



**BAZI 2-FENOKSİASETAMİT/ 3-FENOKSİPROPANAMİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Shakıla SHAKILA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Shakila SHAKILA

06.09.2021

BAZI 2-FENOKSİASETAMİT/ 3-FENOKSİPROPANAMİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Shakıla SHAKILA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2021

ÖZET

Sunulan tez çalışmamızda, fenoksiasetamit türevi 3 bileşik, fenoksipropanamit türevi 2 bileşik ve oksobütanamit türevi 3 bileşik olmak üzere 8 yeni bileşik sentez edildi. Sentezlenen bileşiklerin yapıları, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRMS ve elementel analiz verileri ile kanıtlandı. Daha sonra, bileşiklerin 10 μM konsantrasyonda asetilkolinesteraz (AKE) ve bütirilkolinesteraz (BKE) inhibitör aktiviteleri *in vitro* Ellman yöntemiyle değerlendirildi ve %50'nin üzerinde inhibisyon oluşturan bileşiklerin IC_{50} değerleri hesaplandı. İlave olarak sentezlenen tüm bileşiklerin IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NO gibi enflamatuvar belirteçlerin düzeyleri üzerine etkileri incelendi. Ayrıca bileşiklerin sitotoksosite ve metal şelasyon özellikleri değerlendirildi. Son olarak en güçlü AKE inhibitörü bileşik 8'in ($\text{IC}_{50} = 0.63 \mu\text{M}$) ve en güçlü BKE inhibitör bileşiği 1'in ($\text{IC}_{50} = 2.10 \mu\text{M}$) bağlanma modlarını belirlemek için moleküler kenetlenme (docking) çalışmaları gerçekleştirildi.

Bilim Kodu : 1019
Anahtar : Alzheimer hastalığı, fenoksiasetamit/fenoksipropanamit, kolinesteraz
Kelimeler : inhibisyonu, metal şelasyon, moleküler kenetlenme
Sayfa Adedi : 91
Danışman : Prof. Dr. Deniz S. DOĞRUER

SYNTHESIS OF SOME 2-PHENOXYACETAMIDE/3-PHENOXYPROPANAMIDE DERIVATIVES
AND EVALUATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES

(M. Sc. Thesis)

Shakila SHAKILA

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
September 2021

ABSTRACT

In the presented thesis 8 new compounds were synthesized, including 3 phenoxyacetamide derivatives, 2 phenoxypropanamide derivatives and 3 oxobutanamide derivatives. The structures of the synthesized compounds were confirmed by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRMS and elemental analysis. Following that, the acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activities of compounds at 10 μM concentration were evaluated by *in vitro* Ellman's method and IC_{50} value of compounds which showed cholinesterase inhibition more than %50 was determined. In addition, the effects of all synthesized compounds on the levels of inflammatory markers such as IL-1 β , IL-6, TNF- α and NO were investigated. Moreover cytotoxicity and metal chelation properties of all compounds were evaluated. Finally, molecular docking studies were carried out to determine binding modes of the most potent AChE inhibitor compound 8 (IC_{50} = 0.63 μM) and the most potent BChE inhibitor compound 1 (IC_{50} = 2.10 μM).

Science code : 1019
Key words : Alzheimer's disease, phenoxyacetamide/phenoxypropanamide, metal chelation, cholinesterase inhibition, molecular docking
Page number : 91
Supervisor : Prof. Dr. Deniz S. DOĞRUER

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olduğunu hissettiğim ve birlikte çalışabilme fırsatı bulabildiğim için gurur duyduğum çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Deniz S. DOĞRUER'e gönülden teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen, daima beni aydınlatan Dr. Burcu KILIÇ'a da en kalbi duygularla teşekkür ediyorum.

Tez çalışmamızda antienflamatuvar aktivite ve sitotoksite çalışmasını gerçekleştiren Doç. Dr. Rahşan Ilıkçı SAĞKAN ve moleküler docking çalışmalarımızı yapan Dr. Fatma AKSAKAL'a teşekkür ederim. Tez çalışmam sürecince Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nın olanaklarından yararlanmamı sağlayan anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Erden BANOĞLU'na, tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmamı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK-118S686) çok teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile bu uzun yolculuğu başarıyla tamamlamama yardımcı olan anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Çok kıymetli arkadaşlarım Diyar FIRAT, Umama SHALABY, Amjad HUSSAIN ve Asif NAWAZ'a tüm zor zamanları benimle paylaştıkları, sevgilerini ve yardımlarını her an sundukları için teşekkürlerimi sunuyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
δ	Sigma
ppm	parts per million (milyonda bir birim)
J	Eşleşme sabiti
Å	Angstrom
g	gram
m/z	kütle/yük
mg	milligram
nm	nanometre
Hz	Hertz
MHz	Mega Hertz
μ l	mikrolitre
mM	millimolar
μ M	mikromolar
U	Ünite

Kısaltmalar	Açıklamalar
AH	Alzheimer Hastalığı
Aβ	Amiloid Beta peptit
APP	Amiloid prekürsor protein
APOE	Apolipoprotein E
AKE	Asetilkolinesteraz
ATK	Asetiltiyokolin iyodür
BKE	Bütirilkolinesteraz
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BTk	Bütiriltiyokolin iyodür
BSA	Sığır serum albümini
CHCl₃	Kloroform
DCM	Diklorometan
DMF	Dimetilformamit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMAP	4-(dimetilamino)piridin
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent deneyi
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
HuAKE	İnsan asetilkolinesteraz
IL-1β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
IC₅₀	Maksimum inhibisyonun yarısını oluşturan konsantrasyon
KAB	Katalitik aktif bölge
LPS	Lipopolisakkaritler
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MSS	Merkezi sinir sistemi

Kısaltmalar	Açıklamalar
NFY	Nörofibriler yumaklar
NMDA	N-metil-D-aspartat
MMSE	Mini-mental durum testi
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
PAB	Periferal aromatik bölge
PDB	Protein Data Bank
PET	Pozitron emisyon tomografi
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
OS	Oksidatif stres
ROT	Reaktif oksijen türler
RAT	Reaktif azot türler
TDP-43	TAR DNA bağlayıcı protein 43
TEA	Trietil amin
THF	Tetrahidrofuran
THP	İnsan monositik hücre hattı
TNF-α	Tümör nekrozis faktör- α
OD	Optik densite
TcAKE	<i>Torpedo californica</i> asetilkolinesteraz
HuBKE	İnsan bütirilkolinesteraz
UPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xiv
ŞEKİLERİN LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Normal Yaşlanma Süreci ve Demans.....	5
2.2. Alzheimer Hastalığı.....	5
2.3. Alzheimer Hastalığının Klinik Dönemleri	6
2.4. Risk Faktörleri	7
2.5. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi	9
2.5.1. Amiloid beta plaklar.....	10
2.5.2. Nörofibriler yumaklar	11
2.5.3. Oksidatif stres	11
2.5.4. Nöroenflamasyon	12
2.5.5. Metal dishomeostazisi	12
2.5.6. Eksitotoksisite	13
2.6. Alzheimer Hastalığının Tanısı	13
2.7. Alzheimer Hastalığının Tedavisi.....	14
2.7.1. Kolinesterazlar	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19

Sayfa

3.1. Kimyasal Çalışmalar	19
3.1.1. Kimyasal çalışmalarda kullanılan gereçler	19
3.1.2. Kimyasal çalışmalardaki genel sentez yöntemleri	21
3.2. Analitik Kontroller	27
3.2.1. Erime derecesi tayini	27
3.2.2. İnce tabaka kromatografisi ile yapılan kontroller	27
3.2.3. Spektroskopik yöntemler	27
3.2.4. Elementel analizler	27
3.2.5. Yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumları	28
3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	28
3.3.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite tayini	28
3.3.2. Sitotoksosite çalışmaları	31
3.3.3. Antienflamatuvar aktivite çalışması	33
3.3.4. Metal şelasyon çalışması	36
3.4. Moleküler Docking Çalışması	36
4. BULGULAR	39
4.1. Kimyasal Bulgular	39
4.1.1. <i>N</i> -(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-2-(4-metoksifenoksi)asetamit dihidroklörür (Bileşik 1)	39
4.1.2. <i>N</i> -(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-2-(<i>p</i> -metilfenol)asetamit dihidroklörü (Bileşik 2)	40
4.1.3. <i>N</i> -(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-2-(3,4-dimetoksifenoksi)asetamit hidroklörür (Bileşik 3)	41
4.1.4. <i>N</i> -(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-3-(4-metoksifenoksi)propanamit hidroklörür (Bileşik 4)	42

4.1.5. <i>N</i> -(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-3-(<i>p</i> -metilfenoksi)propanamit dihidroklorür (Bileşik 5)	43
4.1.6. <i>N</i> -(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-4-(4-metoksifenil)-4-oksobütanamit (Bileşik 6)	44
4.1.7. <i>N</i> -(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-4-okso-4-(<i>p</i> -metilfenil)bütanamit (Bileşik 7)	45
4.1.8. <i>N</i> -(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-4-(3,4-dimetoksifenil)-4-oksobütanamit (Bileşik 8)	46
4.2. Biyolojik Aktivite Bulguları.....	47
4.2.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite bulguları	47
4.2.2. Sitotoksisite testi bulguları	50
4.2.3. Antienflamatuvar aktivite bulguları.....	52
4.2.4. Metal şelasyon aktivite bulguları.....	54
4.3. Moleküler Docking Bulguları	64
5. TARTIŞMA.....	67
5.1. Kimyasal Bulguların Değerlendirilmesi.....	67
5.2. Biyolojik Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi	71
5.2.1. Kolinesteraz inhibisyon sonuçlarının değerlendirilmesi	71
5.2.2. Antienflamatuvar aktivite bulgularının değerlendirilmesi	73
5.2.3. Sitotoksisite testi bulgularının değerlendirilmesi	74
5.2.4. Bileşiklerin metal şelatör etki tayini	74
5.3. Moleküler Docking Bulgularının değerlendirilmesi	75
5.3.1. Asetilkolinesteraz için docking sonuçlarının değerlendirilmesi.....	75
5.3.2. Bütirilkolinesteraz için docking sonuçlarının değerlendirilmesi	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77

Sayfa

KAYNAKLAR 79

ÖZGEÇMİŞ 91

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. ELISA için kullanılan kit bilgileri.....	35
Çizelge 4.1. Bileşiklerin % inhibisyon değerleri ve IC ₅₀ sonuçları.....	47
Çizelge 4.2. 5 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda % hücre canlılığı	50
Çizelge 5.1. Kolinesteraz aktivite bulguları	73

ŞEKİLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. N-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-3-(4-metoksifenil)prop-2-enamit	2
Şekil 1.2. Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin yapıları	3
Şekil 2.1. Makroskopik değişiklikler; hipokampus ile serebral korteksin atrofişi	9
Şekil 2.2. Amiloid beta peptit oluşumu	10
Şekil 2.3. Nörofibriler yumakların oluşumu	11
Şekil 2.4. Astrositler, nöronlar ve mikrogliaların ilişkisi	12
Şekil 2.5. AH tedavisinde kullanılan ilaçlar	15
Şekil 2.6. AKE enzim aktif bölgesinin şematik gösterimi.....	18
Şekil 3.1. Ellman testi reaksiyon mekanizması.....	29
Şekil 4.1. AKE inhibitörü bileşiklerin IC ₅₀ grafikleri	48
Şekil 4.2. BKE inhibitörü bileşiklerin IC ₅₀ grafikleri.....	49
Şekil 4.3. Sitotoksikite testi için bileşiklerin % hücre canlılığı grafikleri	51
Şekil 4.4. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda İL-1 β seviyesine donepezil ve bileşiklerin etkisi	52
Şekil 4.5. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda İL-6 seviyesine donepezil ve bileşiklerin etkisi	53
Şekil 4.6. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda TNF seviyesine donepezil ve bileşiklerin etkisi	53
Şekil 4.7. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda NO seviyesine donepezil ve bileşiklerin etki	54
Şekil 4.8. Bileşik 1 için metal şelatör aktivite spektrumları	55
Şekil 4.9. Bileşik 2 için metal şelatör aktivite spektrumları	56
Şekil 4.10. Bileşik 3 için metal şelatör aktivite spektrumları	57
Şekil 4.11. Bileşik 4 için metal şelatör aktivite spektrumları	58
Şekil 4.12. Bileşik 5 için metal şelatör aktivite spektrumları	59
Şekil 4.13. Bileşik 6 için metal şelatör aktivite spektrumları	60
Şekil 4.14. Bileşik 7 için metal şelatör aktivite spektrumları	61
Şekil 4.15. Bileşik 8 için metal şelatör aktivite spektrumları	62
Şekil 4.16. Bileşikler ve metal iyonları için absorban kayması grafikleri	63

Şekil	sayfa
Şekil 4.17. En yüksek AKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 8'in AKE kristali ile elde edilen docking sonuçları.....	64
Şekil 4.18. En yüksek BKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 1'in BKE kristali ile elde edilen docking sonuçları.....	65
Şekil 5.1. 2-(4-Sübstitüefenoksi)asetamit türevleri sonuç bileşiklerin sentez şeması.....	67
Şekil 5.2. 2-(3,4-Dimetoksifenoksi)asetamit sonuç bileşiğinin sentez şeması.....	68
Şekil 5.3. 3-(4-Sübstitüefenoksi)propanamit serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması	69
Şekil 5.4. 4-Oksobütanamit türevleri sonuç bileşiklerin sentez şeması.....	70

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH) genellikle yaşlılıkla birlikte ortaya çıkan nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır. Günümüzde dünya genelinde özellikle gelişmiş ülkelerde ortalama yaşam süresinin uzaması ile birlikte en hızlı artan yaş grubunu 65 yaş ve üstü kişiler oluşturmaktadır. Buna paralel olarak yaşlılıkla birlikte ortaya çıkan AH gibi hastalıkların görülme sıklığı bu yaş grubunda hızla artmaktadır. Dolayısıyla AH, nüfusun giderek yaşlandığı tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur [1-3].

AH'nin klinik ve patolojik bulguları çok iyi tanımlanmasına rağmen nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak hastalığın genetik, yaşam tarzı ve çevresel faktörler gibi etkenlerin sonucunda ortaya çıkabileceğine ilişkin veriler literatürde kayıtlıdır. AH'nin klinik bulguları başta unutkanlık olmak üzere, diğer zihinsel ve davranışsal bozukluklardır. Hastalığın patolojik göstergeleri ise genel olarak; beyindeki asetilkolin (AK) azlığı, glutamat seviyesinde artış, enflamasyon, oksidatif stres, hücre dışı amiloid beta (A β) plaklar ve hücre içi nörofibriler yumaklardır (NFY). AH'yi tedavi etmeye yönelik, söz konusu patolojik bulguları iyileştirmeyi hedefleyen pek çok bileşik geliştirilmiştir. Ancak hastalığın kesin tedavisi yoktur ve günümüzde hastalığın tedavisinde kolinerjik yaklaşım hedef alınarak geliştirilen semptomatik tedavi uygulanmaktadır [4-8].

Kolinerjik yaklaşımda amaç; hafıza ve yeni bilgileri öğrenme ile ilişkili ve hastalık durumunda azalmış nörotransmitter AK seviyesini artırarak hastalığın en önemli klinik bulgusu olan unutkanlığın ve dolayısıyla bilişsel durumun iyileştirilmesidir. Bu amaca yönelik olarak uygulanan yöntem, AK'nin sinaptik hidrolizini gerçekleştiren kolinesteraz enzimlerinin (asetilkolinesteraz ve bütiril kolinesteraz) inhibe edilmesidir [9-11].

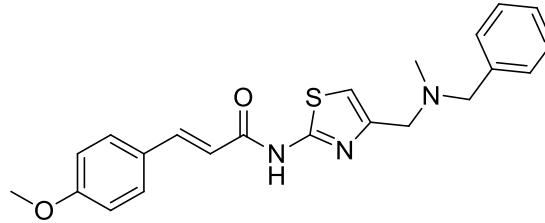
AH'nin önemli patolojik göstergelerinden olan nöroenflamasyonun, A β plaklar ve NFY yumakları ortadan kaldırmak amacıyla olduğu ancak hastalığın ilerleyen evrelerinde plak ve yumak oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir. Bu nedenle AH tedavisinde kolinesteraz inhibisyonu ile birlikte mikrogliya ve astrositlerden salınan proenflamatuvar sitokinlerin; interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve nitrik oksit (NO)

gibi enflamatuvar mediyatörlerin inhibisyonunun dolayısıyla antienflamatuvar etkinliğin de önemli olabileceği varsayılmaktadır [12-16].

Ayrıca Fe^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} metal iyonlarının A β agregasyonuna, Tau hiperfosforilasyonuna ve Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikalının açığa çıkmasına neden olarak AH'ye yol açabileceği bildirilmiştir [17, 18].

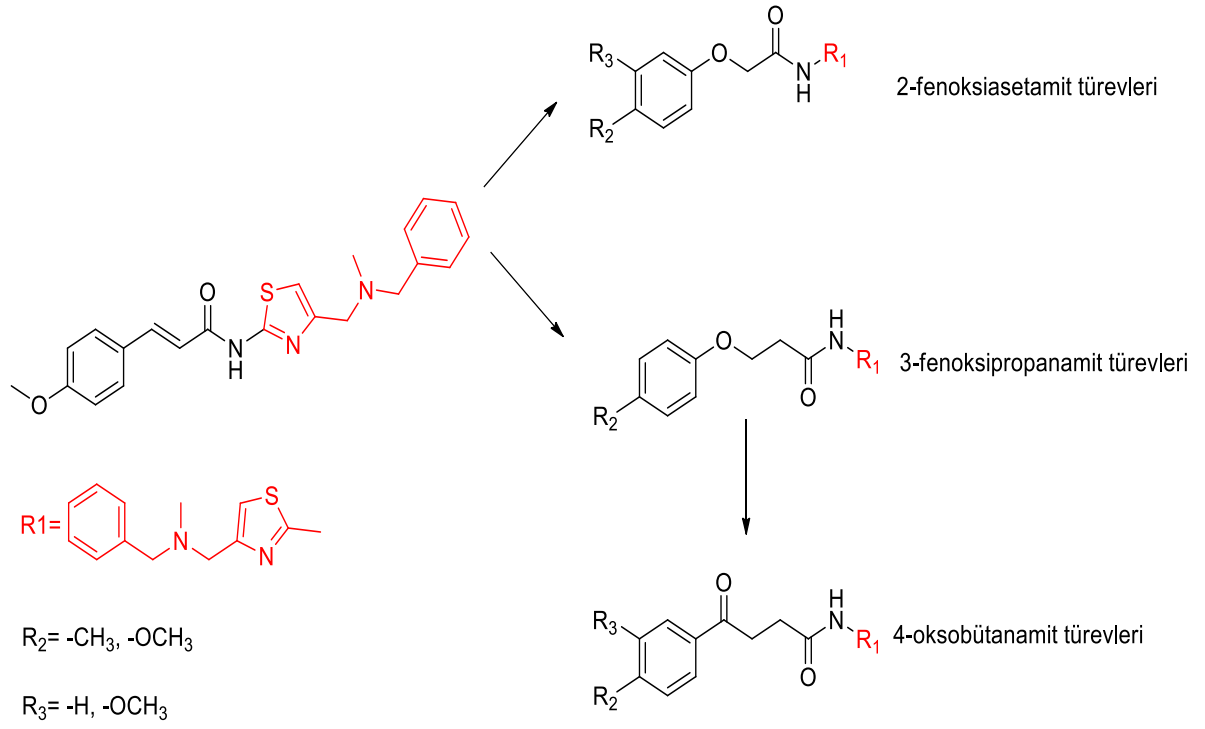
Son yıllarda AH'ye yönelik ilaç etkin madde geliştirme çalışmalarında, hastalığın karmaşık ve çok faktörlü olması nedeniyle, hastalığın farklı patolojik hedefleri ile etkileşebilecek moleküllerin daha etkili olacağı yaklaşımı benimsenmektedir. Biz de tezimizde bu yaklaşımdan hareketle hastalığın farklı patolojik hedefleri ile etkileşmesini öngördüğümüz molekülleri tasarladık ve sentez ettik.

Ayrıca grubumuz tarafından yürütülmekte olan bir çalışmada 3-fenilprop-2-enamit türevi olan bileşiğin (Şekil 1.1.) 1.3 μM 'lık IC_{50} değeri ile seçici asetilkoliesteraz enzim inhibisyonu yaptığı belirlenmiştir.



Şekil 1.1. N-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-3-(4-metoksifenil)prop-2-enamit

Tüm bu verilerden hareketle sunulan tez çalışmamızda, 3-fenilprop-2-enamit yapısı yerine “2-fenoksiasetamit ve 3-fenoksipropanamit” yapılarını taşıyan bileşikler ve fenoksipropanamit serisinin fenoksi grubundaki oksijen atomunun karbonil grubu ile değiştirildiği 4-oksobütanamit yapısında bileşikler sentez edildi ve sentez edilen sekiz yeni bileşiğin yapıları aydınlatıldı. Daha sonra bileşiklerin kolinesteraz enzimleri üzerindeki etkileri incelendi ve seçilen aktif bileşiklerin kolinesteraz enzimleri ile etkileşimleri moleküler docking çalışmaları ile değerlendirildi. İlave olarak bileşiklerin metal şelatör etkileri, belirli enflamasyon belirteçlerine karşı antienflamatuvar etkileri ve sitotoksiteleri incelendi.



Şekil 1.2. Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin yapısı

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Normal Yaşlanma Süreci ve Demans

Sağlıklı yaşlanma, kademeli olarak işitme, kilo, boy ve kas kütlesi kaybını içerebilir. Cilt daha kırılgan hale gelebilir ve kemik yoğunluğu azalabilir. Metabolizma hızında bir düşüşün yanı sıra işitme ve görmede bir azalma meydana gelebilir. Ayrıca normal yaşlanma süreci; bellek, dil, akıl yürütme gibi bazı bilişsel yeteneklerdeki düşüşlerle ilişkilidir. Bu süreçte bilginin daha yavaş hatırlanması ve hafızada hafif bir düşüş olması yaygındır, ancak günlük yaşamı etkileyen bilişsel düşüş yaşlanma sürecinin normal bir parçası değildir [19, 20].

Demans; hafızada, düşüncede, davranışta ve günlük aktiviteleri gerçekleştirme becerisinde bozulma olarak tanımlanan bir sendromdur. Demans esas olarak yaşlıları etkilese de, yaşlanmanın normal bir parçası değildir [21]. Demans, nöronlara zarar veren çeşitli hastalıklardan kaynaklanabilir. Örneğin, vasküler demans, bir felç nedeniyle beynin bir kısmına giden kan akışının azalmasından kaynaklanır. Parkinson hastalığı ve hidrosefali hastalarında da demans mevcut olabilir [22, 23]. AH ise beyinde beta amiloid plaklar ve hiperfosforile tau proteinleri birikimi ile tanımlanan en yaygın demans nedenidir [3].

2.2. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), ilerleyici nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır ve demansın en yaygın nedenidir [2, 24]. AH'nin klinik olarak hafıza kaybı, dil problemleri [25], günlük aktiviteleri gerçekleştirmede zorluk gibi bilişsel bozukluklar [26], psikiyatrik semptomlar (depresyon, görsel ve işitsel halüsinasyonlar, ve ajitasyon) ve bu belirtilerin davranışsal yansımaları ile seyreden ilerleyici ve ölümle sonuçlanan bir hastalıktır [25]. Hastalığın son aşamalarında olan kişiler yatağa bağımlıdır ve 24 saat bakıma ihtiyaç duyarlar.

1906 yılında Alman Psikiyatrist Alois Alzheimer, Alman psikiyatristlerinin toplantısında 51 yaşındaki Auguste Deter isimli hastasına ait; bilişsel bozukluk, yönelim bozukluğu, sanrılar ve diğer davranış değişiklikleri gibi klinik bulguları ve hastanın ölümünün ardından gözlemlediği histopatolojileri (beyin atrofisi, amiloid plaklar (A β), nörofibriler yumaklar

(NFY), nöron ve sinaps kaybı) tanımlamıştır [27, 28]. AH'nin klinik ve patolojik bulguları çok iyi tanımlanmasına ve üzerinde yapılan yoğun çalışmalara rağmen hastalığın nedeni halen bilinmemektedir [29].

AH görülme sıklığı ilk tanımlandığı yıllarda oldukça az iken, ortalama yaşam süresinin uzaması ile günümüzde, kardiyovasküler, serebrovasküler hastalıklar ve malign tümörlerin ardından yaşlı nüfus için üçüncü büyük ölüm nedenidir [30] ve hastalık 65 üstü nüfusta her on kişiden birini etkilemektedir [24]. Dünya Alzheimer raporu verilerine göre, dünyada her üç saniyede bir kişi demans hastalığına yakalanmaktadır. World Alzheimer Report 2019 verilerine göre ise, dünya çapında demansla yaşayan 50 milyondan fazla insan bulunmaktadır ve bu sayının 2050'ye kadar 152 milyona yükselmesi beklenmektedir [31].

AH'nin tanımlanmasından bu yana, tedaviye yönelik pek çok araştırma yapılmasına rağmen hastalığın kesin tedavisi yoktur. Ancak Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve hastalığın belirtilerini hafifletici beş ilaç klinik kullanıma sunulmuştur. Bu nedenle hastalık üzerinde daha etkili olabilecek ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [30].

2.3. Alzheimer Hastalığının Klinik Dönemleri

Genel olarak, AH'nin klinik dönemleri üç evre olarak sınıflandırılrsa da patolojisinin, klinik semptomlarının görülmesinden daha önce başladığı bildirilmiştir [32].

Alzheimer hastalığının erken evresi

AH'nin erken evresinde kişi bağımsız olarak işlev görebilir, araba kullanabilir, çalışabilir ve sosyal faaliyetlerin bir parçası olabilir. Buna rağmen kişi, tanıdık kelimeleri veya günlük nesnelerin yerini unutabilir. Semptomlar bu aşamada yaygın olarak belirgin olmayabilir, ancak aile ve yakın arkadaşlar bunu fark edebilir [33]. Ayrıca, karmaşık görevleri yerine getirme yeteneği azalabilir [34]. Demans öncesi aşamada potansiyel olarak mevcut olan küçük bilişsel bozukluklara ek olarak, bireyler geri çekilme veya depresyon duyguları yaşayabilir [35].

Alzheimer hastalığının hafif evresi

Hafif evre hastalığın teşhis edilebildiği evredir. Bu dönemin en belirgin özelliği, yeni bilgileri öğrenme zorluğu ve hafıza bozukluğudur [35]. Bu aşamada en olumsuz etkilenen bellek, kısa süreli bellektir ve uzak bellek korunmuştur. Depresyon belirtileri hastalığın hafif evresinde başlayabilir [34].

Alzheimer hastalığının orta evresi

Orta evre en uzun aşamadır ve uzun yıllar sürebilir. Bellekteki bozulma artar. Hastaların yeni bilgileri öğrenme becerileri ortadan kalkar. Bu evrede dildeki bozukluklar yaygın hale gelir. Hastalar yavaş yavaş kendilerine ve evlerine bakma becerilerini kaybederler. Yüzleri tanıyamamaya başlarlar. Uyku bozuklukları, psikolojik bozukluklar ve sanrılar bu evrede yaygındır [35-37].

Alzheimer hastalığının ileri evresi

Hastalığın son aşamasında demans semptomları şiddetlidir. Bu evrede, hastaların tüm bilişsel işlevlerinde bozulma ile birlikte, motor fonksiyonlarında da ileri derecede bozulma görülür. Bireyler konuşma becerilerini kaybeder ve çevrelerine tepki vermezler. Bu evrede hastalar kapsamlı hemşirelik bakımına ihtiyaç duyarlar ve temel ihtiyaçlarını karşılayamazlar. Hastalarda görülen en sık ölüm nedeni akciğer enfeksiyonunun ardından miyokard enfarktüsü ve sepsisidir [35].

2.4. Risk Faktörleri

Yaş

AH, yaşlanmanın normal bir parçası olmamakla birlikte hastalığın ortaya çıkmasında önemli bir faktördür. Genel olarak AH görülme sıklığı 65 yaş üzerindeki bireylerde artmakta ve 85 yaş üzerindeki bireylerde bu oranın %50'ye çıktığı bilinmektedir [3, 38].

Genetik faktörler

AH'nin büyük çoğunluğunun genetik bir neden olmadan ortaya çıktığı ancak bazı erken başlangıçlı ve ileri yaşlarda görülen AH olgularında genetik faktörlerin rol oynayabileceği gösterilmiştir.

21. Kromozom üzerinde yer alan amiloid prekürsör protein (APP), 14. kromozom üzerinde yer alan presenilin 1 (PSEN1) ve 1. kromozom üzerinde yer alan presenilin 2 (PSEN2) genleri erken başlangıçlı AH ile ilişkilidir. Ancak bu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu hastalığın 60 yaşından önce ortaya çıkması tüm vakaların sadece % 5'ini oluşturmaktadır [39].

İleri yaşlarda görülen AH olgularında ise Apolipoprotein E (ApoE) geninin $\epsilon 4$ alleli, hastalığın ortaya çıkma olasılığını artıran bir risk faktörüdür. Ancak bu geni taşıyan bireylerin hepsinde AH ortaya çıkmadığı gibi, AH'nin bu geni taşımayan bireylerde de görülebildiği bildirilmiştir [24, 40, 41].

Kafa travması

Kafa travmasının AH riskini artırabileceği bildirilmiştir [24, 42].

Diğer sağlık sorunları

Kalp yetmezliği, yüksek tansiyon, yüksek kolesterol seviyesi, Tip 2 diyabet, depresyon ve stresin de AH gelişme riskini arttırabileceği bildirilmiştir [43].

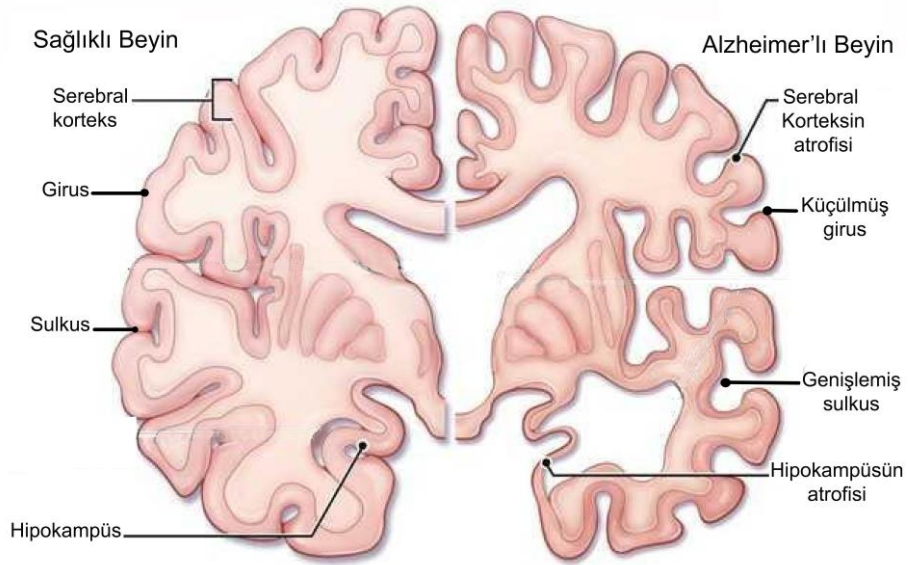
Çevresel faktörler

Çeşitli toksik maddelerin de AH gelişimi ile ilgili olabileceği bildirilmiştir [24].

2.5. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi

AH patolojileri makroskobik ve mikroskobik patolojiler olarak sınıflandırılır. Makroskopik seviyede hastalık beyin atrofisi ile karakterizedir (Şekil 2.1). Özellikle hipokampus ve serebral korteks atrofisi vardır. Hastalığın mikroskobik patolojileri ise amiloid beta peptitlerden oluşan hücre dışı amiloid beta plaklar ve hiperfosforile tau proteinlerinden oluşan hücre içi nörofibriler yumaklar (NFY) ve büyük ölçüde bu iki temel patolojinin neden olduğu nöron ve sinaps kaybı olarak tanımlanır [44].

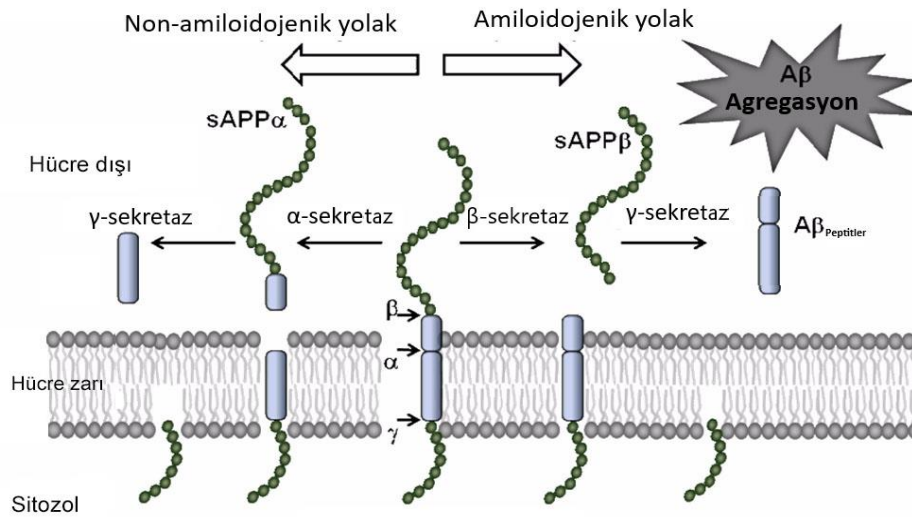
NFY ve amiloid plaklar hem normal yaşlanma sürecinde hem de bazı başka nörodejeneratif hastalıklarda görülebildiğinden, her iki lezyon AH'nin kesin tanısı için gerekli ancak yeterli değildir. AH'nin kesin tanısı için söz konusu patolojilerin belirli bir nöroanatomik dağılım ve miktarlarda olması gereklidir [45].



Şekil 2.1. Makroskopik değişiklikler; hipokampus ile serebral korteksin atrofisi [46]

2.5.1. Amiloid beta plaklar

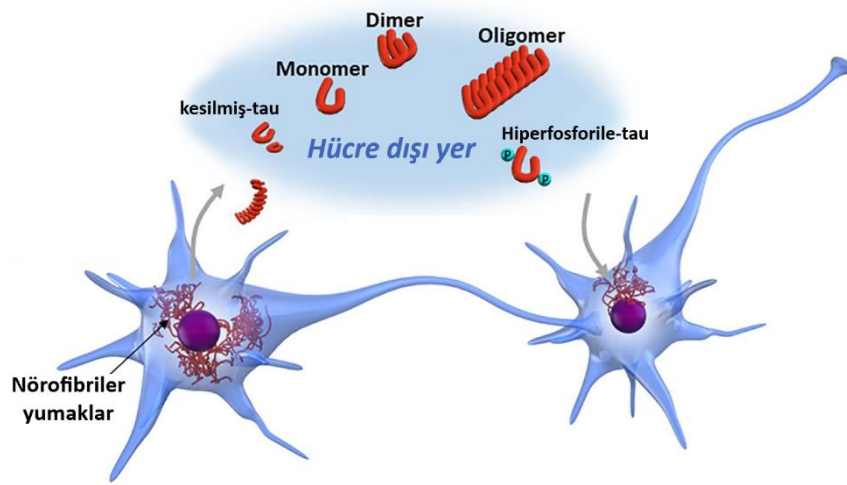
Amiloid beta plaklar AH'nin en önemli patolojik göstergelerinden biridir ve transmembran bir protein olan amiloid prekürsör protein (APP)'nin proteolitik yıkımı ile ortaya çıkan amiloid beta ($A\beta$) peptitlerden oluşur. APP, nonamiloidojenik ve amiloidojenik olmak üzere iki şekilde yıkılır. Nonamiloidojenik yolda APP'nin α -sekretaz ile yıkımından çözünür $APP\alpha$ oluşur. Amiloidojenik yolda ise APP'nin β ve γ sekretazlar ile yıkımından 40-42 amino asitlik $A\beta$ peptitler ortaya çıkar. Her iki yolak arasında sağlıklı bireylerde bir denge söz konusu iken, APP genindeki mutasyonlar sonucu amiloidojenik yolak baskın hale gelir. Yapılan çalışmalarda $A\beta$ plakların farklı biyolojik yolları tetikleyerek (eksitotoksikite, oksidatif stres, nöroenflamasyon, tau hiperfosforilasyonu gibi) nörotoksik etkiye yol açarak bilişsel işlevlerde bozulmaya neden oldukları bildirilmiştir. Ayrıca plak içeriğinde yer alan $A\beta_{42}$ 'nin, daha kısa zincirli $A\beta_{40}$ 'a göre agregasyona daha meyilli olduğu fakat agregat oluşuktan sonra nörotoksiteleri arasında fark olmadığı bildirilmiştir [47-49].



Şekil 2.2. Amiloid beta peptit oluşumu [42]

2.5.2. Nörofibriler yumaklar

AH'nin bir diğer önemli patolojik bulgularından olan NFY, hiperfosforile tau proteinlerinden oluşur. Mikrotübül ile ilişkili bir protein olan tau, 17. kromozom tarafından kodlanır. Normal şartlarda tau, mikrotübüllere bağlanarak mikrotübül dayanıklılığını ve nöron bütünlüğünü sağlar. Hastalık durumunda, tau proteini hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar aracılığı ile hiperfosforile hale gelir böylece mikrotübüllere bağlanamaz ve nöronal ölüme neden olur [8, 50, 51].

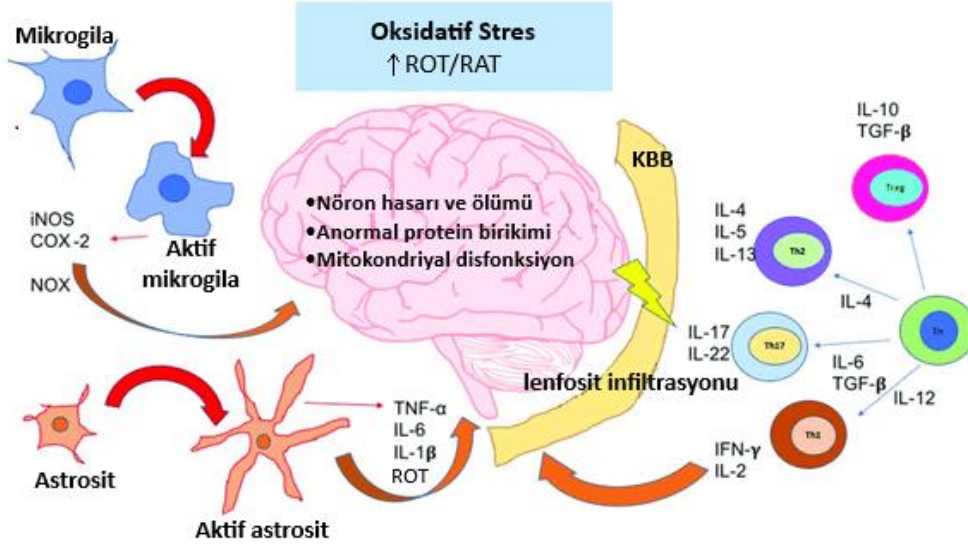


Şekil 2.3. Nörofibriler yumakların oluşumu [52]

2.5.3. Oksidatif stres

Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif azot türleri (RAT), normal metabolik işlemler sırasında vücudumuzda devamlı olarak üretilen ve uzaklaştırılan kimyasal olarak aktif olan yapılardır. Hidrojen peroksit (H_2O_2), ve peroksinitrit ($ONOO^-$) dışında, çoğunluğu hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$), süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$), ve nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$), gibi serbest radikalik yapıda bileşiklerdir. Bu reaktif türler düşük konsantrasyonlarda pek çok fizyolojik fonksiyonda önemli role sahiptirler. Hücrelerimizde ROT'nin zararlı etkilerine karşı bizi koruyan süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim sistemleri mevcuttur. Fakat antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği veya yokluğunda bu reaktiflerin konsantrasyonu artar ve oksidatif stres olarak bilinen durum ortaya çıkar. Reaktif türlerin artan konsantrasyonundan kaynaklanan oksidatif stres; DNA, lipid ve

proteinler gibi hücresel makromoleküllerin oksidasyonuna ayrıca mitokondriyel bozukluğa ve nöroenflamasyona da yol açarak AH'nin de dahil olduğu pek çok hastalığa neden olabilir [53, 54].



Şekil 2.4. Astrositler, nöronlar ve mikrogliaların ilişkisi [55]

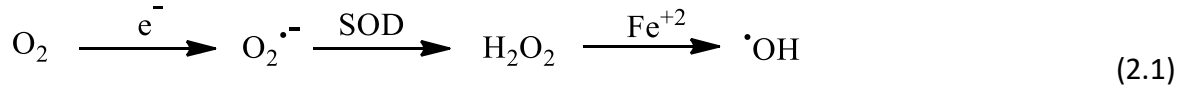
2.5.4. Nöroenflamasyon

Aβ plaklar ve NFY beyinde enflamatuvar mediyatörlerin salımına neden olur [56]. Ancak plaklar ve yumakları ortadan kaldırmak amacıyla beyinde mikrogliya ve astrositlerden salınan enflamatuvar sitokinlerin (IL-1β, IL-6, TNF-α) ve nitrik oksit (NO) gibi enflamatuvar mediyatörlerin aynı zamanda amiloidojenik yolağı da tetikleyerek Aβ₄₂ peptit üretim ve agregasyonunu artırarak kronik nöroenflamasyona neden olduğu bildirilmiştir [12, 15, 42].

2.5.5. Metal dishomeostazisi

Metaller pek çok fizyolojik işlevin yerine getirilmesinde rol oynar. Metal iyonları MSS'de enzimatik aktivitenin devam ettirilmesinde, mitokondriyel fonksiyonda, miyelinizasyonda, nörotransmisyonunda, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. Metal seviyelerinin normal fizyolojik koşullardakine göre daha yüksek olmasının çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkili olabileceği literatürde kayıtlıdır. Özellikle Fe⁺², Cu⁺² ve Zn⁺² metal iyonlarının Aβ agregasyonuna, Tau hiperfosforilasyonuna ve "Eş. 2.1"de

gösterildiği gibi Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikalının açığa çıkmasına neden olarak AH'ye yol açabileceği bildirilmiştir [17, 57-62].



2.5.6. Eksitotoksisite

Beynin uyarıcı nörotransmitteri olan glutamatın artmış aktivitesi ile ortaya çıkan hücre ölümüdür. Glutamatın artmış aktivitesi Aβ plakların artışı ile ilişkilendirilmektedir. Artmış plakların, sinapslarda glutamat alımını engellediği ve bunun sonucunda glutamatın kendi reseptörü olan *N*-metil D-aspartat (NMDA) ile daha uzun süreli etkileştiği, böylece normalden daha fazla nitrik oksit üretimi ile hücre ölümünün gerçekleştiği bildirilmiştir [63, 64].

2.6. Alzheimer Hastalığının Tanısı

AH'yi kesin olarak teşhis etmenin tek yöntemi beyin otopsisidir. Bununla birlikte, zihinsel, davranışsal testler ve fiziksel muayeneler hekimlerin doğru bir AH tanısı koymasına olanak tanır [65]. Günümüzde tanı için manyetik rezonans, pozitron emisyon tomografi ve beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunan biyobelirteçler (α -sinüklein, TDP-43 proteinopati vb) kriter olarak kullanılmaktadır [66, 67].

Fiziksel ve nörolojik muayene

Genel fiziki muayene hastalık sürecinin erken dönemlerinde normaldir. Kan testleri ve idrar tahlili diğer potansiyel demans nedenlerini dışlamak için yapılır. Ayrıca hekim, hastanın refleks, kas tonusu ve gücü, görme ve işitme duyusu ve koordinasyonunu değerlendiren nörolojik bir muayene yapar [68].

Mental durum değ erlendirilmesi

Hafızayı ve diğ er d    nme becerilerini belirlemek için testler yapılır. Testler, benzer ya  ve eğitim düzeyindeki insanların zihinsel işlevleri hakkında bilgi sağlayabilir. Bu testler, bir tanı koymaya yardımcı olabilir ve gelecekte semptomların ilerlemesini izlemek için bir başlangıç noktası görevi görebilir. Bu amaçla en yaygın olarak uygulanan test Mini-Mental Durum testidir (MMSE) [69].

Beyin görüntülemesi

N roɡ r nt leme, AH'yi tespit etmek için umut verici bir araştırma alanıdır. BT, PET ve MRI beyindeki anormallikleri tanımlamak için kullanılan görüntüleme yöntemleridir [70].

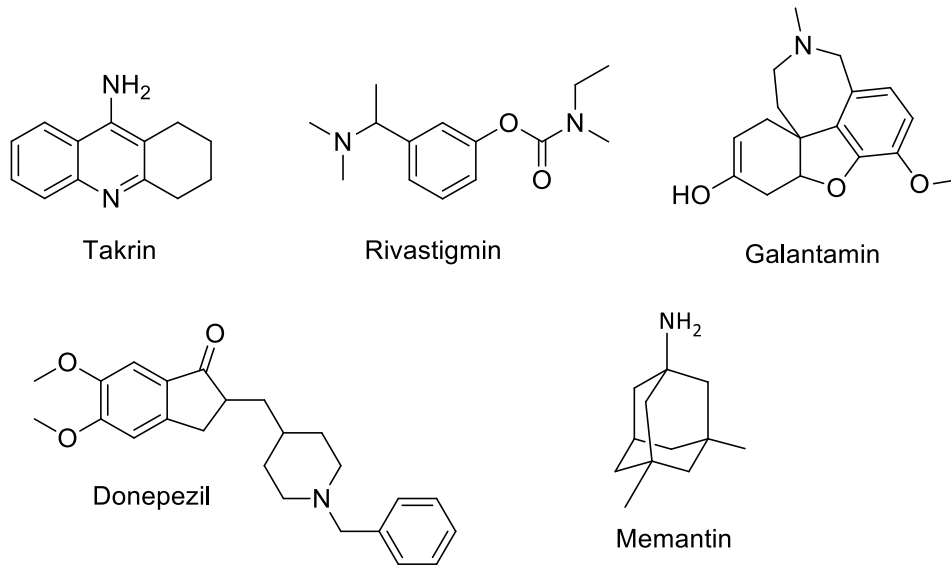
2.7. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

AH'nin kesin tedavisi bulunmamakla birlikte ilerlemesini geciktirecek, hastalığın bilişsel belirtilerine ve davranışsal bozukluklarına yönelik tedaviler uygulanmaktadır.

Bilişsel semptomlara yönelik tedavide; kolinesteraz inhibitörleri kullanılarak kolinergik nöronların dejenerasyonundan kaynaklanan asetilkolin azlığının artırılması ve hastalığın ileri evrelerinde bu tedavi protokoluna *N*-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti memantinin ilave edilmesiyle de artmış olan glutamat seviyesinin düşürülmesi amaçlanır [11, 26, 71].

Ayrıca son günlerde FDA, Alzheimer hastalığı olan hastaları tedavi etmek için Biogen ve Eisai firmaları tarafından geliştirilmiş monoklonal antibadi yapısında bir ilaç olan aducanumab'ı onayladı. Bu onay birçok yönden önemlidir. Aducanumab 2003'ten beri Alzheimer hastalığı için onaylanan ilk yeni tedavidir. Daha da önemlisi bu ilaç, hastalığın temel patolojik göstergelerinden biri olan amiloid beta plakları hedefleyen ilk tedavidir [72, 73].

Zihinsel fonksiyonlardaki kötüleşmenin, beyinde öğrenme ve bellek işlevlerinden sorumlu asetilkolin seviyesinin azalması ile ilişkisi gösterildikten sonra hastalığın ilerlemesini geciktirmeye yönelik kolinesteraz inhibitörleri tedavide kullanılmaya başlanmıştır [30, 74]. Kolinesteraz inhibitörleri işlevsel olan sağlam kolinerjik nöronlar üzerinde etkilerini gösterdiklerinden hastalığın erken dönemlerinde teşhis ve tedaviye başlanması önemlidir. Hafif ve orta şiddette Alzheimer hastalığının tedavisi için dört kolinesteraz inhibitörü onaylanmıştır ancak takrin karaciğer toksisitesine neden olduğu için kullanımdan kaldırılmıştır [75-77].



Şekil 2.5. AH tedavisinde kullanılan ilaçlar

Donepezil 1996'da FDA tarafında onaylanan geri dönüşümlü selektif AKE enzim inhibitörüdür. Ayrıca AKE kaynaklı A β agregasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Donepezilin yarı ömrü 70 saattir, bu nedenle günde bir kez kullanılır. Erişkinler için önerilen başlangıç dozu günde bir kez 5 mg'dır. 4-6 hafta sonunda doz günde 10 mg'a çıkarılabilir. Donepezil akşamları yatmadan önce oral yoldan verilir. Hepatotoksik olmadığından güvenli bir şekilde kullanımı söz konusudur. Sık görülen yan etkileri gastrointestinal yan etkiler ve baş dönmesidir [26, 76, 78].

Donepezil aromatik etkileşimler yoluyla AKE'nin KAB ve PAB bölgeleri ile etkileşime girer. Donepezilin farmakolojik profili, potansiyel anti-Alzheimer ilaçları olarak diğer *N*-benzilpiperidin türevlerinin geliştirilmesine yol açmıştır [79].

Rivastigmin karbamat yapılı psödoreversibl asetil ve bütirkolinesteraz inhibitörüdür. Rivastigminin kolinesteraz inhibitör etkisi uzun olmasına rağmen plazma yarı ömrünün kısa olması klinik kullanımını kısıtlar [79, 80].

Galantamin alkaloid türevi bir bileşiktir. Reversibl ve yarışmalı olarak AKE'yi ve daha düşük oranda BKE enzimini inhibe eder. Ayrıca galantaminin nikotinik reseptörler üzerinden asetilkolin miktarını artırdığı bildirilmiştir [81, 82].

Davranış bozukluklarına yönelik tedavide ise genellikle atipik antipsikotikler düşük dozlarda kullanılır [83].

2.7.1. Kolinesterazlar

Substrat seçicilikleri ve inhibitör duyarlılıklarına göre asetilkolinesteraz (AKE) ve bütirkolinesteraz (BKE) olmak üzere ikiye ayrılan kolinesterazlar, serin hidrolaz ailesine ait enzimlerdir. Kolinesterazlar plazmada, vücut sıvılarında ve pek çok dokuda bulunurlar. Genel yapı ve katalitik mekanizma açısından benzer özelliklere sahip olan bu enzimler farklı genler tarafından kodlanır [84].

Yalnızca kolin esterlerini substrat olarak kullanan AKE (EC. 3.1.1.7) “gerçek kolinesteraz” olarak bilinir. AKE beyin, kas ve eritrosit zarında bulunur. Asetilkolin AKE enziminin özgül substratıdır [85]. Karaciğerde sentezlenip plazmaya salınan ve bu nedenle plazma kolinesterazı olarak bilinen enzim ise BKE'dir (EC. 3.1.1.8) [86]. BKE beyin, kalp, akciğer, böbrek olmak üzere pek çok farklı dokuda bulunan bir enzimdir. Ayrıca BKE kolin olmayan esterleri de hidroliz edebildiğinden “psödokolinesteraz” olarak da adlandırılır. BKE'nin tam işlevi bilinmemekle birlikte, AKE yokluğunda kolinerjik sinir iletiminin kontrol edilmesinde rol oynar. Ayrıca karbamat ve organofosfat yapılı bileşikler AKE'ye ulaşmadan etkisiz hale getirir. BKE'nin bilinen en uygun substratı bütirkolindir [87, 88].

Kolinesteraz enzimlerinin yapısı

Her iki enzimin aktif bölgesi yaklaşık 20 Å derinliğindedir. BKE'nin aktif bölge cebi AKE'den yaklaşık 200 Å daha geniş olmakla birlikte her iki enzimin aktif bölgesi yüksek oranda benzerliğe sahiptir. AKE cebinde fenilalanin, triptofan ve tirozin gibi aromatik amino asitleri yer alırken, BKE aktif bölge cebinde alifatik amino asitler (valin ve lösin gibi) yer alması, BKE aktif bölge cebinin daha geniş olmasına neden olur. Her iki enziminin aktif bölge cebi; periferik aromatik bölge (PAB) ve katalitik aktif bölge (KAB) olmak üzere genel olarak iki ana bölgeden meydana gelmektedir [89, 90].

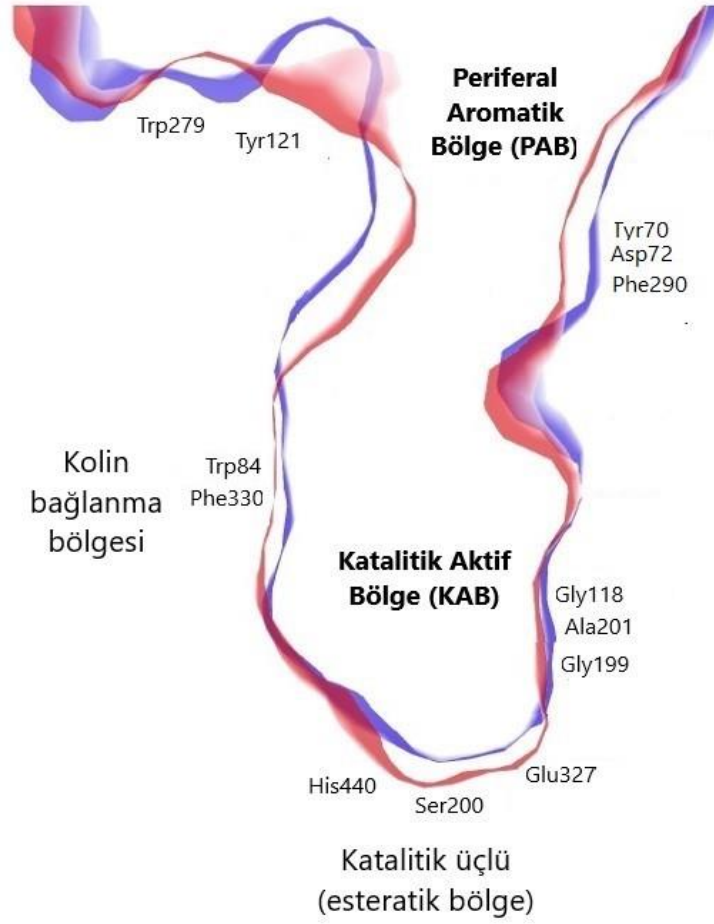
Tezimizin moleküler kenetlenme (docking) çalışmalarında *Torpedo californica* AKE'si (TcAKE) ve *Human* BKE'si (HuBKE) kullanıldığı için, bu enzimlerin aktif bölge ceplerinde yer alan amino asitlerin numaralandırılmasında sırasıyla TcAKE ve HuBKE enzimlerindeki konumlar kullanılmıştır.

Asetilkolinesteraz aktif bölge cebi

AKE aktif bölge cebi girişinde PAB yer alır. Bu bölgeyi; Tyr70, Tyr121, Trp279 ve Tyr334 gibi aromatik amino asitler ve asidik bir amino asit olan Asp72 oluşturur. Bu bölgenin yapısındaki aromatik amino asitler aracılığı ile çeşitli ligantlar ile π - π veya katyon- π etkileşimleri yapabildiği bildirilmiştir. KAB ise kolin bağlanma bölgesi ve esteratik bölge olmak üzere iki alt bölgeden oluşur. Trp84 ve Phe330 gibi aromatik amino asitlerden oluşan kolin bağlanma bölgesi, ligantlar ile π - π veya katyon- π etkileşimleri yapar. Aktif bölge cebinin en dibinde yer alan Ser200, His440, Glu327 amino asitlerinden oluşan esteratik bölge ise asetilkolinin karbonil karbonu ile etkileşerek hidrolizini gerçekleştirir [88, 91].

Bütirilkolinesteraz aktif bölge cebi

Aktif bölge cebi girişinde Asn68, Asp70, Ala277, Phe329, Tyr332 amino asitlerinden oluşan PAB'da yer alır. Kolin bağlanma bölgesinde Trp82 ve Ala328 amino asitleri bulunur. Ser198, Glu325 ve His438'den oluşan katalitik üçlünün oluşturduğu esteratik bölge ise AKE aktif bölge cebinde olduğu gibi cebin en dibinde yer alır [87, 92].



Şekil 2.6. AKE enzim aktif bölgesinin şematik gösterimi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Kimyasal çalışmalarda kullanılan gereçler

Tasarlanan moleküllerin kimyasal sentezleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler teknik ve analitik saflıkta olup çeşitli firmalardan temin edilmiştir. Kullanılan maddeler ve aletler aşağıda listelenmiştir.

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma
4-Metilfenol	Sigma Aldrich
4-Metoksifenol	Sigma Aldrich
1,2-Dimetoksibenzen	Sigma Aldrich
Sezyum karbonat	Sigma Aldrich
Triton B	Sigma Aldrich
Akrilonitril	Sigma Aldrich
1,3-Dikloroaseton	Sigma Aldrich
N-Benzilmetilamin	Sigma Aldrich
EDC	Sigma Aldrich
DMAP	Sigma Aldrich
Süksinik anhidrit	Sigma Aldrich
Oksalil klorür	Sigma Aldrich
Toluen	Sigma Aldrich
Tiyoüre	Merck

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma
Sodyum hidrosit	Merck
Trietilamin (TEA)	Merck
Kloroasetik asit	Merck
Alüminyum klorür	Merck
Sodyum sülfat	Merck
Potasyum karbonat	Merck
Hidroklorik asit	Merck
Silika	Merck
Metanol	Merck
Etanol	Merck
Aseton	Merck
Petrol eteri	Merck
Diklorometan	Merck
Dioksan	Merck
Bütanol	Merck
Anisol	Fluka Analytical
3,4-Dimetoksifenol	Tokyo Chemical Industry

3.1.2. Kimyasal çalışmalardaki genel sentez yöntemleri

2-(4-Sübstitüefenoksi)asetik asit [92]

1,5 g (0,012 mol) 4-sübstitüefenol 4 ml %50 NaOH çözeltisi içinde çözöldü. Üzerine 1,9 g (0,020 mol) kloroasetik asit porsiyonlar halinde, 40°C'de ilave edildi. İlave bittikten sonra 85°C'de 3 saat boyunca ısıtıldı. Süre sonunda balon içeriğı buzlu suya boşaltıldı ve HCl ilavesi ile çöken ürün süzöldü, kurutuldu ve sonraki basamak için kullanıldı.

2-(4-Metoksifenoksi)asetik asit; verim 1,27 g (%57), erime derecesi 110.5-111 °C.

2-(4-Metilfenoksi)asetik asit; verim 1,19 g (%92), erime derecesi 137.4-137.8 °C.

2-(4-Sübstitüefenoksi)asetil klorür [93]

Her bir türev için 1 ekivalen 2-(4-sübstitüefenoksi)asetik asit, 3 ekivalen oksalil klorür, katalitik miktarda DMF ve 40 ml toluen ilave edilerek argon gaz altında oda sıcaklığında 3 saat karıştırıldı. Süre sonunda toluen uçuruldu ve kalan yağlı ürün bir sonraki basamakta kullanıldı.

N-Karbamotiyoil-2-(4-sübstitüefenoksi)asetamit

3 Ekivalen tiyoüre balona alındı, üzerine 15 ml dioksan ilave edildi. 1 ekivalen uygun 2-(4-sübstitüefenoksi)asetil klorür 4 ml dioksan içinde çözölüp, tiyoüre çözeltisinin üzerine ilave ederek 18 saat kaynatıldı. Süre sonunda balon içeriğı soğutulup buzlu suya boşaltıldı. Çöken madde vakumdan süzöldü, kurutuldu ve bir sonraki basamak için kullanıldı.

N-Karbamotiyoil-2-(4-metoksifenoksi)asetamit; verim 992 mg (%76).

N-Karbamotiyoil-2-(4-metilfenoksi)asetamit; verim 1 g (%82).

N-(4-(Klorometil)tiyazol-2-il)-2-(4-sübstitüefenoksi)asetamit hidroklorür

2 Ekivalen 1,3-dikloroaseton balona alındı, üzerine 20 ml aseton ilave edilip karıştırıldı. Daha sonra porsiyonlar halinde 1 ekivalen uygun N-karbamotiyoil-2-(4-sübstitüefenoksi)asetamit türevi ilave edildi, 18 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı.

Süre sonunda balon içeriği soğutulup süzüldü, kurutuldu ve bir sonraki basamak için kullanıldı.

N-(4-(klorometil)tiyazol-2-il)-2-(4-metoksifenoksi)asetamit hidroklorür; verim 860 mg (%65).

N-(4-(klorometil)tiyazol-2-il)-2-(4-metilfenoksi)asetamit hidroklorür; verim 1 g (%71).

N-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-2-(4-sübstitüefenoksi)asetamit dihidroklorür türevlerinin genel sentez yöntemi (Yöntem A)

1 Ekivalen uygun *N*-(4-(klorometil)tiyazol-2-il)-2-(4-sübstitüefenoksi)asetamit hidroklorür türevi ve 2,5 ekivalen potasyum karbonat balona alınıp üzerine 2 ml dimetilformamit (DMF) ilave edildi ve 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra 1,1 ekivalen *N*-benzilmetilamin ilave edilip 9 saat 40 °C'de ısıtıldı ve bir gece oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği soğutuldu, buzlu suya boşaltıldı, diklorometan ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz susuz sodyum sülfat ile kurutuldu, süzüldü, kuruluğa kadar uçuruldu. Elde edilen yağ uygun solvan içinde alındı ve HCl tuzuna geçilerek katılaştırıldı.

2-(3,4-Dimetoksifenoksi)asetik asit [94]

0,5 g (0,003) 3,4-dimetoksifenol 2 ml %25 NaOH çözeltisi içinde çözüldü. Üzerine 0,5 g (0,005 mol) kloroasetik asit porsiyonlar halinde, 40°C'de ilave edildi. İlave bittikten sonra 80°C'de 3 saat boyunca kaynatıldı. Süre sonunda balon içeriği buzlu suya boşaltıldı ve HCl ilavesi ile çöken ürün süzüldü, kurutuldu ve sonraki basamak için kullanıldı. Verim 390 mg (%56). Erime derecesi 116.4°C-116.8°C'dir.

4-(Klorometil)tiyazol-2-amin hidroklorür [95]

4 g (0,030 mol) 1,3-dikloroaseton balona alınıp üzerine 15 ml metanol ve 30 ml aseton ilavesinin ardından 2 g (0,002 mol) tiyoüre porsiyonlar halinde oda sıcaklığında ilave edildi ve karışım 24 saat karıştırıldı. Süre sonunda solvan uçuruldu ve ürün aseton ile muamele ederek süzüldü, kurutuldu. Verim 4,7 g (%96).

4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-amin

2,5 g (0,02 mol) potasyum karbonat ve 5 ml DMF balona alındı. Üzerine 0,75 ml (0,005 mol) *N*-benzilmetilamin ve 1 g (0,005 mol) 4-(klorometil)tiyazol-2-amin hidroklorür ilave edilip 10 dakika 50 °C derecede ısıtıldı. Sonra bu karışım 18 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği buzlu suya boşaltıldı ve 30 dakika karıştırıldı. Sarı katı vakumdan süzüldü, kurutuldu ve sonraki basamak için kullanıldı. Verim 507 mg (%41).

N-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-2-(3,4-dimetoksifenoksi)asetamit dihidroklorür türevlerinin genel sentez yöntemi (Yöntem B)

1,1 Ekivalen 2-(3,4-dimetoksifenoksi)asetik asit 25 ml diklorometan içinde çözüldü, üzerine 1,2 ekivalen EDC ve 0,2 ekivalen DMAP ilave edildi. Sonra 1 ekivalen 4-((benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-amin ilave edilip 3,5 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda diklorometan uçuruldu ve kalan ham ürün uygun çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Elde edilen sıvı ürün uygun solvan içine alındı ve HCl tuzuna geçirilerek katılaştırıldıktan sonra uygun çözücünden kristallendirildi.

3-(4-Sübstitüefenoksi)propannitril [96]

1 Ekivalen sübstitüefenol ve 0,05 ekivalen Triton B balona alınıp üzerine 5,5 ml akrilonitril ilave edildip argon gaz altında 8 saat kaynatıldı ve bir gece oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği 30 ml eter ile alındı. Üzerine 2 N (10 ml) sodyum hidroksit, 1 N (10 ml) hidroklorik asit ve 10 ml su ilave edilip ekstraksiyon yapıldı. Organik faz ayrıldı ve susuz sodyum sülfat ile kurutuldu. Sonra eter kuruluğa kadar uçurularak ürün elde edildi.

3-(4-Metoksifenoksi)propannitril; verim 1,88 g (%87).

3-(4-Metilfenoksi)propannitril; verim 1.73 g (%77).

3-(4-Sübstitüefenoksi)propanoik asit [97]

1,3 g 3-(4-sübstitüefenoksi)propanenitril balona alındı, üzerine 20 ml hidroklorik asit ilave edilip yaklaşık 6 saat boyunca geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Süre sonunda balon içeriği soğutuldu. Çöken katı vakumdan süzüldü, kurutuldu ve sonraki basamak için kullanıldı.

3-(4-Metoksifenoksi)propanoik asit; verimi 940 mg (%62), erime derecesi 109.6-110°C.

3-(4-Metilfenoksi)propanoik asit; verim 1,3 g (%90), erime derecesi 147.9-149.6 °C.

3-(4-Sübstitüefenoksi)propanoil klorür

Her bir türev için 1 ekivalen 2-(4-sübstitüefenoksi)propanoik asit, 3 ekivalen oksalil klorür, katalitik miktarda DMF ve 40 ml toluen ilave edilerek argon gaz altında oda sıcaklığında 3 saat karıştırıldı. Süre sonunda toluen uçuruldu ve kalan yağlı ürün bir sonraki basamakta kullanıldı.

Metoksi türevi için (CAS 1181631-06-0), Metil türevi için (CAS 189132-56-7).

N-Karbamotiyoil-3-(4-sübstitüefenoksi)propanamit

3 Ekivalen tiyoüre balona alındı, üzerine 15 ml dioksan ilave edildi. Uygun 3-(4-sübstitüefenoksi)propanoil klorür türevi 4 ml dioksan içinde çözülüp, tiyoüre çözeltisinin üzerine ilave edilerek 18 saat kaynatıldı. Süre sonunda balon içeriği soğutulup buzlu suya boşaltıldı. Çöken katı vakumdan süzüldü ve petrol eteri ile ısıtıldıktan sonra süzüldü, kurutuldu ve uygun çözücüden kristallendirildi.

N-karbamotiyoil-3-(4-metoksifenoksi)propanamit; verim 1 g (%77).

N-karbamotiyoil-3-(4-metilfenoksi)propanamit; verim 1,45 g (%73).

N-(4-(Klorometil)tiyazol-2-il)-3-(4-sübstitüefenoksi)propanamit

2 Ekivalen 1,3-dikloroaseton balona alındı, üzerine 20 ml aseton ilave edilip karıştırıldı. Daha sonra porsiyonlar halinde 1 ekivalen uygun N-karbamotiyoil-3-(4-sübstitüefenoksi)propanamit türevi ilave edildi 20 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı.

Süre sonunda balon içeriği soğutulup uçuruldu, çöken katı aseton ile alındı, süzüldü, kurutuldu. Her iki türev de TEA ilavesiyle DCM içinde tuzundan kurtarıldı ve uygun solvandan kristallendirildi.

N-(4-(*klorometil*)*tiyazol-2-il*)-3-(4-*metoksifenoksi*)*propanamit*; verim 750 mg (%64).

N-(4-(*klorometil*)*tiyazol-2-il*)-3-(4-*metilfenoksi*)*propanamit*; verim 1,2g (%90).

N-(4-((Benzil(metil)amino)metil)*tiyazol-2-il*)-3-(4-sübstitüefenoksi)*propanamit*
dihidroklorür türevlerinin genel sentez yöntemi (Yöntem C)

1 Ekivalen uygun *N*-(4-(*klorometil*)*tiyazol-2-il*)-3-(4-sübstitüefenoksi)*propanamit* türevi 4 ml DMF içinde çözüldü. Çözeltiye 1,1 ekivalen sezyum karbonat ilave edilerek 15 dakika karıştırıldı. Süre bittikten sonra 1,1 ekivalen *N*-benzilmetilamin ilave edildi ve 4 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği suya boşaltıldı. Diklorometan ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra solvan kuruluğa kadar uçuruldu, kalan yağ uygun çözücü sistemi kullanılarak kolon koromatografisi ile saflaştırıldı ve HCl tuzuna geçirilerek katılaştırıldı. Elde edilen ürün uygun solvandan kristallendirildi.

4-(4-Metoksifenil)-4-oksobütanoik asit [98]

3,5 ml (0,025 mol) anisol balona alındı ve buz banyosuna yerleştirildi. Bir beherde 7 g (0,05 mol) alüminyum klorür ve 2,95 g (0,03 mol) süksinik anhidrit karıştırıldı. Sonra bu karışım porsiyonlar halinde balona ilave edildi. İlave bittikten sonra 5 dakika 50 °C derecede ısıtıldı. Daha sonra 30 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği buzlu suya boşaltıldı ve HCl ile nötralize edildi, çöken katı süzüldü, kurutuldu ve sulu etanol ile kristallendirildi. Verim 1,1 g (%21).

4-(4-Metilfenil)-4-oksobütanoik asit [98]

3,5 ml (0,025 mol) toluen balona alındı ve buz banyosuna yerleştirildi. Bir beherde 7 g (0,05 mol) alüminyum klorür ve 2,95 g (0,03 mol) süksinik anhidrit karıştırıldı. Sonra bu karışım porsiyonlar halinde balona ilave edildi. İlave bittikten sonra 5 dakika 50 °C derecede ısıtıldı. Daha sonra 30 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği buzlu suya boşaltıldı ve HCl ile nötralize edildi, çöken katı süzüldü, kurutuldu ve toluen ile kristallendirildi. Verim 1,8 g (%37).

4-(3,4-Dimetoksifenil)-4-oksobütanoik asit [99]

5 ml (0,04 mol) 1,2-Dimetoksibenzen balona alındı ve buz banyosuna yerleştirildi. Bir beherde 7,3 g (0,05 mol) alüminyum klorür ve 2,74 g süksinik anhidrit karıştırıldı. Sonra bu karışım porsiyonlar halinde balona ilave edildi. İlave bittikten sonra 2 ml diklorometan ilave edilip 1,5 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği buzlu suya boşaltıldı ve HCl ile nötralize edildi, çöken katı süzüldü, kurutuldu ve bütanol'den kristallendirildi. Verim 1,2 g (%12).

N-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-4-(4-sübstitüefenil)-4-oksobütanamit türevlerinin genel sentez yöntemi (Yöntem D)

1 Ekivalen 4-((benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-amin, 1,2 ekivalen EDC, 0,2 ekivalen DMAP, 1,1 ekivalen uygun 4-(4-sübstitüelfenil)-4-oksobütanoik asit türevi ve 25 ml DCM kullanılarak yöntem B'ye göre sentez edildi. Süre sonunda diklorometan uçuruldu. Elde edilen yağ üzerine uygun çözücü ilave edilerek katılaştırıldı ve uygun solvandan kristallendirildi.

3.2. Analitik Kontroller

3.2.1. Erime derecesi tayini

Bileşiklerin erime dereceleri Stuart Automatic Melting Point SMP-50 dijital erime derecesi tayin cihazı ile tayin edildi ve olduğu gibi verildi.

3.2.2. İnce tabaka kromatografisi ile yapılan kontroller

Kimyasal sentez çalışmalarında ve bileşiklerin saflık kontrollerinde Silikajel 60 F254 (Merck) hazır alüminyum plaklar kullanıldı. Çözücü sistemi olarak benzen:metanol (45:5) kullanıldı. Lekelerin belirlenmesinde UV ışığından (254 ve 366 nm) ve Dragendorf belirtecinden yararlanıldı.

3.2.3. Spektroskopik yöntemler

¹H-NMR spektrumları

Spektrumlar, maddelerin DMSO-d₆ veya CDCl₃ içindeki çözeltilerinden yararlanılarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki Varian Mercury 400, 400 MHz FT-NMR spektrometresinden kaydedildi.

¹³C-NMR spektrumları

Spektrumlar, maddelerin DMSO-d₆ veya CDCl₃ içindeki çözeltilerinden yararlanılarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki Varian Mercury 400, 100 MHz FT-NMR spektrometresinden kaydedildi.

3.2.4. Elementel analizler

Bileşiklerin elementel analizleri CHNS-932 (LECO) Elementel Analiz Cihazı ile Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında yapıldı.

3.2.5. Yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumları

Bileşiklerin tam kütle ölçümleri, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki ultra performanslı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UPLC) (Waters Corporation, Milford, USA) ile birleştirilmiş Micromass LCT Premier XE, Waters (Milford, MA, USA) marka yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresinde (HRSM), elektron sprey iyonizasyon (ESI) yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.3.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite tayini

Kullanılan maddeler

Üretici

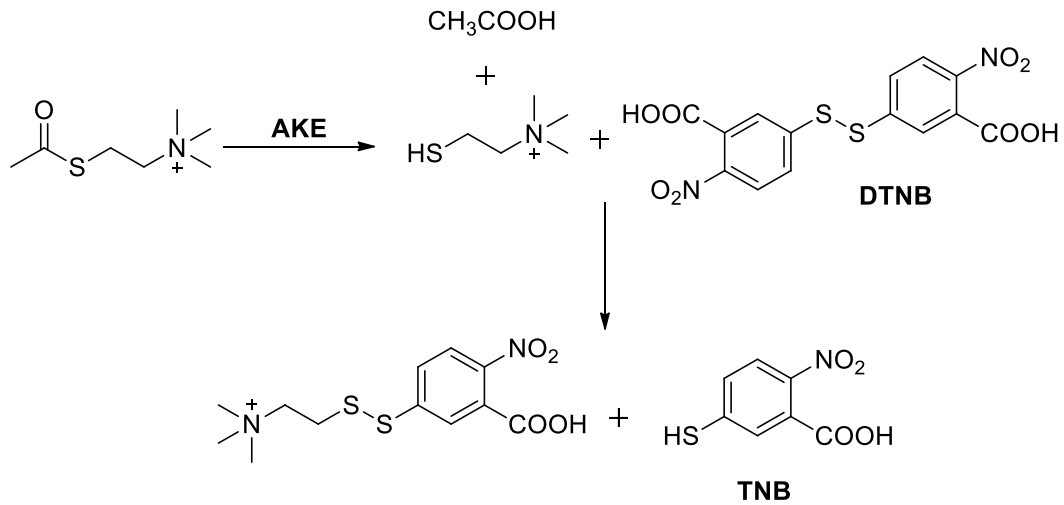
Asetilkolinesteraz Enzimi (Electrophorus electricus, tip VI-S, 200-1,000 ünite/mg protein)	Sigma Aldrich
Bütirilkolinesteraz Enzimi (At serumu, ≥900 ünite/mg protein)	Sigma Aldrich
Asetiltiyokolin iyodür (ATK)	Sigma Aldrich
Bütiriltiyokolin iyodür (BTK)	Sigma Aldrich
5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Sigma Aldrich
Galantamin hidrobromür	Sigma Aldrich
Donepezil hidroklorür monohidrat	Sigma Aldrich
Magnezyum klorür anhidrit	Sigma Aldrich
Tris(hidroksimetil) aminometan (Tris HCl)	Sigma Aldrich
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma Aldrich
Sodyum klorür	Sigma Aldrich

Kullanılan Aletler

Marka ve Model

Ultra saf su cihazı	Mes mp MINIpure
Mikroplak okuyucu	Molecular Devices Versamax Tunable Microplate Reader

Sentezlerini gerçekleştirdiğimiz bileşiklerin AKE ve BKE inhibitör aktiviteleri, spektrofotometrik bir yöntem olan Ellman testi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde asetilkolinesteraz enzimi substrat olarak kullanılan asetiltiyokolini hidroliz eder ve sonucunda açığa çıkan tiyokolin, Ellman reaktifi olarak da bilinen 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşturur. TNB oluşumu ile açığa çıkan sarı renk 412 nm'de ölçülür, renk şiddeti AKE aktivitesi ile doğru orantılıdır. Deneydeki reaksiyon mekanizması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Ellman testi reaksiyon mekanizması

Asetilkolinesteraz inhibisyonunun tayini

Deneylerde kullanılmak üzere 50 mM Tris HCl (pH 8,0) tampon çözeltisi kullanılmıştır. Tampon 4°C'de muhafaza edilir. 6,8 mM DTNB çözeltisi (100 mM NaCl ve 20 mM MgCl₂ içeren), tampon çözelti kullanılarak her kullanımdan önce taze olarak hazırlanır. AKE substratı olarak; 10 mM ATK, soğuk su ile çözülerek her kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır. AKE enzimi (500 U/mg), deneylerde doğrudan kullanılmak üzere, tampon çözelti ile gerekli seri seyreltme işlemlerinden sonra, 0,5 U/ml derişimli 0,5 ml'lik kısımlar halinde endorf tüplere alınarak -80 °C'de saklanmıştır. Kullanım öncesinde gerekli miktarda enzim çözeltisi 0 °C'ye alınarak çözdürülmüştür. Referans olarak, 1 mM galantamin ve 1 mM donepezil çözeltisi su ile çözülerek hazırlanılmış ve 0 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada test edilecek bileşiklerin 1 mM konsantrasyonlu stok çözeltileri (final

hacimde 10 μ M) DMSO kullanılarak hazırlanmıştır. Ancak test çözeltilerinin hazırlanmasında AKE aktivitesini etkilememesi için DMSO miktarının final hacmin %1'ini aşmamasına dikkat edilmiştir. Her ölçüm üç tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir. Aktivite çalışmasında 96 kuyucuklu mikropak kullanılmıştır. Her kuyucukta final hacim 200 μ l olacak şekilde; 168 μ l tampon, 10 μ l DTNB, 10 μ l AKE ve 2 μ l test çözeltisi ilave edilir. İlk üç kuyucuk kör olarak kullanılmak üzere AKE çözeltisi içermeyecek şekilde, sonraki 3 kuyucuk tam aktivite olarak kullanılmak üzere test çözeltisi yerine 2 μ l solvan eklenerek hazırlanmıştır. Referans olarak kullanılmak üzere ise galantamin ve donepezil çözeltisi içeren 3'er kuyucuk daha hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyon sonrasında tüm kuyucuklara 10 μ l ATK hızla ilave edilerek, 412 nm dalga boyunda, 25 C° sıcaklıkta, her 30 saniyede bir tarama olacak şekilde, 10 dakika boyunca absorbans değerleri ölçülmüştür.

Bütirilkolinesteraz inhibisyonunun tayini

Deneylerde kullanılmak üzere 50 mM Tris HCl (pH 8.0) tampon çözeltisi kullanılmıştır. Tampon 4°C'de muhafaza edilir. 6,8 mM DTNB çözeltisi (100 mM NaCl ve 20 mM MgCl₂ içeren), tampon çözelti kullanılarak her kullanımdan önce taze olarak hazırlanır. BKE substratı olarak; 30 mM BTK, soğuk su ile çözülerek her kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır. BKE enzimi (132 U/mg), deneylerde doğrudan kullanılmak üzere, tampon çözelti ile gerekli seri seyreltme işlemlerinden sonra, 0,5 U/ml derişimli 0,5 ml'lik kısımlar halinde ependorf tüplere alınarak -80 °C'de saklanmıştır. Kullanım öncesinde gerekli miktarda enzim çözeltisi 0 °C'ye alınmıştır. Referans olarak 1 mM galantamin ve 1 mM donepezil çözeltisi su ile çözülerek hazırlanılmış ve 0 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada test edilecek bileşiklerin 1 mM konsantrasyonlu stok çözeltileri (final hacimde 10 μ M) DMSO kullanılarak hazırlanmıştır. Ancak test çözeltilerinin hazırlanmasında BKE aktivitesini etkilememesi için DMSO miktarının final hacmin %1'ini aşmamasına dikkat edilmiştir. Her ölçüm üç tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir. Aktivite çalışmasında 96 kuyucuklu mikropak kullanılmıştır. Her kuyucukta final hacim 200 μ l olacak şekilde; 168 μ l tampon, 10 μ l DTNB, 10 μ l BKE ve 2 μ l test çözeltisi ilave edilir. İlk üç kuyucuk kör olarak kullanılmak üzere BKE çözeltisi içermeyecek şekilde, sonraki 3 kuyucuk tam aktivite (kontrol) olarak kullanılmak üzere test çözeltisi yerine 2 μ l solvan eklenerek hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere ise galantamin ve donepezil çözeltisi içeren 3'er kuyucuk daha

hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyon sonrasında tüm kuyucuklara 10 µl BTK hızla ilave edilerek, 412 nm dalga boyunda, 25 C° sıcaklıkta, her 30 saniyede bir tarama olacak şekilde, 10 dakika boyunca absorbans değerleri ölçülmüştür.

Kolinesteraz inhibitör etki hesaplanması

Kolinesteraz inhibitör aktivite test sonuçlarının hesaplanması AKE ve BKE inhibitör aktivitelerinin değerlendirilmesinde her plaka için, tam aktivite (kontrol) absorbans değerinin 0,8'e en yakın ölçüldüğü dakikanın verileri hesaplamalar için kullanılmıştır. Hesaplama kullanılan tüm absorbans değerlerinden kör çözeltisinin absorbansı çıkartılarak düzeltme yapılmıştır. Bileşiklerin oluşturduğu enzim inhibisyon yüzdeleri aşağıda belirtilen "Eş.3.1" denklemine göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Inhibisyon} = 100 \times (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{inhibitör}}) / A_{\text{kontrol}} \quad (3.1)$$

Bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin tayini

10 µM'da %50'nin üzerinde AKE veya BKE inhibisyonu gerçekleştiren bileşiklerin IC₅₀ değerleri ölçülmüştür. Ölçümlerde, inhibisyon tayininde belirtilen deney yöntemi kullanılmıştır. Bileşiklerin IC₅₀ değerleri, GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California USA) programında, bileşik derişiminin logaritmasına karşı elde edilen % inhibisyon verilerinin non-linear regresyonu ile oluşturulan sigmoid doz-cevap grafikleri kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.2. Sitotoksite çalışmaları

Materyal

RPMI 1640, with L-glutamine (RPMI-A, Capricorn)

Horse Serum (HOS-1A, Capricorn)

Fetal Bovine Serum Advanced, Heat Inactivated (FBS-HI-11B, Capricorn)

L-glutamin, 200 mM (GLN-B, Capricorn)

Penisilin/Streptomisin (100x) (PS-B, Capricorn)

T25 - 25 cm² Hücre Kültür Kabı (07-8025, Biologix)

15 ml Falkon Tüpü

50 ml Falkon Tüpü

96-kuyucuklu Hücre Kültür Kabı (Cat No. 655 180, Greiner Bio-one)

10 µl filtreli pipet ucu

200 µl filtreli pipet ucu

1000 µl filtreli pipet ucu

Mikropipetler

Serolojik pipet

Biotium MTT Cell Viability Assay Kit

Hücre hattı

Çalışmada kullanılan PC12 (Rat adrenal pheochromocytoma) hücre hattı yurtdışından temin edilmiştir (ECACC, Cat.No.88022401).

Hücre kültürü besi ortamının hazırlanması

Hücre kültürü vasatı RPMI 1640 içine son konsantrasyonu %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin, son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde L-glutamin ve son konsantrasyonu %5 olacak şekilde 0,45 µM gözenek çaplı steril filtreden süzülerek fetal bovin serumu (FBS) ve %10 Horse serum ilave edildi.

Hücre kültürü ve sitotoksite çalışması (MTT hücre proliferasyon testi)

Çalışmada Biotium MTT Cell Viability Assay Kit (Cat No. PI-30006) kullanılarak PC12 (Rat adrenal pheochromocytoma) hücre canlılıkları spektrofotometrik olarak test edilmiştir. PC12 hücre hattını çoğaltmak amacıyla cryotüp içerisinde donmuş halde bulunan hücreler, temin edilen kültür koleksiyonunun önerdiği şekilde besi yeri içerisine ekilerek çoğaltıldı. Canlılık kontrolü ve hücre sayımı için 0,9 ml numune alındı, alınan numune içine 0,1 ml tripan mavisi konuldu ve hemasitometre kullanılarak ışık mikroskopunda hücre sayımı yapıldı. Sentezlenen bileşiklerin 2 farklı dozu (5 µM ve 10 µM) DMSO içinde hazırlandı.

Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler serumsuz besi yerine ekildikten sonra bileşikler uygulanarak (99 µl serumsuz besi yerine 1 µl bileşik olacak şekilde) 24 saat inkübe edildi. Çözücü olarak kullanılan DMSO toksik olmayan dozda kullanılmıştır. Bileşiklerin uygulandığı hücrelere inkübasyon süreleri sonunda MTT eklenerek, 4 saat'lik inkübasyonu takiben ortamda oluşan boya kristalleri 200 mL DMSO ile çözüldü ve bir mikropipetle okuyucusu (Thermofisher Scientific, Finland) ile 570 nm'de optik yoğunluk ölçüldü. Bütün gruplar en az 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Hücre canlılığı aşağıdaki "Eş.3.2" formülü kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = 100 \times \frac{(OD_{\text{test}} - OD_{\text{kör}})}{(OD_{\text{kontrol}} - OD_{\text{kör}})} \quad (3.2)$$

3.3.3. Antienflamatuvar aktivite çalışması

Sentezlenen bileşikler hücre hattı THP-1 (insan monositik hücre hattı) (ATCC® TIB-202™) üzerinde 10 µM son konsantrasyonda denenerek IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha ve NO seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür.

Materyal

RPMI 1640, with L-glutamine (RPMI-A, Capricorn)

Fetal Bovine Serum Advanced, Heat Inactivated (FBS-HI-11B, Capricorn)

L-glutamin, 200 mM (GLN-B, Capricorn)

Penisilin/Streptomisin (100x) (PS-B, Capricorn)

T25 - 25 cm² Hücre Kültür Kabı (07-8025, Biologix)

15 ml Falkon Tüpü

50 ml Falkon Tüpü

24-kuyucuklu Hücre Kültür Kabı (Greiner Bio-one)

10 µl filtreli pipet ucu

200 µl filtreli pipet ucu

1000 µl filtreli pipet ucu

Mikropipetler

Serolojik pipet

Lipopolisakkarit Escherichia Coli O111:B4 (Millipore, LPS25)

Tümör Nekrozis Faktör Alpha ELISA Kit (BTLAB, E0082Hu)

İnterlökin 6 ELISA Kit (BTLAB, E0090Hu)

İnterlökin 1 Beta ELISA Kit (BTLAB, E0143Hu)

Nitrik Oksit ELISA Kit (BTLAB, E1510Hu)

Hücre hattı

THP-1 hücre hattı ATCC hücre kültür koleksiyonundan (ATCC® TIB-202™) elde edilmiştir.

Hücre kültürü, LPS stimülasyonu ve sitokin ölçümü

THP-1 hücreleri, %5 CO₂, 37 ° C'de %10 ısı ile inaktive FBS (fetal bovin serumu) ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren RPMI 1640 içinde kültüre edildi. 24 kuyucuklu plakta, her bir kuyucuya 40,000 THP-1 hücresi ekildi. Uygulama öncesi hücrelerin 24 saat boyunca ortama alışmaları sağlandı. THP-1 hücreleri konfluense ulaştığında serolojik pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüp'e toplanır. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra FBS içeren eski besiyeri uzaklaştırılarak hücreler serum içermeyen besiyeri içerisinde süspanse edildi. Her bir kuyucuğa 4 x 10⁴ hücre olacak şekilde hücreler ekildi. Hücreler ekilirken 99 µl besiyeri içerisine 1 µl bileşikler (10 µM) ve donepezil (10 µM) uygulaması yapıldı. 1 saat boyunca %5 CO₂, 37 °C inkübatörde inkübasyonu sağlandı. LPS ile enflamasyon indüklenmesi için 1mg/mL stok LPS konsantrasyonu 100 ng/mL son konsantrasyonda olacak şekilde kuyucuklara uygulandı. 24 saat inkübasyonu sağlandı. Deney grupları; madde ve LPS uygulanmamış kontrol grubu, sadece LPS uygulanmış grup, LPS + 10 µM donepezil referans grubu ve LPS + 10 µM bileşik grupları oluşturuldu. 24 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerin bulunduğu plakalar inkübatörden alındı. Hücreler besiyeri ile beraber toplanarak 4000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Hücre pelletine dokunulmadan supernatant ayrı bir 1,5 mL ependorf tüp içerisine toplandı ve ELISA aşamasına geçildi. Human interlökin 1 beta, Human interlökin 6, Human tümör nekrozis faktör Alpha, Human nitrik oksit seviyeleri ELISA kit protokolü izlenerek ölçüldü. Aşağıdaki tabloda kit bilgileri verilmiştir. Kit içerisinde

gelen plak, araştırılan biyomolekölün antikoruna ile önceden kaplanmıştır. Örnekte bulunan biyomolekül kuyucuklara eklendiğinde, kuyucuklardaki önceden kaplanan antikorlara bağlanır. Sonra araştırılan biyomolekölün biyotinle işaretlenmiş antikoruna eklenir ve numunedeki biyomoleküle bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklendiğinde biyomolekölün biyotinle işaretlenmiş antikoruna bağlanır. Bir inkübasyon aşamasından sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama işlemiyle uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi ilave edilir ve araştırılan biyomolekölün miktarıyla orantılı olarak renklenme olur. Renklenme reaksiyonu, asidik durdurma çözeltisi ilave edilerek sonlandırılır. Optik dansite (OD), 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri, araştırılan molekülün konsantrasyonu ile orantılıdır. Numune içerisindeki araştırılan biyomolekölün seviyesini belirlemek için, kullanılan standartların konsantrasyonu ve bu standartların OD değeri yatay-dikey eksen üzerine grafik çizilerek hesaplanabilmektedir. Standart konsantrasyonların ve OD değerlerinin grafikteki kesiştiği noktalara göre en uygun eğri çizilerek standart bir eğri oluşturulmuştur. Numunelerin OD'si standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki araştırılan molekülün konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. ELISA için kullanılan kit bilgileri

Kullanılan Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No	Duyarlılık
Bt-Laboratory	Human İnterlökin 1 Beta ELISA Kit	E0143Hu	10.07 pg/mL
Bt-Laboratory	Human İnterlökin 6 ELISA Kit	E0090Hu	1.03 pg/mL
Bt-Laboratory	Human Tümör Nekrozis Faktör Alpha ELISA Kit	E0082Hu	1.52 pg/mL
Bt-Laboratory	Human Nitrik Oksit ELISA Kit	E1510Hu	1.12 μ mol/L

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS ve 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD) ile yapıldı. Veriler, en az üç tekrarlı testten ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Grup farklılıklarının önemi tek yönlü ANOVA ile değerlendirildi ve Posthoc test olarak Tukey testi gruplar arası karşılaştırmalar için kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak belirlendi.

3.3.4. Metal şelasyon çalışması

Yöntem

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve ZnCl_2 etanol ile çözülerek 200 μM derişimde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Test edilecek bileşikler önce DMSO ile çözüldükten sonra etanol ile seyreltilerek, 400 μM 'lık stok çözeltileri hazırlanmıştır. Final hacimde 40 μM test bileşiğı ve ekivalen miktarda metal (1:1) karışımının UV spektrumlarının ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 100 μL bileşik çözeltisi, 200 μL metal çözeltisi ve 700 μL etanol karışımı 25 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbans değeri 230-500 nm aralığında (5 nm'lik artışla), Molecular Devices SpectraMax i3x Multi-Mode Detection Platform cihazı kullanılarak kaydedilmiştir. Kontrol çözeltileri olarak 100 μL bileşik çözeltisi veya 200 μL metal çözeltisi etanol ile final hacime tamamlanarak (1 ml) kullanılmıştır. Kör çözeltisi olarak 4 μL DMSO ve 996 μL etanol karışımı kullanılmış ve tüm spektrumlardan çıkarılmıştır [100]. Test bileşiğine ait spektrum ve ilgili bileşik+metal çözeltilisine ait spektrumların dalga boyuna (nm) karşılık absorbans grafikleri hazırlanmıştır.

3.4. Moleküler Docking Çalışması

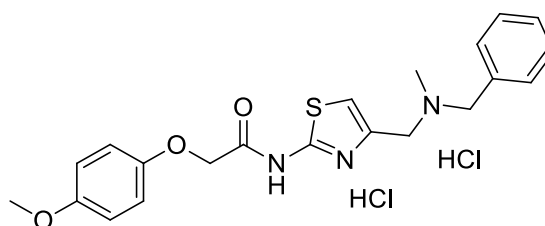
Moleküler kenetlenme (docking) çalışmalarında kullanılan asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzimlerinin kristal yapıları sırasıyla 1EVE [101] ve 4BDS [102] erişim kodlarıyla RCBS protein veri bankasından (<http://www.rcsb.org/pdb>) alınmıştır. Moleküler docking çalışmaları Molecular Operating Environment (MOE) [103] programı ile gerçekleştirilmiştir. Ligand veya enzimden 4.5 Å mesafeden daha uzakta bulunan bağı

bileşikler ve su molekülleri enzimlerin kristal yapısından silinmiştir. Enzim-ligand kompleksi protonlanmış ve AMBER99 kuvvet alanı ile minimize edilmiştir. Enzim yükleri AMBER99, ligand yükleri ise MMF94X kuvvet alanları kullanılarak saptanmıştır. Enzimlerin aktif bölgesi, MOE yazılımı içerisinde yer alan “site finder” modülü ile tespit edilmiştir. Her bir ligand için enzimin aktif bölgesine en iyi kenetlenen 30 ligand pozunu, triangle matcher algoritması ile London dG ve GBVI/WSA dG skorumları kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen bütün pozlar incelenmiş ve her bileşiğin en düşük bağlanma enerjisine sahip en iyi skorlanmış pozunu ilgili enzimle etkileşimlerinin araştırılması için seçilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Kimyasal Bulgular

4.1.1. *N*-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-2-(4-metoksifenoksi)asetamit dihidroklorür (Bileşik 1)



0,3 g (0,0008 mol) *N*-(4-(klorometil)tiyazol-2-il)-2-(4-metoksifenoksi)asetamit hidroklorür, 0,3 g (0,002 mol) potasyum karbonat ve 125 µl (0,0009 mol) *N*-benzimetilamin kullanarak 2 ml DMF içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Elde edilen yağ aseton içinde alındı ve HCl tuzuna geçilerek katılaştırıldı. Verim 146 mg (%36). Erime derecesi=123-150 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 12.58 (s, 1H, amit NH), 11.34 (s, 1H, t-amin tuzu NH), 7.70-7.68 (m, 2H, $\text{H}^{3'}$, $\text{H}^{5'}$), 7.57 (s, 1H, $\text{H}^{\text{tiyazol}}$), 7.45-7.42 (m, 3H, $\text{H}^{2'}$, $\text{H}^{4'}$, $\text{H}^{6'}$), 6.90-6.84 (m, 4H, H^2 , H^3 , H^5 , H^6), 4.83 (s, 2H, OCH_2CO), 4.46-4.18 (m, 4H, tiyazol- CH_2 -N, N- CH_2 -fenil), 3.67 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2.58 (d, 3H, $J=4.0$ Hz, N- CH_3).

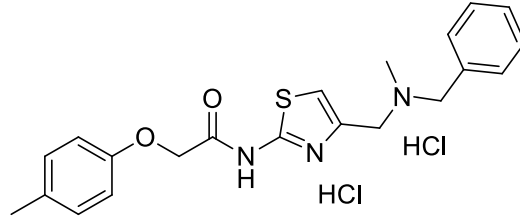
^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 167.40, 157.74, 153.71, 151.59, 139.56, 131.36, 130.10, 129.32, 128.62, 117.41, 115.40, 114.50, 66.54, 57.41, 55.25, 52.09.

$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ için HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ Hesaplanan: 398.1538 Bulunan: 398.1535

Elementel Analiz

$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	Hesaplanan %	C=53.62	H=5.36	N=8.93	S=6.82
$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{S} \cdot 2\text{HCl}$	Bulunan %	C=53.89	H=5.74	N=9.08	S=6.77

4.1.2. *N*-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-2-(*p*-metilfenol)asetamit dihidroklorü (Bileşik 2)



0,4 g (0,001 mol) *N*-(4-(klorometil)tiyazol-2-il)-2-(4-metilfenoksi)asetamit hidroklorür, 0,4 g (0,002 mol) potasyum karbonat ve 175 µl (0,001 mol) *N*-benzilmetilamin kullanarak 2,5 ml DMF içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Elde edilen yağ aseton içinde alındı ve HCl tuzuna geçilerek katılaştırıldı. Verim 118 mg (%22). Erime derecesi= 158.1-173 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 12.61 (s, 1H, amit NH), 11.35 (s, 1H, t-amin tuzu NH), 7.70-7.68 (m, 2H, $\text{H}^{3'}$, $\text{H}^{5'}$), 7.57 (s, 1H, $\text{H}^{\text{tiyazol}}$), 7.45-7.42 (m, 3H, $\text{H}^{2'}$, $\text{H}^{4'}$, $\text{H}^{6'}$), 7.08 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, H^3 , H^5), 6.83 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, H^2 , H^6), 4.86 (s, 2H, -OCH₂CO), 4.45-4.41 (m, 4H, tiyazol-CH₂-N, N-CH₂-fenil), 2.58 (d, 3H, $J=4.0$ Hz, N-CH₃), 2.20(s, 3H, CH₃-Ø).

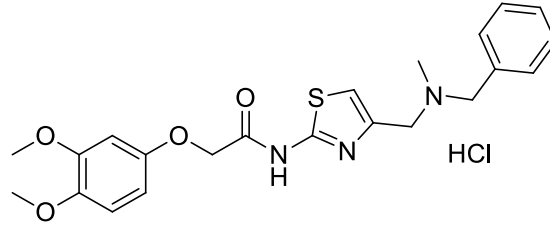
^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 167.28, 157.73, 155.50, 139.55, 131.35, 130.10, 129.84, 129.74, 129.30, 128.61, 117.41, 114.21, 65.94, 57.39, 52.06, 19.95.

$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ için HRMS (m/z) [$\text{M}+\text{H}$]⁺ Hesaplanan: 382.1589 Bulunan: 382.1580

Elementel Analiz

$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S} \cdot 2\text{HCl}$	Hesaplanan %	C=55.85	H=5.55	N=9.50	S=7.06
	Bulunan %	C=55.99	H=5.73	N=9.39	S=6.79

4.1.3. N-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-2-(3,4-dimetoksifenoksi)asetamit hidroklorür (Bileşik 3)



1 g (0,005 mol) 2-(3,4-dimetoksifenoksi)asetik asit, 1g 4-((benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-amin, 1 g (0,005 mol) EDC ve 100 mg (0,0008 mol) DMAP kullanarak 25 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Diklorometan:metanol (99:1) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile temizlendi. Elde edilen sıvı ürün eter içine alındı ve HCl tuzuna geçirilerek katılaştırıldı. Asetondan kristallendirildi. Verim 1,100 mg (%55). Erime derecesi 199.5-200.1°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 12.55 (s, 1H, amit NH), 11.26 (s, 1H, t-amin tuzu NH), 7.69-7.67 (m, 2H, $\text{H}^{3'}$, $\text{H}^{5'}$), 7.57 (s, 1H, $\text{H}^{\text{tiyazol}}$), 7.45-7.43 (m, 3H, $\text{H}^{2'}$, $\text{H}^{4'}$, $\text{H}^{6'}$), 6.83 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, H^5), 6.66 (d, 1H, $J=2.8$ Hz, H^2), 6.42 (dd, 1H, $J=8.8$ Hz, $J=2.8$ Hz, H^6), 4.84 (s, 2H, OCH_2CO), 4.45-4.19 (m, 4H, tiyazol- CH_2 -N, N- CH_2 -fenil), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 2.59 (broad s, 3H, N- CH_3).

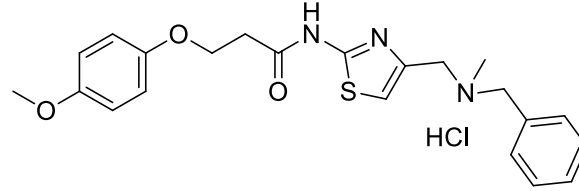
^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 167.43, 157.85, 152.17, 149.65, 143.62, 139.69, 131.43, 130.20, 129.43, 128.72, 117.52, 112.51, 104.01, 101.26, 66.60, 57.59, 56.03, 55.53, 52.29.

$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ için HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ Hesaplanan: 428.1644 Bulunan: 428.1649

Elementel Analiz

	Hesaplanan %	C=56.95	H=5.65	N=9.06	S=6.91
$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{S.HCl}$	Bulunan %	C=56.77	H=5.77	N=9.08	S=6.87

4.1.4. *N*-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-3-(4-metoksifenoksi)propanamit hidroklorür (Bileşik 4)



1 g (0,003) *N*-(4-(klorometil)tiyazol-2-il)-3-(4-metoksifenoksi)propanamit, 1 g (0,003 mol) sezyum karbonat ve 435 µl (0,002) *N*-benzilmetilamin kullanılarak 4 ml DMF içinde yöntem C'ye uygun olarak sentezlendi. Elde edilen ham ürün diklorometan:metanol (99:1) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile temizlendi. Elde edilen sıvı ürün eter içine alındı ve HCl tuzuna geçirilerek katılaştırıldı. Asetondan kristallendirildi. 180 mg elde edildi, verim %12'dir. Erime derecesi 207.2-208°C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 12.43 (s, 1H, amit NH), 11.22 (s, 1H, t-amin tuzu NH), 7.69-7.67 (m, 2H, H^{3'}, H^{5'}), 7.53 (s, 1H, H^{tiyazol}), 7.45-7.43 (m, 3H, H^{2'}, H^{4'}, H^{6'}), 6.87-6.81 (m, 4H, H², H³, H⁵, H⁶), 4.45-4.19 (m, 6H, -OCH₂, tiyazol-CH₂-N, N-CH₂-fenil), 3.67 (s, 3H, -OCH₃), 2.92 (t, 2H, *J*=6.2 Hz, CH₂-CO-N), 2.58 (d, 3H, *J*=3.2 Hz, N-CH₃).

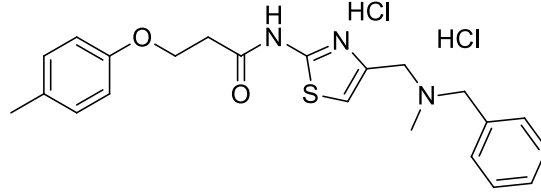
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 169.31, 158.20, 153.36, 152.12, 139.41, 131.32, 130.12, 129.33, 128.63, 117.10, 115.30, 114.49, 63.70, 57.46, 55.23, 52.23, 35.067.

C₂₂H₂₅N₃O₃S için HRMS (m/z) [M+H]⁺ Hesaplanan: 412.1695 Bulunan: 412.1695

Elementel Analiz

C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₃ S.HCl	Hesaplanan %	C=58.99	H=5.85	N=9.38	S=7.16
	Bulunan %	C=59.16	H=6.06	N=9.33	S=7.01

4.1.5. *N*-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-3-(*p*-metilfenoksi)propanamit dihidroklorür (Bileşik 5)



0,5 g (0,0016 mol) *N*-(4-(klorometil)tiyazol-2-il)-3-(4-metilfenoksi)propanamit, 0,57 g (0,0017 mol) sezyum karbonat ve 230 µl (0,0017) *N*-benzilmetilamin 4 ml DMF içinde yöntem C'ye uygun olarak sentezlendi. Elde edilen yağ aseton ile alındı, üzerine eter ilave edildi ve süzüldü. Süzüntü HCl tuzuna geçilerek katılaştırıldı, süzüldü ve eterden kristallendirildi. Verim 120 mg (%16). Erime derecesi 125 -179.6 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 12.46 (s, 1H, amit NH), 11.32 (s, 1H, t-amin tuzu NH), 7.70-7.67 (m, 2H, H^{3'}, H^{5'}), 7.53 (s, 1H, H^{tiyazol}), 7.44-7.42 (m, 3H, H^{2'}, H^{4'}, H^{6'}), 7.05 (d, 2H, *J*=8.2 Hz, H³, H⁵), 6.80 (d, 2H, *J*=8.2 Hz, H², H⁶), 4.45-4.17 (m, 6H, OCH₂, tiyazol-CH₂-N, N-CH₂-fenil), 2.93 (t, 2H, *J*=6.2 Hz, CH₂CO-N), 2.57 (d, 3H, *J*=4.0 Hz, N-CH₃), 2.20 (s, 3H, -CH₃-Ø).

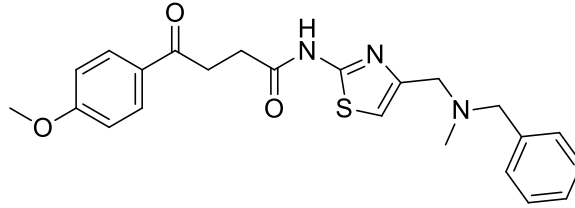
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 169.29, 158.17, 156.01, 139.40, 131.34, 130.12, 129.73, 129.31, 129.25, 128.61, 117.10, 114.17, 63.13, 57.39, 52.16, 34.98, 19.96.

C₂₂H₂₅N₃O₂S için HRMS (m/z) [M+H]⁺ Hesaplanan: 396.1746 Bulunan: 396.1744

Elementel Analiz

	Hesaplanan %	C=54.62	H=6.01	N=8.64	S=6.59
C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₂ S.2HCl.1H ₂ O	Bulunan %	C=54.64	H=6.29	N=8.79	S=6.59

4.1.6. *N*-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-4-(4-metoksifenil)-4-oksobütanamit (Bileşik 6)



1 g (0,0048 mol) 4-(4-metoksifenil)-4-oksobutanoik asit, 1 g (0,005 mol) EDC, 100 mg (0,0008 mol) DMAP ve 1g (0,004 mol) 4-((benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-amin kullanarak 25 ml diklorometan içinde yöntem D'ye uygun olarak sentezlendi. Süre sonunda diklorometan uçuruldu, üzerine aseton:hekzan ilave edilerek katılaştırıldı ve etil asetat:hekzandan kristallendirildi. Verim 210 mg (%10). Erime derecesi 138.8-139.4 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 12.20 (s, 1H, NH), 7.96 (d, 2H, *J*=9.0 Hz H², H⁶), 7.34-7.20 (m, 5H, H^{2'}, H^{3'}, H^{4'}, H^{5'}, H^{6'}), 7.03 (d, 2H, *J*=9 Hz, H³, H⁵), 6.94 (s, 1H, H^{tiyazol}), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.52 (s, 4H, tiyazol-CH₂-N, N-CH₂-fenil), 3.31 (t, 2H, *J*=6.4 Hz, -COCH₂-CH₂), 2.76 (t, 2H, *J*=6.4 Hz, -COCH₂-CH₂), 2.11 (s, 3H, NCH₃).

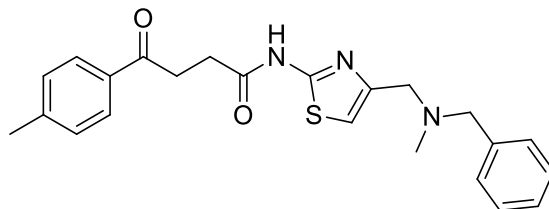
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 196.69, 170.50, 163.04, 157.32, 148.24, 138.93, 130.09, 129.20, 128.54, 128.04, 126.74, 113.78, 109.67, 60.72, 56.50, 55.42, 32.34, 29.01.

C₂₃H₂₅N₃O₃S için HRMS (m/z) [M+H]⁺ Hesaplanan: 424.1695 Bulunan: 424.1716

Elementel Analiz

C ₂₃ H ₂₅ N ₃ O ₃ S	Hesaplanan %	C=65.23	H=5.95	N=9.92	S=7.57
	Bulunan %	C=65.09	H=6.20	N=9.95	S=7.65

**4.1.7. *N*-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-4-okso-4-(*p*-metilfenil)bütanamit
(Bileşik 7)**



0,9 g (0,0047 mol) 4-(4-metilfenil)-4-oksobutanoik asit, 1 g (0,005 mol) EDC, 100 mg (0,0008 mol) DMAP ve 1 g (0,004 mol) 4-((benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-amin kullanarak 20 ml diklorometan içinde yöntem D'ye uygun olarak sentezlendi. Etil asetat:metanol (99:1) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile elde edilen ürün eterden katılaştırıldı ve etil asetat:hekzandan kristallendirildi. Verim 666 mg (%34). Erime derecesi 169.1-169.3°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 12.17 (s, 1H, NH), 7.87 (d, 2H, $J=8.4$ Hz, H^2 , H^6), 7.32-7.20 (m, 7H, H^3 , H^5 , $\text{H}^{2'}$, $\text{H}^{3'}$, $\text{H}^{4'}$, $\text{H}^{5'}$, $\text{H}^{6'}$), 6.92 (s, 1H, $\text{H}^{\text{tiyazol}}$), 3.52 (s, 4H, tiyazol- CH_2 -N, N- CH_2 -fenil), 3.32 (t, 2H, $J=6.6$ Hz, $-\text{COCH}_2-\text{CH}_2$), 2.76 (t, 2H, $J=6.6$ Hz, $-\text{COCH}_2-\text{CH}_2$), 2.35 (s, 3H, NCH_3), 2.10 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

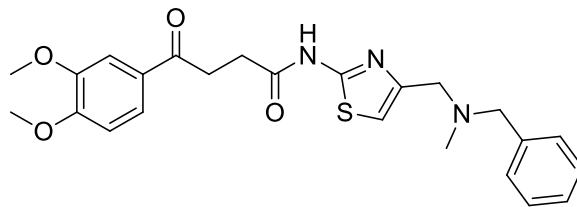
^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 197.85, 170.43, 157.31, 148.27, 143.48, 138.94, 133.81, 129.16, 128.54, 128.04, 127.89, 126.73, 109.67, 60.73, 56.51, 32.60, 28.97, 21.05.

$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ için HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ Hesaplanan: 408.1746 Bulunan: 408.1747

Elementel Analiz

$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$	Hesaplanan %	C=67.79	H=6.18	N=10.31	S=7.87
	Bulunan %	C=67.63	H=6.17	N=10.35	S=7.87

4.1.8. *N*-(4-((Benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-il)-4-(3,4-dimetoksifenil)-4-oksobütanamit (Bileşik 8)



1 g (0,004 mol) 4- (3,4-dimetoksifenil)-4-oksobutanoik asit, 0,877 g (0,004 mol) EDC, 100 mg (0,0008 mol) DMAP ve 0,889 g (0,0038 mol) 4-((benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-amin kullanarak 20 ml diklorometan içinde yöntem D'ye uygun olarak sentezlendi. Etil asetat:metanol (99:1) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile elde edilen ürün eterden katılaştırıldı ve etil asetat:hekzandan kristallendirildi. Verim 690 mg (%36). Erime derecesi 127.1-127.7 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 12.17 (s, 1H, NH), 7.66 (dd, 1H, $J=8.4$ Hz, $J=2$ Hz H^6), 7.44 (d, 1H, $J=2$ Hz H^2), 7.32-7.20 (m, 5H, $\text{H}^{2'}$, $\text{H}^{3'}$, $\text{H}^{4'}$ $\text{H}^{5'}$, $\text{H}^{6'}$), 7.05 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H^5), 6.92 (s, 1H, $\text{H}^{\text{tiyazol}}$), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.52 (s, 4H, tiyazol- CH_2 -N, N- CH_2 -fenil), 3.32 (t, 2H, $J=6.2$ Hz, $-\text{COCH}_2-\text{CH}_2$), 2.75 (t, 2H, $J=6.2$ Hz, $-\text{COCH}_2-\text{CH}_2$), 2.10 (s, 3H, NCH_3).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 196.82, 170.59, 157.40, 153.06, 148.52, 148.34, 139.01, 129.25, 128.01, 128.11, 126.81, 122.55, 110.86, 110.11, 109.74, 60.80, 56.58, 55.71, 55.44, 32.43, 29.18.

$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ için HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ Hesaplanan: 454.1801 Bulunan: 454.1808

Elementel Analiz

$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	Hesaplanan %	C=63.56	H=6.00	N=9.26	S=7.07
	Bulunan %	C=63.69	H=6.20	N=9.32	S=7.09

4.2. Biyolojik Aktivite Bulguları

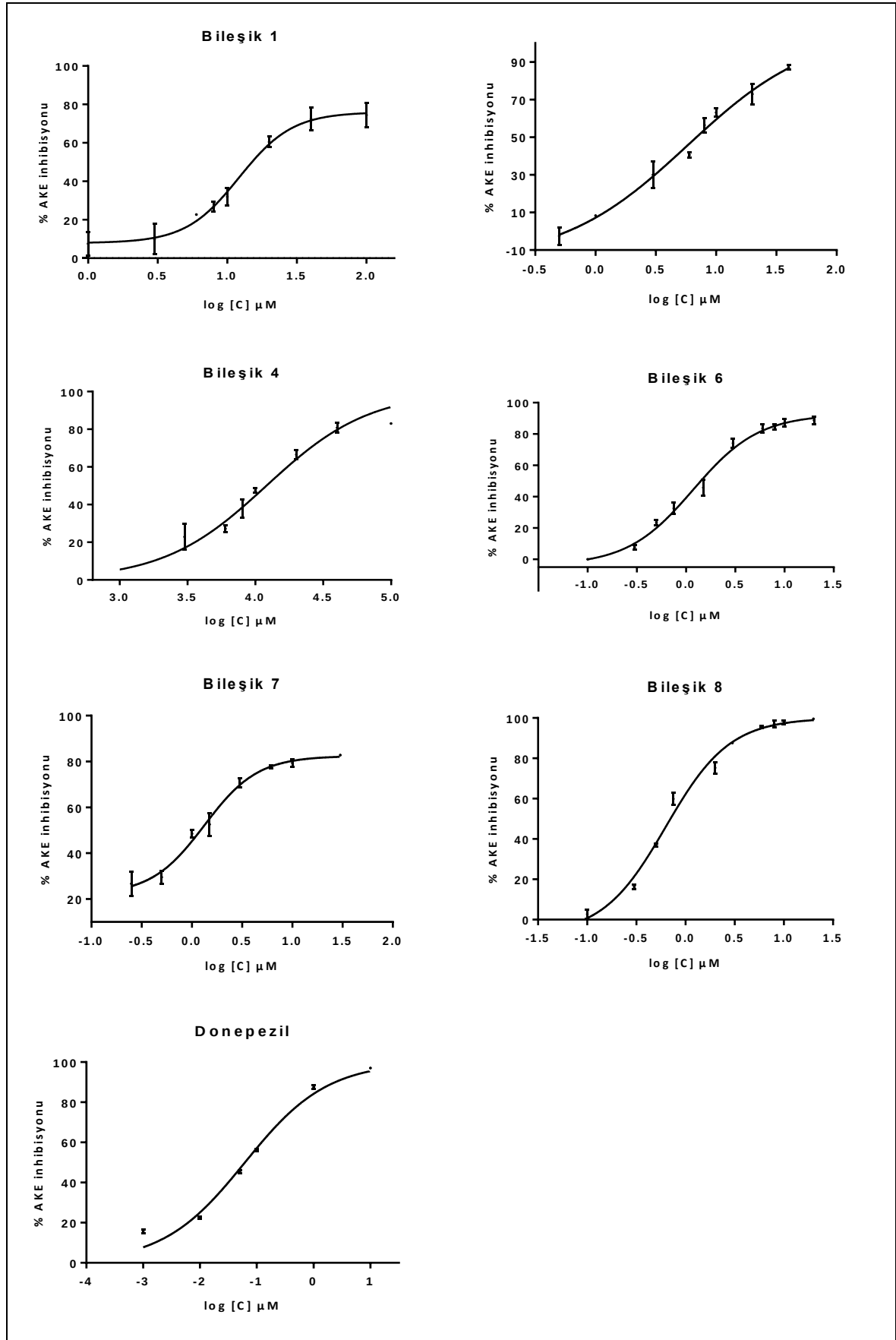
4.2.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite bulguları

Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin AKE ve BKE inhibitör aktivite sonuçları çizelge 4.1’de, IC₅₀ hesaplamaları için kullanılan doz-cevap eğrileri ise Şekil 4.1 ve 4.2’de sunulmuştur.

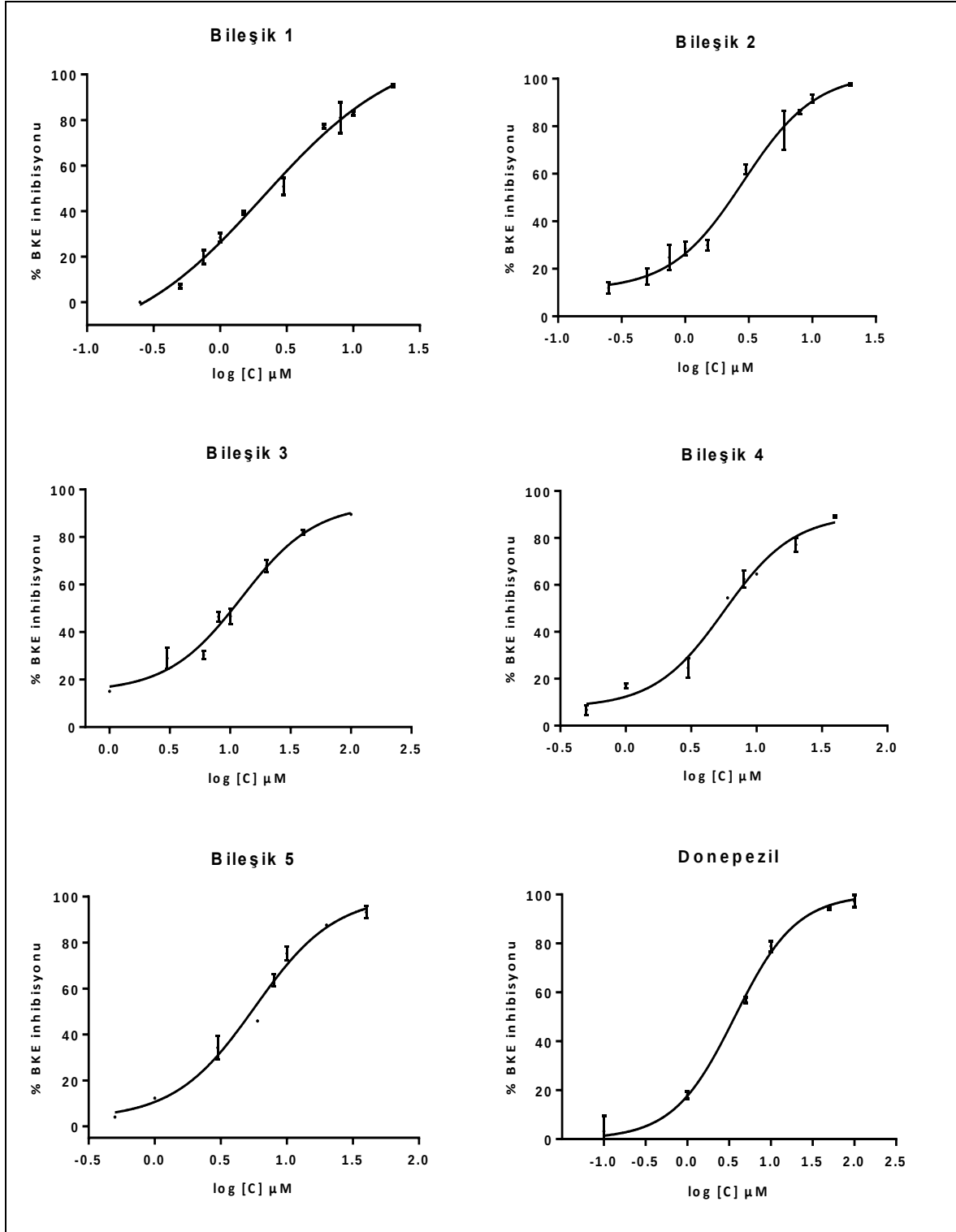
Çizelge 4.1. Bileşiklerin % inhibisyon değerleri ve IC₅₀ sonuçları

Bileşik	AKE için % inhibisyon $\pm$ SD (10 μ M)	AKE için IC ₅₀ $\pm$ SD (μ M)	BKE için % inhibisyon $\pm$ SD (10 μ M)	BKE için IC ₅₀ $\pm$ SD (μ M)
1	53 $\pm$ 0.30	12.10 $\pm$ 0.02	84 $\pm$ 0.04	2.10 $\pm$ 0.09
2	19 $\pm$ 5.20	-	82 $\pm$ 0.30	2.86 $\pm$ 0.05
3	68 $\pm$ 3.30	5.80 $\pm$ 0.12	53 $\pm$ 4.20	12.39 $\pm$ 0.07
4	55 $\pm$ 4.90	12.00 $\pm$ 0.05	67 $\pm$ 1.70	5.64 $\pm$ 0.06
5	27 $\pm$ 4.20	-	72 $\pm$ 3.40	4.99 $\pm$ 0.08
6	88 $\pm$ 0.30	1.18 $\pm$ 0.05	47 $\pm$ 1.80	-
7	65 $\pm$ 3.40	1.20 $\pm$ 0.05	18 $\pm$ 2.30	-
8	96 $\pm$ 2.30	0.63 $\pm$ 0.04	32 $\pm$ 1.40	-
Donepezil	98 $\pm$ 1.00	0.06 $\pm$ 0.07	90 $\pm$ 0.50	3.7 $\pm$ 0.02

(-): inhibitör aktivite yok anlamına gelmektedir.



Şekil 4.1. AKE inhibitörü bileşiklerin IC_{50} grafikleri



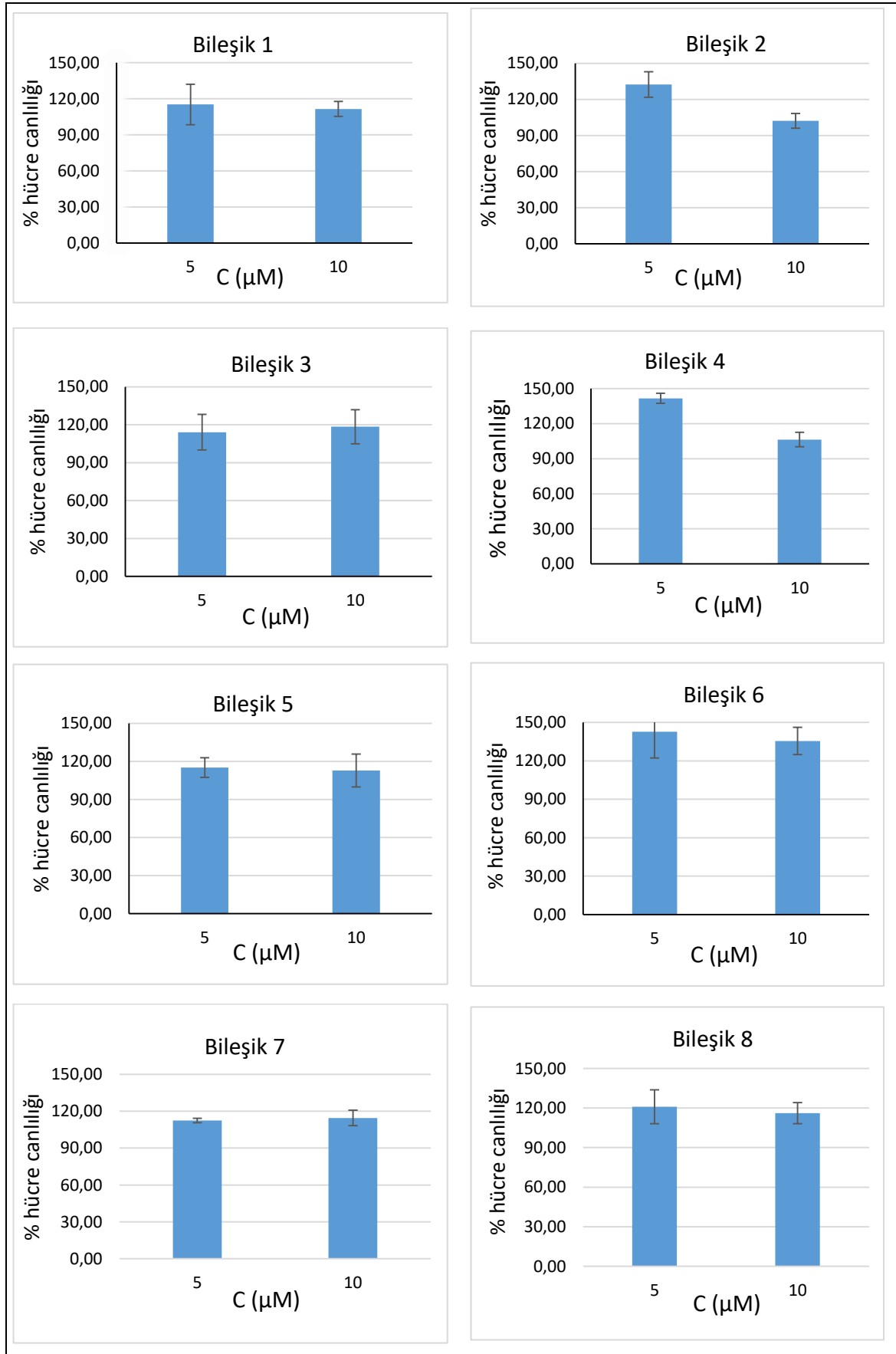
Şekil 4.2. BKE inhibitörü bileşiklerin IC_{50} grafikleri

4.2.2. Sitotoksosite testi bulguları

Sentezlenen bileşiklere 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda sitotoksosite testi uygulanmıştır ve elde edilen bulgular Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda % hücre canlılığı

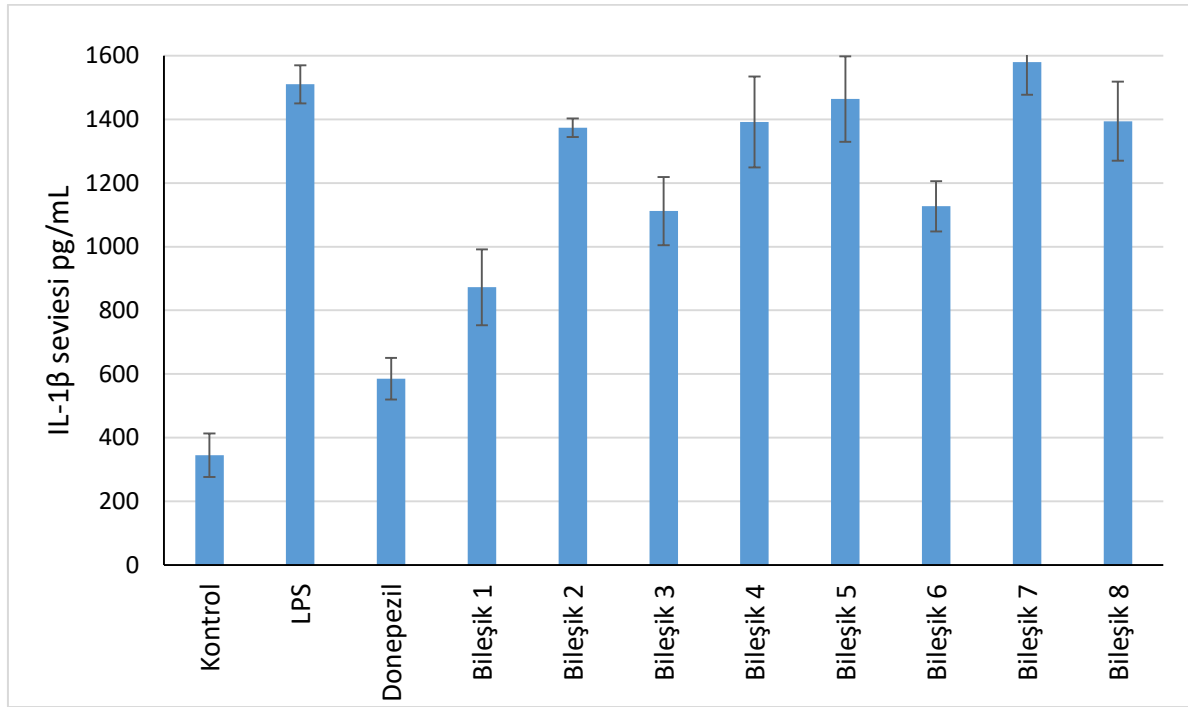
Bileşik	5 μ M için % hücre canlılığı $\pm$ SD	10 μ M için % hücre canlılığı $\pm$ SD)
1	115.26 $\pm$ 16.88	111.00 $\pm$ 5.70
2	132.00 $\pm$ 10.68	102.00 $\pm$ 6.11
3	114.04 $\pm$ 14.09	118.30 $\pm$ 13.51
4	141.60 $\pm$ 4.30	106.37 $\pm$ 6.22
5	115.14 $\pm$ 7.73	112.91 $\pm$ 12.98
6	142.74 $\pm$ 20.49	135.00 $\pm$ 10.60
7	112.42 $\pm$ 1.78	114.00 $\pm$ 6.27
8	120.94 $\pm$ 3.69	116.19 $\pm$ 8.01



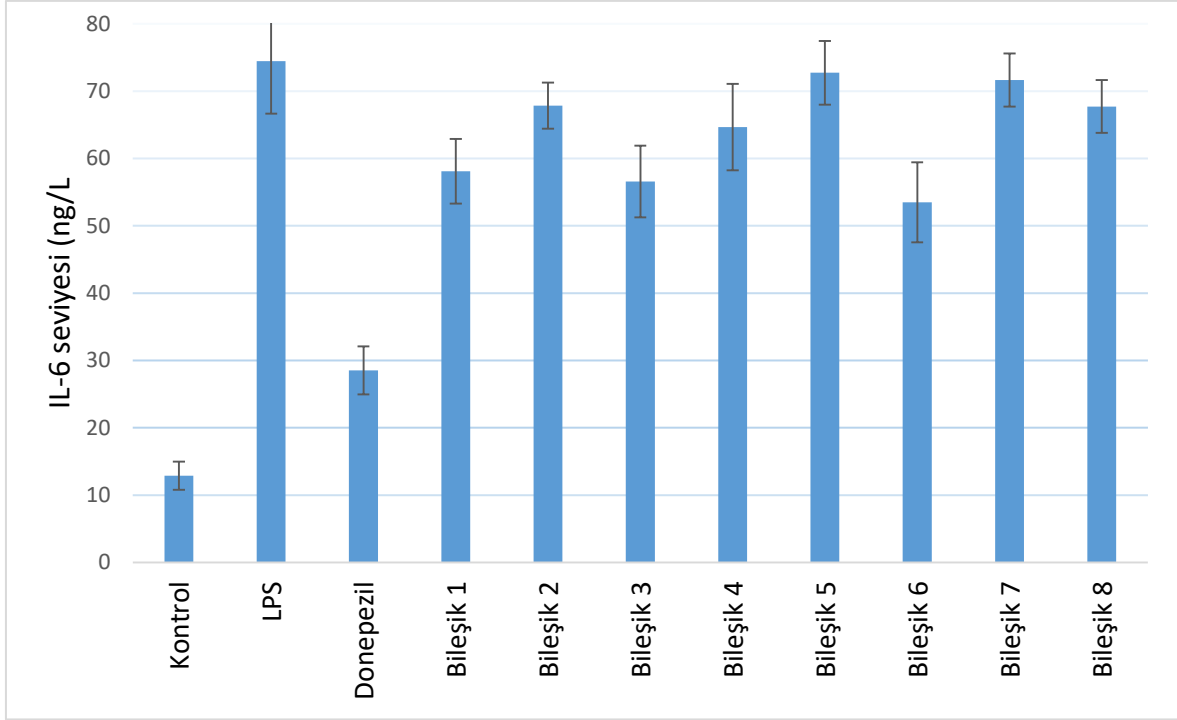
Şekil 4.3. Sitotoksosite testi için bileşiklerin % hücre canlılığı grafikleri

4.2.3. Antienflamatuvar aktivite bulguları

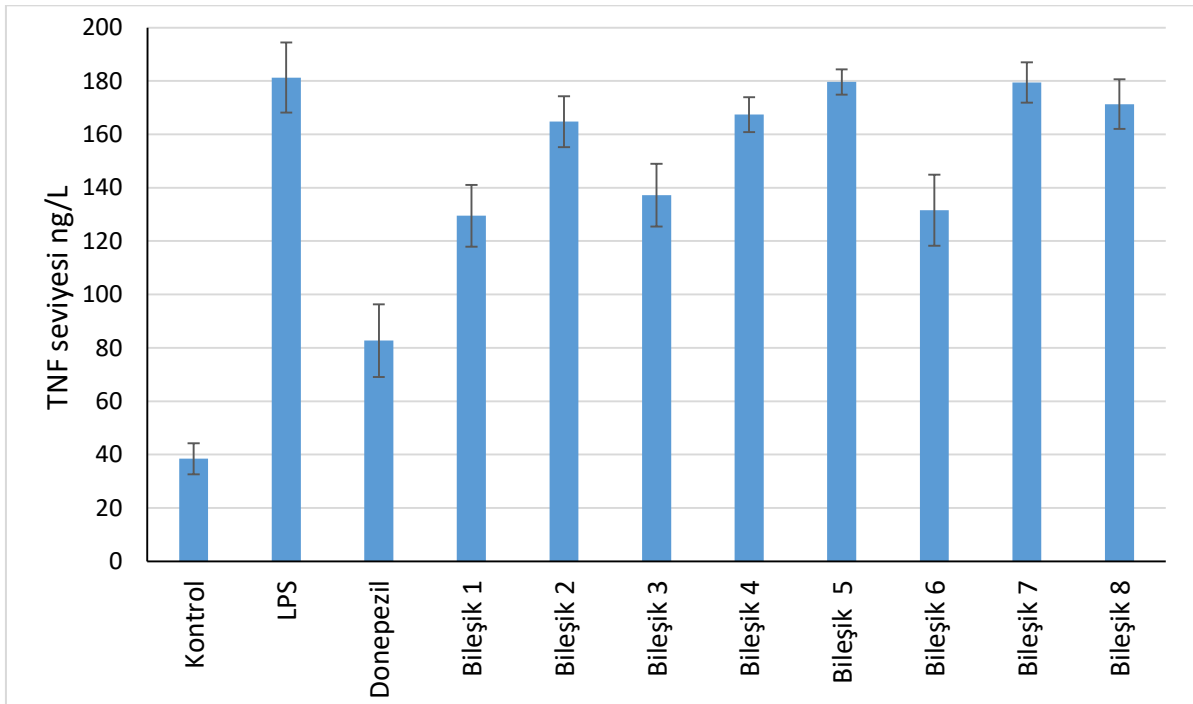
Sentezlenen bileşiklerin 10 μ M konsantrasyonda THP1 hücrelerinde enflamatuvar belirteçler üzerine etkileri (IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NO) ELISA yöntemi ile test edilmiş dolayısıyla antienflamatuvar etkileri değerlendirilmiş ve bulgular Şekil 4.4-4.7’de sunulmuştur.



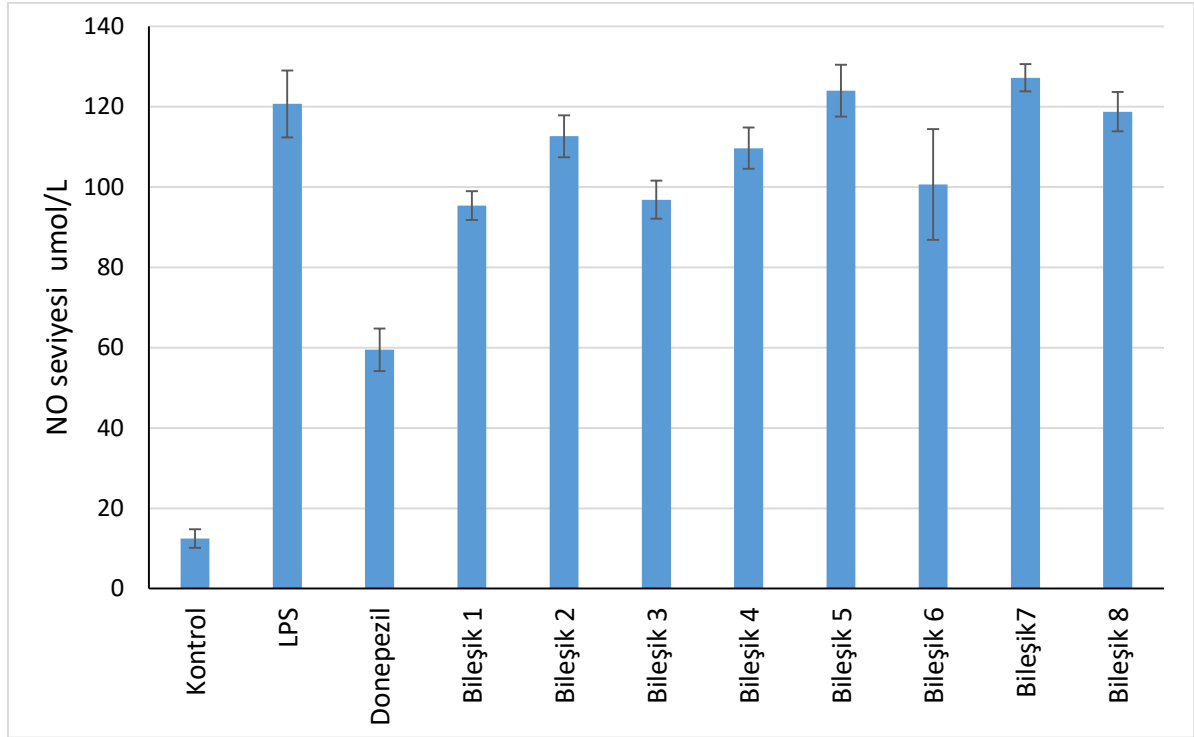
Şekil 4.4. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda IL-1 β seviyesine donepezil ve bileşiklerin etkisi



Şekil 4.5. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda İL-6 seviyesine donepezil ve bileşiklerin etkisi



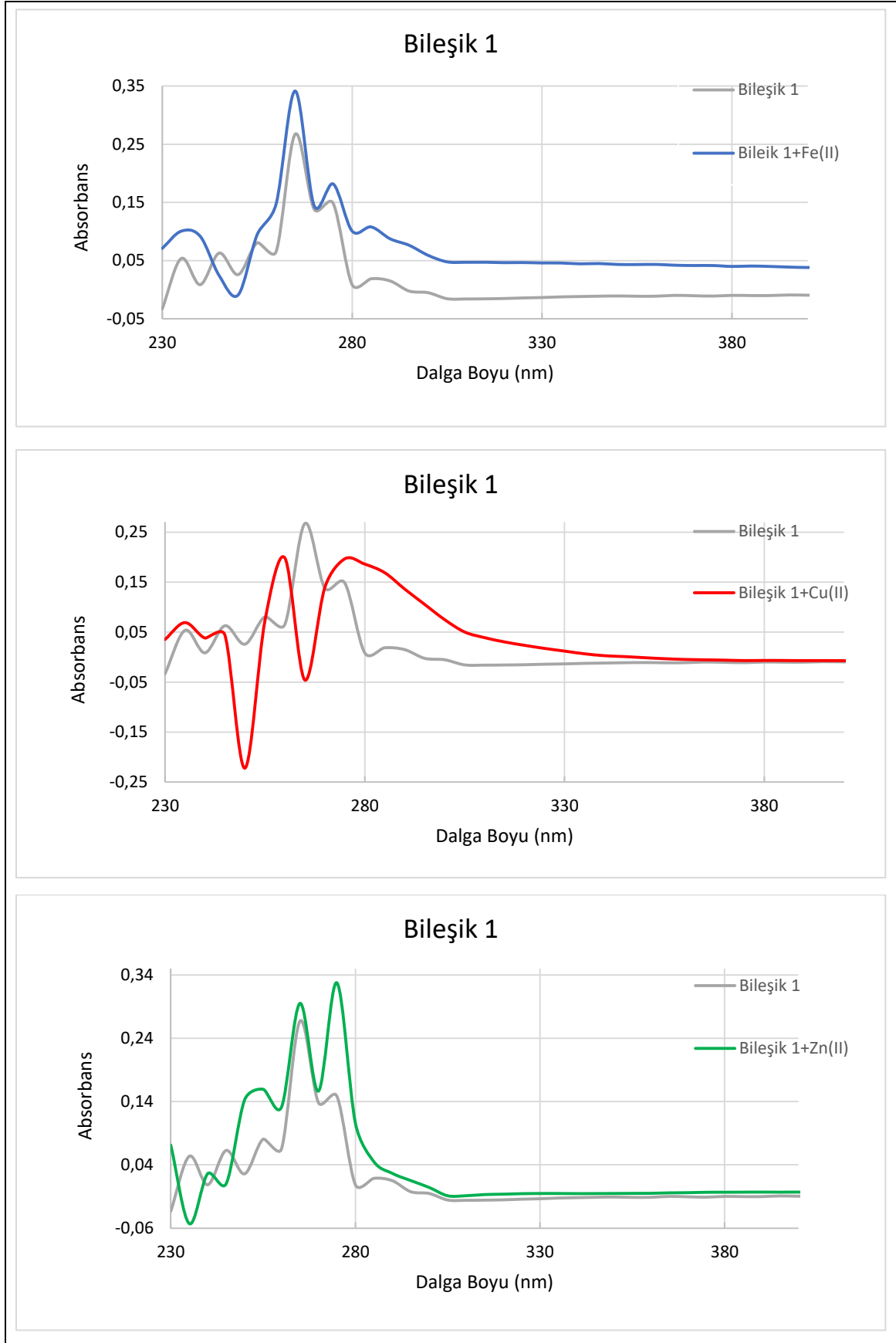
Şekil 4.6. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda TNF seviyesine donepezil ve bileşiklerin etkisi



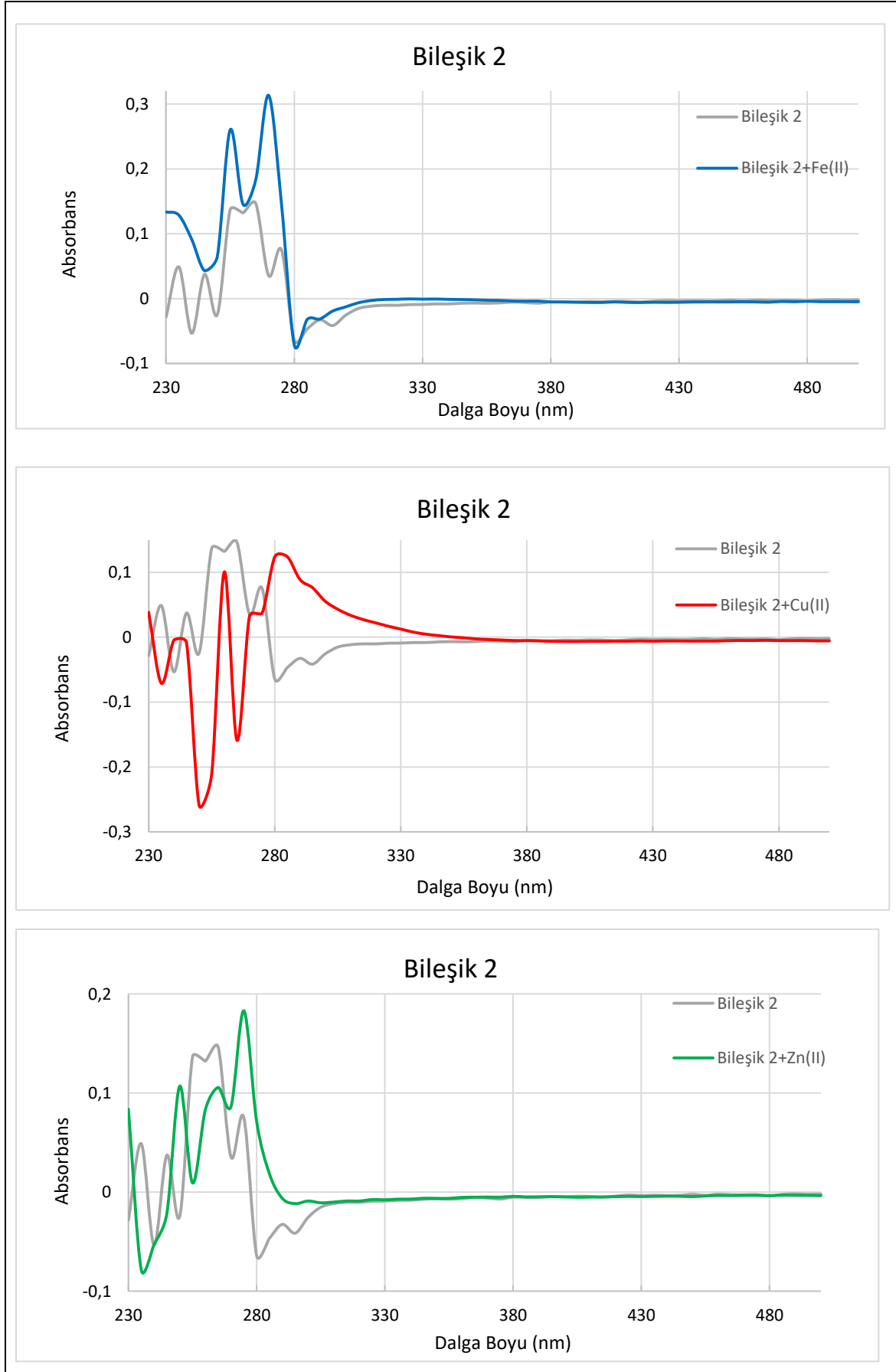
Şekil 4.7. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda NO seviyesine donepezil ve bileşiklerin etki

4.2.4. Metal şelasyon aktivite bulguları

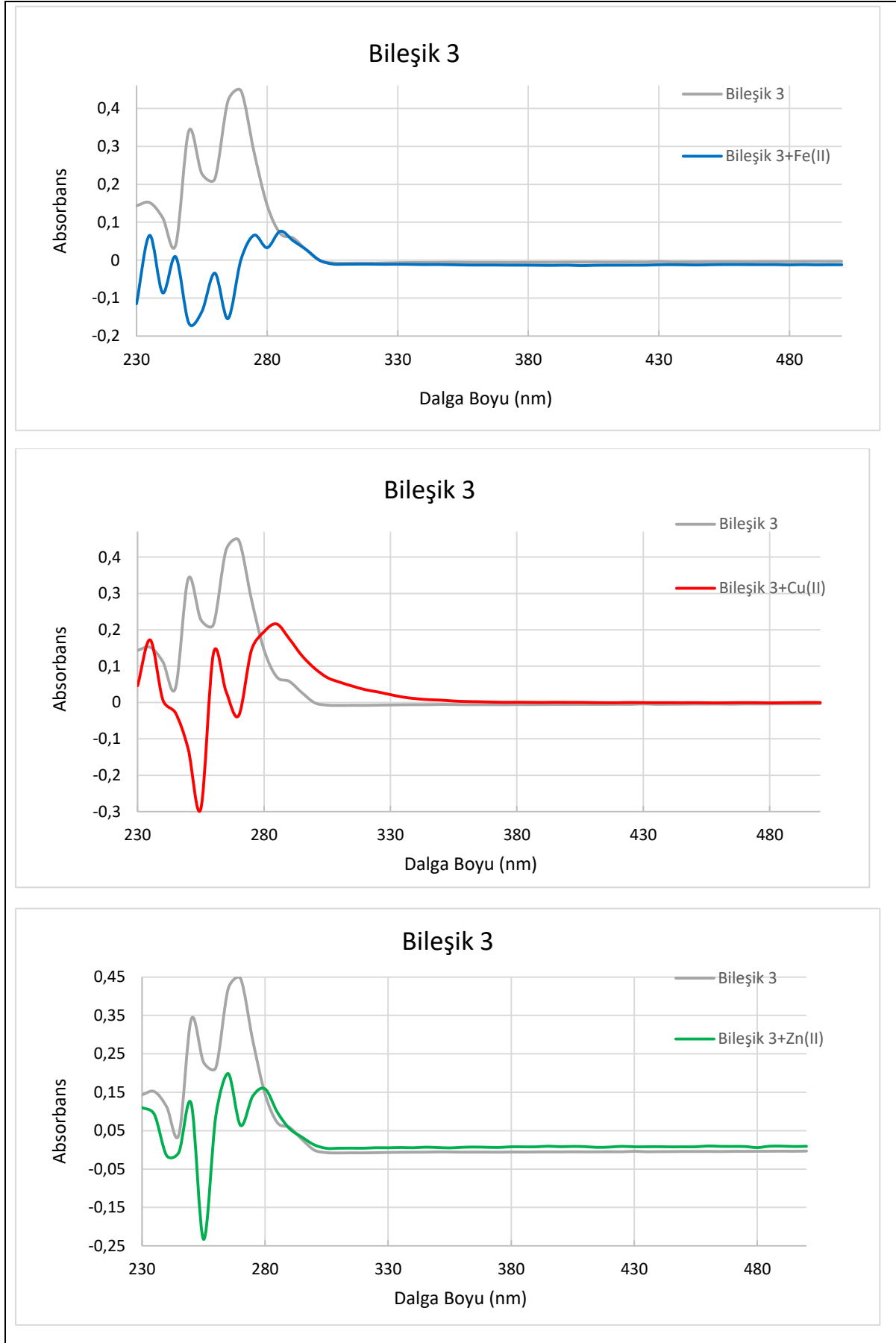
Test bileşiğine ait spektrum ve ilgili bileşik+metal çözeltisine ait spektrumlar dalga boyuna (nm) karşılık absorbans grafikleri Şekil 4.8-4.15 ile verilmiştir ve absorbans kayması grafikleri Şekil 4.16'da sunulmuştur.



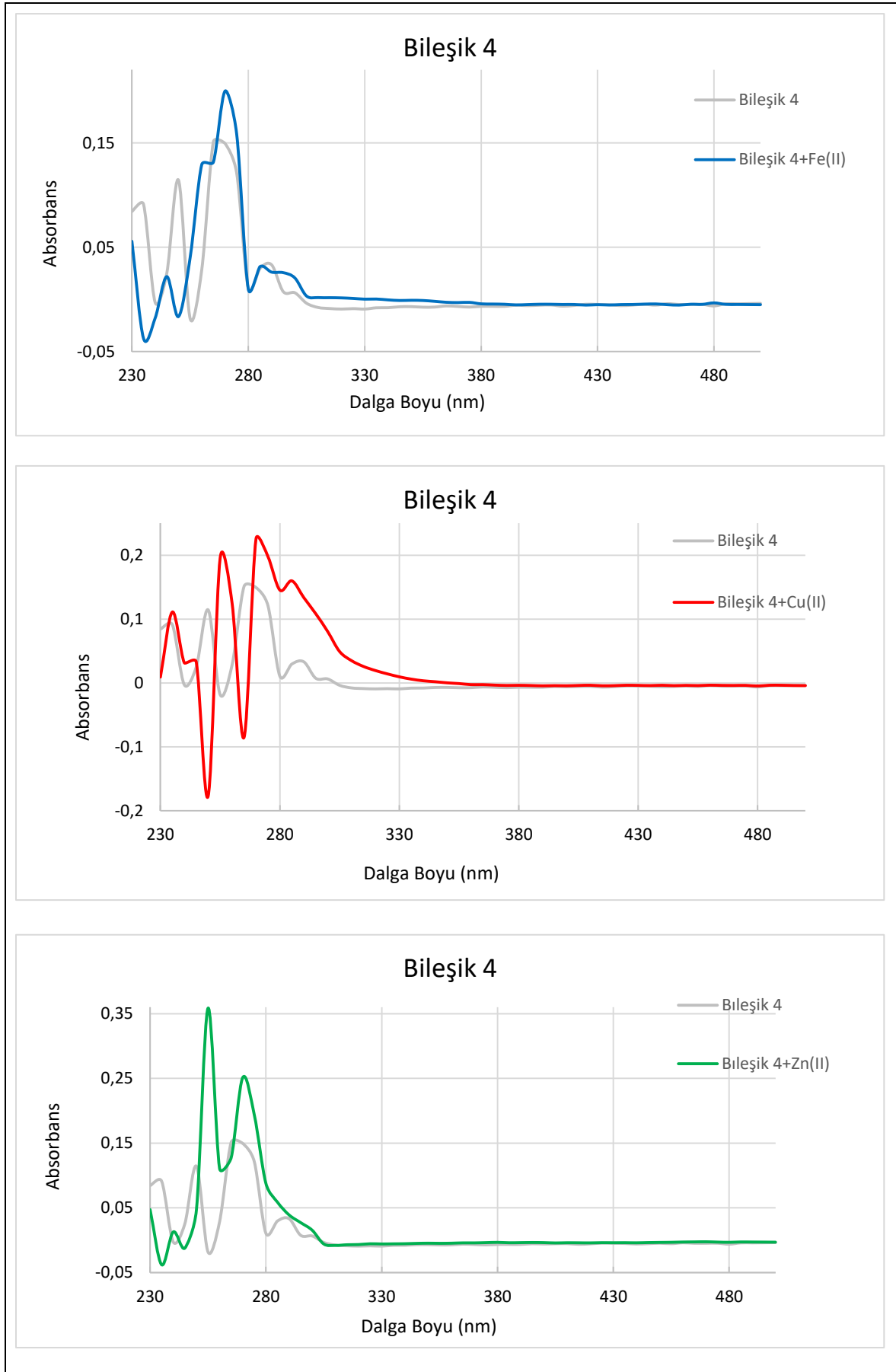
Şekil 4.8. Bileşik 1 için metal şelatör aktivite spektrumları



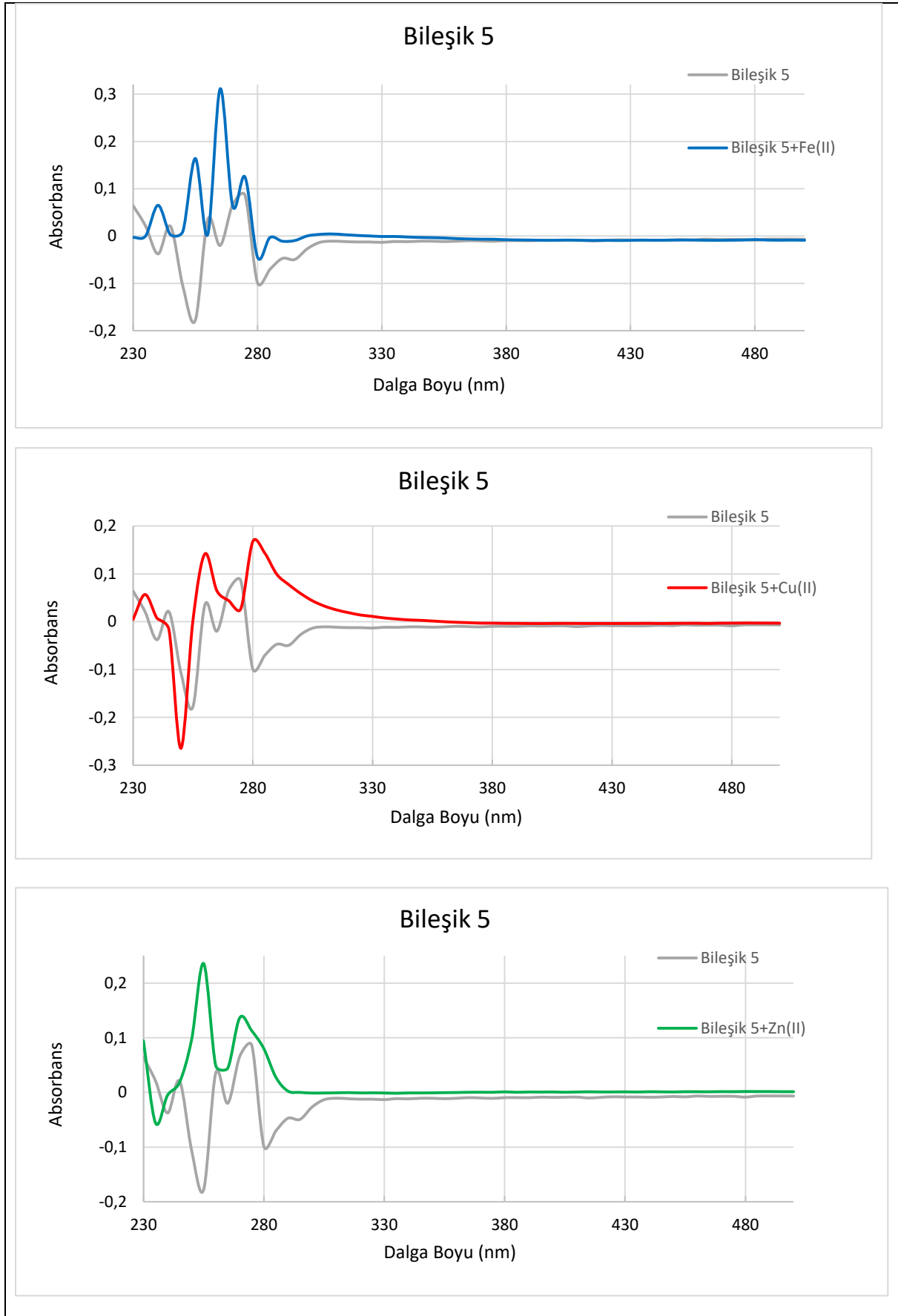
Şekil 4.9. Bileşik 2 için metal şelatör aktivite spektrumları



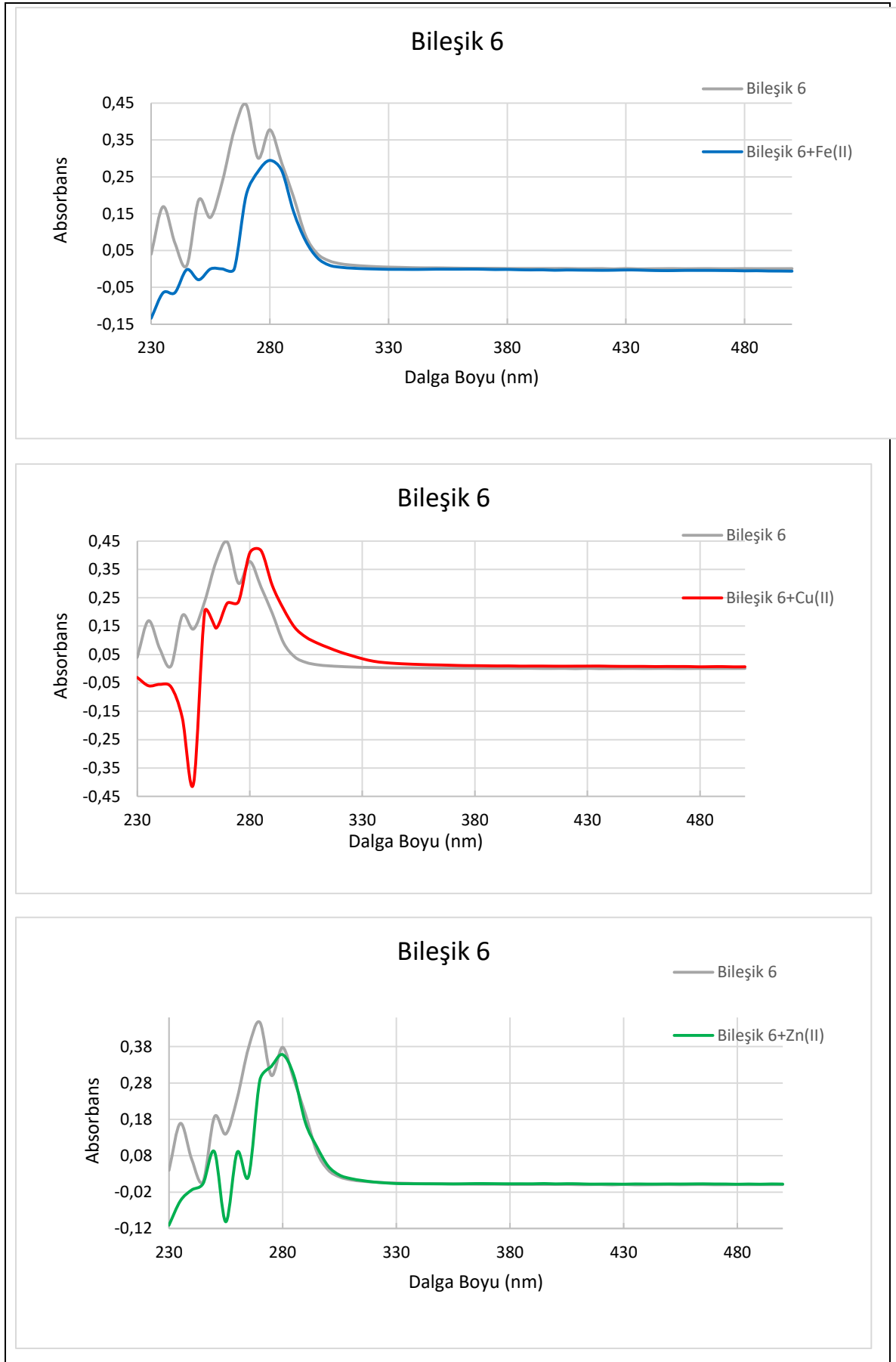
Şekil 4.10. Bileşik 3 için metal şelatör aktivite spektrumları



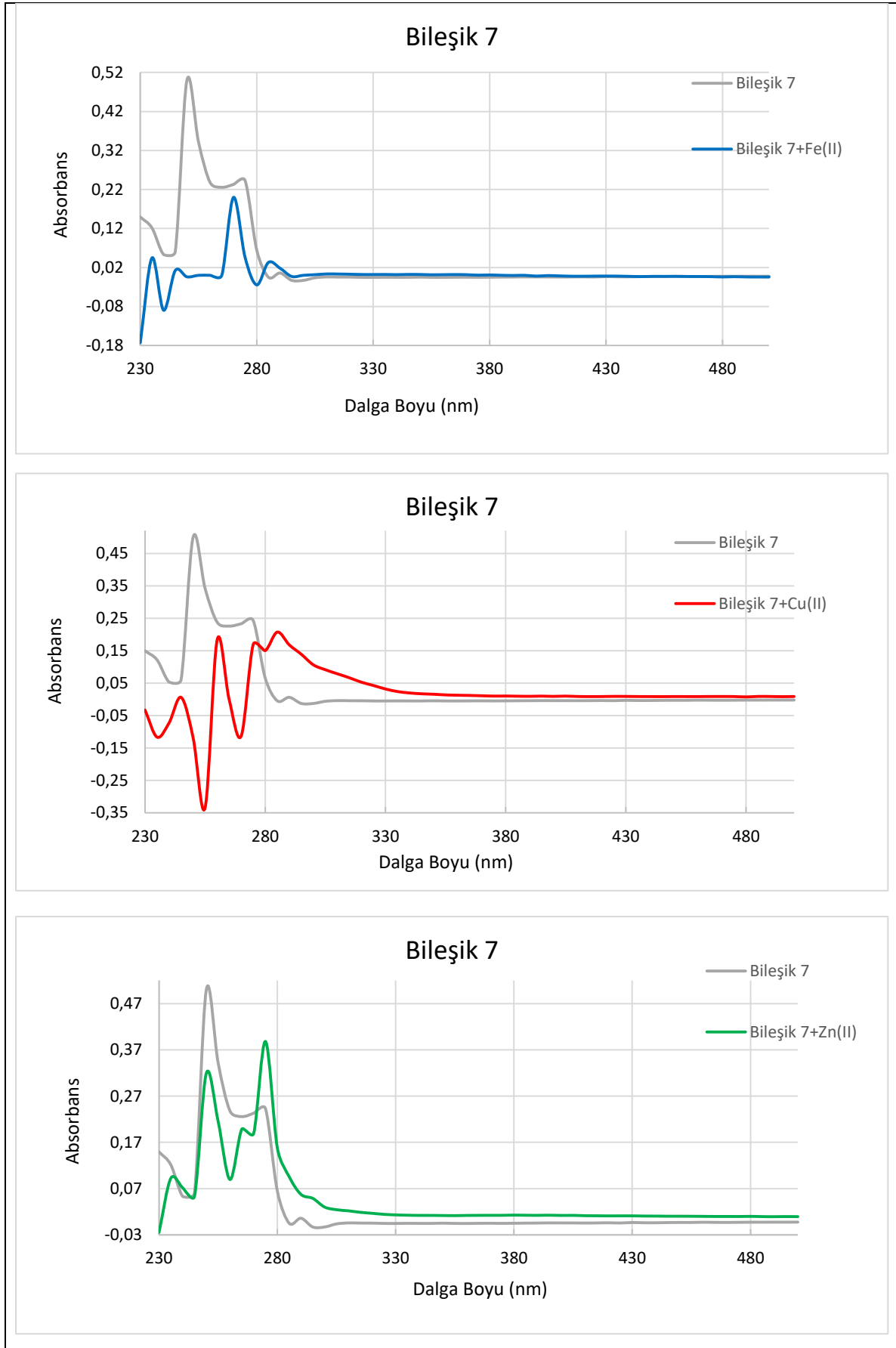
Şekil 4.11. Bileşik 4 için metal şelatör aktivite spektrumları



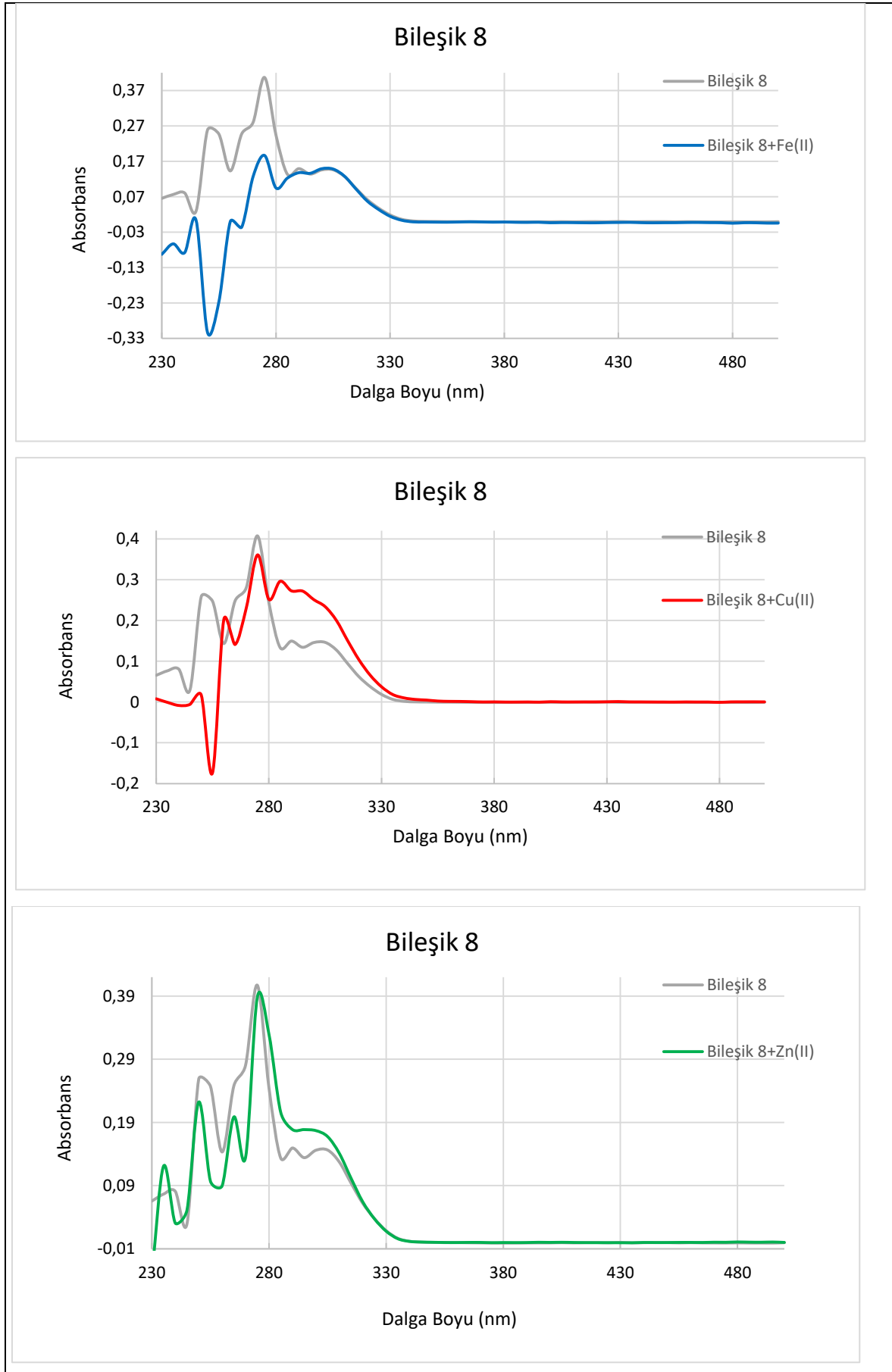
Şekil 4.12. Bileşik 5 için metal şelatör aktivite spektrumları



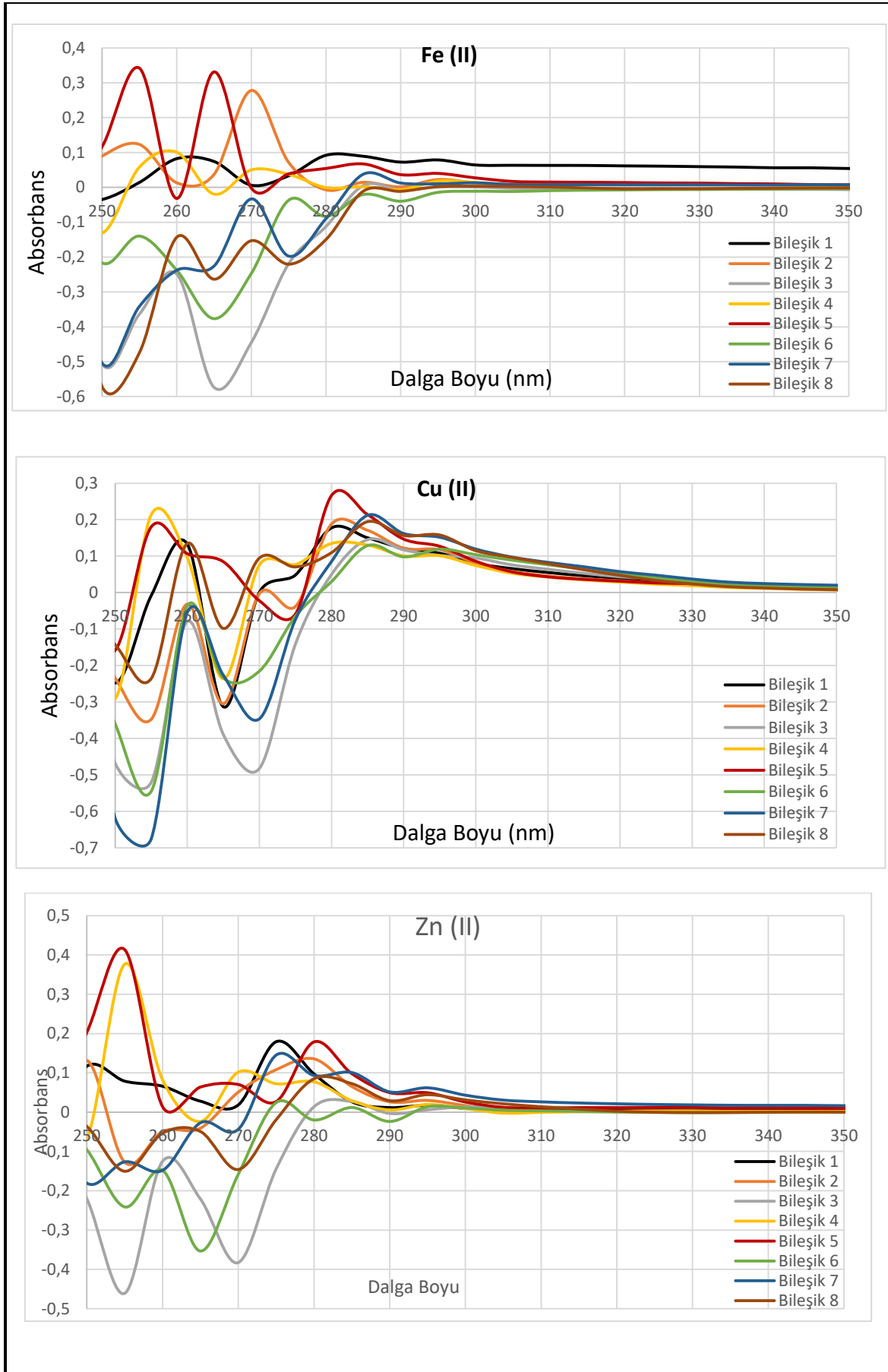
Şekil 4.13. Bileşik 6 için metal şelatör aktivite spektrumları



Şekil 4.14. Bileşik 7 için metal şelatör aktivite spektrumları



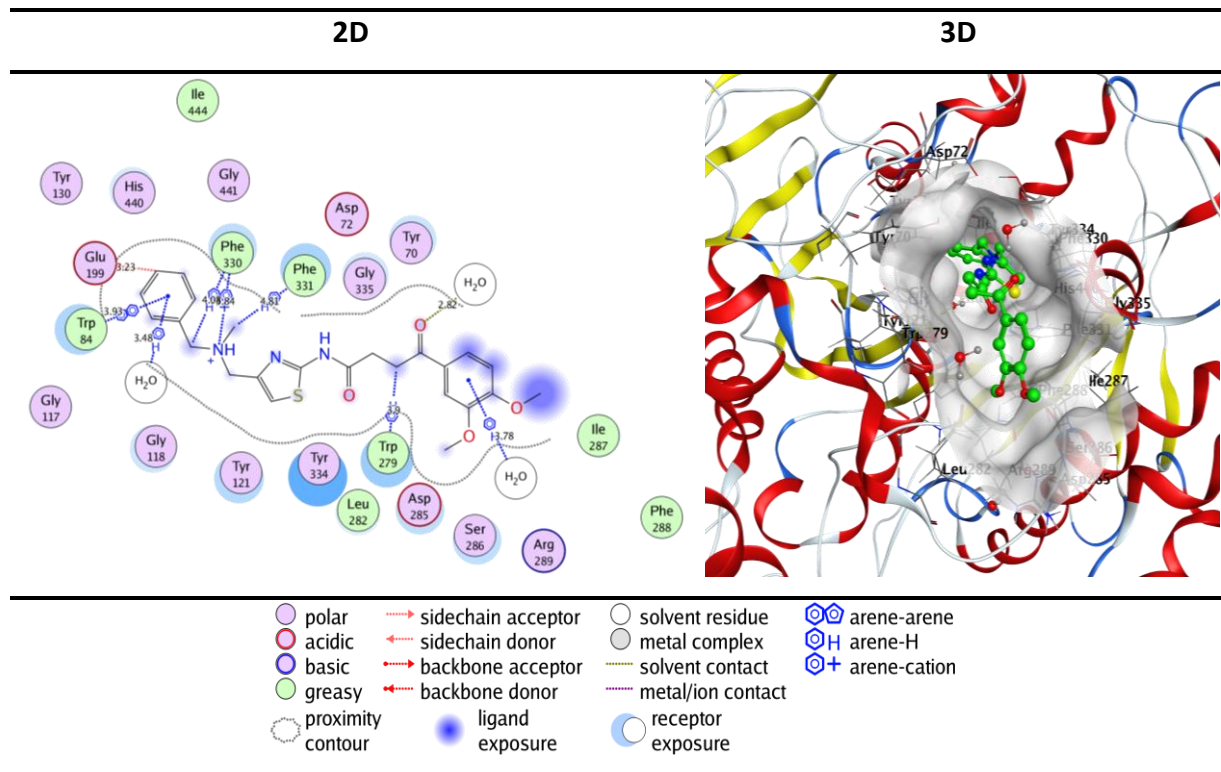
Şekil 4.15. Bileşik 8 için metal şelatör aktivite spektrumları



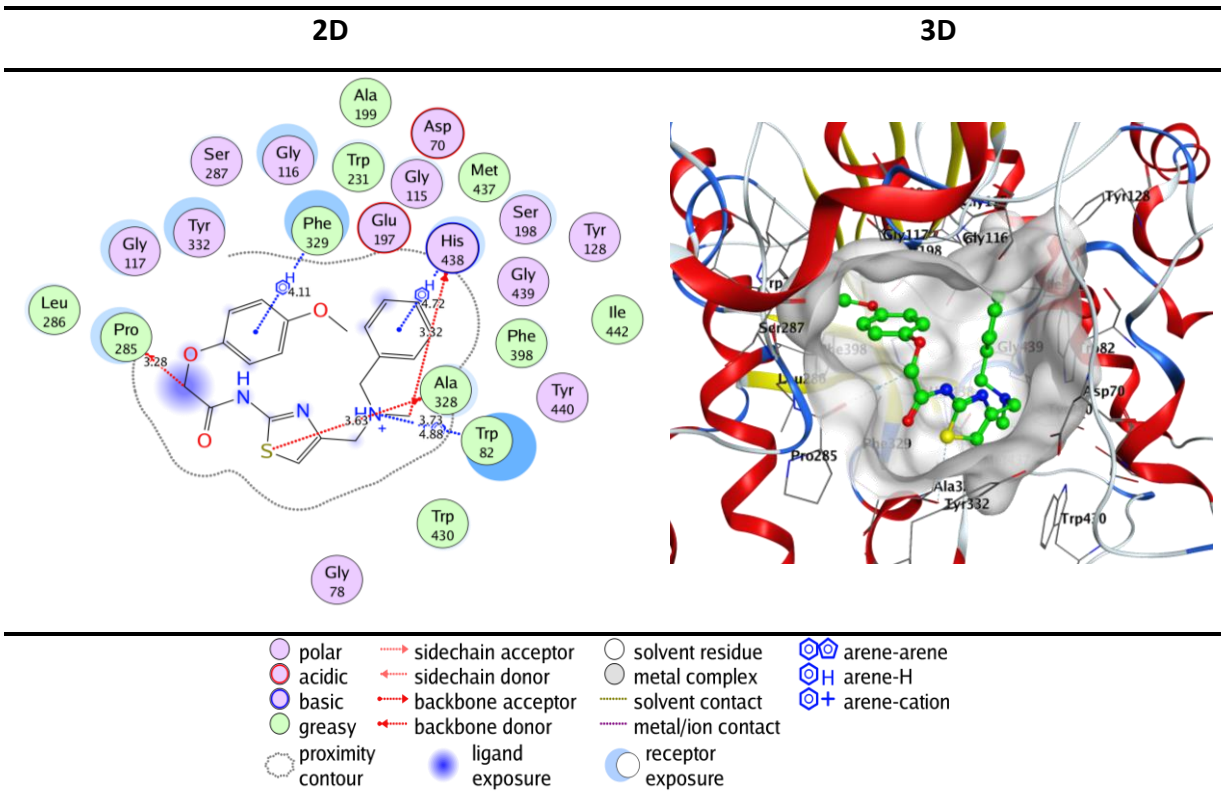
Şekil 4.16 Bileşikler ve metal iyonları için absorbans kayması grafikleri

4.3. Moleküler Docking Bulguları

Sentezlenen sekiz bileşikten, en yüksek AKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 8 ve en yüksek BKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 1'in bağlanma modların incelenebilmesi için moleküler docking çalışmasından faydalanılmıştır. Docking çalışmalarında kullanılmak üzere moleküllerin iyonize formları Marvin Sketch programı ile hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de sunulmuştur.



Şekil 4.17. En yüksek AKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 8'in AKE kristali ile elde edilen docking sonuçları



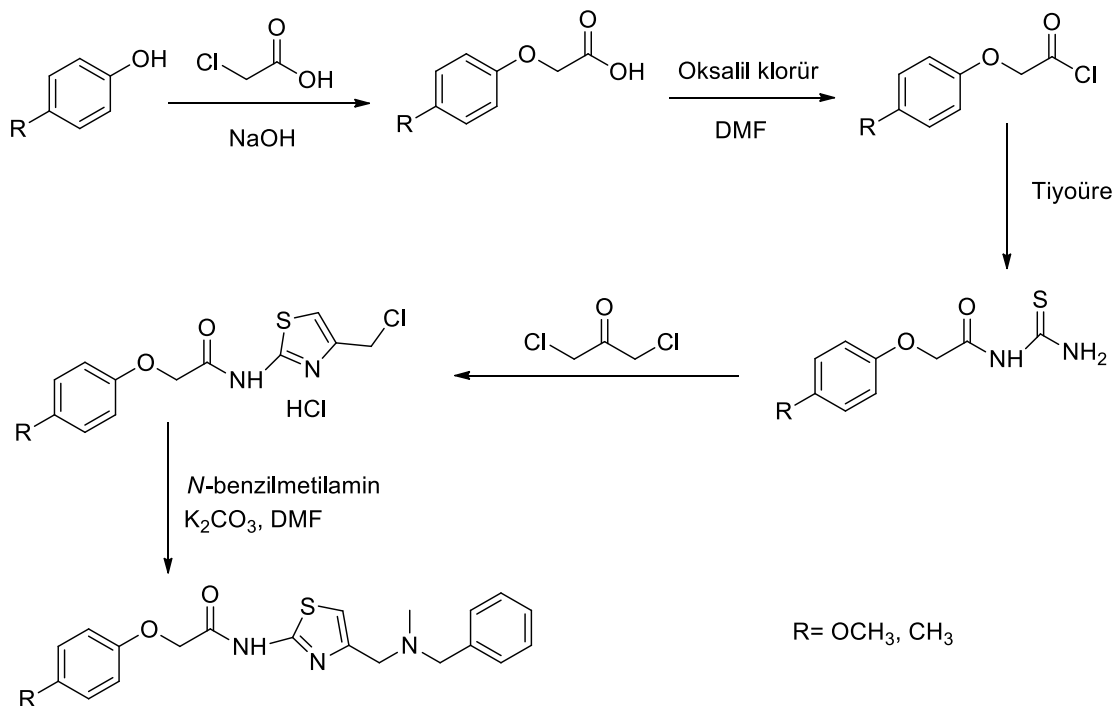
Şekil 4.18. En yüksek BKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 1'in BKE kristali ile elde edilen docking sonuçları

5. TARTIŞMA

5.1. Kimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

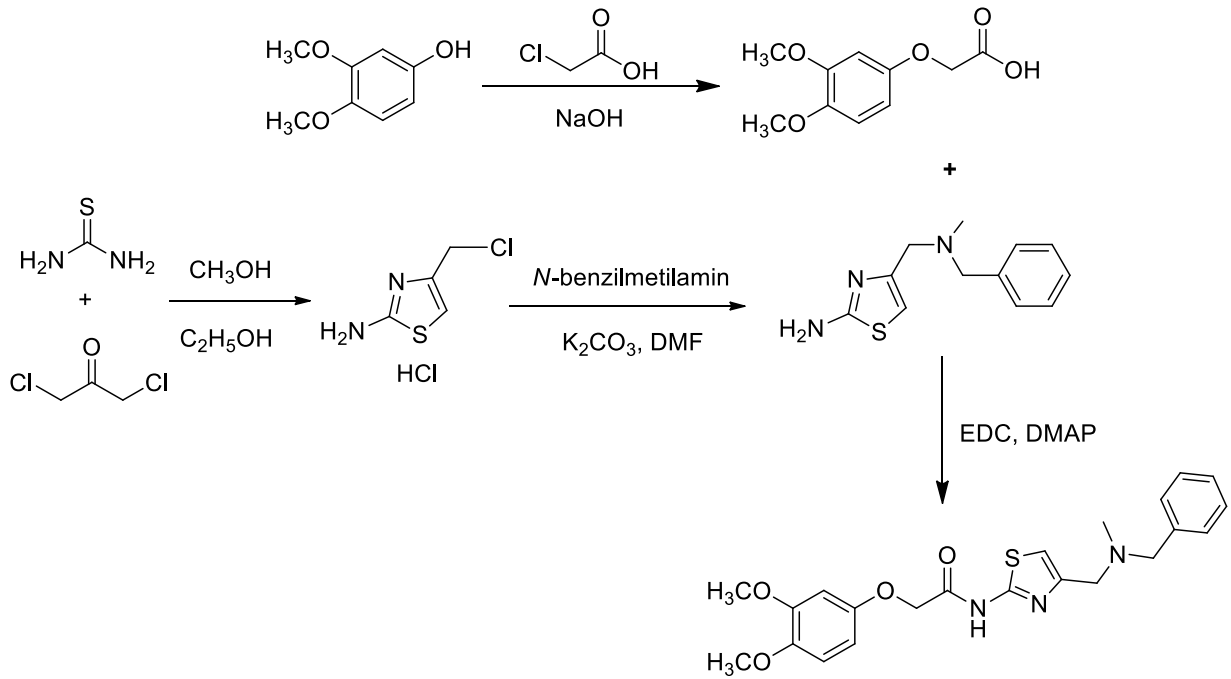
Tez çalışmamızda, 2-aminotiyazol halka sistemine sahip 8 yeni bileşik sentez edildi ve yapıları $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRMS ve elementel analiz yöntemleriyle aydınlatıldı.

2-(4-Süstitüefenoksi)asetamit serisinin sentezinde kullanılan 2-(4-süstitüefenoksi)asetik asit türevleri, ticari olarak mevcut 4-metoksifenol veya 4-metilfenolun kloroasetik asit ile bazik ortamdaki tepkimesinden elde edildi. Sentez edilen fenoksiasetik asitlerin, oksalil klorür ile tepkimesinden karşılık gelen asetil klorür türevleri hazırlandı. Bu türevlerin tiyoüre ile tepkimesinden açiltiyoüre yapısındaki ara bileşikler elde edildi. Elde edilen açiltiyoürelerin, 1,3-dikloroaseton ile reaksiyonundan 4-(klorometil)-2-aminotiyazol hidroklorür türevleri sentez edildi. Daha sonra sentez edilen türevlerin DMF içinde bazik ortamda *N*-benzimetilamin ile tepkimesinden 4-(süstitüefenoksi)asetamit türevi iki bileşik elde edildi ve hidroklorik asit tuzları hazırlandı.



Şekil 5.1. 2-(4-Süstitüefenoksi)asetamit türevleri sonuç bileşiklerin sentez şeması

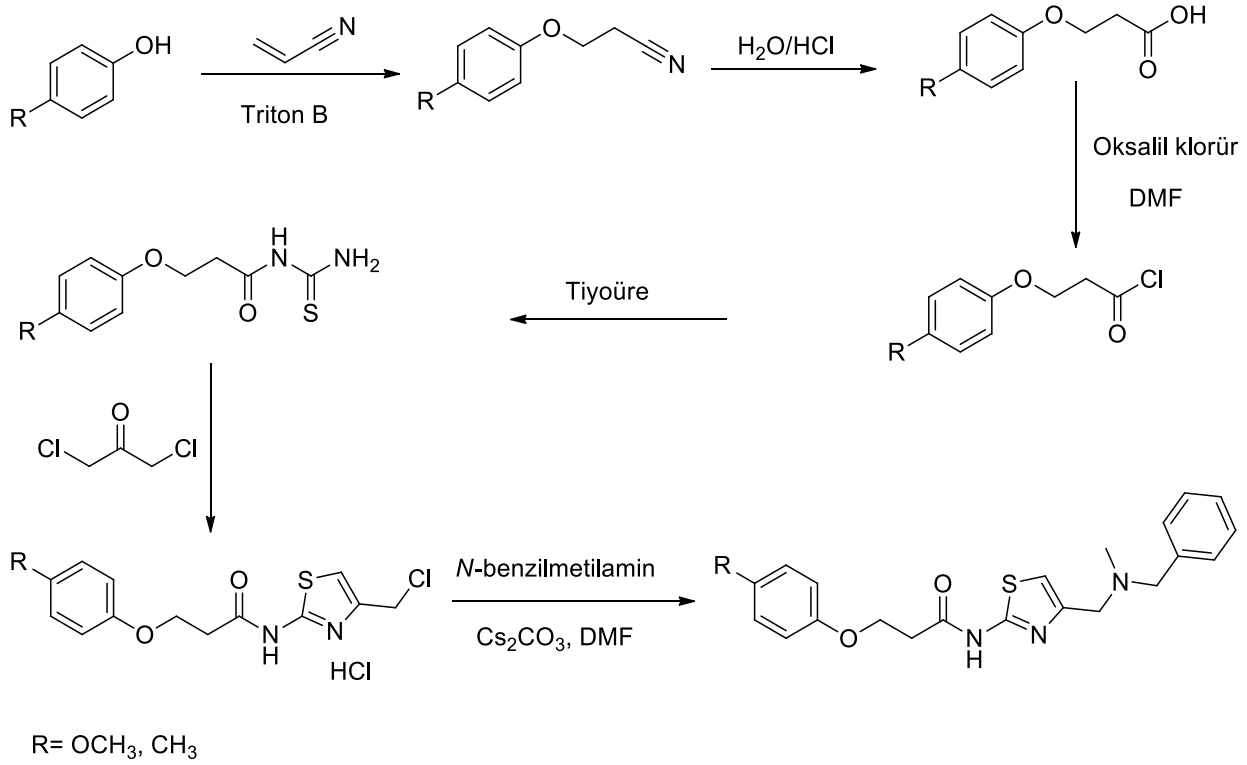
2-(3,4-Dimetoksifenoksi)asetamit türevinin sentezinde kullanılan 2-(3,4-dimetoksifenoksi)asetik asit, ticari olarak mevcut 3,4-dimetoksifenol ve kloroasetik asit'in bazik ortamda tepkimesinden elde edildi. 1,3-Dikloroaseton ve tiyoüre'nin tepkimesinden elde edilen 4-(klorometil)-2-aminotiyazol hidroklorür türevinin, bazik ortamda *N*-benzilmetilamin ile tepkimesinden amin türevi diğer hareket maddesi hazırlandı. Hazırlanan bu iki bileşiğin EDC ve DMAP varlığında diklorometan içindeki tepkimesinden, sentez edilmek istenen 2-(3,4-dimetoksifenoksi)asetamit türevi elde edildi ve hidroklorik asit tuzu hazırlandı.



Şekil 5.2. 2-(3,4-Dimetoksifenoksi)asetamit sonuç bileşiğin sentez şeması

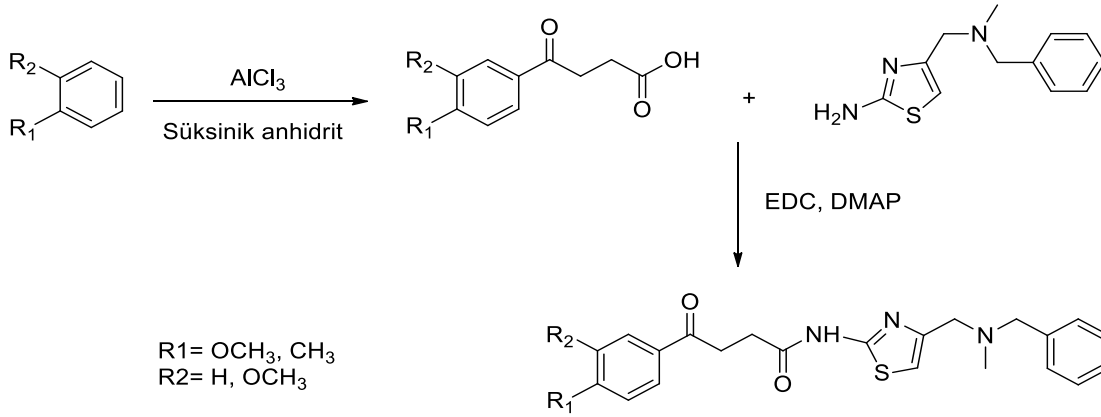
3-(4-Süstitüefenoksi)propanamit türevlerinin sentezinde kullanılan 3-(4-süstitüefenoksi)propanoik asit türevleri; ticari olarak mevcut 4-metoksifenol veya 4-metilfenolun triton B varlığında akrilonitril ile tepkimesinden elde edilen nitril türevlerinin hidrolizi ile hazırlandı. Hazırlanan fenoksipropanoik asitlerin oksalil klorür ile tepkimesinden, karşılık gelen propil klorür türevleri elde edildi. Bu türevlerin tiyoüre ile tepkimesinden açiltiyoüre yapısındaki ara bileşikler hazırlandı. Hazırlanan açiltiyoürelerin, 1,3-dikloroaseton ile reaksiyonundan 4-(klorometil)-2-aminotiyazol hidroklorür türevleri sentez edildi. Daha

sonra sentez edilen türevlerin DMF içinde, bazık ortamda N-benzilmetilamin ile tepkimesinden 4-(süstitüefenoksi)propanamit türevi iki bileşik elde edildi ve hidroklorik asit tuzları hazırlandı.



Şekil 5.3. 3-(4-Süstitüefenoksi)propanamit serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması

4-Oksobütanamit türevlerinin sentezinde kullanılan 4-oksobütanoik asit türevleri; anisol, toluen veya 3,4-dimetoksibenzenin alüminyum klorür varlığında süksinik anhidrit ile tepkimesinden sentez edildi. Daha sonra sentez edilen 4-oksobütanoik asit türevlerinin EDC ve DMAP varlığında diklorometan içinde 4-((benzil(metil)amino)metil)tiyazol-2-amin ile tepkimesinden 4-oksobütanamit türevi üç bileşik elde edildi.



Şekil 5.4. 4-Oksobütanamit türevleri sonuç bileşiklerin sentez şeması

Sentezlenen bileşiklerin yapıları $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRMS ve elementel analiz verileri ile kanıtlandı ve bu sonuçlar önerilen kimyasal yapılar ile uyumlu bulundu.

Sentezlenen bileşiklerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında, amit protonuna ait sinyal 12.61-12.17 ppm aralığında singlet olarak gözlenmiştir. Bileşik 1, 2, 3, 4 ve 5'te tersiyer amin tuzuna ait sinyal 11.35-11.22 ppm aralığında singlet olarak gözlenmiştir. Tiyazol halkasının 5.konumundaki proton 7.57-6.92 ppm aralığında singlet olarak görülmüştür.

Bileşiklerin diğer aromatik halka protonları beklenildiği gibi gözlenmiş ve gerekli açıklamalar bulgular kısmında yapılmıştır.

Fenoksiasetamid türevi bileşiklerde (bileşik 1, 2 ve 3), asetamid zincirindeki $-\text{CH}_2-$ protonları 4.86-4.83 ppm aralığında singlet olarak görülmüştür. Bu türevlerde tiyazol halkasına komşu $-\text{CH}_2-$ protonları, fenil halkasına komşu $-\text{CH}_2-$ protonları ile birlikte 4.46-4.18 ppm aralığında multipler olarak gözlenmiştir. Fenoksipropanamid türevi bileşiklerde (4 ve 5) ise tiyazol halkasına komşu $-\text{CH}_2-$ ve fenil halkasına komşu $-\text{CH}_2-$ protonları, fenoksipropanamid yapısında oksijene komşu $-\text{CH}_2-$ protonları ile birlikte 4.45-4.17 ppm aralığında multipler olarak rezonansa gelmiştir. Fenoksipropanamid yapısındaki diğer $-\text{CH}_2-$ protonları da 2.93-2.92 ppm aralığında triplet olarak görülmüştür.

4-Oksobütanamit türevi bileşiklerde (6, 7 ve 8) keton grubuna komşu $-CH_2-$ protonları ve amit karboniline komşu $-CH_2-$ protonları sırasıyla 3.32-3.31 ppm aralığında ve 2.76-2.75 ppm aralığında triplet olarak gözlenmiştir. Bu bileşiklerde tiyazol halkasına komşu $-CH_2-$ protonları, fenil halkasına komşu $-CH_2-$ protonları ile birlikte 3.52 ppm'de singlet olarak görülmüştür.

Fenoksi halkası üzerindeki metoksi ve metil protonları sırasıyla 3.83-3.66 ppm ve 2.20-2.10 ppm aralığında singlet olarak gözlenmiştir.

Aminometil protonları asetamit ve propanamit türevlerinde 2.59-2.57 ppm aralığında bileşik 3 dışında dublet olarak gözlenmiştir. Bileşik 3'te bu pik broad singlet olarak görülmüştür. 4-Oksobütanamit türevi bileşiklerde ise bu pik 2.35-2.10 ppm aralığında singlet olarak görülmüştür.

5.2. Biyolojik Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi

5.2.1. Kolinesteraz inhibisyon sonuçlarının değerlendirilmesi

Sentez edilen bileşiklerin kolinesteraz inhibitör aktiviteleri 10 μ M konsantrasyonda tarandı ve bileşiklerin IC_{50} değerleri hesaplandı. AKE inhibitör aktivite bakımından asetamit ve propanamit serilerindeki bileşiklerin yapı etki ilişkileri incelendiğinde, fenoksi halkasının para konumunda metil grubu taşıyan bileşiklerin (bileşik **2** ve **5**) AKE inhibitör aktiviteye sahip olmadığı bulunmuştur. Halka üzerindeki metil grubunun metoksi grubu ile değiştirildiği türevlerde ise (bileşik **1** IC_{50} =12.10 μ M ve bileşik **4** IC_{50} =12.00 μ M) AKE inhibitör aktivitenin ortaya çıktığı belirlenmiştir. Aktivite sonuçları, fenoksiasetamit türevi bileşiklerin (bileşik **1** ve **2**) ve onların fenoksipropanamit türevi eşleniklerinin (bileşik **4** ve **5**) AKE inhibitör aktiviteleri arasında bir fark olmadığını göstermiştir. Bir başka ifadeyle, zincir uzatılması AKE inhibitör aktivite karakterini değiştirmemiştir. Ayrıca fenoksi halkasının 3 ve 4. konumlarında dimetoksi grubu taşıyan bileşik **3**'ün (IC_{50} =5.80 μ M) monometoksi türevi bileşik **1** ile karşılaştırıldığında daha iyi AKE inhibisyonuna sahip olduğu görülmüştür.

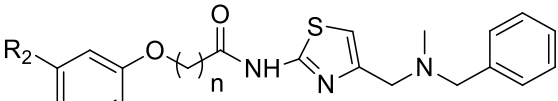
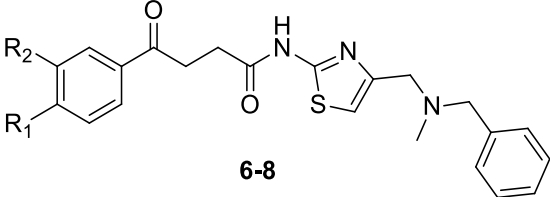
Sentez edilen bileşikler arasında, 4-oksobütanamit türevi bileşiklerin seçici AKE inhibitör aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. 0.63 μM 'lık IC_{50} değeri ile bu yapıyı taşıyan bileşik **8** en yüksek AKE inhibisyonuna sahiptir. Genel olarak 4-oksobütanamit yapısındaki bileşiklerin AKE inhibitör aktivitelerinin, asetamit ve propanamit türevlerinden daha iyi olduğu belirlenmiştir.

Fenil halkası üzerindeki grupların aktivite üzerine etkisi değerlendirildiğinde; halkanın para konumunda metil ya da metoksi grubu olmasının AKE inhibitör aktiviteyi değiştirmedığı, ancak 3,4-dimetoksi sübstitüsyonunun AKE inhibitör aktiviteyi monosübstitüsyona göre yaklaşık 2 kat arttırdığı bulunmuştur.

Bileşiklerin BKE inhibitör aktiviteleri değerlendirildiğinde genel olarak, 4-oksobütanamit yapısındaki bileşiklerin BKE inhibitör aktivitesi bulunmamıştır. 3,4-Dimetoksiasetamit türevi bileşik **3** haricinde (AKE IC_{50} =5.80 μM ; BKE IC_{50} =12.40 μM) asetamit yapısındaki bileşiklerin (bileşik **1** ve **2**) BKE inhibitör aktiviteleri AKE inhibitör aktivitelerine kıyasla daha iyi ve seçicidir. Sentez edilen bileşikler arasında, 2.10 μM 'lık IC_{50} değeri ile bileşik **1** en güçlü ve seçici BKE inhibitörüdür. Bileşik **2** de 2.80 μM 'lık IC_{50} değeri ile selektif BKE inhibitörüdür.

Fenoksipropanamit türevi bileşiklerin de BKE inhibitör aktiviteleri AKE inhibitör aktivitelerine kıyasla daha iyi bulunmuştur. Fakat fenoksiasetamit türevi bileşiklerin (bileşik **1** ve **2**) BKE inhibitör aktivitesi fenoksipropanamit türevi (bileşik **4** ve **5**) eşleniklerinden daha iyidir. Bir başka deyişle zincir uzatılması BKE inhibitör aktivitenin azalmasına neden olmuştur.

Çizelge 5.1. Kolinesteraz aktivite bulguları

			
1-5		6-8	

Bileşik	n	R ₁	R ₂	AKE için IC ₅₀ ± SD (µM)	BKE için IC ₅₀ ± SD (µM)
1	1	OCH ₃	H	12.10 ± 0.02	2.10 ± 0.09
2	1	CH ₃	H	-	2.86 ± 0.05
3	1	OCH ₃	OCH ₃	5.80 ± 0.12	12.39± 0.07
4	2	OCH ₃	H	12.00 ± 0.05	5.64 ± 0.06
5	2	CH ₃	H	-	4.99 ± 0.08
6	-	OCH ₃	H	1.18 ± 0.05	-
7	-	CH ₃	H	1.20 ± 0.05	-
8	-	OCH ₃	OCH ₃	0.63 ± 0.04	-
Donepezil				0.06 ± 0.07	3.70 ± 0.02

(-): inhibitör aktivite yok anlamına gelmektedir.

5.2.2. Antienflamatuvar aktivite bulgularının değerlendirilmesi

Sentezlenen bileşiklerin 10 µM konsantrasyonda THP-1 hücrelerinde enflamatuvar belirteçler üzerine etkileri (IL-1β, IL-6, TNF-α ve NO) ELISA yöntemi ile test edilmiş dolayısıyla antienflamatuvar etkileri değerlendirilmiştir.

Sentez edilen bileşikler arasında bileşik 1, 3 ve 6'nın diğer bileşiklere kıyasla 10 µM konsantrasyonda, test edilen tüm enflamatuvar belirteçlerin seviyesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı tespit edilmiştir (p<0,05). Bu üç bileşiğin IL-6, TNF-α ve NO seviyelerini istatistiksel olarak hemen hemen aynı düzeyde azalttığı, bileşik 1'in ise IL-1β belirtecini

seviyesini diğer iki bileşiğe kıyasla istatistiksel olarak daha anlamlı düzeyde azalttığı söylenebilir ($p < 0,05$).

5.2.3. Sitotoksosite testi bulgularının değerlendirilmesi

Bileşiklerin sitotoksisiteleri 5 μM ve 10 μM konsantrasyonda MTT yöntemi ile tarandı. Bileşiklerin bu konsantrasyonlarda sitotoksosite göstermedikleri ve hücre canlılığının %100'ün üzerinde olduğu belirlenmiştir.

5.2.4. Bileşiklerin metal şelatör etki tayini

Bileşiklerin Fe(II), Cu(II) ve Zn(II) ile şelasyon tayini belirli bir dalga boyu aralığındaki UV spektroskopisi ile incelenebilmekte ve literatürde de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemle göre bileşiğin spektrumu alınır ve daha sonra istenilen metal ile hazırlanan çözeltisinden elde edilen spektrumla kıyaslanır. Bileşik ile metal arasında etkileşim olduğunda, genellikle spektrumun λ_{max} değerlerinde batokromik kayma ve absorbans şiddetinde azalma gözlenmektedir [104-106]. Ancak metal iyonu ilavesi ile bileşik spektrumunda gözlenen tüm değişimler kompleks oluşumunun göstergesi olarak değerlendirilebilir [107]. Bu nedenle, bileşiklerin şelatör etkilerinin daha sağlıklı değerlendirilmesi amacıyla, bileşik+metal karışımının spektrumundan, bileşik ve metal kontrol çözeltilerinin spektrumları çıkarılarak, absorbans kayması grafikleri hazırlanmış [108] ve sonuçlar Şekil 4.16'da sunulmuştur. Grafikler incelendiğinde tüm bileşiklerin Fe(II), Cu(II) ve Zn(II) varlığında anlamlı düzeyde absorbans kaymasına neden olduğu görülmüştür. Sonuç olarak sentezlenen tüm bileşiklerin Fe(II), Cu(II) ve Zn(II) iyonları için şelatör etkilerinin olduğu bulunmuştur.

5.3. Moleküler Docking Bulgularının Değerlendirilmesi

Moleküler docking çalışmasında, en yüksek AKE (Bileşik 8) ve en yüksek BKE (Bileşik 1) inhibitör aktiviteye sahip iki bileşiğin bu enzimlerin aktif bölgelerinde yer alan amino asitler ile yaptıkları kovalent olmayan etkileşimler ve bağlanma modları belirlendi. Bu çalışmada AKE enzimi için, *Torpedo Californica* türünden elde edilen kristal yapısı (TcAKE) kullanılırken, BKE enzimi için insan BKE enzim kristal yapısı (HuBKE) tercih edilmiştir.

Bileşikler ve kolinesteraz enzimleri arasında görülen; hidrojen bağı, π - π , katyon- π , C-H... π ve suyun aracılık ettiği etkileşimler “bileşik-kolinesteraz enzim kompleksinin” stabilitesinde önemli role sahip olan etkileşimlerdir. Bu etkileşimlerin yanı sıra enzim kristal yapısında gözlenen ve aktif bölgede gömülü halde bulunan su moleküllerin de ligand ile etkileşimde önemli rolü olduğu ifade edilmiştir. [91, 109, 110].

5.3.1. Asetilkolinesteraz için docking sonuçlarının değerlendirilmesi

Bileşiklerin AKE enziminin KAB’ında bulunan Trp84 ve Phe330 ve enzimin PAB’ında bulunan Trp279 ile yaptığı etkileşimlerin önemli olduğu ve bu etkileşimlerin E2020-TcAKE enzim kompleksinin yapısında da gözlemlendiği bildirilmiştir. Bileşik 8’de benzil yapısındaki fenil halkasının Trp84 ile π - π etkileşimi (3.93 Å) yaptığı gözlenmiştir. Bileşiğin pozitif yüklü azotu ise Phe330’un fenil halkası ile katyon- π etkileşimi (3.84 Å) yapmaktadır. Ayrıca bileşiğin benzil yapısındaki CH₂ karbonunun da Phe330 ile CH- π etkileşimi (4.08 Å) yaptığı belirlenmiştir. İlave olarak benzil yapısındaki fenil halkası ve AKE su molekülü arasında O-H... π etkileşimi (3.48 Å) belirlenmiştir. PAB’da ise keton grubuna komşu CH₂ karbonunun Trp279 ile CH- π etkileşimi (3.90 Å) yaptığı gözlenmiştir. Ayrıca keton grubu oksijeni ile AKE su molekülü arasında hidrojen bağı (2.82 Å) ve 3,4-dimetoksifenil halkası ile AKE su molekülü arasında O-H... π (3.78 Å) etkileşimleri belirlenmiştir.

5.3.2. Bütirilkolinesteraz için docking sonuçlarının değerlendirilmesi

AKE aktif cebine göre yaklaşık 200 Å³ daha geniş olan BKE aktif cebinde bulunan Asp70, Ser79, Trp82, Ser198, Thr120, Trp231, Phe285, Ser287, Phe329, Tyr332, Trp430, His438, Tyr440 ve Ala328 kalıntılarının BKE inhibisyonu için önemli oldukları bildirilmiştir [111]. AKE’de olduğu gibi BKE aktif bölgesinde de korunmuş su moleküllerin bulunduğu ve ligand etkileşiminde önemli oldukları düşünülmektedir [91, 110, 112-114].

Bileşik 1’de Pro285 kalıntısı ile fenoksi metil grubuna ait protonlar arasında H-bağı (3.28 Å) belirlenmiştir. Pozitif yüklü azotunun Trp82’nin hem beşli hem de altılı halkası ile katyon- π etkileşimleri (3.73 Å, 4.88 Å) yaptığı gözlenmiştir. Bileşiğin tiyazol halkasındaki kükürt, Ala328 ile hidrojen bağı yapmaktadır. Ayrıca benzil yapısındaki fenil halkasının His438 ile (4.72 Å) ve fenoksi halkasının ise Phe329 ile (4.11 Å) π -CH etkileşimleri yaptığı belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda, 3-fenilprop-2-enamit türevi hit bileşiğimizden esinlenerek 2-fenoksiasetamit, 3-fenoksipropanamit ve 4-oksobütanamit yapısında bileşikler sentez edildi. Hit bileşiğimiz $1.3 \mu\text{M}$ 'lık IC_{50} değeri ile seçici AKE inhibitör aktiviteye sahipken, bu bileşiğin 2-fenoksiasetamit eşleniği olan bileşik 1'in, seçici BKE inhibitör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak 3-fenoksipropanamit türevlerinde BKE inhibitör aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. 4-Oksobütanamit yapısına sahip bileşiklerin ise seçici AKE inhibitör aktiviteye sahip oldukları ve bu serinin en güçlü AKE inhibitör aktivitesine sahip bileşik 8'in, hit bileşikten yaklaşık 2 kat daha aktif olduğu belirlenmiştir.

Bileşik 1, 3 ve 6'nın test edilen tüm enflamatuvar belirteçlerin seviyesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı tespit edilmiştir. Sentezlenen tüm bileşiklerin Fe(II) , Cu(II) ve Zn(II) iyonları için şelatör etkilerinin olduğu bulunmuştur. Ayrıca bileşiklerin etkili oldukları konsantrasyonlarda sitotoksik olmadıkları belirlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında sonraki çalışmalarımızda tez kapsamında çalışılan hedefler üzerinde daha etkili yeni bileşiklerin geliştirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Alzheimer's, A. (2021). 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Race ethnicity and Alzheimer's in America*, 1-19.
2. Internet: Türk Nöroloji Derneği 2021: Alzheimer Hastalığı. Web: <https://www.noroloji.org.tr/menu/94/alzheimer-hastaligi> adresinden 08 Ağustos 2021'de alınmıştır.
3. Toepper, M. (2017). Dissociating normal aging from Alzheimer's disease: A view from cognitive neuroscience. *Journal of Alzheimers Disease*, 57(2), 331-352.
4. Escher, C.M., Sannemann, L., and Jessen, F. (2019). Stress and Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 126(9), 1155-1161.
5. Sun, B. L., Li, W. W., Zhu, C., Jin, W. S., Zeng, F., Liu, Y. H., Bu, X.L., Zhu, J., Yao, X.Q., and Wang, Y. J. (2018). Clinical research on Alzheimer's disease: progress and perspectives. *Neuroscience Bulletin*, 34(6), 1111-1118.
6. Huang, L. K., Chao, S. P., and Hu, C. J. (2020). Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1-13.
7. Di Resta, C., and Ferrari, M. (2019). New molecular approaches to Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry*, 72, 81-86.
8. Cao, J., Hou, J., Ping, J., and Cai, D. (2018). Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1), 1-20.
9. Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Molecular Medicine Reports*, 20(2), 1479-1487.
10. Ladner, C. J., and Lee, J. M. (1998). Pharmacological drug treatment of Alzheimer disease: the cholinergi hypothesis revisited. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(8), 719.
11. Stanciu, G. D., Luca, A., Rusu, R. N., Bild, V., Beschea Chiriac, S. I., Solcan, C., Bild, W., and Ababei, D. C. (2020). Alzheimer's disease pharmacotherapy in relation to cholinergic system involvement. *Biomolecules*, 10(1), 40.

12. Erdogan, M., Kilic, B., Sagkan, R. I., Aksakal, F., Ercetin, T., Gulcan, H. O., and Dogruer, D. S. (2021). Design, synthesis and biological evaluation of new benzoxazolone/benzothiazolone derivatives as multi-target agents against Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 212, 113124.
13. Calsolaro, V., and Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimer's and Dementia*, 12(6), 719-732.
14. Moore, A. H., and O'banion, M. K. (2002). Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(12), 1627-1656.
15. Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., and Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 4, 575-590.
16. Ozben, T., and Ozben, S. (2019). Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease. *Clinical biochemistry*, 72, 87-89.
17. Squitti, R. (2012). Metals in Alzheimer's disease: a systemic perspective. *Frontiers in Bioscience*, 17(1), 451-472.
18. Liu, Y., Nguyen, M., Robert, A., and Meunier, B. (2019). Metal ions in Alzheimer's disease: A key role or not?. *Accounts of Chemical Research*, 52(7), 2026-2035.
19. Harada, C. N., Love, M. C. N., and Triebel, K. L. (2013). Normal cognitive aging. *Clinics in Geriatric Medicine*, 29(4), 737-752.
20. Amarya, S., Singh, K., and Sabharwal, M. (2018). Ageing process and physiological changes. *Gerontology, IntechOpen*, 1-24.
21. Internet: World Health Organization. (2021). Dementia. Web: https://www.who.int/health-topics/dementia#tab=tab_1 adresinden 03 Ağustos 2021'de alınmıştır.
22. Raz, L., Knoefel, J., and Bhaskar, K. (2016). The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(1), 172-186.
23. Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., De Vos, R. A. I., Jansen, E. N. H., and Bohl, J. (1997). Neurofibrillary tangles and neuropil threads as a cause of dementia in Parkinson's disease. *Dementia in Parkinsonism*, 49-55.

24. Alzheimer's, A. (2017). 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Next Frontier of Alzheimer's Research*, 5-6.
25. Burns, A., and Iliffe, S. (2009) Alzheimer's disease. *British Medical Journal*, 338, b158.
26. Scarpini, E., Scheltens, P., and Feldman, H. (2003). Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives. *The Lancet Neurology*, 2(9), 539-547.
27. Hansen, D. V., Hanson, J. E., and Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *Journal of Cell Biology*, 217(2), 459-472.
28. Soria Lopez, J. A., González, H. M., and Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 167, 231–255.
29. Liu, P. P., Xie, Y., Meng, X. Y., and Kang, J. S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1), 1-22.
30. Du, X., Wang, X., and Geng, M. (2018). Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translational Neurodegeneration*, 7(1), 1-7.
31. World Alzheimer Report 2019: Attitudes of dementia. *Alzheimer's Disease International*, 1-8.
32. Mueller, K. D., Hermann, B., Mecollari, J., and Turkstra, L. S. (2018). Connected speech and language in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A review of picture description tasks. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 40(9), 917-939.
33. İnternet: Alzheimer's Association (2021). Alzheimer and dementia: Stages of Alzheimer's. Web: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/stages> adresinden 03 Ağustos 2021'de alınmıştır.
34. İnternet: Mayo Clinic (2021). Alzheimer's stages: How the disease progresses. Web: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers-stages/art-20048448> adresinden 03 Ağustos 2021'de alınmıştır.
35. Förstl, H., & Kurz, A. (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 249(6), 288-290.

36. Honig, L. S., and Mayeux, R. (2001). Natural history of Alzheimer's disease. *Aging Clinical and Experimental Research*, 13(3), 171-182.
37. Cummings, J. L., and Cole, G. (2002). Alzheimer disease. *American Medical Association*, 287(18), 2335-2338.
38. Castellani, R. J., Rolston, R. K., and Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease *Disease-a-month*, 56(9), 484-546.
39. Vinters, H. V. (2015). Emerging concepts in Alzheimer's disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10, 291-319.
40. Yankner, B. A. (1996). Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*, 16(5), 921-932.
41. Kunz, L., Schröder, T. N., Lee, H., Montag, C., Lachmann, B., Saryiska, R., Reuter, M., Stirnberg, R., Söcker, T., Messing-Floeter, P.C., Fell, J., Doeller, C.F., and Axmacher, N. (2015). Reduced grid-cell-like representations in adults at genetic risk for Alzheimer's disease. *Science*, 350(6259), 430-433.
42. Lee, Y. J., Han, S. B., Nam, S. Y., Oh, K. W., and Hong, J. T. (2010). Inflammation and Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 33(10), 1539-1556.
43. Armstrong, R. A. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*, 57(2), 87-105.
44. Dos Santos Picanco, L.C., Ozela, P.F., de Fatima de Brito Brito, M., Pinheiro, A. A., Padilha, E. C., Braga, F.S., de Paula da Silva, C.H.T., dos Santos, C.B.R., Rosa, J.M.C., and da Silva Hage-Melim, L.I. (2018). Alzheimer's disease: a review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 25(26), 3141-3159.
45. Forestier, A., Douki, T., De Rosa, V., Béal, D., and Rachidi, W. (2015). Combination of A β secretion and oxidative stress in an Alzheimer-like cell line leads to the over-expression of the nucleotide excision repair proteins DDB₂ and XPC. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 17422-17444.
46. Internet: Sciencesourceimages. (2021). Alzheimer's disease brain comparison. Web: <https://www.sciencesource.com/archive/Image/Alzheimer-s-Disease-Brain-Comparison-SS2569030.html> adresinden 03 Ağustos 2021'de alınmıştır.

47. Querfurth, H. W., and LaFerla, F. M. (2010). Mechanisms of disease: Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344.
48. Blennow, K., Mattsson, N., Schöll, M., Hansson, O., and Zetterberg, H. (2015). Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(5), 297-309.
49. O'Brien, R. J., and Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 185-204.
50. Ballatore, C., Lee, V. M. Y., and Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9), 663-672.
51. Zetterberg, H. (2017). Tau in biofluids—relation to pathology, imaging and clinical features. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 43(3), 194-199.
52. Takeda, S. (2019). Tau propagation as a diagnostic and therapeutic target for dementia: potentials and unanswered questions. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1274.
53. Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., and Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1502(1), 139-144.
54. Gella, A., & Durany, N. (2009). Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration*, 3(1), 88-93.
55. Solleiro-Villavicencio, H., and Rivas-Arancibia, S. (2018). Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+ T cells in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 114.
56. Solana, C., Tarazona, R., and Solana, R. (2018). Immunosenescence of natural killer cells, inflammation, and Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2018, 1-9.
57. Kepp, K. P. (2012). Bioinorganic chemistry of Alzheimer's disease. *Chemical Reviews*, 112(10), 5193-5239.
58. Huber, A., Stuchbury, G., Burkle, A., Burnell, J., and Munch, G. (2006). Neuroprotective therapies for Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 12(6), 705-717.

59. Biran, Y. A., Masters, C. L., Barnham, K. J., Bush, A. I., and Adlard, P. A. (2009). Pharmacotherapeutic targets in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(1), 61-86.
60. Sestito, S., Wang, S., Chen, Q., Lu, J., Bertini, S., Pomelli, C., Chiellini, G., He, X., Pi, R., and Rapposelli, S. (2019). Multi-targeted ChEI-copper chelating molecules as neuroprotective agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 174, 216-225.
61. Bortolami, M., Pandolfi, F., De Vita, D., Carafa, C., Messore, A., Di Santo, R., Feroci, M., Costi, R., Chiarotto, I., Bagetta, D., Alcaro, S., Colone, M., Stringaro, A., and Scipione, L. (2020). New deferiprone derivatives as multi-functional cholinesterase inhibitors: design, synthesis and in vitro evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 198, 112350.
62. Wang, X., Wang, X., and Guo, Z. (2018). Metal-involved theranostics: An emerging strategy for fighting Alzheimer's disease. *Coordination Chemistry Reviews*, 362, 72-84.
63. Hynd, M. R., Scott, H. L., and Dodd, P. R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 45(5), 583-595.
64. Esposito, Z., Belli, L., Toniolo, S., Sancesario, G., Bianconi, C., and Martorana, A. (2013). Amyloid β , glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: are we on the right track?. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 19(8), 549-555.
65. McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34(7), 939-944.
66. Knopman, D. S., DeKosky, S. T., Cummings, J. L., Chui, H., Corey-Bloom, J., Relkin, N., Small, G.W., Miller, B., and Stevens, J. C. (2001). Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 56(9), 1143-1153.
67. Kovacs, G. G., Milenkovic, I., Wöhrer, A., Höftberger, R., Gelpi, E., Haberler, C., Honigschnabl, S., Reiner-Concin, A., Heinzl, H., Jugwirth, S., Krampla, W., Fischer, P., and Budka, H. (2013). Non-Alzheimer neurodegenerative pathologies and their combinations are more frequent than commonly believed in the elderly brain: a community-based autopsy series. *Acta Neuropathologica*, 126(3), 365-384.

68. Selekler, K. (2010). Alois Alzheimer and Alzheimer's disease. *Turk Geriatri Dergisi*, 13(3) 9-14.
69. Baldwin, S., and Farias, S. T. (2009). Neuropsychological assessment in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Current Protocols in Neuroscience*, 49(1), 10-3.
70. Apostolova, L. G. (2016). Alzheimer disease. *Continuum (Minneapolis, Minn.): Lifelong Learning in Neurology*, 22(2 Dementia), 419-434.
71. Atri, A. (2019). Current and future treatments in Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 39 (2), 227-240.
72. Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O’Gorman, J., Qian, F., Arastu, M., Li, M., Chollate, S., Brennan, M.S., Quintero-Monzon, O., Scannevin, R.H., Arnold, M., Engber, T., Rhodes, K., Ferrero, J., Hang, Y., Mikulskis, A., Grimm, J., Hock, C., M. Nitsch, R., and Sandrock, A. (2016). The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer’s disease. *Nature*, 537(7618), 50-56.
73. Alexander, G. C., Emerson, S., and Kesselheim, A. S. (2021). Evaluation of aducanumab for Alzheimer disease: scientific evidence and regulatory review involving efficacy, safety, and futility. *The Journal of the American Medical Association*, 325(17), 1717-1718.
74. Buccafusco, J. J. (2004). The cholinergic hypothesis—past and present. *In Cognitive Enhancing Drugs*, USA, 1-10.
75. Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., and Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer’s disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 66(2), 137-147.
76. Sugimoto, H. (2008). The new approach in development of anti-Alzheimer's disease drugs via the cholinergic hypothesis. *Chemico-Biological Interactions*, 175(1-3), 204-208.
77. Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2013). Current and future treatments for Alzheimer’s disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(1), 19-33.
78. Schneider, L. S. (2013). Alzheimer disease pharmacologic treatment and treatment research. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 19(2), 339-357.

79. Anand, P., & Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 36(4), 375-399.
80. Mayeux, R., & Sano, M. (1999). Treatment of Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 341(22), 1670-1679.
81. Grutzendler, J., and Morris, J. C. (2001). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Drugs*, 61(1), 41-52.
82. Massoud, F., and Léger, G. C. (2011). Pharmacological treatment of Alzheimer disease. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 56(10), 579-588.
83. Ballard, C., Creese, B., Corbett, A., and Aarsland, D. (2011). Atypical antipsychotics for the treatment of behavioral and psychological symptoms in dementia, with a particular focus on longer term outcomes and mortality. *Expert Opinion on Drug Safety*, 10(1), 35-43.
84. Wilson, B. W. (2010). Cholinesterases. *Handbook of Pesticide Toxicology* (Third Edition). California: 1457-1478.
85. Talesa, V. N. (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(16), 1961-1969.
86. Li, Q., Yang, H., Chen, Y., and Sun, H. (2017). Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 132, 294-309.
87. Ha, Z. Y., Mathew, S., and Yeong, K. Y. (2020). Butyrylcholinesterase: a multifaceted pharmacological target and tool. *Current Protein and Peptide Science*, 21(1), 99-109.
88. Patočka, J., Kuča, K., and Jun, D. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase—important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 47(4), 215-228.
89. Greig, N. H., Lahiri, D. K., and Sambamurti, K. (2002). Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics*, 14(S1), 77-91.
90. Darvesh, S., Hopkins, D. A., & Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(2), 131-138.

91. Bajda, M., Więckowska, A., Hebda, M., Guzior, N., Sotriffer, C. A., and Malawska, B. (2013). Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5608-5632.
92. Pohanka, M. (2013). Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. *Bratislava Medical Journal*, 114(12), 726-734.
93. Luo, L., Jia, J. J., Zhong, Q., Zhong, X., Zheng, S., Wang, G., and He, L. (2021). Synthesis and anticancer activity evaluation of naphthalene-substituted triazole spirodienones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 213, 113039.
94. Zhao, G., Yu, T., Wang, R., Wang, X., and Jing, Y. (2005). Synthesis and structure–activity relationship of ethacrynic acid analogues on glutathione-s-transferase P1-1 activity inhibition. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(12), 4056-4062.
95. Russell, S., Rahmani, R., Jones, A. J., Newson, H. L., Neilde, K., Cotillo, I., Khajouei, M.R., Ferrins, L., Qureishi, S., Nguyen, N., Martinez-Martinez, M.S., Weaver, D.F., Kaiser, M., Riley, J., Thomas, J., De Rycker, M., Read, K.D., Flematti, G.R., Ryan, E., Tanghe, S., Rodriguez, A., Charman, S.A., Kessler, A., Avery, V.M., Baell, J.B., and Piggott, M. J. (2016). Hit-to-lead optimization of a novel class of potent, broad-spectrum trypanosomacides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(21), 9686-9720.
96. De Wald, H. A., Heffner, T. G., Jaen, J. C., Lustgarten, D. M., McPhail, A. T., Meltzer, L. T., Pugsley, T.A., and Wise, L. D. (1990). Synthesis and dopamine agonist properties of (+)-trans-3, 4, 4a, 10b-tetrahydro-4-propyl-2H, 5H-[1] benzopyrano [4, 3-b]-1, 4-oxazin-9-ol and its enantiomers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 33(1), 445-450.
97. Iida, H., Akatsu, Y., Mizukami, K., Natori, S., Matsukawa, M., and Takahashi, K. (2016). Efficient and rapid synthesis of phenolic analogs of 4-phenylbutanoic acid using microwave-assisted Michael addition as a key reaction. *Synthetic Communications*, 46(7), 581-585.
98. Mogilaiah, K., Vasudeva Reddy, N., and Randheer Reddy, G. (2003). An efficient and novel method for the synthesis of β -aroylpropionic acids under solvent-free conditions. *Synthetic Communications*, 33(18), 3109-3113.
99. Koul, S., Singh, B., Taneja, S. C., and Qazi, G. N. (2003). New chemo and chemo-enzymatic synthesis of β -benzyl- γ -butyrolactones. *Tetrahedron*, 59(19), 3487-3491.

100. Mao, F., Huang, L., Luo, Z., Liu, A., Lu, C., Xie, Z., and Li, X. (2012). O-Hydroxyl-or o-amino benzylamine-tacrine hybrids: multifunctional biometals chelators, antioxidants, and inhibitors of cholinesterase activity and amyloid- β aggregation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(19), 5884-5892.
101. Kryger, G., Silman, I., and Sussman, J. L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 7(3), 297-307.
102. Nachon, F., Carletti, E., Ronco, C., Trovaslet, M., Nicolet, Y., Jean, L., and Renard, P. Y. (2013). Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochemical Journal*, 453(3), 393-399.
103. Molecular Operating Environment (MOE), 2014.0901; Chemical Computing Group ULC, Montreal, QC, Canada, (2014).
104. Huang, W., Liang, M., Li, Q., Zheng, X., Zhang, C., Wang, Q., Tang, L., Zhang, Z., Wang, B., and Shen, Z. (2019). Development of the "hidden" multifunctional agents for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 177, 247-258.
105. Sestito, S., Wang, S., Chen, Q., Lu, J., Bertini, S., Pomelli, C., Chiellini, G., He, X., Pi, R., and Rapposelli, S. (2019). Multi-targeted ChEI-copper chelating molecules as neuroprotective agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 174, 216-225.
106. Wichur, T., Więckowska, A., Więckowski, K., Godyń, J., Jończyk, J., del Río Valdivieso, Á., Panek, D., Pasięka, A., Sabtae, R., Knez, D., Gobec, S., and Malawska, B. (2020). 1-Benzylpyrrolidine-3-amine-based BuChE inhibitors with anti-aggregating, antioxidant and metal-chelating properties as multifunctional agents against Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 187, 111916.
107. Bortolami, M., Pandolfi, F., De Vita, D., Carafa, C., Messore, A., Di Santo, R., Feroci, M., Costi, R., Chiarotto, I., Bagetta, D., Alcar, S., Colone, M., Stringaro, A., and Scipione, L. (2020). New deferiprone derivatives as multi-functional cholinesterase inhibitors: design, synthesis and in vitro evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 198, 112350.
108. Huang, W., Lv, D., Yu, H., Sheng, R., Kim, S. C., Wu, P., Luo, K., Li, J., and Hu, Y. (2010). Dual-target-directed 1, 3-diphenylurea derivatives: BACE 1 inhibitor and metal chelator against Alzheimer's disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(15), 5610-5615.

109. Kryger, G., Silman, I., and Sussman, J. L. (1998). Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *Journal of Physiology-Paris*, 92(3-4), 191-194.
110. Košak, U., Brus, B., Knez, D., Šink, R., Žakelj, S., Trontelj, J., Pišlar, A., Šlenc, J., Gobec, M., Živin, M., Tratnjek, L., Perše, M., Sašat, K., Podkova, A., Filipek, B., Nachon, F., Brazzolotto, X., Więckowska, A., Malawska, B., Stojan, J., Raščan, I.M., Kos, J., Coquelle, N., Colletier, J.P., & Stanislav Gobec, S. (2016). Development of an in-vivo active reversible butyrylcholinesterase inhibitor. *Scientific Reports*, 6(1), 1-16.
111. Saxena, A., Fedorko, J. M., Vinayaka, C. R., Medhekar, R., Radić, Z., Taylor, P., Lockridge, O., and Doctor, B. P. (2003). Aromatic amino-acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E2020 (Aricept®) to cholinesterases. *European Journal of Biochemistry*, 270(22), 4447-4458.
112. Dighe, S. N., Deora, G. S., De la Mora, E., Nachon, F., Chan, S., Parat, M. O., Brazzolotto, X., and Ross, B. P. (2016). Discovery and structure–activity relationships of a highly selective butyrylcholinesterase inhibitor by structure-based virtual screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(16), 7683-7689.
113. Knez, D., Brus, B., Coquelle, N., Sosič, I., Šink, R., Brazzolotto, X., Marvljak, J., Colletier, J.P., and Gobec, S. (2015). Structure-based development of nitroxoline derivatives as potential multifunctional anti-Alzheimer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(15), 4442-4452.
114. De Boer, D., Nguyen, N., Mao, J., Moore, J., and Sorin, E. J. (2021). A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. *Biomolecules*, 11(4), 580.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Shakıla SHAKILA
 Uyruğu : Pakistan
 Doğum tarihi ve yeri :
 Medeni hali : Bekar
 Telefon :
 e-mail :



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Devam ediyor
Lisans	Quaid-i-azam University, Islamabad, Pakistan	2018
Lise	Public School and College Jutial Gilgit, Pakistan	2013

Yabancı Dil

Türkçe, İngilizce, Urduca, Hintçe, Brushaski

Yayınlar

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

- Shakıla Shakıla, Burcu Kılıç, Fatma Aksakal, Deniz S. Doğruer. Synthesis Of Some New 2-Phenoxyacetamide And 3-Phenoxypropanamide Derivatives and Evaluation of Their Cholinesterase Inhibitor Activities. 22-25 Haziran Ankara, Turkey, ISOPS 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences: Poster.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..