yapıları.

Çizelge 1. Sentezlenen komplekslerin fiziksel, spektroskopik özellikleri ve IC_{50} değerleri.

Bileşik No	R	Bazı fiziksel ve spektroskopik değerler				IC_{50} değerleri (μM)		
		Verim (%)	E.N. ($^{\circ}\text{C}$)	<i>NCHN</i> (ppm)	<i>NCHN</i> (ppm)	<i>hCA I</i>	<i>hCA II</i>	<i>PPO</i>
2a	-H	84	165-166	8.85	146.2	32.46	24.23	30.37
2b	2- CH_3	72	226-227	8.61	146.1	32.50	22.80	44.45
2c	2,4,6- $(\text{CH}_3)_3$	81	248-249	8.07	144.8	31.97	23.46	42.46
2d	2-Cl	69	195-196	8.70	146.4	32.65	23.65	34.82
2e	2,6- $(\text{Cl})_2$	65	264-265	8.47	145.9	29.58	21.05	37.24
Asetazolamid*						4.6	3.9	-
Gallik asit**						-	-	30.0

*(Büyükkıdan ve ark., 2013), ** (Karataş ve ark., 2014)

Enzim İnhibisyonu Çalışmaları

Literatürde birçok gümüş kompleksi sentezlenmiş ve anti-mikrobiyal ve anti-kanser etkileri incelenmiştir. Benzimidazol temelli *N*-heterosiklik karben ve *N*-heterosiklik ligandlar kullanılarak sentezlenen gümüş komplekslerinin de genellikle anti-mikrobiyal, anti-kanser ve DNA etkileşim özellikleri incelenmiş (Wu ve ark., 2012; Wu ve ark., 2014), enzim inhibisyonu özelliklerine yönelik çalışmalar çok sınırlı kalmıştır. Bu nedenle, sentezlenen tüm komplekslerin insan CA I ve II (*hCA I* ve *hCA II*) enzimlerinin esteraz aktivitesi ve *PPO* enzimi aktivitesi üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiş ve IC_{50} değerleri Çizelge 1'de listelenmiştir. Görüldüğü gibi tüm kompleksler enzimlerin aktivitesini

önemli ölçüde inhibe etmiştir. Asetazolamid hCA I ve II için (Büyükkıdan ve ark., 2013), Gallik asit ise PPO için (Karataş ve ark., 2014) karşılaştırma amaçlı Çizelge 1’de verilmiştir. hCA I ve II için IC₅₀ değerleri incelendiğinde, tüm komplekslerin birbirlerine oldukça yakın değerlerde inhibisyon gerçekleştirdiği görülmekteyken, tüm kompleksler bilinen en iyi CA inhibitörlerinden biri olan Asetazolamid’e göre daha düşük etki göstermiştir. Komplekslerin PPO aktivitesi üzerinde IC₅₀ değerleri incelendiğinde, yine oldukça güçlü inhibisyon etki gösterdikleri görülmektedir. Tüm kompleksler PPO inhibitörü olan Gallik asite yakın etki gösterirken, benzil grubu üzerinde süstitüent bulundurmayan **2a** kompleksi Gallik asit ile yaklaşık olarak aynı inhibisyon etkisini göstermiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada, beş yeni *N*-benzilbenzimidazol-gümüş(I) kompleksi sentezlenmiş ve uygun yöntemler ile tamamen karakterize edilmiştir. Elde edilen komplekslerin hCA I – II ve PPO enzimleri üzerinde inhibisyon özellikleri incelenmiş ve tüm komplekslerin enzimleri güçlü şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Özellikle **2a** kompleksi PPO enzimini karşılaştırma için kullanılan ve endüstride PPO inhibitörü olarak kullanılan Gallik asit ile aynı seviyede inhibe etmiştir.

Her ne kadar gerek CA gerekse de PPO için birçok inhibitör geliştirilmiş olsa da insan vücuduna belirli konsantrasyonlara kadar toksik etkisi olmayan inhibitörlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Gümüş bileşiklerinin düşük konsantrasyonlarda insan vücuduna karşı toksik olmadığı bilinmektedir (Medici ve ark., 2016). Gerek gümüş bileşiklerinin bu özellikleri gerekse de bu çalışmada elde edilen yüksek inhibisyon değerleri sentezlenen komplekslerin glokom ve hiperpigmentasyon tedavisinde ilaç olarak, gıda endüstrisinde ise beyazlatıcı olarak kullanılabilir potansiyelde olduklarını göstermektedir. Devam eden çalışmalarda bu bileşiklerin etki mekanizmaları ve *in vivo* deneylerin yapılması amaçlamaktayız.

KAYNAKLAR

- Aggarwal M, Kondeti B, McKenna R, 2013. Anticonvulsant/antiepileptic carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23: 717-724.
- Armstrong JMcD, Myers DV, Verpoorte JA, Edsall JT, 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *Journal of Biological Chemistry*, 241(21): 5137-5149.
- Arslan O, 1994. Glaukoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış)
- Arslan O, Erzenin M, Sinan S, Özensoy Ö, 2004. Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, 88: 479-484.
- Barker HA, Smyth RD, Weissbach H, Toohey JI, Ladd JN, Volcani BE, 1960. Isolation and properties of crystalline cobamide coenzymes containing benzimidazole or 5,6-dimethylbenzimidazole. *Journal of Biological Chemistry*, 235(2): 480-488.
- Büyükkıdan N, Bülbül M, Kasımoğulları R, Büyükkıdan B, 2013. Synthesis and characterization of metal complexes of heterocyclic sulfonamide as carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(2): 311-315.
- Chang TS, 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10:2440-2475.
- Elie CR, David G, Schmitzer AR, 2015. Strong antibacterial properties of anion transporters: A result of depolarization and weakening of the bacterial membrane. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(5): 2358-2366.

- Gaba M, Mohan C, 2016. Development of drugs based on imidazole and benzimidazole bioactive heterocycles: recent advances and future directions. *Medicinal Chemistry Research*, 25: 173-210.
- Herrmann WA, 2002. N-Heterocyclic carbenes: A new concept in organometallic catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(8): 1290-1309.
- Hindi KM, Panzner MJ, Tessier CA, Cannon CL, Youngs WJ, 2009. The medicinal applications of imidazolium carbene metal complexes. *Chemical Reviews*, 109:3859-3884.
- Kandel M, Gornall AG, Wong SCC, Kandel SI, 1970. Some characteristics of human, bovine and horse carbonic anhydrases as revealed by inactivation studies. *Journal of Biological Chemistry*, 245(9): 2444-2450.
- Karataş MO, Alici B, Çakır Ü, Çetinkaya E, Demir D, Ergün A, Genç N, Arslan O, 2013. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of coumarin derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(2):299-304.
- Karataş MO, Alici B, Çetinkaya E, Bilen Ç, Genç N, Arslan O, 2014. Synthesis, characterization and tyrosinase inhibitory properties of benzimidazole derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 40(4):461-466.
- Karlık Ö, Balcıoğlu S, Karataş MO, Ateş B, Alici B, Özdemir N, 2018. Synthesis, structural characterization and cytotoxicity studies of T-shaped silver(I) complexes derived from 1-benzyl-3H-benzimidazolium p-toluenesulfonates. *Polyhedron*, 142:63-70.
- Klasen HJ, 2000. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, 26: 117-130.
- Liu LX, Wang XQ, Zhou B, Yang LJ, Li Y, Zhang HB, Yang XD, 2015. Synthesis and antitumour activity of novel N-substituted carbazole imidazolium salt derivatives. *Scientific Reports*, 5:13101-13120.
- Medici S, Peana M, Crisponi G, Nurchi VM, Lachowicz JI, Remelli M, Zoroddu MA, 2016. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. *Coordination Chemistry Reviews*, 327-328: 349-359.
- Monti BM, Supuran CT, De Simone G, 2013. Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008-2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23: 737-749.
- Oehninger L, Rubbiani R, Ott I, 2013. N-Heterocyclic carbene metal complexes in medicinal chemistry. *Dalton Transactions*, 42: 3269-3284.
- Özdemir İ, Şahin N, Gök Y, Demir S, Çetinkaya B, 2005. In situ generated 1-alkylbenzimidazole-palladium catalyst for the Suzuki coupling of aryl chlorides. *Journal of Molecular Catalysis A. Chemical*, 234: 181-185.
- Özdemir UO, Özbek N, Genç ZK, İlbiz F, Gündüzalp AB, 2017. New bioactive silver(I) complexes: Synthesis, characterization, anticancer, antibacterial and anticarbonic anhydrase II activities. *Journal of Molecular Structure*, 1138:55-63.
- Scozzafava A, Supuran CT, Carta F, 2013. Antiobesity carbonic anhydrase inhibitors: a literature and patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23: 725-735.
- Singla P, Luxami V, Paul K, 2014. Benzimidazole-biologically attractive scaffold for protein kinase inhibitors. *RSC Advances*, 4: 12422-12440.
- Supuran CT, 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20: 3467-3474.
- Wu H, Yuan J, Bai Y, Pan G, Wang H, Kong J, Fan X, Liu H, 2012. Synthesis, structure, DNA-binding properties and antioxidant activity of silver(I) complexes containing V-shaped bis-benzimidazole ligands. *Dalton Transactions*, 41:8829-8838.
- Wu H, Zhang Y, Chen C, Zhang J, Bai Y, Shi F, Wang X, 2014. DNA binding studies and antioxidant activities of two-, three- and four-coordinate silver(I) complexes containing bis(2-benzimidazolyl)aniline derivatives. *New Journal of Chemistry*, 38: 3688-3698.
- Yadav G, Ganguly S, 2015. Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97:419-443.