Doruk SATICI FARMASÖTİK BİLİMLER ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ 2024

Kapak Sırtı



T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEKNİDAZOL TÜREVİ BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE ASETİLKOLİNESTERAZ-BÜTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Doruk SATICI

Danışman: Doç. Dr. Esra DİLEK

FARMASÖTİK BİLİMLER ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
Haziran 2024
Her Hakkı Saklıdır.

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEKNİDAZOL TÜREVİ BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE ASETİLKOLİNESTERAZ-BÜTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Doruk SATICI

Danışman: Doç. Dr. Esra DİLEK

FARMASÖTİK BİLİMLER ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
Haziran 2024
Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Bilimler Anablim Dalı Biyokimya programında öğrenci Doruk SATICI tarafından Doç. Dr. Esra DİLEK danışmanlığında hazırlanan "**Seknidazol Türevi Bileşiklerin Tasarımı, Sentezi ve Asetilkolinesteraz-Bütirilkolinestreaz İnhibitör Aktivitelerinin Araştırılması**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 07/06/2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavında başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (…/…) ile kabul edilmiştir.

Başkan:	Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ	İmza:
Üye :	Doç. Dr. Esra DİLEK	İmza:
Üye :	Doç. Dr. Yeliz DEMİR	İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun …. / …. / 20.... tarih ve …../…….. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Filiz YANGILAR

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk

"**Seknidazol Türevi Bileşiklerin Tasarımı, Sentezi ve Asetilkolinesteraz-Bütirilkolinestreaz İnhibitör Aktivitelerinin Araştırılması**" isimli "Yüksek Lisans" tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. **07/06/2024**

(İmza)

Doruk SATICI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SEKNİDAZOL TÜREVİ BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE ASETİLKOLİNESTERAZ-BÜTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Doruk SATICI

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötil Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Esra DİLEK

Amaç: Bazı seknidazol türevi (**1a-h**) bileşiklerin tasarımı, sentezi ve asetilkolinesteraz (AChE)-bütirilkolinesteraz (BChE) enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerini araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin AChE ve BChE enzim inhibitör etkileri Ellman metodu ile araştırılmıştır. Standart madde olarak donepezil ve Ellman'ın reaktifleri kullanılmıştır.

Bulgular: Sonuçlarımız, tüm bileşiklerin referans bileşik olan donepezil'e kıyasla hem AChE hem de BChE karşı önemli bir inhibisyon etkisi sergilediğini göstermektedir. Özellikle **1h** bileşiği her iki enzim içinde daha etkili inhibisyon sergilemiştir. Elektroforus elektrikus AChE (EeAChE) için 0.024±0.009 nM ve equine serum BChE (eqBChE) için 0.087±0.017 nM olan K_i değerleri ile en yüksek etkiyi göstermiştir. Ayrıca, moleküler docking çalışmaları, bu bileşiklerin AChE ve BChE kristal yapılarının (sırasıyla PDB Kimlikleri: 4EY7 ve 4BDS) aktif bölgelerindeki etkileşim mekanizmaları hakkında değerli bilgiler sağlamıştır.

Sonuç: Seknidazol türevlerinin Alzheimer hastalığının (AD) tedavisi için umut vadeden fonksiyonel ajanlar olduğu gösterilmiştir. Bu enzimlerin çift inhibisyonu, özellikle AD gibi nörolojik bozuklukların tedavisi için umut vadeden bir strateji olarak kabul edilmektedir.

2024, 59 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, metronidazol, seknidazol, moleküler doking, Alzheimer hastalığı.

ABSTRACT

MSc Thesis

DESIGN, SYNTHESIS, AND INVESTIGATION OF ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYRYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITIES OF SEKNIDAZOLE DERIVATIVES

Doruk SATICI

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Health Sciences
Department of Pharmaceutical Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Esra DİLEK

Aim: The objective is to design, synthesize, and investigate the inhibitory effects of certain seknidazole derivatives **(1a-h)** on the enzymatic activities of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE).

Material and Method: The inhibitory effects of the synthesized compounds on AChE and BChE enzymes were investigated using the Ellman method. Donepezil and Ellman's reagents were used as standard substances.

Results: Our results indicate that all compounds exhibit significant inhibitory effects against both AChE and BChE compared to the reference compound donepezil. In particular, compound **1h** demonstrated more effective inhibition for both enzymes. It exhibited the highest potency with Ki values of 0.024±0.009 nM for Electrophorus electricus AChE (EeAChE) and 0.087±0.017 nM for equine serum BChE (eqBChE). Additionally, molecular docking studies provided valuable insights into the interaction mechanisms of these compounds within the active sites of the AChE and BChE crystal structures (PDB IDs: 4EY7 and 4BDS, respectively).

Conclusion: Seknidazole derivatives have been shown to be promising functional agents for the treatment of Alzheimer's disease (AD). The dual inhibition of these enzymes is considered a promising strategy, particularly for the treatment of neurological disorders such as AD.

2024, 59 Pages

Keywords: Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, metronidazole, secnidazole, molecular docking, Alzheimer’s disease,

TEŞEKKÜR

Öncelikle, danışmanlığımı üstlenen ve tez çalışmam boyunca bana rehberlik eden, değerli bilgisi, tecrübesi ve katkılarıyla sürecimi zenginleştiren kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Esra DİLEK'e ve yüksek lisans eğitimim boyunca Biyokimya'yı hayatla iç içe geçmiş şekilde keyifle aktaran Sayın Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ'e,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde emeği geçen, çalışmaları, araştırmaları ve bilgileriyle bana katkı sağlayan, tez kapsamında kullanılan bileşikleri sentezleyen Sayın Prof. Dr. Öztekin ALGÜL ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Burak KUZU'ya, bileşiklerin tasarımını yapan Sayın Doç. Dr. Burçin TÜRKMENOĞLU'na,

Bu süreçte her zaman yanımda olan ve maddi manevi destekleriyle beni hayat boyu motive eden sevgili aileme minnettarım. Gösterdikleri anlayış, özveri ve sonsuz sevgi için annem Yeter SATICI'ya, babam Yücel SATICI'ya ve kardeşim Yağmur Deniz SATICI'ya,

Ayrıca çok değerli çalışma arkadaşlarım Emine Selin POLAT ve Çağla Gül GICI'ya

En içten dileklerimle en özel teşekkürlerimi iletmek isterim…

Doruk SATICI

Haziran, 2024

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay ..... **i**
Bilimsel Etiğe Uygunluk ..... **ii**
ÖZET ..... **iii**
ABSTRACT ..... **iv**
TEŞEKKÜR ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **vii**
TABLOLAR LİSTESİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2.GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Enzimler 4
2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması 7
2.2. Kolinesterazlar 7
2.2.1. AChE Enzimi 8
2.2.2. BChE Enzimi 12
3. MATERYAL ve METOT **18**
3.1. Materyal 18
3.1.1. Kimyasal maddeler 18
3.1.2. Kullanllan Çözeltiler 18
3.2. Metot 20
3.2.1. Aktivite Tayini 20
3.2.2. AChE ve BChE ile ilgili in vitro İnhibisyon Çalışmaları 21
3.2.3. In Silico Çalışmalar 21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI **23**
4.1. AChE Enzimi ile Yapılan Çalışma Bulguları 23
4.2. BChE Enzimi ile Yapılan Çalışma Bulguları 33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ **43**
KAYNAKLAR **52**
ÖZGEÇMİŞ **59**

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Anahtar kilit modeli (Mohan ve ark., 2014) 4
Şekil 2. 2. Enzim Alt Birimleri 5
Şekil 2. 3. Asetilkolinin Yapısı 8
Şekil 2. 4. AChE'nin biyolojik rolü 10
Şekil 2. 5. BChE'nin moleküler formları (Darvesh ve ark., 2003) 13
Şekil 2. 6. BChE'nin enzimatik olarak aktif bölgesi. Ser226 (S), His466 (H), Glu353 (E), Lys286 ve Val288 içeren asil cebi (A), Trp82 (W), Asp70 (D) ve Tyr332 (Y) (Darvesh ve ark., 2003) 14
Şekil 3. 1. Kolinesterazlar için sentezlenmiş bileşikler 18
Şekil 4. 1. AChE enzimi için 1a inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 24
Şekil 4. 2. AChE enzimi için 1a inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 24
Şekil 4. 3. AChE enzimi için 1b inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 25
Şekil 4. 4. AChE enzimi için 1b inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 25
Şekil 4. 5. AChE enzimi için 1c inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 26
Şekil 4. 6. AChE enzimi için 1c inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 26
Şekil 4. 7. AChE enzimi için 1d inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 27
Şekil 4. 8. AChE enzimi için 1d inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 27
Şekil 4. 9. AChE enzimi için 1e inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 28
Şekil 4. 10. AChE enzimi için 1e inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 28

Şekil 4. 11. AChE enzimi için 1f inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 29
Şekil 4. 12. AChE enzimi için 1f inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 29
Şekil 4. 13. AChE enzimi için 1g inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 30
Şekil 4. 14. AChE enzimi için 1g inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 30
Şekil 4. 15. AChE enzimi için 1h inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 31
Şekil 4. 16. AChE enzimi için 1h inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 31
Şekil 4. 17. AChE enzimi için Donepezil ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 32
Şekil 4. 18. AChE enzimi için Donepezil inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 32
Şekil 4. 19. BChE enzimi için 1a inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 34
Şekil 4. 20. BChE enzimi için 1a inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 34
Şekil 4. 21. BChE enzimi için 1b inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 35
Şekil 4. 22. BChE enzimi için 1b inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 35
Şekil 4. 23. BChE enzimi için 1c inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 36
Şekil 4. 24. BChE enzimi için 1c inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 36
Şekil 4. 25. BChE enzimi için 1d inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 37
Şekil 4. 26. BChE enzimi için 1d inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 37

Şekil 4. 27. BChE enzimi için 1e inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 38
Şekil 4. 28. BChE enzimi için 1e inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 38
Şekil 4. 29. BChE enzimi için 1f inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 39
Şekil 4. 30. BChE enzimi için 1f inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 39
Şekil 4. 31. BChE enzimi için 1g inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 40
Şekil 4. 32. BChE enzimi için 1g inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 40
Şekil 4. 33. BChE enzimi için 1h inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 41
Şekil 4. 34. BChE enzimi için 1h inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 41
Şekil 4. 35. BChE enzimi için Donepezil ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği 42
Şekil 4. 36. BChE enzimi için Donepezil derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği 42
Şekil 5. 1. (A) 1h bileşiğinin AChE ile (PDB Kimliği: 4EY7) 3 boyutlu etkileşim diyagramı. (B) Donepezil bileşiğinin AChE ile (PDB Kimliği: 4EY7) 3 boyutlu etkileşim diyagramı. (C) 1h bileşiğinin BChE ile (PDB Kimliği: 4BDS) 3 boyutlu etkileşim diyagramı. (D) Donepezil bileşiğinin BChE ile (PDB Kimliği: 4BDS) 3 boyutlu etkileşim diyagramı. 49

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2. 1. Enzim İnhibisyon Çeşitleri 6
Tablo 3. 1. Kolinesteraz enzimlerinin aktivite tayin yönteminde kullanılan küvet içeriği ve madde miktarları 20
Tablo 4. 1. AChE üzerinde inhibitör etkiye sahip bileşiklerin (1a-h) ve Donepezil ilacının IC_{50} değerleri ve Ki sabitleri 33
Tablo 4. 2. BChE üzerinde inhibitör etkiye sahip bileşiklerin (1a-h) ve Donepezil ilacının IC_{50} değerleri ve Ki sabitleri 43
Tablo 5. 1. 2D etkileşim diyagramı, docking skoru ve MM/GBSA değerleri, Donepezil ve 1h'nin AChE (PDB Kimliği: 4EY7) ile in silico yaklaşımlar kullanılarak etkileşimde bulunması durumunda şu şekildedir: 46
Tablo 5. 2. Donepezil ve MNZ-8'in BuChE (PDB Kimliği: 4BDS) ile etkileşime girerken in silico yaklaşımlar kullanılarak elde edilen 2 boyutlu etkileşim diyagramı, docking skoru ve MM/GBSA değerleri 47
Tablo 5. 3. Sentezlenen tüm bileşiklerin ADMET analizi 50

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
L	Litre
g	Gram
Mg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
nM	Nanomolar
µM	Mikromolar
mg	Miligram
M	Molarite
mL	Mililitre
°C	Santigrat derece
B	Beta
Å	Angstrom
ε	DTNB'nin molar ekstinksiyon katsayısı (13,6 $M^{-1}cm^{-1}$)
f	Seyreltme katsayısı
Δ*OD*	Bir dakikadaki absorbans değişimi

Kısaltmalar

IC50	Enzim aktivitesini %50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu
Ki	İnhibisyon denge sabiti
AChE	Asetilkolinesteraz
BChE	Bütirilkolinesteraz

EC	Enzim kompleksi
AD	Alzheimer hastalığı
Aβ	Amiloid beta
ACh	Asetilkolin
MAO	Monoamin oksidaz
NMDA	N-metil-D-aspartat
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
KDa	Kilodalton
NAD^+	Nikotinamid adenin dinükleotit
FAD	Flavin adenin dinükleotit
ES	Enzim-substrat kompleksi
EİS	Enzim-substrat-inhibitör kompleksİ
Eİ	Enzim-inhibitör kompleksi
CoA	Koenzim A
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
TRİS	Tris(hidroksimetil)aminometan
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
HCl	Hidroklorik asit
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit
EU	Enzim Ünitesi
Vmax	Maksimum reaksiyon hızı

1. GİRİŞ

Enzimler, yaşayan sistemlerdeki metabolizmanın büyük çoğunluğunu oluşturan biyokimyasal reaksiyonlarda görev alan biyolojik katalizörlerdir. Çoğu enzim, aktivitelerini sürdürebilmek için protein yapılarının dışında ek bir kimyasal gruba ihtiyaç duymaz. Enzimler, oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı temel kategoriye ayrılmaktadır. Kolinesterazlar bilhassa asetilkolin ve bütirilkoline olan substrat seçicilikleri sebebiyle iki gruba ayrılır. Asetilkolinesteraz (AChE, asetilkolin asetilhidrolaz, EC 3.1.1.7) gerçek (reel) kolinesteraz olarak bilinirken, bütirilkolinesteraz (BChE, açilkolin açilhidrolaz, EC 3.1.1.8) psödokolinesteraz, serum kolinesterazı veya nonspesifik kolinesteraz olarak adlandırılır. AChE, nörotransmitter asetilkolinin hidrolizini gerçekleştiren bir hidrolazdır. AChE enzimi, organofosfat türevi bileşikler olan pestisitler ve sinir gazları tarafından inhibe edilmek için birincil hedef olarak seçilir. AChE, bütirilkolin, asetilkolin ve süksinilkolin gibi kolin esterlerinin hidrolizini katalize eder ve aynı zamanda bazı aromatik aminlerin açil amidlerinin hidrolizini gerçekleştiren açilamidaz aktivitesine sahiptir. Alzheimer hastalığında, AChE ve BChE enzimleri kritik bir rol oynar. AD, yaşla birlikte gelişen bir tür demanstır. Davranışsal ve bilişsel bozukluklar, işlevsel bağımsızlığın kaybı, düşünme becerilerinde azalma ve ilerleyici hafıza kaybı ile karakterizedir (Karantzoulis ve Galvin, 2011; Ullah ve ark., 2023). Son zamanlarda 50 yaşın altındaki kişileri etkileyen AD'nin yakında 65 yaş ve üzerindeki bireyler için en önemli sağlık sorunlarından biri haline geleceği tahmin edilmektedir (Kumar ve ark, 2018). Alzheimer, gelişmekte olan ülkelerde ölümün önde gelen nedenidir (Hammoudi ve ark., 2018) ve 2050'de Alzheimer hastalarının sayısının 107 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Taha ve ark., 2021). AD'nin patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Ancak, amyloid-β (Aβ) birikimleri (Busciglio ve ark., 1993; Butterfield ve ark., 2013), nörofibriller demetler (NFT) (Brion ve ark., 2021), hiperfosforile tau protein (Lippens ve ark., 2007; Iqbal ve ark., 2010), beyin hücrelerinde inflamasyon (Kinney ve ark., 2018), oksidatif stres (Huang ve ark., 2018), nöronal hücre ölümü (Goel ve ark., 2022) ve beyinde asetilkolin (ACh) seviyesinde azalma gibi patolojik bulgular hastalığın seyrini belirlemek için kullanılmaktadır. Ek olarak, AD'nin %5'i çevresel faktörler ve genetik risklerden kaynaklanmaktadır (Boyd ve ark., 2022).

AD'nin patolojisi gibi, uygun tedavi yöntemleri hala net değildir, ancak birçok mekanizma önerilmiştir (Pesaresi ve ark., 2022; Fan ve ark., 2022). Birçok çalışmada ileri sürülen kolinerjik hipoteze göre, AD'deki bilişsel bozuklukların temel nedeni beyindeki ACh seviyelerindeki azalmadır. ACh, özellikle hafıza olmak üzere bilişsel fonksiyonlarda önemli bir rol oynamaktadır (Hammoudi ve ark., 2021; Greig ve ark., 2001). Bu nedenle, AD gibi nörodejeneratif hastalıklarda kullanılan terapotik ajanlar, ACh'nin yıkımını azaltarak bilişsel fonksiyon ve hafıza kapasitesinde etkili iyileşme göstermiştir (Hampel ve ark., 2018). Bugüne kadar, potansiyel anti-Alzheimer adayları olarak yaklaşık 100 ilaç tasarlanmış ve klinik testlere tabi tutulmuştur. Ancak bunlardan sadece beşi FDA onaylıdır. Bunlar, akridin halkalı takrin (Kelly, 1999), adamantil grubu içeren memantin (Kishi ve ark., 2017), N-metil-N-etil karbamat fonksiyonel grubu içeren rivastigmin (Birks ve Grimley, 2015), benzofuran yapılı azepan içeren galantamin (Gaudig ve ark., 2011) ve inden ve piperidin içeren donepezil (Akasofu ve ark., 2018) içermektedir. Takrin, önemli bir hasta yüzdesinde hepatotoksisite gibi ciddi yan etkiler nedeniyle piyasadan çıkarılmıştır (Gregson ve ark., 2019), donepezil, rivastigmin ve galantamin ise AD semptomlarının tedavisi için kullanılan ilaçlardır (Pesaresi ve ark., 2022). Ancak, bu ilaçların etkileri geçicidir ve tam iyileşme sağlamamaktadır (Ullah ve ark., 2023). Ayrıca, bu ilaçların ciddi yan etkileri arasında hepatotoksisite ve gastrointestinal rahatsızlık bulunmaktadır (Ullah ve ark., 2023).

Birçok çalışmada, Alzheimer hastalarının beyinlerinde AChE aktivitesinin değişmediği veya azaldığı, BChE aktivitesinin ve BChE/AChE oranının ise giderek arttığı gözlemlenmiştir (Ullah ve ark., 2023). Son çalışmalar, belirli BChE inhibitörlerinin yaşlı farelerin bilişsel performansını ve transgenik farelerde AD'nin diğer patolojik belirteçlerini iyileştirdiğini göstermiştir (Greig ve ark., 2001). Bu nedenle, AD tedavisi için sadece AChE inhibitörlerinin değil, aynı zamanda belirli BChE inhibitörlerinin geliştirilmesi giderek artan bir ilgi konusu haline gelmiştir.

İlaç yeniden konumlandırma çalışmaları birçok bilim insanının odak noktası haline gelmiştir. Bu bağlamda, birçok çalışma devam etmektedir. Örneğin, çalışmamızda kullandığımız antibiyotik grubu ilaçlar arasında yer alan metronidazol ve seknidazolun birçok türeviden sentezlenmiş ve çeşitli aktiviteleri birçok çalışma tarafından belirlenmiştir. Yeni sentezlenen metronidazol içeren piridin türevinin antikanser

aktiviteleri incelenmiştir (Elzahhar ve ark., 2023). Yeni sentezlenen Metronidazol-tiyazol bileşiklerinin antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir (Patel ve ark., 2021). Yeni sentezlenen Seknidazol metal komplekslerinin antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri belirlenmiştir (Yong ve ark., 2016). Yeni sentezlenen Metronidazol ve Seknilazol Karbamatlarının antiprotozoal aktiviteleri belirlenmiştir (Qin ve ark., 2014).

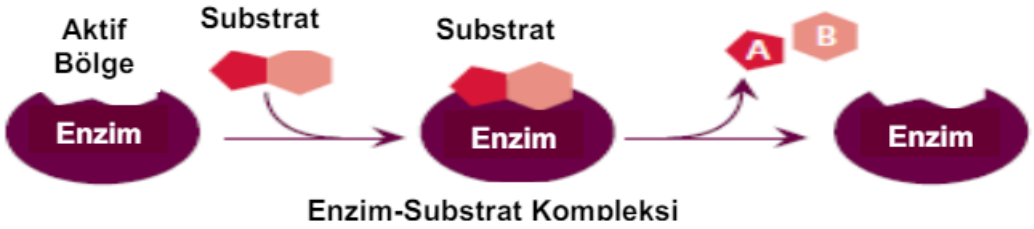
Literatürde, kanser, diyabet, depresyon, kalp ve epilepsi gibi farklı hastalıklar için gösterilen çeşitli ilaçların Alzheimer'ın çeşitli hedeflerine afinitesi olduğu bildirilmiştir (Rocha-Garduño ve ark., 2020; Gabr ve Abdel-Raziq, 2018). Kumar ve arkadaşları, 150 antipsikotik ilacı BACE1 (beta-amyloid öncü protein kesme enzimi1), BChE, AChE, MAO (monoamin oksidaz) ve NMDA (N-metil-D-aspartat) hedefleri olarak ele alan bir doklama tabanlı yaklaşım kullanarak AD tedavisi için pimozid, bromperidol ve benperidol'ün iyi potansiyele sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Zhao ve ark., 2017). Bir grup bilim insanı, antidiyabetik ilaçların AD'nin tedavisinde kullanımını değerlendirmek için çeşitli ön klinik ve klinik çalışmalar yapmıştır (Bautista-Aguilera ve ark., 2014; Żurek ve ark., 2013).

Bu çalışmada, kapsamlı bir literatür araştırması yapıldı ve aktif bileşikler (metronidazol-seknidazol) in silico yöntemlerle belirlendi. Daha sonra, bu bileşiklerin türevleri olan yeni bileşikler Prof. Dr. Öztekin ALGÜL ve Dr. Öğr. Üyesi Burak KUZU tarafından sentezlendi ve bunların AChE ve BChE aktivitesine karşı etkileri değerlendirildi. Ayrıca, inhibisyon çalışmalarını aydınlatmak için moleküler doklama çalışmaları Doç. Dr. Burçin TÜRKMENOĞLU tarafından yapıldı.

2.GENEL BİLGİLER

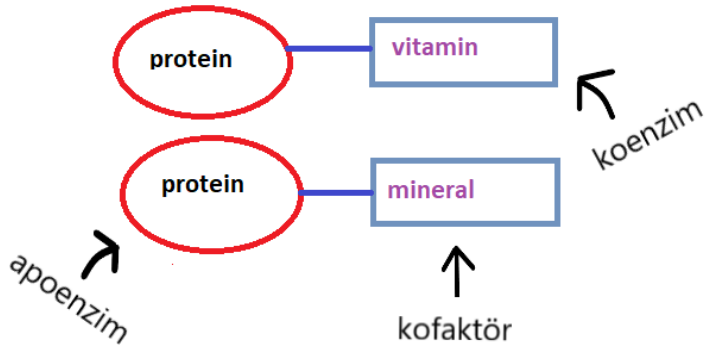
2.1. Enzimler

Canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonların tümünü gerçekleştiren, yüzde yüz verimle ürün oluşturan biyokatalizörlerdir (Yang ve ark., 2012). Katalizörler, kimyasal tepkimeyi hızlandıran bileşiklerdir. Enzimler ise reaksiyonları yan ürün oluşturmadan ve değişikliğe uğramadan tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek hızlandırırlar. Enzimlerin çoğu protein yapılıdır (katalitik RNA molekülleri hariç) ve molekül ağırlığı, 12.000 ile 1.000.000 Da arasında değişmektedir. DNA tarafından kodlanırlar ve özgüldürler. Defalarca kullanılabilir ve tüketilemezler. Girmiş oldukları reaksiyonda oluşturdukları maddeye ürün, etki ettikleri maddeye ise substrat adı verilir. Substratlar enzimin aktif bölgesine non-kovalent (zayıf) bağlarla bağlanırlar bunun sonucunda enzim substrat kompleksi oluşur. Enzimlerde substrata karşı seçiciciliğin sebebi; protein yapısını oluşturan aminoasit zincirlerinin katlanarak kendine özgü dizilişleri ile üç boyutlu bir yapı oluşturmasıdır. Enzim substrat bağlanmasına ilişkin iki hipotez mevcuttur. Anahtar-kilit modeli, 1894 yılında Hermann Emil Fischer tarafından tanımlanmıştır. Fakat sonrasında 1958 yılında Daniel E. Koshland daha açık haliyle İndüklenmiş Uyum Modelini öne sürmüştür.



Şekil 2. 1. Anahtar kilit modeli (Mohan ve ark., 2014)

Enzimin protein kısmına apoenzim (apoprotein), protein olmayan yardımcı kısımına ise kofaktör veya koenzim denmektedir. Yardımcı grup organik yapıda (NAD^+, FAD^+. Koenzim A) veya vitaminlerden oluşursa koenzim, metal iyonları (Mg^{+2}, Fe^{+2}, Zn^{+2} vb.) veya inorganik yapıda olursa kofaktör ismini alır. Holoenzimler (kofaktörlü enzim) reaksiyonların katalizlenmesinde önemli rol almaktadırlar, apoenzimler tek başına katalitik aktivite gösteremezler (Moini, 2019).



Şekil 2. 2. Enzim Alt Birimleri

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler arasında substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatör varlığı ile sıcaklık buIunur. Proteinler, biyolojik aktivitelerini belirli sıcaklık ve pH aralıklarında gösterebilirler. Bu nedenle, bir proteinin saf halde bir hücre veya doku örneğinden izole edilmesi oldukça zor olabi1ir. Ancak, bugüne kadar birçok protein başarıyla saf hale getirilmiştir. Proteinlerin saflaştırılması genellikle mo1eküler ağırlık, çözünürlük, adsorpsiyon özellikleri ve elektriksel yük farklılıkları gibi prensip1ere dayalı olarak gerçekleştirilir. Spesifik Ligand esasına dayalı afinite kromatografisi, proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu teknik, saflaştırılmak istenen molekülün, kolona kovalent olarak bağlanmış bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bir şekilde bağlandığı bir tür adsorpsiyon kromatografisidir (Keha ve Küfrevioğ1u, 2007).

Enzim inhibitörleri, enzimle birleşerek enzim-inhibitör kompleksi oluştururlar ve böylece enzimin kata1itik aktivitesini azaltarak veya tamamen inhibe ederek reaksiyon hızını düşürürler. Bir inhibitör, enzim aktif bölgesine bağlanarak substratın bu bölgeye girmesini engelleyebilir. Bazı inhibitörler, aktif bölgeden farklı bir alana bağlanarak, substratın aktif bölgeye ulaşımını etkileyen konformasyonel değişikliklere yol açabilir. Enzim inhibisyonu, geri dönüşümsüz veya geri dönüşümlü olarak meydana gelebilir. Geri dönüşümsüz inhibitörler, enzime sıkıca bağlanır ve bu nedenle enzimden kolayca ayrılamazlar. Bu tür inhibitörler, enzimle kovalent veya kovalent olmayan bağlar kurabilirler. (Berg ve ark., 2014). Geri dönüşümlü enzim inhibisyonu ise, enzim-

inhibitör kompleksinden kolayca ayrılabilir. Üç tür geri dönüşümlü inhibisyon mevcuttur. Yarışmalı tip inhibisyon (kompetitif), enzimin substrata bağlanmasıyla birlikte enzim-substrat (ES) veya enzim-inhibitör (EI) komp1ekslerini oluşturur, ancak enzim-substrat-inhibitör (ESI) komp1eksini oluşturmaz. Yarışmalı inhibitörler, enzimin aktif bölgesine substrata benzer şekilde bağlanarak substratın enzime bağlanmasını engellerler. Substrat konsantrasyonu yükseldiğinde, aktif bölgeye substratın bağlanma olasılığı artabilir. (Keha ve Küfrevioğlu, 2007). Yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyonlarda ise, inhibitör ES komp1eksine bağlanır. Yarışmasız inhibitör, ES kompleksi o1uştuktan sonra bağlanma bölgesine yerleşir. Bu tür inhibisyonda substrat konsantrasyonunun değiştirilmesi inhibisyonu etkilemez çünkü substrat ve inhibitör, enzimin farklı bölgelerine bağlanırlar. İnhibitör, serbest enzime olduğu gibi ES kompleksine de bağlanabilir (Berg ve ark., 2014). Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonda ise, inhibitör sadece enzim-substrat kompleksine bağlanabilir, serbest enzime değil (Keha ve Küfrevioğlu, 2007).

Tablo 2. 1. Enzim İnhibisyon Çeşitleri

• Dönüşümsüz İnhibisyon
• Dönüşüm1ü İnhibisyon
• Yarışmalı (competitive) İnhibisyon
• Yarışmasız (noncompetitive) İnhibisyon
• Yarı yarışmalı (uncompetitive) İnhibisyon
• Lineer Karışık Tip İnhibisyon
• Al1osterik İnhibisyon
• Feed-Back İnhibisyon

2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin çoğu, substrat adının sonuna "-az" eki eklenerek adlandırılır. 1961'de toplanan Enzim Komisyonu raporuna göre enzimler katalize ettikleri reaksiyonlara göre altı ana grupta sınıflandırılmıştır (Clifford, 1984):

i. Oksidoredüktazlar, oksidasyon-indirgeme reaksiyonlarını katalize ederek H^+, O^{-2} ve bir substrattan diğerine transfer sağlar. Dehidrogenezlar, oksidazlar, redüktazlar, peroksidazlar, monooksijenazlar ve katalaz bu grupta yer almaktadır.

ii. Transferazlar, fonksiyonel grupların transferini katalize eder (örneğin, amino ve fosfat grupları). Kinaz1ar, transaldolaz1ar, a1anin transferaz, tranketo1azlar, hekzokinaz ve g1ukokinaz bu grupta yer almaktadır.

iii. Hidrolazlar, hidroliz reaksiyonlarını katalize eder. Proteo1itik enzimlerin tamamı, esteraz1ar, lipaz1ar, nükleaz1ar, fosfataz1ar bu grupta yer almaktadır.

iv. Liyazlar, bir grubun çift bağ üzerinden eklenmesini katalize eder. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimler bu gruptandır. Karbonik anhidraz enzim ailesi bu gurubun üyesidir.

v. İzomerazlar, bir molekül içindeki yeniden düzenleme reaksiyonlarını katalize eder. Rasemazlar, mutazlar, epimerazlar bu grupta yer almaktadır.

vi. Ligazlar (sentetazlar), pirofosfat bağının hidrolizi ile birleştirilmiş iki molekül arasındaki bağ oluşumunu katalize eder. Sentetazlar, karboksilazlar ve piruvat karboksilaz bu grupta yer almaktadır.

2.2. Kolinesterazlar

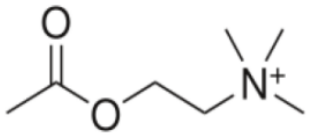
Kolinesterazlar, 1914 yılında Henry Dale tarafından keşfedilen ve 1930'lardan bu yana yoğun bir şekilde araştırılan serin hidrolaz sınıfı enzimlerdir. 1959'ların başından itibaren, aktif bölgedeki reaktif serinin ve aminoasit diziliminin belirlenebildiği bilinmektedir. 1987'de Lockridge tarafından insan BChE'nin tam dizisi eksiksiz olarak be1irlenmiştir (Massoulie ve ark., 1993). Asetilkolin ve bütirilkoline olan substrat seçicilikleri nedeniyle, kolinesterazlar iki gruba ayrılır. AChE, gerçek kolinesteraz olarak adlandırılırken; BChE, serum kolinesterazı, psödokolinesteraz veya nonspesifik kolinesteraz o1arak bilinir. AChE ve BChE arasındaki önemli bir fark da yüksek substrat konsantrasyonlarında AChE'nin inhibe olma eğilimiyle BChE'nin aktive olma eğilimidir. AChE, özellikle 1,5-bis (4-allildimetilaminopropi1pentan-3-on-dibromür)

ile inhibe olurken; BChE'nin inhibisyonu ise 10-(2-dieti1aminopropil)-fenotiyazid (etopropazin) ve tetraizopropi1 pirofosforamid (iso-OMPA) ile gerçekleşir.

2.2.1. AChE Enzimi

AChE veya Asetilhidrolaz, asetilkolinin (ACh) asetat ve koline hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. Nörotransmitter olarak görev yapan ACh'in parçalanmasını sağlayarak işlev görür. Bu enzim, hidrolaz sınıfına ve karboksilesteraz ailesine aittir. AChE'nin yüksek bir aktivitesi vardır ve saniyede yaklaşık olarak 25.000 ACh molekülünü parçalayabilir. AChE, genellikle karaciğerde sentezlenir.

Enzimin aktif bölgesi, iki alt birimden oluşur; biri katyonik, diğeri ise anyonik yapıdadır. AChE'nin yapısı ve reaksiyon mekanizması, enzimin kristal yapısı ile detaylı bir şekilde açıklanmıştır (Sussman, 1991).



Şekil 2. 3. Asetilkolinin Yapısı

AChE'nin Fizyolojik Önemi

Asetilkolin günümüzde Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının teşhisinde ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. (Zubenko ve ark., 1986). Kolinerjik ileti sırasında nörotransmitter olarak görev yapan asetilkolin, sinirsel uyarıları sinir sistemince ileterek, bu uyarıların kaslara veya ilişkili dokulara ulaşmasını sağlar. AChE inhibisyonu, AD, miyastenia gravis gibi hastalıklarda sinaptik aralıktaki ACh seviyelerini artırmak amacıyla tedavi olarak kullanılmasının yanı sıra, kimyasal sinir gazlarının üretiminde de öldürücü asetilkolinerjik uyarım oluşturmak için de kullanılmaktadır. (Singh ve ark., 2013). Kolinerjik sinirlerle uyarılmayan dokularda da AChE enziminin varlığı, enzimin kolinerjik olmayan etkilere sahip olduğunu

açıklamaktadır. AChE'nin vücuttaki diğer önemli işlevleri şunlardır (Singh ve ark., 2013):

- Nörogenez

- Hücre Adezyonu

- Sinaptogenez (Sinaps Oluşumu)

- Dopamin Nöronların Aktivasyonu

- Sinir Hücresi Rejenerasyonu

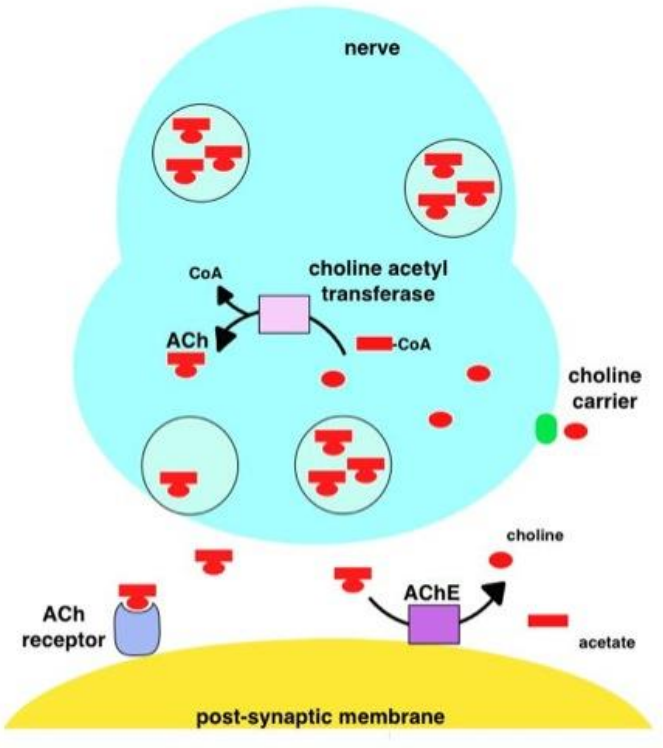
- Apoptozun Düzenlenmesi

- Hematopoez

- Lenfosit Aktivasyonu

AChE'nin Biyolojik Fonksiyonu

Nörotransmisyon sırasında, ACh sinir hücrelerinden sinaptik boşluğa salınır ve sonrasında post-sinaptik membrandaki ACh reseptör1erine bağlanarak bir sinya1 oluşturur. Bu süreçle iletim gerçekleşir. Aynı şekilde, postsinaptik membranda bulunan AChE enzimi, asetilkolini parçalayarak sinyal iletimini sonlandırır. Kolin, önceki sinaptik sinir hücresi tarafından tekrar alınır ve kolin asetiltransferaz enzimi vasıtasıyla asetil-CoA ile birleşerek yeniden asetilkolin sentezlenir.



Şekil 2. 4. AChE'nin biyolojik rolü

AChE'nin Aktivitesi

AD, merkezi kolinerjik fonksiyonun yaygın kaybı ile tanımlanan ilerleyici bir nörodejeneratif bozukluktur. Bu hastalığın tek bilinen semptomatik tedavisi, kolinesteraz inhibitörlerinin kullanılmasıdır; bu, kolinerjik aktiviteyi artırmayı amaçlar. Normal bir beyinde, AChE baskın bir rol oynarken, BChE beyin aseti1kolin seviyelerini düzenlemedeki rolü daha sınırlıdır. Ancak, AD olan bireylerde BChE aktivitesi artarken, AChE aktivitesi sabit kalır veya azalır. Bu bulgular, bellek işleme ve depolama süreçlerinde kolinerjik nörotransmisyonun önemli rolüyle birlikte, asetilkolin etkisini artırarak Alzheimer semptomlarını azaltma hipotezine yol açmıştır. Alzheimer'in nedeni ve tam patogenezi belirsiz olduğundan, bu hipotezin, bilişsel işlevleri iyileştirmesi umudu ile, Alzheimer'in semptomatik tedavisinde merkezi kolinerjik fonksiyonu güçlendirmeyi amaçlayan bir mantık oluşturmuştur.

Bu bağlamda, kolinesteraz inhibitörlerinin kullanımıyla değişen AChE aktivitesinin hastalığın seyriyle ilişkili olduğu düşünülmüştür.

AChE İnhibitörleri

AChE inhibitörleri, asetilkolinin parçalanmasını önleyerek nörotransmitterin konsantrasyonunu artırır ve etki süresini uzatır. Bu inhibitörler genellikle geri dönüşümlü, yarı geri dönüşüm1ü ve geri dönüşümsüz olarak sınıflandırılır. Yarışmalı ve yarışmasız geri dönüşüm1ü inhibitörler esas olarak tedavi odaklı kullanılırken, yarı-geri dönüşüm1ü ve geri dönüşümsüz inhibitörler genelde kimyasal silahlar ve pestisitlerin üretiminde tercih edilir.

Tedavi amacıyla kullanılan inhibitörler arasında karbamatlar, fizostigmin, neostigmin, pyridostigmine, ambenonium, demekaryum, rivastigmin, fenantren türev1eri, ga1antamin, kafein (yarışmasız), piperidin1er, donepezi1, takrin (tetrahidroaminokridin, THA), edrofonyum, Huperzin A, ladostigil ve ungeremine örnek verilebilir (Zilbeyaz ve ark., 2018). Kimyasal silahlar ve pestisitlerin üretiminde kullanılan inhibitörlere ise ekotiofat, sarin, diazinon, ethiofencarb, propamocarb, diizopropilfluorofosfat, malathion, soman, galantamin, cadusafos, klorprifos, pinmicarb, oxamyl, siklosarin, diklorvos, dimethoat, tabun, parathion, aldicarb, bendiocarb, phenmedipham, bufencarb, pirimicarb, huperzine A, karbaril, karbendazim, propoxur, karbetamit, karbofuran, karbosulfan, chlorbufam, chlorpropham, formetanate, methiocarb, methomyl, propham, onchidal ve kumarin1er örnek olarak gösterilebilir örnek olarak gösterilebilir (Pohanka, 2011). Tıbbi bakımdan bu inhibitörler, glaukom ve myastenia gravis gibi hastalıkların tedavisinde ve antiko1inerjik zehirlenmeye karşı antidot olarak, non-depolarize kas gevşeticilerin etkisini tersine döndürmek amacıyla, Alzheimer gibi nöropsikiyatrik belirtileri olan hastalıkların tedavisinde, özellikle de tepkisizlik durumlarında kullanılırlar. Ayrıca Lewy Body Dementia ve Parkinson Hastalıklarının tedavisinde de etkili olabilirler. Normal şartlarda, beyinde AChE baskınken, BChE'nin beyindeki asetilkolin seviyelerini düzenlemede sınırlı bir rolü olduğu düşünülür. Ancak, AD olan bireylerde BChE aktivitesi giderek artarken, AChE aktivitesi değişmeden kalır veya azalır (Pohanka, 2011).

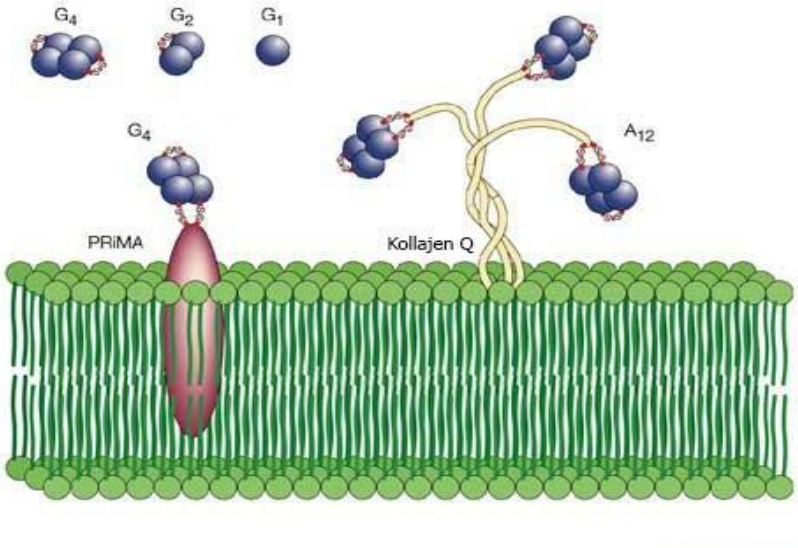
2.2.2. BChE Enzimi

BChE, AChE'nin fonksiyonel ve yapısal bir türevidir. Çeşitli dokularda (beyin, akciğer, karaciğer, ka1p, böbrek, kaslar) ve vücut sıvılarında (serum, ter, beyin-omurilik sıvısı, plevra gibi) yaygın olarak bulunur. İnsan barsak epitel hücrelerinde de kolinesteraz aktivitesi tespit edilmiştir. BChE'nin kesin fizyolojik işlevi henüz tam olarak anlaşılamamıştır; ancak, BChE'nin ksenobiyotiklerin ester veya karbamat kısımlarını ayırdığı ve insan plazmasındaki önemli bir detoksifikasyon ajanı olduğu belirlenmiştir. İlerlemiş AD'de, beyindeki AChE seviyelerinin normalin %55-67'sine kadar azaldığı, BChE seviyelerinin ise normalin %120'sine kadar arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, BChE'nin AD'nin ileri evrelerinde ACh hidrolizi için AChE'nin yerini aldığını ve kritik bir fonksiyon oynadığını düşündürmektedir.

BChE, ACh'nin hidrolizine ilave olarak, enzimatik olmayan fonksiyonlara da sahiptir. Son zamanlarda, organofosfat yapıdaki sinir gazları ve kokain gibi esterlerin kısmi hidrolizini gerçekleştirebilmesi nedeniyle, bu bileşiklerle olan zehirlenmelerde normal ve mutant BChE'nin terapötik olarak kullanımıyla ilgili çalışmalar artmıştır. BChE, AChE enzimi gibi üç farklı katalitik bö1geye sahiptir, bunlar; esteraz, aril asilamidaz ve peptidaz (proteaz) aktivitesi gösteren bölgelerdir. BChE enzimi, organofosfat ve karbamat yapılarındaki molekülleri dolaşımda hidroliz eden, AChE'a ulaşmasını engelleyerek etki gösteren inhibitörler olarak bilinen bileşiklerdir. AChE eksikliği durumunda, kolinerjik sinir iletiminin kontrolü sırasında, süksinilkolinin hidrolizi, aspirin, eroin ve amitriptilin gibi bazı ilaçların metabolizması ve bambuterolün aktive edilmesi gibi reaksiyonlar BChE tarafından katalizlenir. Bu nedenle, BChE çok sayıda molekülü arındıran bir enzim olarak kabul edilir (Massoulie ve ark., 1993). Örneğin, insanlar için kas gevşetici olan süksinilkolinin parçalanma reaksiyonunun gerçekleşmemesinden ötürü anestezi altında kalma süresinin uzaması, BChE enziminin aktivitesinin düşüklüğünden kaynaklıdır (Zivkovic ve ark., 2018).

BChE'nin Moleküler Yapısı

İnsan BChE, 85 kilodalton ağırlığında ve 574 aminoasitten meydana ge1en bir glikoproteindir. BChE'nin çeşitli mo1eküler formları tanımlanmıştır; bunlar, çözünebilir monomer (G1), dimer (G2) ve tetramer (G4) g1obüler yapıları içermektedir. İki monomer arasındaki disülfid bağları, dimerik (G2) yapıyı oluştururken, hidrofobik etkileşimlerle bir araya gelen iki dimer, tetramer (G4) yapısını meydana getirir. Bu üç moleküler form (G1, G2 ve G4), BChE'nin simetrik, hidrofilik ve çözünebilir globüler formlarıdır. Ancak, globüler BChE, aynı zamanda bir protein bağlayıcı ile membrana bağlı tetramerleri (G4) içeren, çözünebilir, asimetrik ve membrana bağlı formlarda da bulunabilir. BChE'nin membrana bağlanmasını sağlayan bir protein olan PRIMA (proline-rich membrane anchor), katalitik alt birimlerin oligomerizasyonunu kolaylaştırır. Ek olarak, kollajen bir bağlayıcıya bağlanarak, katalitik alt birimlerin tetramerlerini içeren, asimetrik kollajen-kuyruklu BChE formları mevcuttur. Kollajen-kuyruklu formdaki tetramer A4, iki tetramer A8 formunu ve bu tetramerlerin üç tanesi A12 formunu oluşturur. Bu heteromerik multimerler içinde BChE'yi toplayan kollajen Q, ekstraselüler matrikste bu yapıların bir araya gelmesini sağlar (Darvesh ve Hopkins, 2003).



Şekil 2. 5. BChE'nin moleküler formları (Darvesh ve ark., 2003)

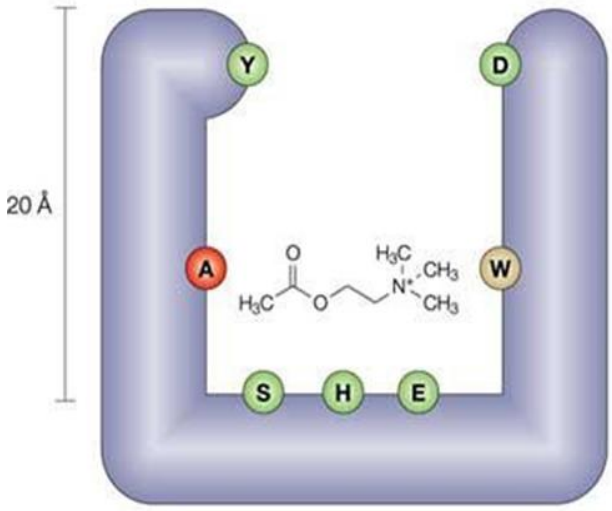
BChE'nin Fizyolojik Önemi

AD'de BChE'nin rolü ve bu enzimin AD patofizyolojisindeki fizyolojik önemi incelendiğinde, BChE'nin hastalıkta kritik bir rol oynadığı ve bu durumun hastalığın mekanizmalarını anlamak ve tedavi yöntemleri geliştirmek açısından önemli olduğu ortaya çıkmıştır. BChE'nin aktivitesindeki artışın AD'deki beyin dokusunda gözlemlendiği ve bu artışın hastalıkla ilişkili klinik semptomlarla bağlantılı olduğu ve hastalığın ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı vurgulanmaktadır. BChE'nin beyindeki artan aktivitesinin, sinir iletimini düzenleyen temel mekanizmalardan biri olduğu ve AD'nin sinir hücrelerindeki dejenerasyonunu tetiklediği görülmüştür.

Bu bulgular, BChE'nin AD patofizyolojisindeki rolünün anlaşılmasına önemli bir katkı sağlamaktadır. Ayrıca, BChE'nin hedef alınmasıyla ilgili yapılan araştırmaların, hastalığın tedavisi ve yönetimi için yeni yaklaşımların geliştirilmesine yol açabileceği öne sürülmektedir (Darvesh ve ark., 2008).

BChE'nin Enzimatik Özellikleri

BChE, her monomerde yaklaşık 20 angstrom derinliğinde ve yaklaşık 55 amino asit birimiyle çevrelenmiş dar bir oluk içeren bir aktif bölgeye sahiptir. (Şekil 2.6.).



Şekil 2. 6. BChE'nin enzimatik olarak aktif bölgesi. Ser226 (S), His466 (H), Glu353 (E), Lys286 ve Val288 içeren asil cebi (A), Trp82 (W), Asp70 (D) ve Tyr332 (Y) (Darvesh ve ark., 2003)

BChE'nin yapı ve işlevi, AChE ile yakından ilişkilidir. AChE'nin ve BChE'nin aktif bölge olukları arasında yapısal benzerlikler bulunmaktadır. Bununla birlikte, AChE'nin aktif merkez oluğunu sınırlayan on dört aromatik amino asit birimi, BChE'de altı alifatik amino asit birimiyle değiştirilmiştir. Bu durum, BChE'nin aktif merkez oluk hacminin (500 Å3), AChE'ninkinden yaklaşık 200 Å3 daha büyük olmasına yol açar böylece iki enzimin substrat seçicilikleri ve farklı inhibitörlere olan seçici duyarlılıkları üzerinde etkili olabilir. BChE'ye spesifik inhibitör1er, AChE'ye spesifik inhibitörlerden çok daha geniş moleküler yapıya sahiptir (Saxena ve ark., 1997).

BChE'nin Aktivitesi

Serumdaki BChE aktivitesinin belirlenmesi, çeşitli klinik kimya alanlarında önemli bir araştırma konusudur. Yapılan çalışmalar, yüksek serum BChE aktivitesi ile obezite, insülin direnci, metabolik sendrom, hiperlipidemi, koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve diyabetes mellitus arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, BChE'nin grelini inaktive ettiği gösterilmiştir (Jońca ve ark., 2015). Ayrıca, BChE enzim aktivitesinin septik hastalarda belirgin şekilde azaldığı ve ölçülen BChE aktivitesinin septik hastaların sonucunu tahmin etmede önemli bir belirteç olabileceği gösterilmiştir. Bu bulgular, sepsisin erken teşhisinde BChE enzim aktivitesinin kullanılabileceğini desteklemektedir (Zivkovic ve ark., 2018).

Organofosfat pestisit veya sinir ajanına maruz kalan bireylerde, genellikle insan kanındaki AChE veya BChE aktivitelerinde azalma gözlemlenir. Bu nedenle, pestisit maruziyeti durumunda klinik zehirlenme belirtileri olmaksızın BChE aktivitesinin azalabileceği gözlenmiştir (Lockridge ve Masson, 2000). BChE aktivitesi ile LDL kolesterol ve total kolesterol seviyeleri arasında bir ilişki olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca, BChE'ın VLDL kolesterolün LDL kolesterole dönüşümünde etkili olduğu düşünülmektedir (Kutty ve ark., 1975). Yüksek BChE aktivitesi, anormal lipit metabolizması ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin, diyabetik ve sağlıklı sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, BChE inhibitörü olan iso-ompa (tetraizopropil pirofosforamid) uygulandıktan sonra BChE aktivitesindeki azalmaya paralel olarak serum trigliserit, LDL ko1esterol ve gliserol seviyelerinde belirgin bir düşüş tespit edilmiştir (Annapurna

ve ark., 1991). Ayrıca, diklorvos (DDVP) gibi organofosfatlar uygulanan tavşanlarda serum BChE aktivitesindeki azalmanın yanı sıra LDL kolesterol düzeylerinde de bir azalma gözlenmiştir.

Anksiyete tedavi öncesi ve sonrasındaki serum BChE aktivitesinin değerlendirilmesi, tedavi sonrasında BChE aktivitesinde belirgin bir artış olduğunu göstermektedir. Tüm bu bulgular, BChE enzim aktivitesinin birçok biyolojik fonksiyon için önemli bir belirteç olabileceğini göstermektedir (Ağırgöl ve ark., 2008).

BChE'nin İnhibitörleri

Kolinesteraz inhibitörleri, kolinesteraz adı verilen enzimlerin hidrolitik aktivitesini engelleyen bir grup kimyasal bileşikleri içerir. Bu inhibitörler, AChE ve BChE için farklılık gösteren seçicilik, inhibisyon mekanizması ve tersinirlik özellikleri sergiler. Kolinesterazların inhibisyonu, Alzheimer gibi hastalıkların tedavisi için kullanılan ilaçların, insektisit olarak kullanılan nörotoksinlerin ve kimyasal savaş için kullanılan sinir gazlarının ana etkisidir. Kolinesteraz inhibitörleri, kolinesterazların aktivitesini geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz şekilde inhibe ederek nöronal ve nöromüsküler iletim için mevcut olan asetilkolin miktarını arttırır. Bu farmakolojik etki, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda önemli bir rol oynar (Gauthier, 2001).

Kolinesteraz inhibitörleri, AD'nin tedavisinde onaylanmış tek ilaçtır. AChE ve BChE inhibitörleri, merkezi, periferik veya her ikisinde birden kolinerjik krizlere neden olabilen nörotoksik bileşiklerdir. Bu bileşiklerin bir kısmı, AD ve myastenia gravis'in tedavisi için geliştirilen ilaçlar olarak da kullanılmıştır. Bunların esas amacı, beyindeki asetilkolin reseptörlerinde asetilkolin seviyelerinin artırılmasıyla bilişsel işlevin iyileştirilmesine dayanır (Ofek ve Soreq, 2013).

Organofosfor bileşikleri, nöronal iletimi etkileyen ve AChE ile BChE'yi etkisiz hale getiren güçlü inhibitörlerdir. Bu tür bileşikler, sinir ajanları olarak kullanılan son derece toksik maddeler içerir, örneğin sarin, soman ve tabun gibi. Ayrıca, önceden böcek ilacı olarak kullanılan paraokson, paration, malaokson ve malatiyon gibi bileşikler de

organofosfor grubuna girer. Bu kimyasallar, kolinesteraz enzimlerini geri dönüşümsüz şekilde inhibe ederek sinir iletimini bozar ve ciddi sağlık sorunlarına yol açabilirler (Ahmed ve ark., 2007).

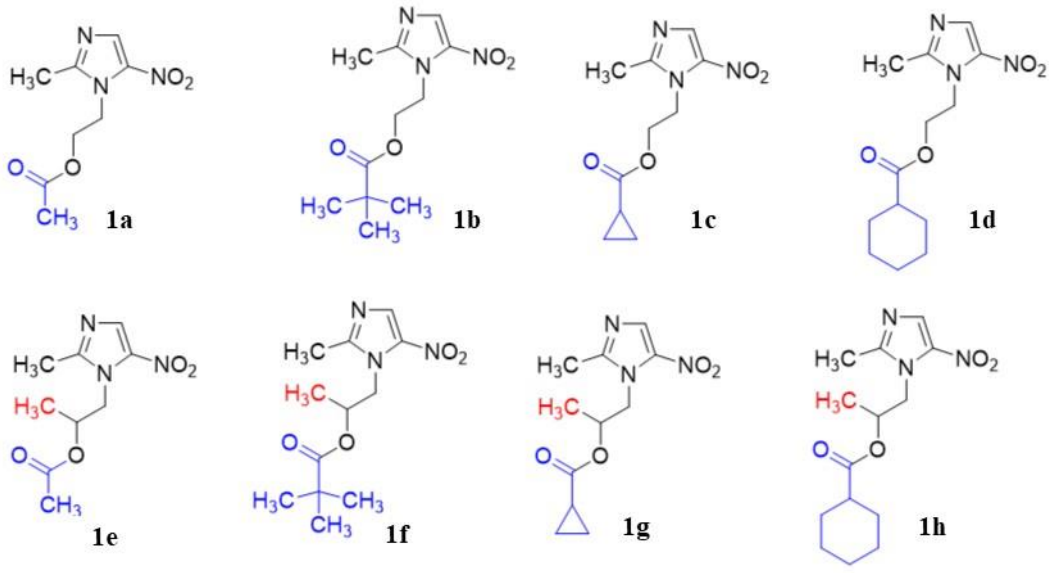
Organofosfor inhibitörleri genellikle yüksek toksisiteye sahiptir ve kimyasal savaşta veya böcek ilacı olarak kullanılırlar. Bu bileşiklerin farmakolojik önemi genellikle sınırlıdır. Metrifonat (triklorfon), AD'nin tedavisi için bir seçenek olarak düşünülmüştür, ancak yan etkileri nedeniyle geri çekilmiştir. Organofosfor bileşikleri genellikle hem AChE'yi hem de BChE'yi inhibe ederken, tetraizopropil pirofosforamid olarak da bilinen izo-OMPA, yalnızca BChE'yi inhibe eder çünkü AChE'nin aktif bölgesine nüfuz etmez (Oropesa ve ark., 2013).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materya1

3.1.1. Kimyasal maddeler

Sentez ve enzim inhibisyon çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ve reaktifler Sigma (Almanya) ve Aldrich (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Ayrıca, AChE (CAS no. 9000-81-1) ve BChE (CAS no. 9001-08-5) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Bileşikler Prof. Dr. Öztekin ALGÜL ve Dr. Öğr. Üyesi Burak KUZU tarafından sentezlenmiştir.



Şekil 3. 1. Kolinesterazlar için sentezlenmiş bileşikler

3.1.2. Kullanllan Çözeltiler

1M Tris/HCl - 5mM EDTA (pH:8,0 (tampon) çözeltisi: 30,27 g tris ve 0,370 g EDTA alınarak 200 mL disti1e suda çözü1dü. HCI çöze1tisi ile pH 8'e ayarlandı. Sonrasında toplam hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

10 mM asetil tiyokolin iyodat çözeltisi: 0,145 g asetil tiyokolin iyodat bir miktar distile suda çözündü. Daha sonra top1am hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

10 mM bütiril tiyokolin yodat çözeltisi: 0,159 g bütiril tiyokolin iyodat bir miktar distile suda çözü1dü. Daha sonra toplam hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

%1 lik sodyum sitrat - 0,5 mM DTNB çözeltisi: 0,5 g sodyum sitrat ile 0,01 g DTNB (Ellman'ın Reaktifi) (5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) alınarak bir miktar distile suda çözüldü. Daha sonra toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

DTNB : Kolinesteraz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan bir bileşiktir. Özellikle, AChE ve BChE gibi enzimatik aktivitelerin ölçümünde yaygın olarak kullanılır. DTNB, kolinesteraz aktivitesini ölçmek için kullanılan bir substrat olan tiyoilkolin üretmek için kullanılır. Bu reaksiyon sırasında, DTNB'nin tiyo grubu serbest kalır ve 5-tio-2-nitrobenzoik asit (TNB) adı verilen bir ürün oluşur. Bu reaksiyon, kolinesteraz aktivitesinin bir ölçüsü olarak kullanılır çünkü kolinesteraz substratı hidroliz ettiğinde tiyoilkolin ve asetik asit gibi ürünler meydana getirir. Dolayısıyla, TNB'nin miktarı, kolinesteraz aktivitesinin miktarını yansıtır. Bu nedenle, DTNB, kolinesteraz aktivitesini ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir reaktiftir.

Asetilkolin iyodat (ATCI), kolinesteraz aktivitesini ölçmek için kullanılan bir bileşiktir. Bu kimyasal, asetilkolinin bir türevidir ve kolinesteraz enzimi tarafından hidrolize edilerek asetilkolin ve tiyokolin oluşturur. Bu hidroliz reaksiyonu sonucunda meydana gelen tiyokolindeki renk değişimi ölçülebilir ve kolinesteraz aktivitesini yansıtır. Bu nedenle, biyokimya ve farmakoloji alanlarında araştırmalarda ve tıbbi tanımlamalarda kullanılan yaygın bir reaktiftir.

Bütiriltiyokolin iyodat (BTİ), kolinesteraz aktivitesini ölçmek için kullanılan önemli bir bileşiktir. Bu kimyasal, asetilkolinin türevlerinden biridir ve kolinesteraz enzimi tarafından hidrolize edilerek asetilkolin ve tio-bütanol oluşturur. Bu hidroliz reaksiyonu sırasında ortaya çıkan tio-bütanoldeki renk değişimi ölçülerek kolinesteraz aktivitesi belirlenebilir. BTİ, biyokimya ve farmakoloji alanlarında araştırmalarda ve tıbbi tanımlamalarda yaygın olarak kullanılan önemli bir reaktiftir.

3.2. Metot

3.2.1. Aktivite Tayini

AChE ve BChE, sırasıyla asetiltiyokolin ve bütiriltiyokolini tiyokoline hidroliz eder. Tiyokolinin oluşum hızı, 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin sarı rengi üreten 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyonu sonucu belirlenir ve bu reaksiyon 412 nm dalga boyunda ölçülür. (Ellman ve ark., 1951).

Tablo 3. 1. Kolinesteraz enzimlerinin aktivite tayin yönteminde kullanılan küvet içeriği ve madde miktarları

Stok Aktivite Çöze1tileri	**Kontrol Küveti**	**Numune Küveti**
Tris-HCl	100	100
DTNB	50	50
Distile Su	795	Değişken
Enzim	5	5
İnhibitör	0	Değişken
Karışım 37°C'de 5 dakika inkübe edilir.		
Asetilkolin iyodat/Bütirilkolin iyodat	50	50

$$EU/ml = \frac{\Delta OD}{\varepsilon} \times \frac{V_T}{V_E} \times f$$

EU/ml: 1 mL'deki enzim ünitesi

ΔOD: Bir dakikadaki absorbans değişimi

ε: DTNB'nin mo1ar ekstinksiyon katsayısı (13,6 $M^{-1}cm^{-1}$)

V_T: Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi (mL)

V_E: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi (mL)

f: Seyreltme katsayısı

Absorbans artışı 412 nm'de beş dakikalık süre ile ölçülmüş birer dakika aralıklarla sonuçlar kaydedilmiştir.

3.2.2. AChE ve BChE ile ilgili *in vitro* İnhibisyon Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan AChE (CAS no. 9000-81-1) ve BChE (CAS no. 9001-08-5) enzimleri Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. Metronidazol-seknilazol türevlerinin **(1a-h)** AChE ve BChE aktiviteleri üzerindeki inhibitör etkileri, Ellman ve ark. tarafından belirtilen metodolojiyi takiben *in vitro* koşullarda IC_{50} ve K_i değerleri ile belirlenmiştir (Huang ve ark., 2011). IC_{50}, enzim aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonunu ifade eder ve düşük bir IC_{50} değeri yüksek inhibisyon gücünü gösterir. **(1a-h)** bileşiklerinin IC_{50} değerlerini belirlemek amacıyla, her bir molekül için en az beş farklı konsantrasyonda AChE ve BChE aktiviteleri ölçülmüş ve aktivite yüzdesi hesaplanmıştır. Enzimlerin kontrol aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. İnhibitör konsantrasyonlarına karşı %Aktivite, her bir molekül için çizilmiştir. Bu grafiklerden, her bir molekülün AChE ve BChE için IC_{50} değerleri belirlenmiştir. K_i değerlerinin hesaplanması için, test edilen bileşiklerin üç farklı konsantrasyonu ve altı farklı substrat (Asetil tiyokolin iyodür: ACh ve Butiril tiyokolin iyodür: BCh) konsantrasyonu kullanılarak Lineweaver–Burk grafikleri çizilmiştir. Çalışma ayrıca, en etkili bileşiklerin inhibitör grafiklerini içermekte olup, bunlar ayrı olarak çizilmiştir. AChE ve BChE enzimlerinin standart inhibitörü olan donepezil için de aynı prosedürler uygulanmış ve hem IC_{50} hem de K_i değerleri hesaplanmıştır. Enzim birimi, 5-tiyobenzoik asidin 412 nm'de molar absorpsiyon katsayısı (13.600 $M^{-1}.cm^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır (Ellman ve ark., 1961).

3.2.3. In Silico Çalışmalar

Fakültemiz öğretim üyelerinden Doç. Dr. Burçin TÜRKMENOĞLU tarafından yapılan bu çalışmada tüm hesaplamalı analizler (moleküler bağlanma, MM-GBSA ve ADMET tahmini gibi) Schrödinger 2021-2 programı ile gerçekleştirilmiştir (Shirinzadeh ve ark., 2022). Moleküler bağlanma, Glide modülü ile uygulanmış, Prime MM-GBSA Prime modülü ile gerçekleştirilmiş ve ADMET tahmini QikProp modülü ile gerçekleştirilmiştir (Lineweaver ve Burk, 1934; Boztaş ve ark., 2019). Hesaplamalar, Schrödinger yazılımının Maestro sürüm 12.8 kullanıcı arayüzü kullanılarak yapılmıştır (Shirinzadeh ve ark., 2022).

Molekül Yerleştirme Süreçleri

Ligand Hazırlama Adımı: Metronidazol ve seknidazol türevlerindeki her bir molekülün en düşük enerji durumu oluşturulmuş ve hesaplanmıştır. İyonlaşma durumu, Epik modülü tarafından pH değeri 7.4±0.0 olarak ayarlanarak hesaplanmıştır. Tüm bileşiklerin konformasyonunda OPLS4 kuvvet alanı kullanılmıştır.

Protein Hazırlama Adımı: İnsan asetilkolinesterazı ve butirilkolinesterazının kristal yapıları protein veritabanından elde edilmiştir. AChE ile ilişkili hedef PDB Kimlik Numarası 4EY7 olan enzim kristal yapısının çözünürlüğü Donepezil ile kompleks halinde 2.35 Å'dir. BChE ile ilişkili hedef PDB Kimlik Numarası 4BDS olan enzim kristal yapısının çözünürlüğü Tacrin ile kompleks halinde 2.10 Å'dir. Hedefin yapısı, Schrödinger paketinin 'protein hazırlama sihirbazı' kullanılarak hesaplanmıştır. İthalat ve işleme, gözden geçirme ve değiştirme ve rafinaj gibi adımları içerir. pH değeri, eksik kalıntıları ve yan zincirleri doldurmak için 7.4±0.0 olarak ayarlanmıştır. Kısıtlama minimizasyonu, OPLS3e kuvvet alanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Reseptör Izgarası Oluşturma Adımı: Bu adım, proteinin aktif bölgesi etrafında bir ızgara oluşturmak için kullanılmıştır ve bu ızgara, ko-kristalleşmiş koligand tarafından sınırlanmıştır. Tüm parametreler varsayılan olarak tutulmuş ve AChE için ızgara X, Y ve Z koordinatları sırasıyla -14.27, -43.95 ve 27.98 olarak ayarlanmıştır. BChE için ızgara X, Y ve Z koordinatları sırasıyla 133.19, 116.11 ve 40.922 olarak ayarlanmıştır.

Moleküler Bağlanma Adımı: Moleküler bağlanma çalışması boyunca Schrödinger 2021-2 paketinin Maestro 12.8 sürümü kullanılmıştır. Glide modülü, moleküler bağlanma aracı olarak kullanılmıştır. Hazırlanan ligandlar, protein veritabanından elde edilen hazırlanan hedeflerle etkileşime girmiştir. Hazırlanan ligand 1h, *in vitro* incelenen AChE ve BChE ile aktif bağlanma bölgesine bağlanma modları analizi için dock edilmiştir. Moleküler bağlanma için ek hassasiyet (XP) modlarına bağlanma parametre değerleri hesaplanmıştır.

Moleküler Mekanik/Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı (MM/GBSA) Kullanarak Bağlanma Serbest Enerjisinin Hesaplanması

Enzim ile bağlanmış ligand 1h arasındaki bağlanma serbest enerjisi, Maestro'nun Prime MM/GBSA arayüzü kullanılarak hesaplandı. Bu hesaplama, ligand bağlanma eğilimlerini belirlemek için yapılan MM/GBSA ΔG_{Bind} hesabıdır. Prime MM/GBSA arayüzünde kompleksin serbest bağlanma enerjisi hesaplanırken VSGB çözünme modeli ve OPLS4 kuvvet alanı kullanıldı.

ADMET Tahmin Analizi

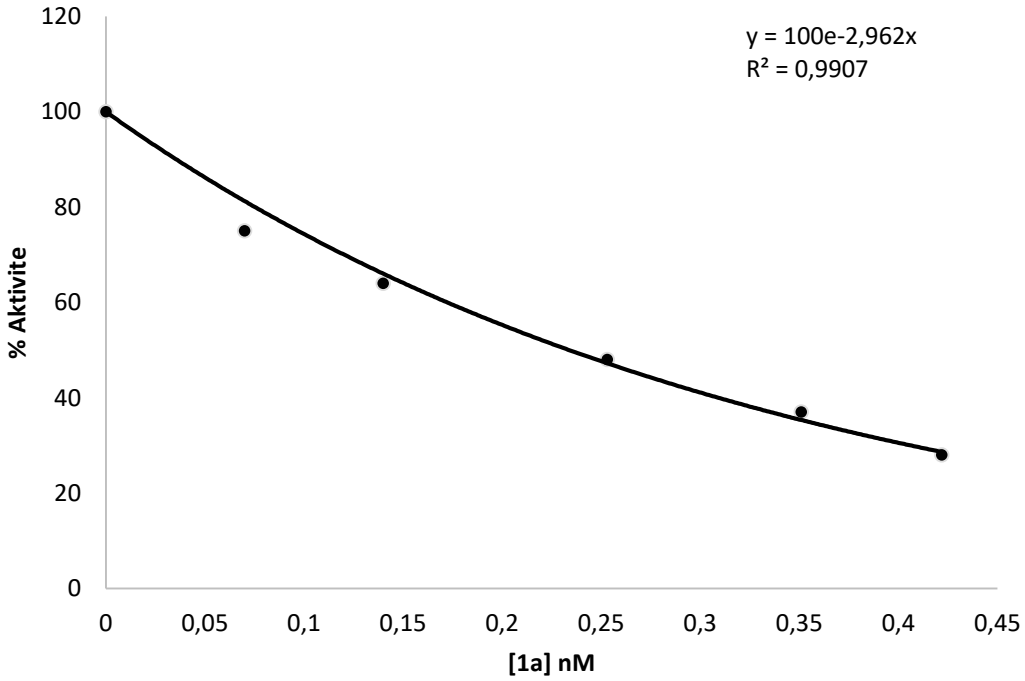
Sentezlenen ligandların ve *in vitro* olarak AChE ve BChE enzimlerine karşı analiz edilen ligandların emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite profillerini belirlemek için Schrödinger Maestro 12.8 QikProp arayüzü kullanıldı. ADMET analizi için % Oral Emilim, geçirgenlik (QPPCaco), tahmin edilen oktanol/su bölünme katsayısı (QPlogPo/w), kardiyotoksisite (QPlogHERG) ve beş kat Lipinski kuralı belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

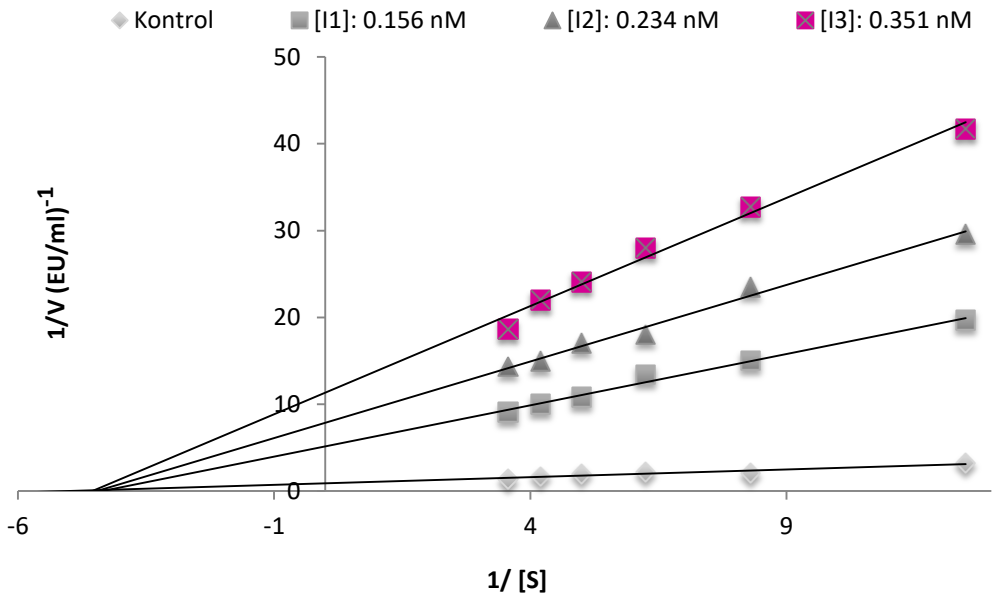
Sentetik türevlerin inhibisyon etkisi, IC_{50} ve K_i değerleri ile değerlendirildi. Bu çalışmalar kapsamında, sekiz farklı bileşik **1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h** ve donepezil için elde edilen verilere dayanarak grafikler oluşturuldu.

4.1. AChE Enzimi ile Yapılan Çalışma Bulguları

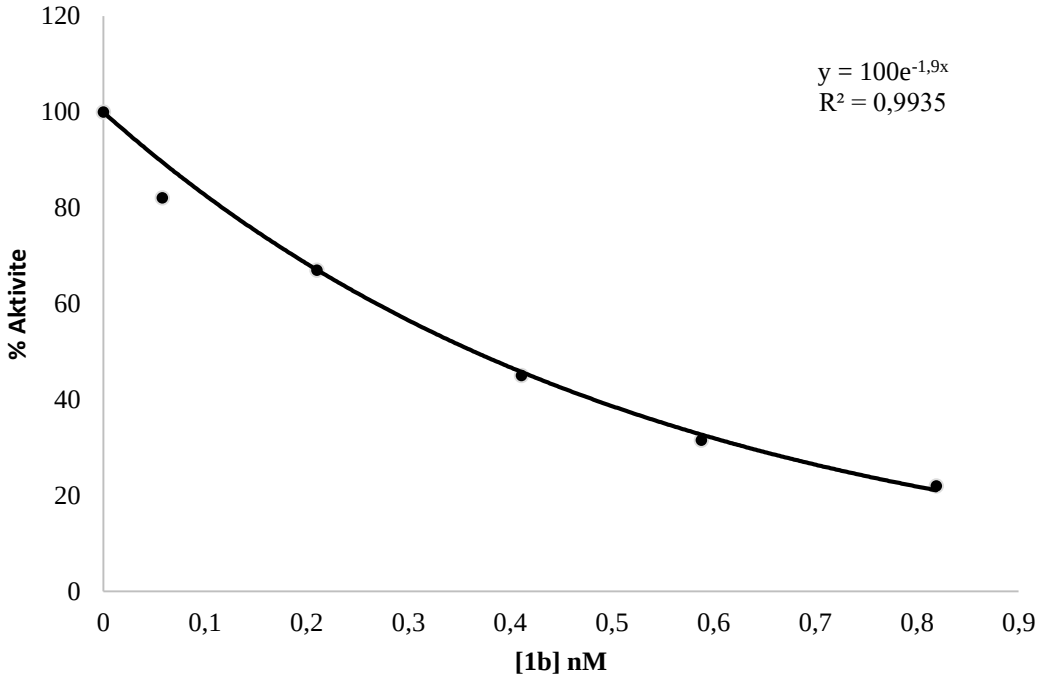
Sentetik ve yapısal olarak doğrulanmış piridazin türevlerinin ticari olarak tedarik edilen AChE enzimi üzerindeki tesiri araştırıldı. Ölçümler, esteraz aktivite yöntemi kullanılarak 5 dakikalık aralıklarla ve 412 nm'de yapıldı. Sentetik türevlerin inhibitör etkisi IC_{50} ve K_i değerleri ile belirlendi. IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri hesaplandı. İnhibisyon eğrisini çizmek için Aktivite (%) - [I] ölçümleri 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda gerçekleştirildi. Ek olarak, Ki için 3 farklı inhibitör konsantrasyonu seçildi ve deneyler 6 farklı substrat konsantrasyonunda (0,08-0,12-0,16-0,20-0,24-0,28 *mM*) yapıldı. IC_{50} ve Ki değerleri çizilen grafiklerden hesaplanarak Tablo 4.1.'de verilmiştir.



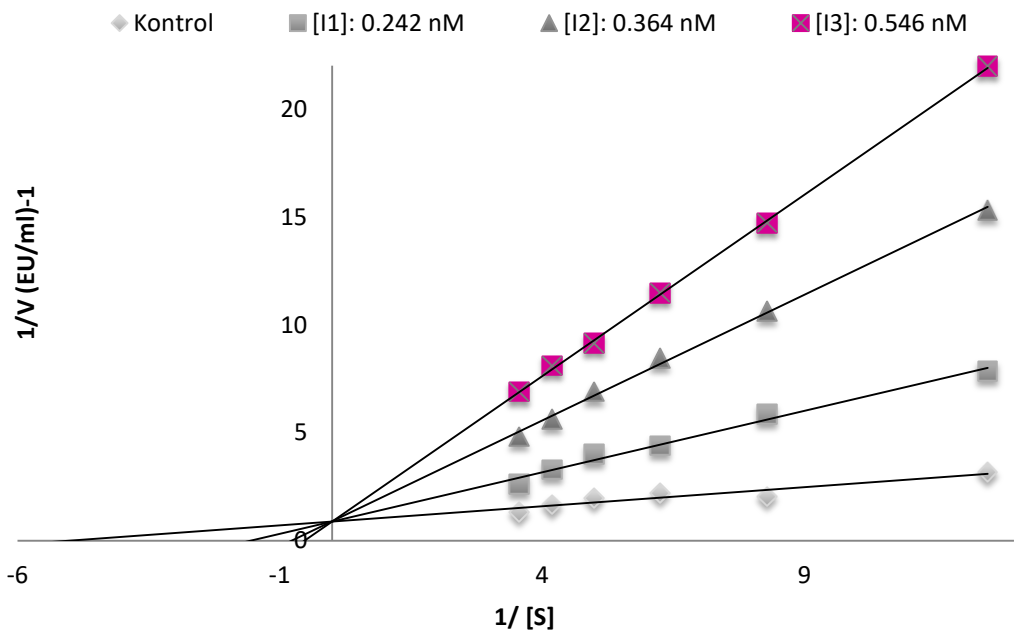
Şekil 4. 1. AChE enzimi için **1a** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



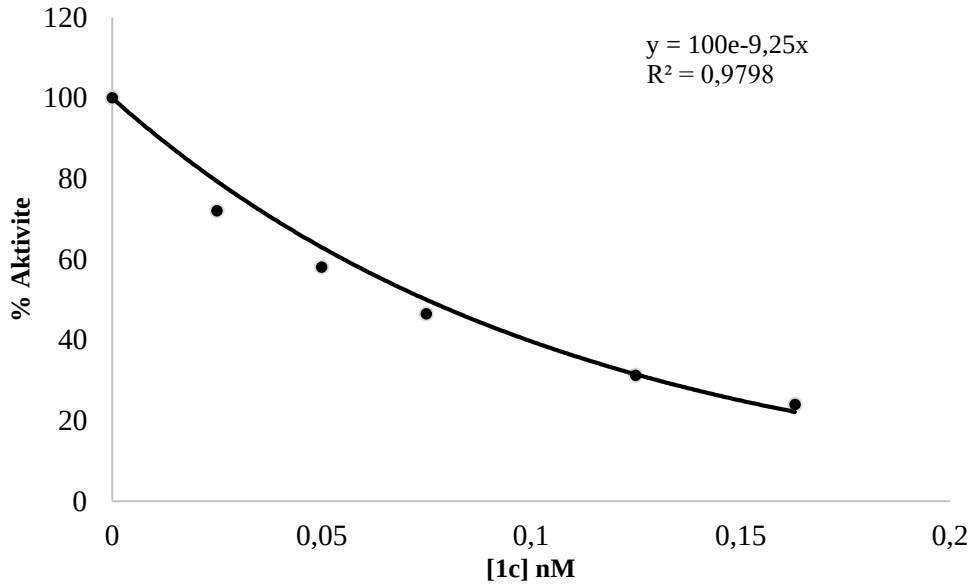
Şekil 4. 2. AChE enzimi için **1a** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



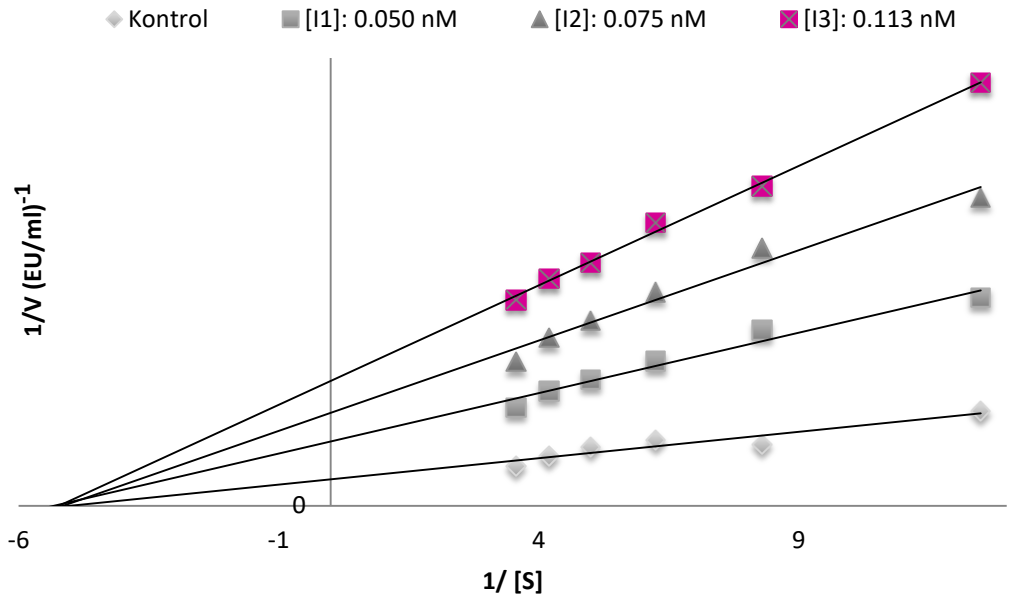
Şekil 4. 3. AChE enzimi için **1b** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



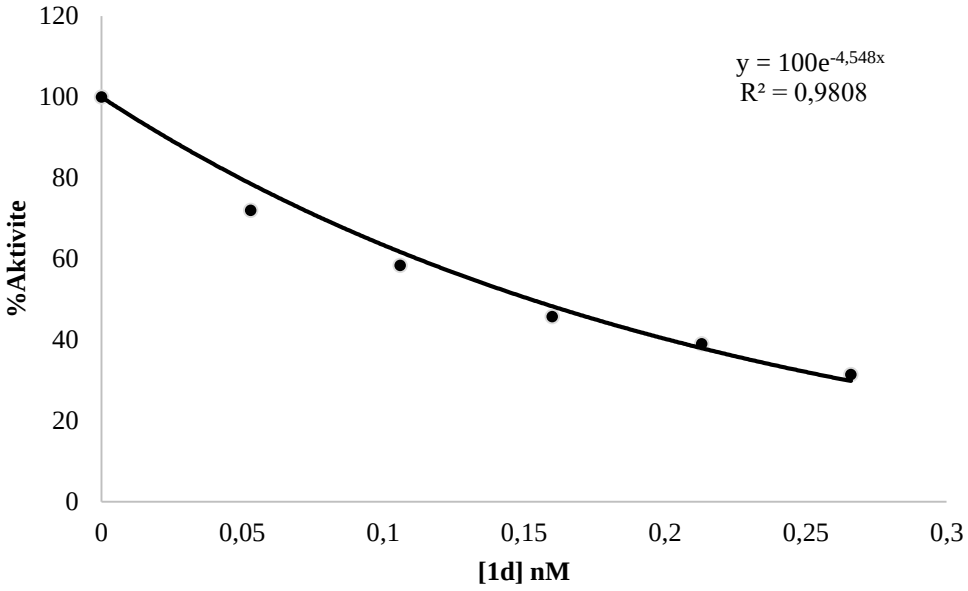
Şekil 4. 4. AChE enzimi için **1b** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



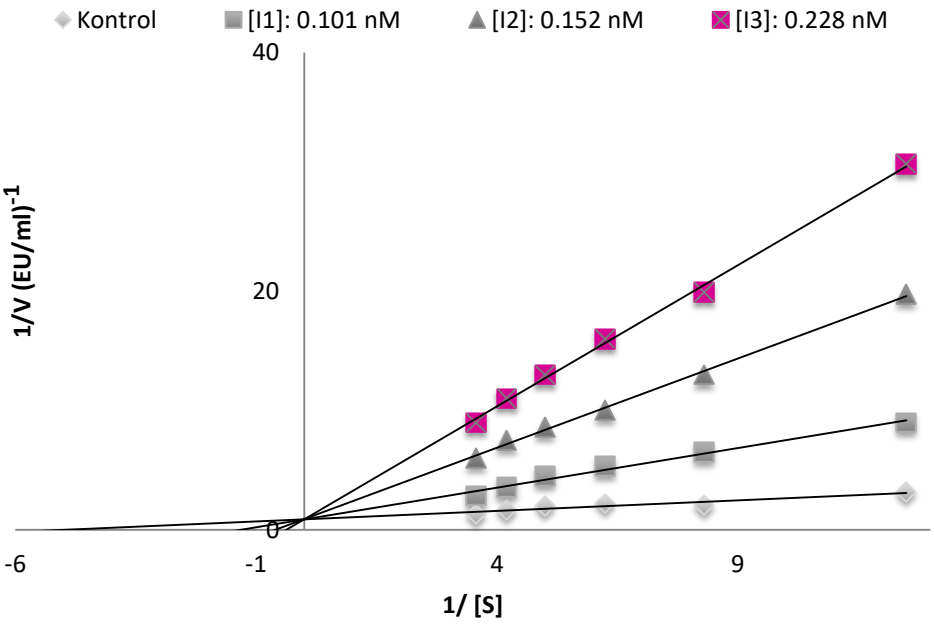
Şekil 4. 5. AChE enzimi için **1c** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



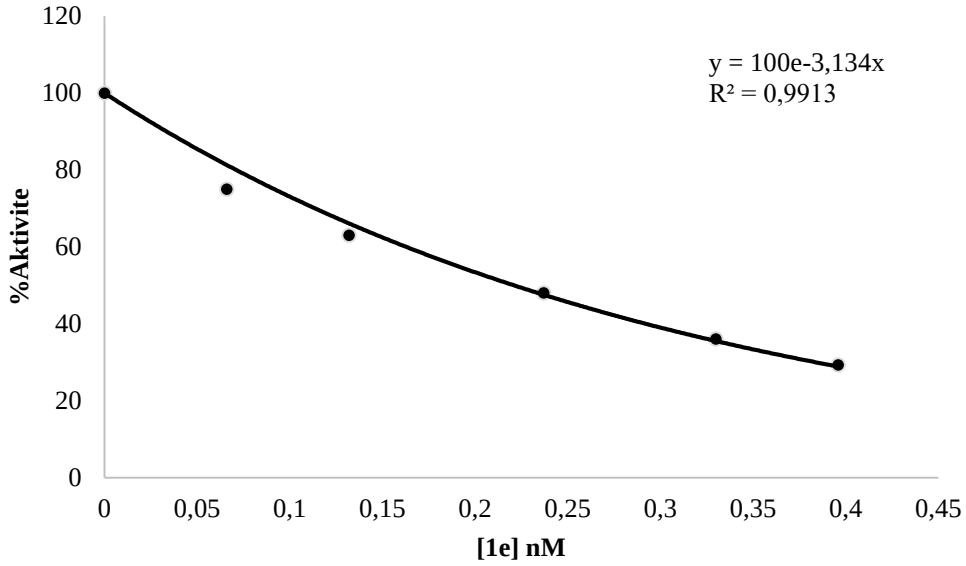
Şekil 4. 6. AChE enzimi için **1c** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



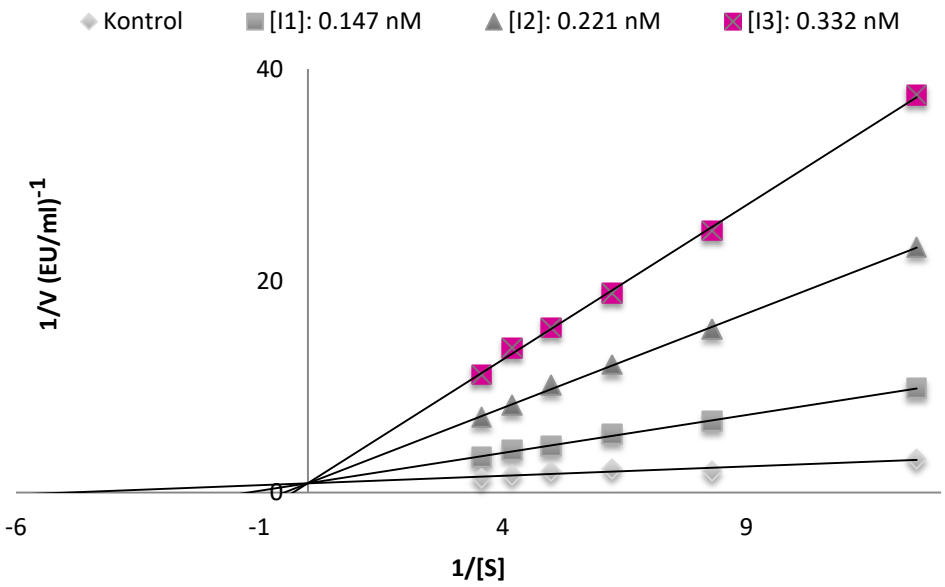
Şekil 4. 7. AChE enzimi için **1d** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



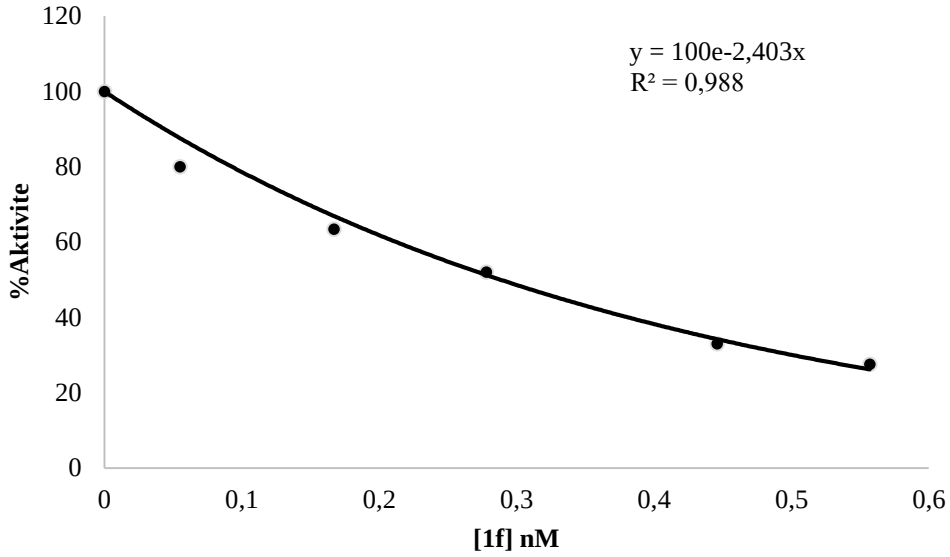
Şekil 4. 8. AChE enzimi için **1d** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



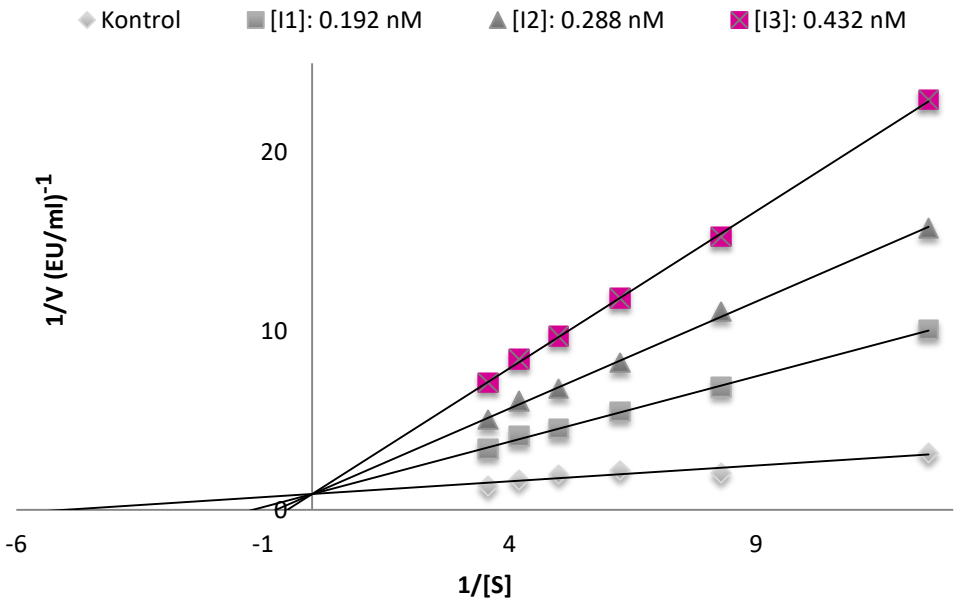
Şekil 4. 9. AChE enzimi için **1e** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



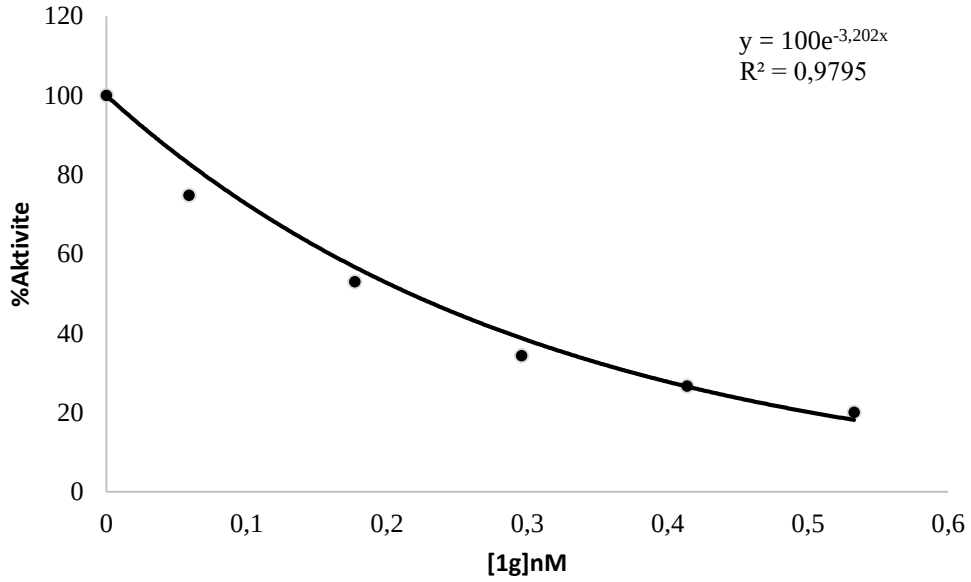
Şekil 4. 10. AChE enzimi için **1e** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



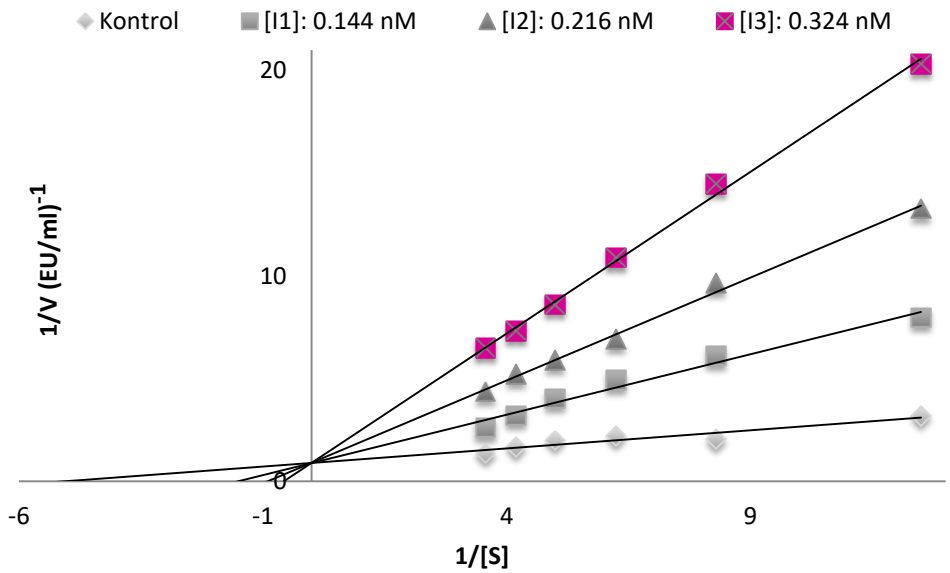
Şekil 4. 11. AChE enzimi için **1f** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



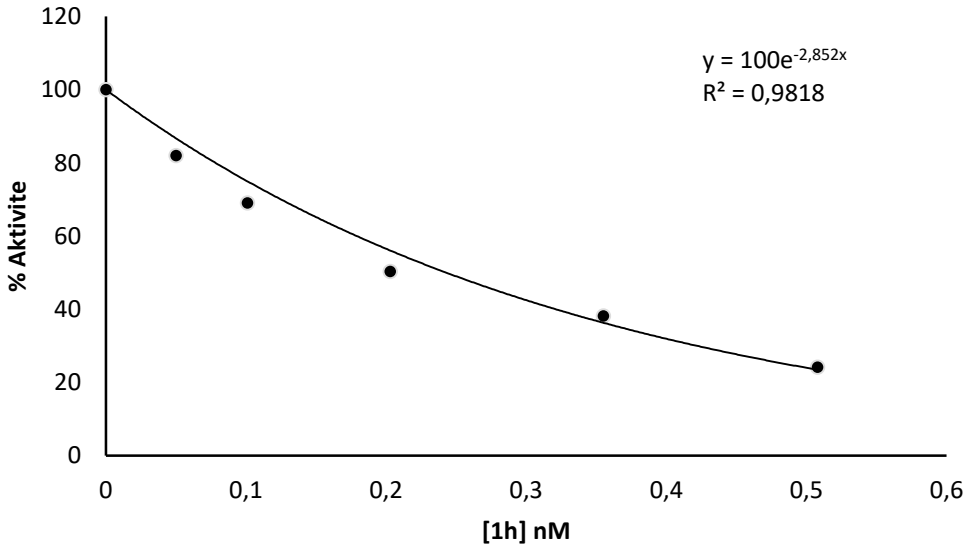
Şekil 4. 12. AChE enzimi için **1f** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



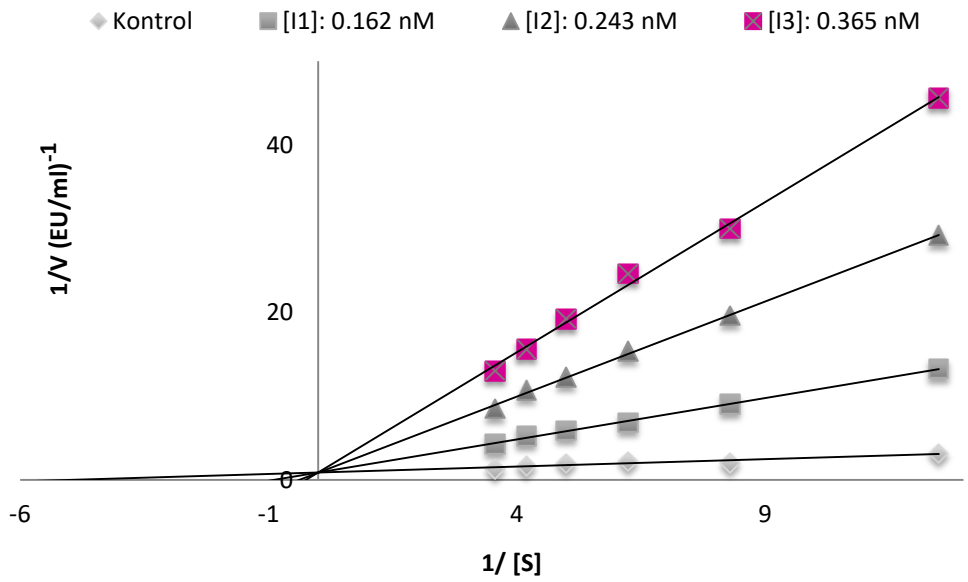
Şekil 4. 13. AChE enzimi için **1g** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



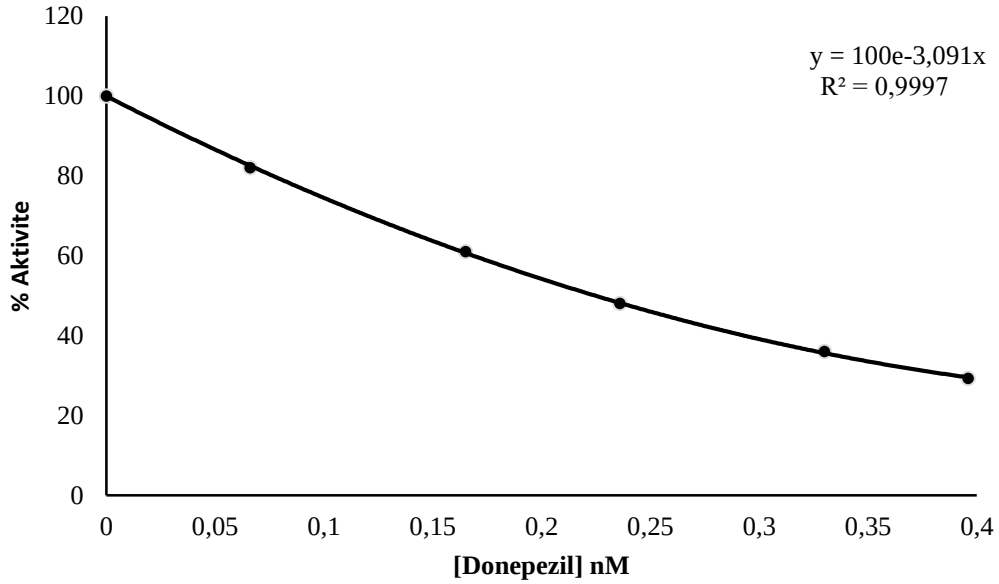
Şekil 4. 14. AChE enzimi için **1g** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



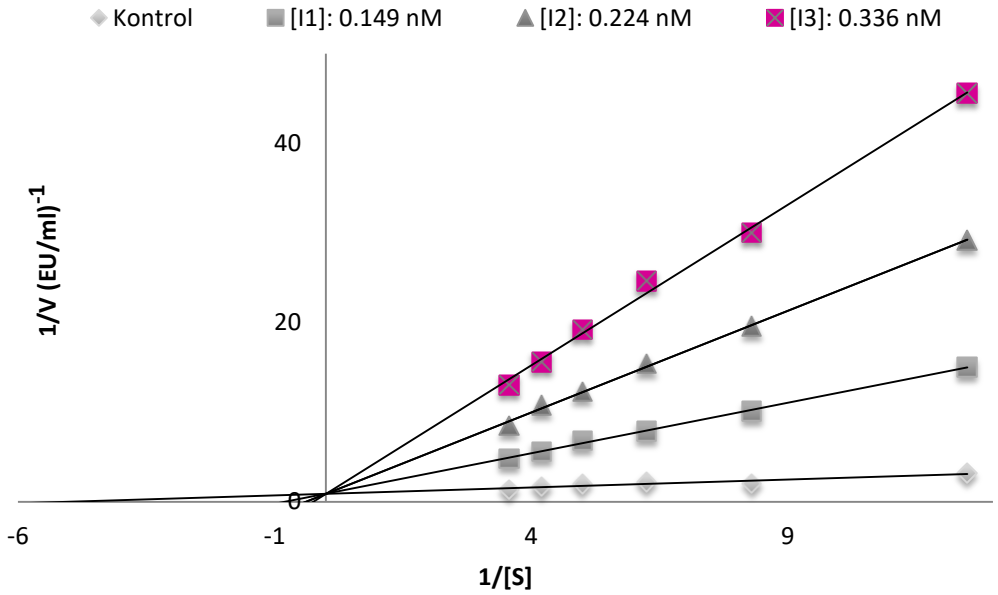
Şekil 4. 15. AChE enzimi için **1h** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



Şekil 4. 16. AChE enzimi için **1h** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4. 17. AChE enzimi için **Donepezil** ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



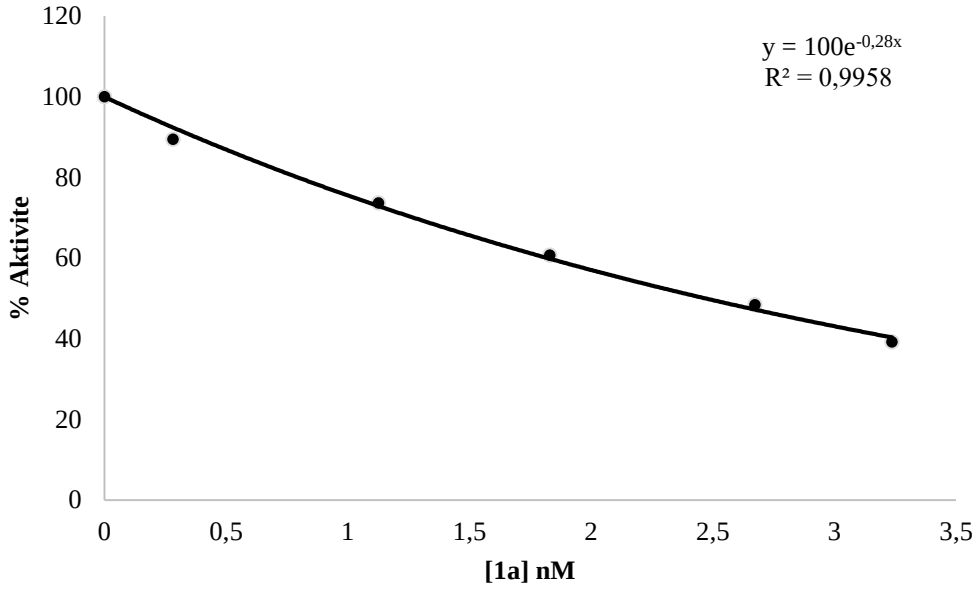
Şekil 4. 18. AChE enzimi için **Donepezil** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4. 1. AChE üzerinde inhibitör etkiye sahip bileşiklerin (1a-h) ve Donepezil ilacının IC_{50} değerleri ve Ki sabitleri

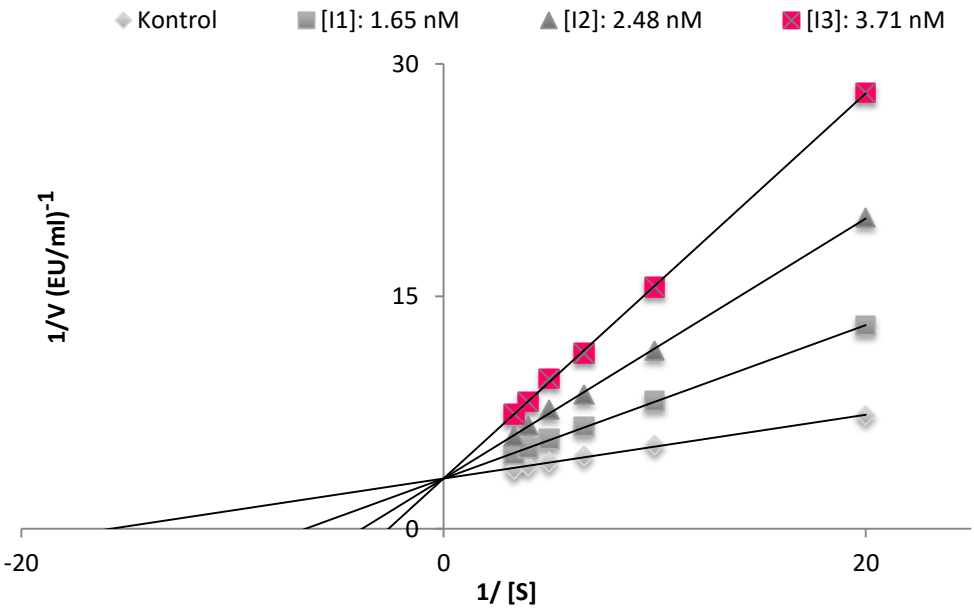
Bileşikler	**AChE**		
	IC_{50} (nM)	**R^2**	**K_i (nM)**
1a	0.234	0.9907	0.030±0.001
1b	0.364	0.9935	0.079±0.025
1c	**0.075**	**0.9798**	0.032±0.003
1d	**0.152**	**0.9808**	**0.025±0.010**
1e	0.221	0.9913	0.031±0.014
1f	0.288	0.9880	0.053±0.007
1g	0.216	0.9795	0.049±0.011
1h	**0.243**	**0.9818**	**0.024±0.009**
Donepezil	0.224	0.9997	0.021±0.005

4.2. BChE Enzimi ile Yapılan Çalışma Bulguları

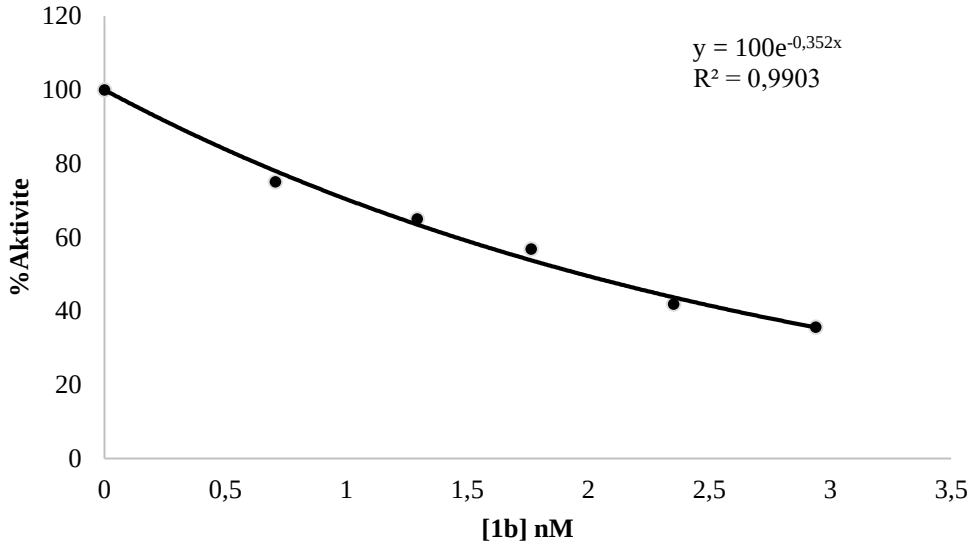
Sentetik ve yapısal olarak doğrulanmış piridazin türevlerinin ticari olarak tedarik edilen BChE enzimi üzerindeki tesiri araştırıldı. Ölçümler, esteraz aktivite yöntemi kullanılarak 5 dakikalık aralıklarla ve 412 nm'de yapıldı. Sentetik türevlerin inhibitör etkisi IC_{50} ve Ki değerleri ile belirlendi. IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri hesaplandı. İnhibisyon eğrisini çizmek için Aktivite (%) - [I] ölçümleri 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda gerçekleştirildi. Ek olarak, K_i için 3 farklı inhibitör konsantrasyonu seçildi ve deneyler 6 farklı substrat konsantrasyonunda (0,05-0,10-0,15-0,20-0,25-0,30 *mM*) yapıldı. IC_{50} ve K_i değerleri BChE için çizilen grafiklerden hesaplanarak Tablo 4.2.' de verilmiştir.



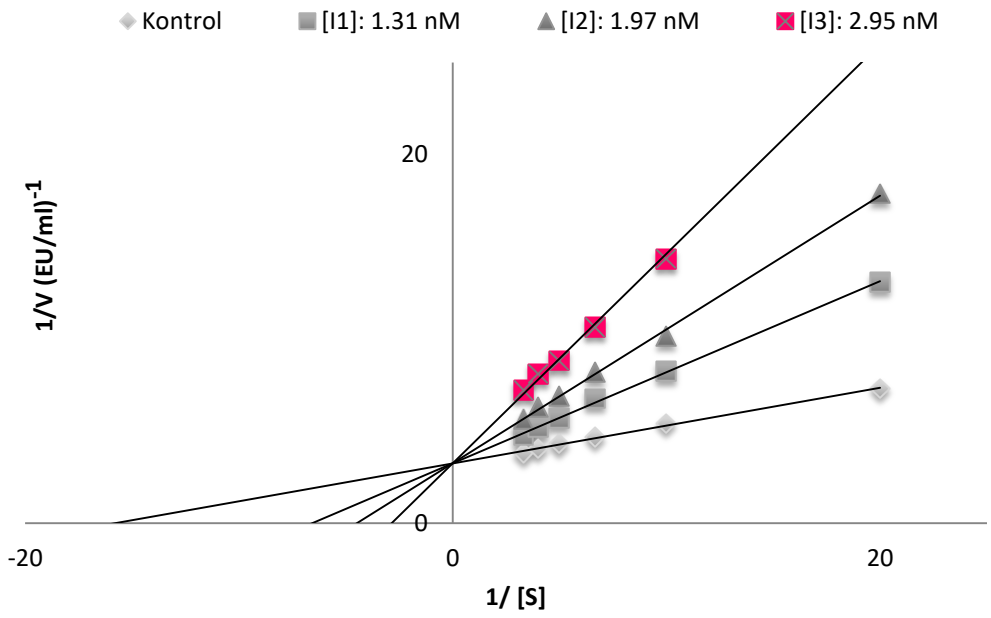
Şekil 4. 19. BChE enzimi için **1a** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



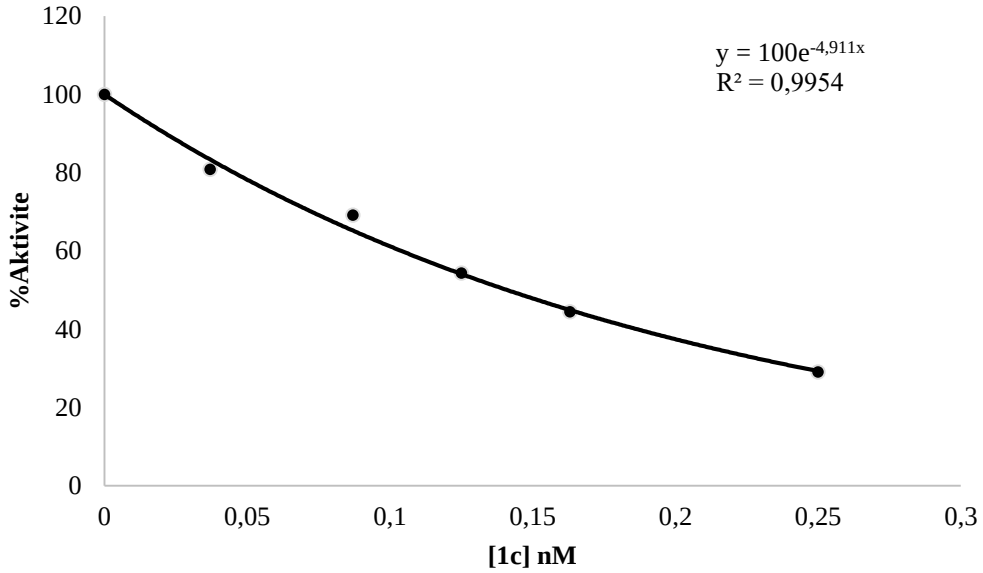
Şekil 4. 20. BChE enzimi için **1a** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



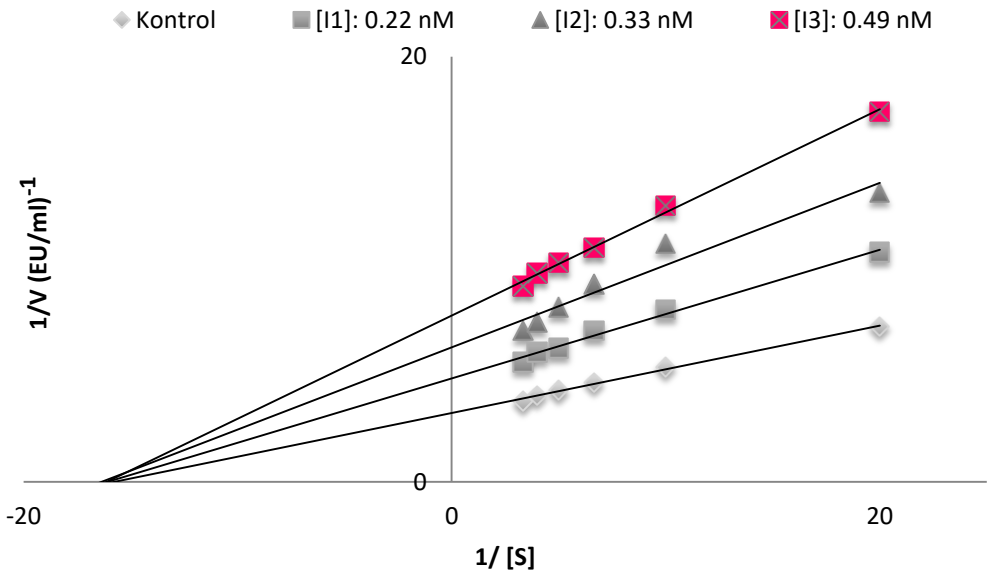
Şekil 4. 21. BChE enzimi için **1b** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



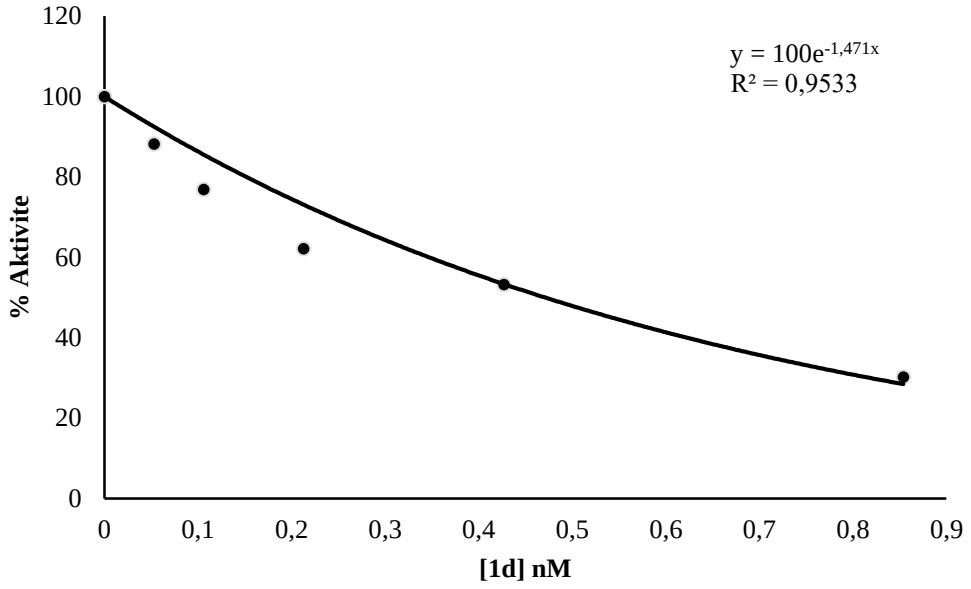
Şekil 4. 22. BChE enzimi için **1b** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



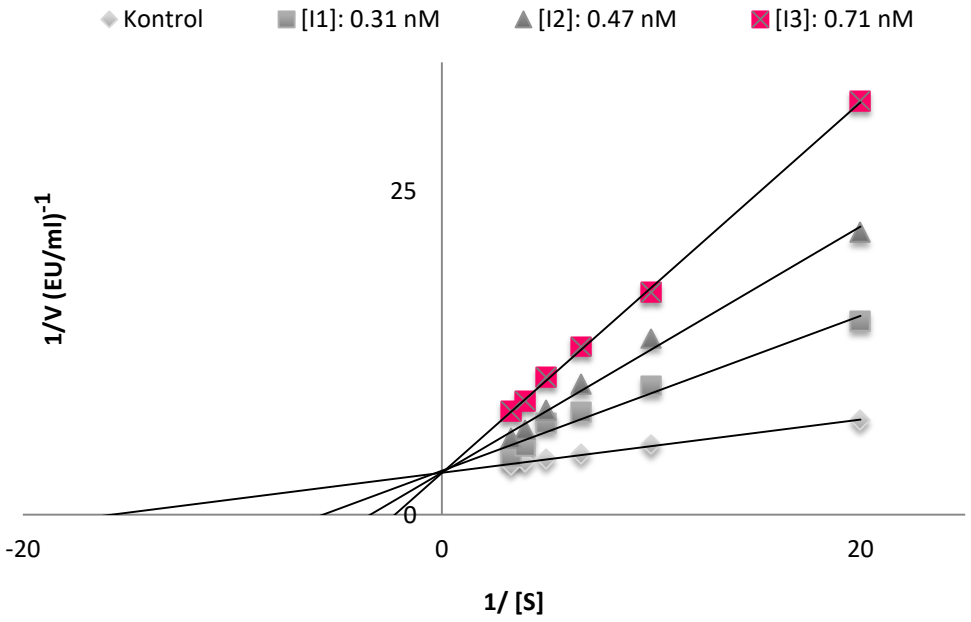
Şekil 4. 23. BChE enzimi için **1c** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



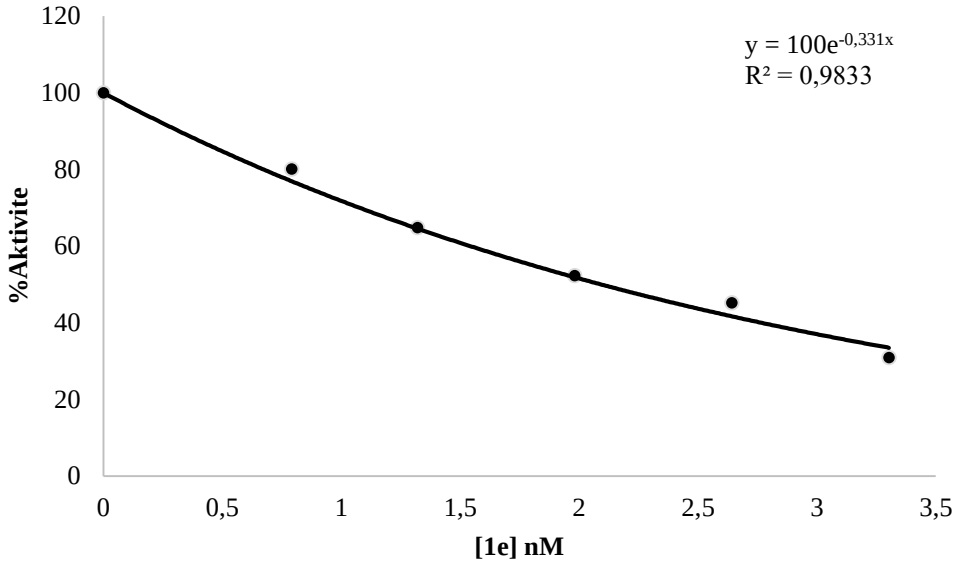
Şekil 4. 24. BChE enzimi için **1c** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



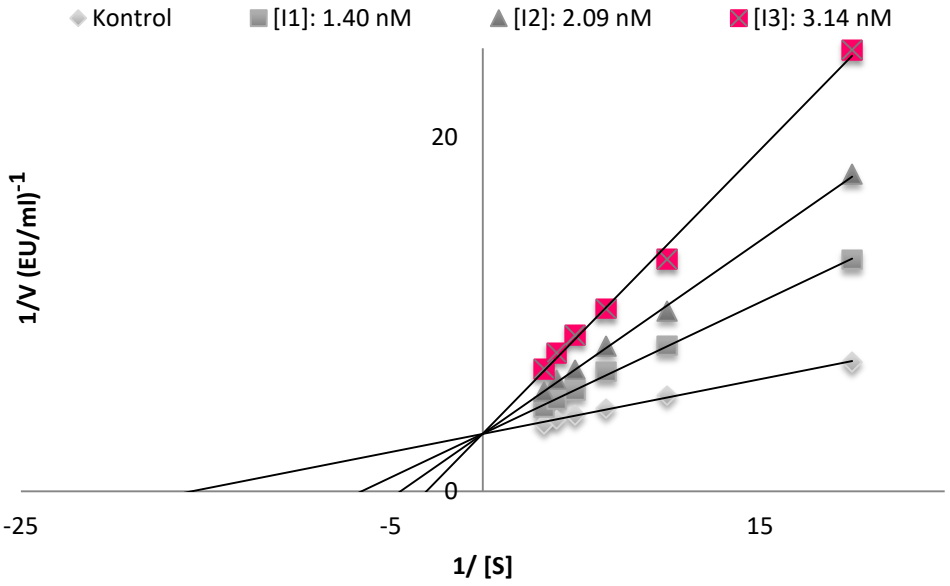
Şekil 4. 25. BChE enzimi için **1d** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



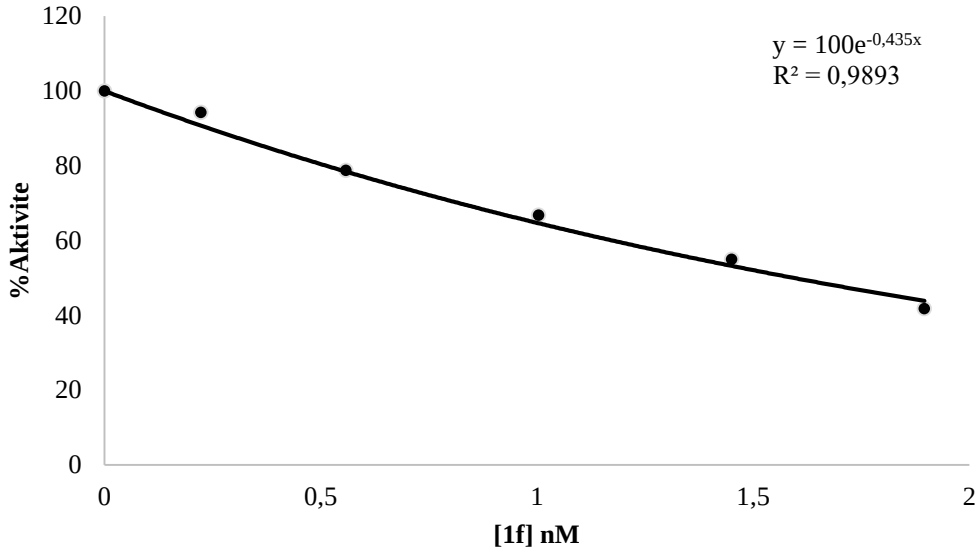
Şekil 4. 26. BChE enzimi için **1d** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



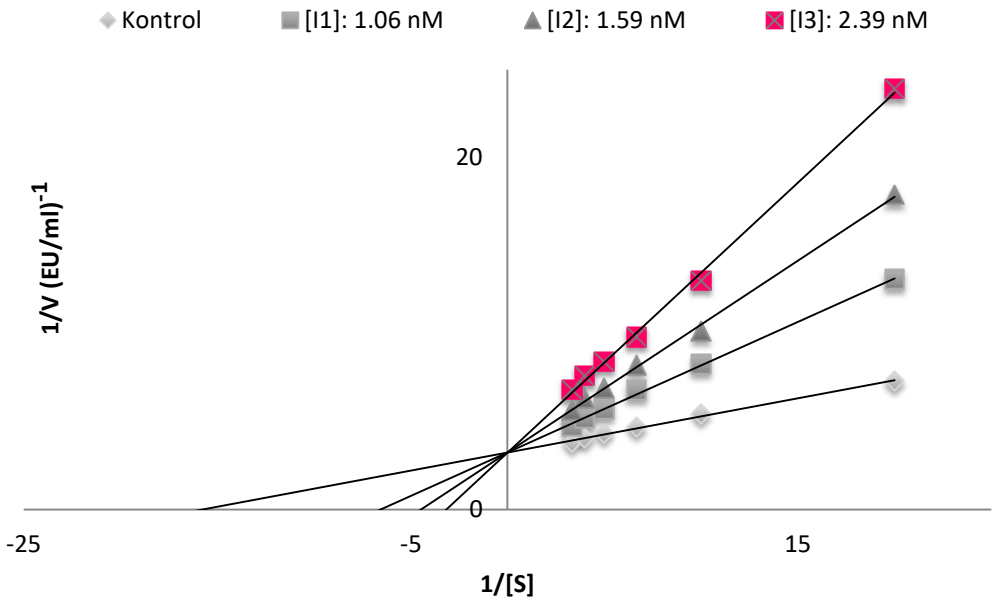
Şekil 4. 27. BChE enzimi için **1e** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



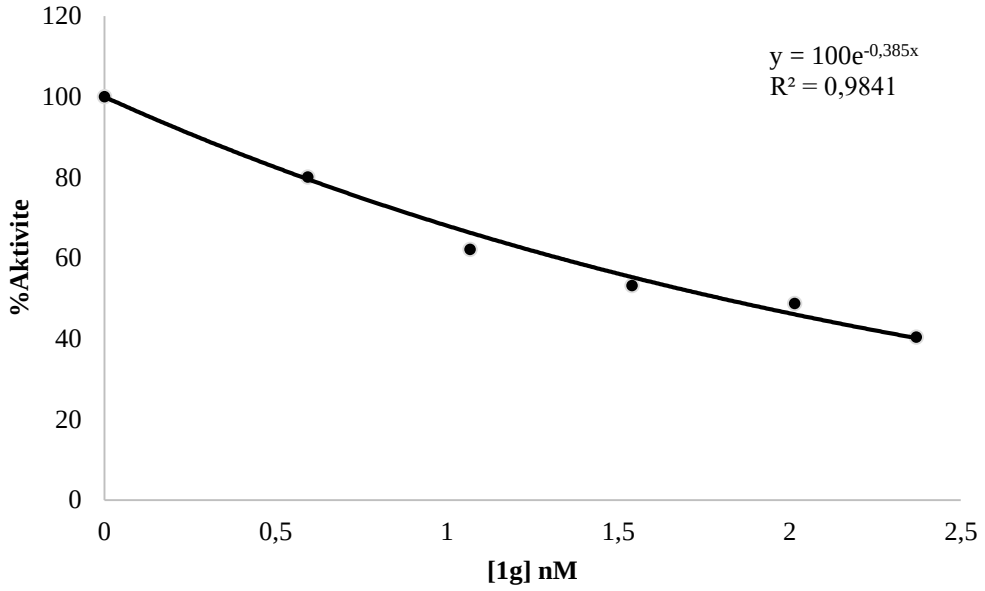
Şekil 4. 28. BChE enzimi için **1e** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



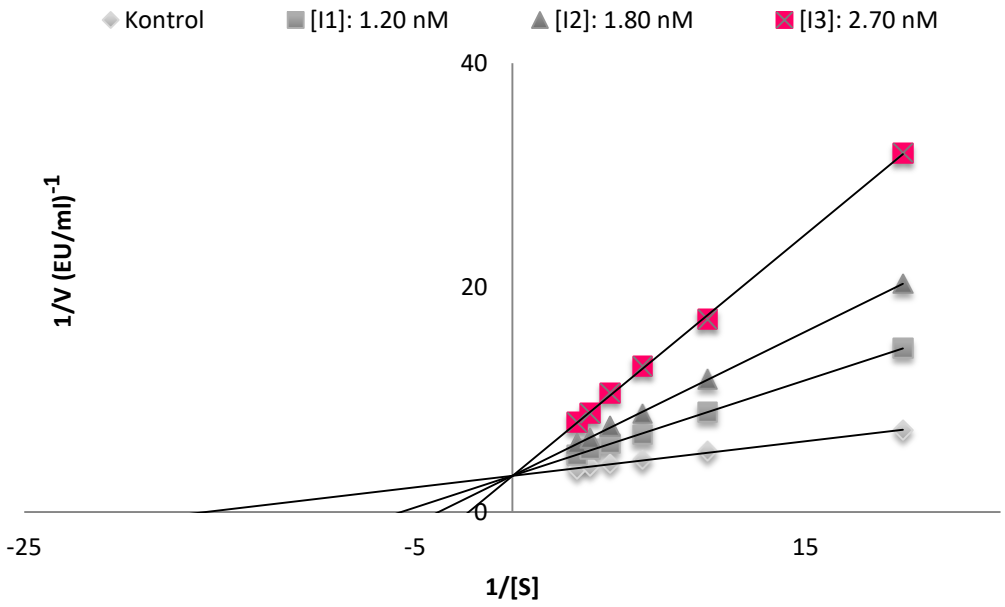
Şekil 4. 29. BChE enzimi için **1f** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



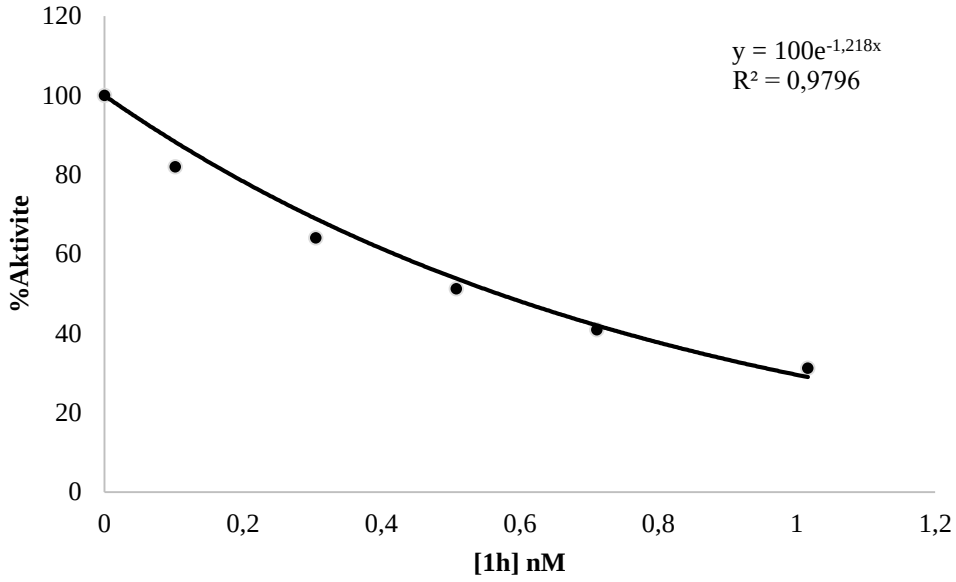
Şekil 4. 30. BChE enzimi için **1f** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



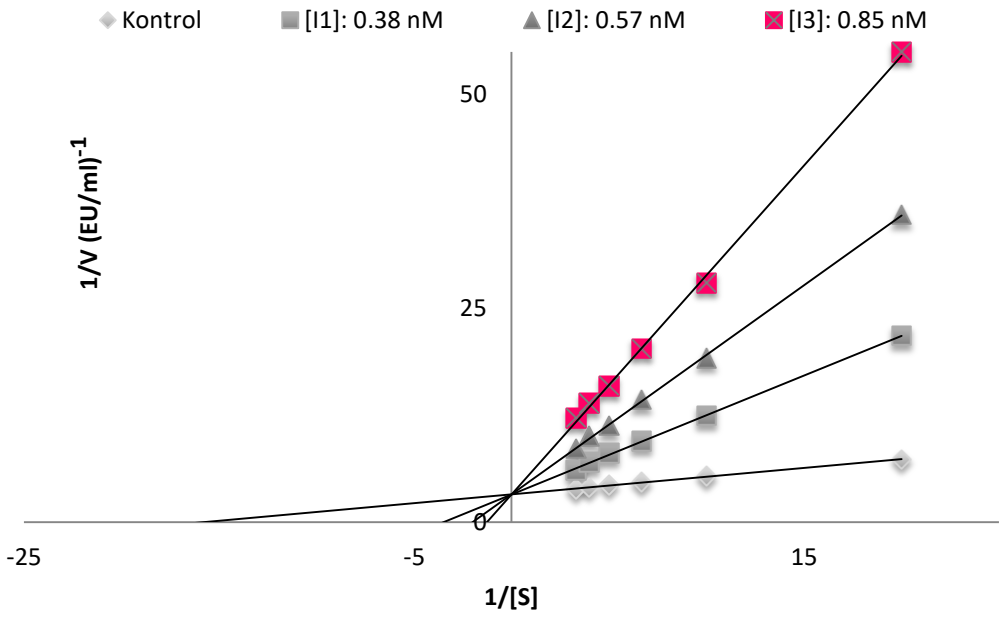
Şekil 4. 31. BChE enzimi için **1g** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



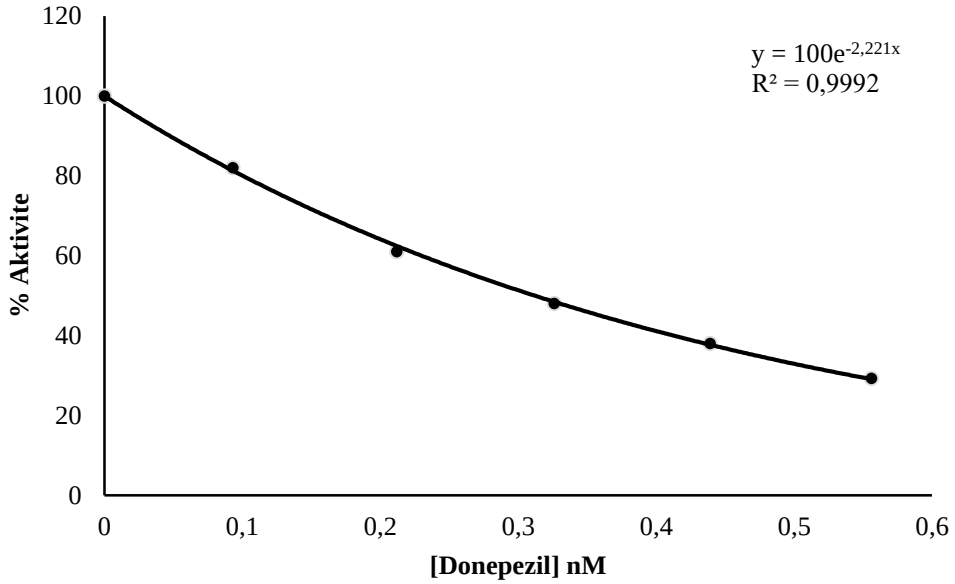
Şekil 4. 32. BChE enzimi için **1g** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



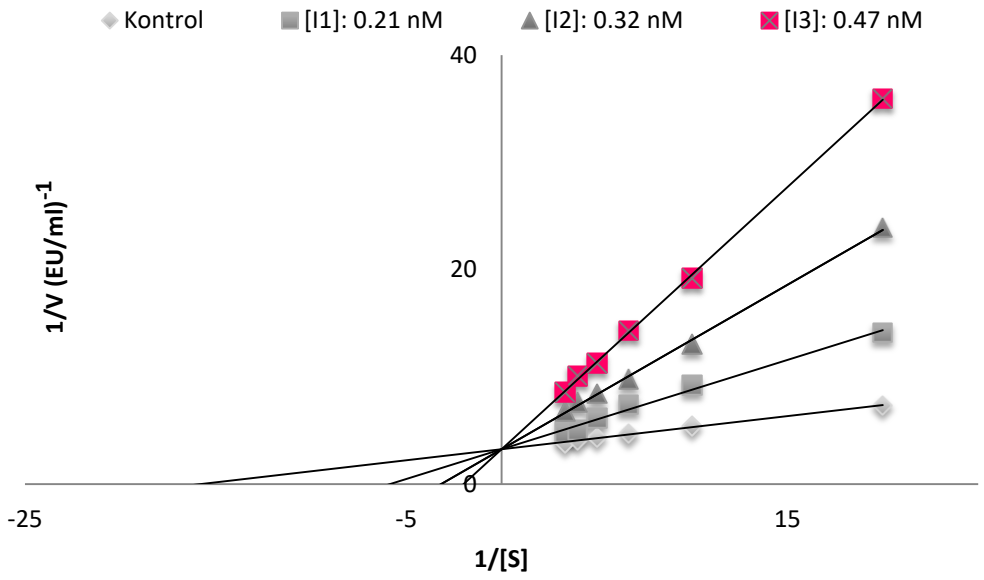
Şekil 4. 33. BChE enzimi için **1h** inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



Şekil 4. 34. BChE enzimi için **1h** inhibitörü derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4. 35. BChE enzimi için **Donepezil** ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği



Şekil 4. 36. BChE enzimi için **Donepezil** derişimi ve 6 farklı substrat derişiminde çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4. 2. BChE üzerinde inhibitör etkiye sahip bileşiklerin (1a-h) ve Donepezil ilacının IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri

Bileşikler	**BChE**		
	IC_{50} (nM)	**R^2**	**K_i (nM)**
1a	2.475	0.9958	0.904±0.235
1b	1.969	0.99503	0.787±0.141
1c	0.327	0.9954	0.371±0.052
1d	**0.471**	**0.9533**	**0.137±0.024**
1e	2.094	0.9833	0.856±0.0123
1f	1.593	0.9893	0.663±0.085
1g	1.800	0.9841	0.633±0.221
1h	**0.569**	**0.9796**	**0.087±0.017**
Donepezil	0.312	0.9992	0.090±0.028

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

AChE ve BChE, nörotransmiter asetilkolin ve bütirilkolini (ACh ve BuCh) hidrolize ederek kolinerjik iletimde hayati bir rol oynayan enzimlerdir. AD'nin kolinerjik kayıpla bağlantısı nedeniyle, kolinesteraz inhibitörleri AD'yi tedavi etmede en etkili ve iyi bilinen stratejidir. Kolinerjik hipoteze göre, bu enzimlerin inhibisyonu, ilerleyici ve sıklıkla ölümcül olan nörodejeneratif hastalık AD'yi hafifletmek için umut vaat edici olabilir.

Ticari olarak bulunabilen seknidazol türevlerinin sentetik ve yapısal olarak onaylanmış etkileri, AChE ve BChE enzimleri üzerinde incelendi. Sentetik türevlerin inhibitör etkisi, IC_{50} ve Ki değerleriyle belirlendi. IC_{50} değerleri ve Ki sabitleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda; IC_{50} değerlerinin AChE için 0.075-0.364 nM ve BChE için 0.327-2.475 nM aralığında olduğu belirlendi ve Ki değerlerinin AChE için 0.024 ± 0.009 - 0.079 ± 0.025 nM ve BChE için 0.087 ± 0.017 - 0.904 ± 0.235 nM aralığında olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre, **1d** ve **1h** bileşiklerinin, sırasıyla 0.025 ± 0.010 ve 0.024 ± 0.009 nM'lik Ki değerleri ile AChE üzerinde en iyi inhibitör etkiyi gösterdiği belirlendi. Benzer şekilde, **1d** ve **1h** bileşikleri BChE üzerinde sırasıyla 0.137 ± 0.024

ve 0.087 ± 0.017 nM'lik Ki değerleri ile en iyi inhibitör etkiyi gösterdi. Birçok bileşik güçlü inhibitör etkiler gösterse de, **1d** ve **1h** hem AChE hem de BChE enzimlerinde en iyi inhibitör etkileri gösterdi.

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerle çizilen grafikler 1h bileşiğinin, BChE için standart bileşik donepezil'den daha iyi bir inhibitör etki gösterdiğini kanıtlamıştır. İnhibisyon sonuçları Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada metronidazol-seknidazol türevlerinin (**1a-h**) hem AChE hem de BChE aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Her iki enzim için referans inhibitör olarak Donepezil kullanıldı. İnhibisyon sonuçları Donepezil ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada kullandığımız metronidazol-seknidazol türevlerinin bazıları Donepezil'den daha az etkili, bazıları benzer şekilde etkili ve bazıları daha etkili inhibitörler olarak görülmüştür. Bu moleküllerin AChE ve BChE üzerindeki inhibitör etkileri nanomolar seviyelerdeydi. Ayrıca sonuçlarımız, **1h**'nin her iki enzim üzerinde güçlü etki gösterirken kalan tüm moleküllerin AChE üzerinde BChE'den daha güçlü bir inhibitör etki gösterdiğini ortaya koydu.

Geleneksel yöntemlerle yeni bir ilaç geliştirmek hem maliyetli bir süreçtir hem de uzun zaman gerektirir. Son yıllarda bilim insanları, daha yüksek başarı oranına daha kısa sürede ulaşmak için ilaç yeniden amaçlandırma stratejisine odaklanmıştır. Bu strateji, bilinen bir bileşiğin farklı bir hastalığı tedavi etmek için yeni bir kullanımını keşfetme sürecidir. AD'nin tedavisinde istenen nokta hala ulaşılmadığı ve mevcut ilaçların birçok yan etkisi olduğu için, daha az yan etkiye sahip etkili AChE-BChE inhibitörlerini belirlemeye büyük ihtiyaç vardır (2). İlaç yeniden konumlandırma çalışmaları, bu hastalığın tedavisine katkı sağlamak için önemli bir başlangıç noktası olacaktır.

AD'nin ciddiyeti ve hasta sayısındaki sürekli artış göz önüne alındığında, belirli belirteçleri hedef alan birçok ilacı geliştirmek zorunlu hale gelmiştir. Bu nedenle, test edilen bileşikler, nörodejeneratif bozukluk araştırmalarına katılan bilim insanlarına yeni bilgiler sağlayarak ilaç yeniden konumlandırma çalışmalarına katkıda bulunacaktır.

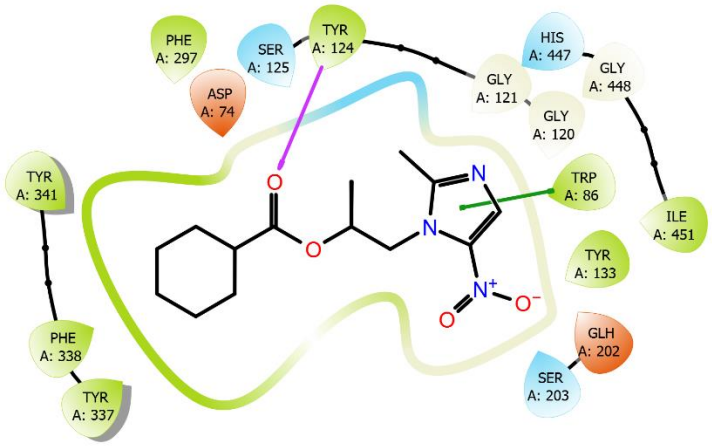
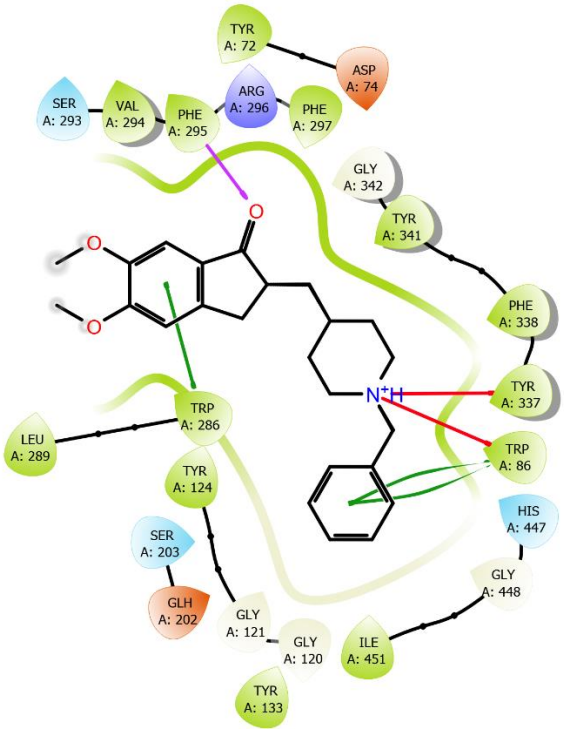
Bu çalışmada, bileşiklerin AChE ve BChE üzerindeki etkisini belirlemek için *in silico* yaklaşımlar kullanılmıştır. Belirlenmiş kristal yapılar ile birlikte bir koligand olan

Donepezil'in AChE ve BChE hedefleriyle bağlanma modu belirlenmiş ve en iyi aktiviteye sahip **1h** ile karşılaştırılmıştır. Mevcut çalışmada, **1h**'nin AChE ve BChE üzerindeki inhibitör özellikleri de in silico yaklaşımlarla incelenmiştir. Bunun için Schrödinger 2021-2 Maestro 12.8 ile moleküler docking çalışmaları Doç. Dr. Burçin Türkmenoğlu tarafından yapılmıştır. Ligandların bağlanma etkileşimleri ve docking skoru değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, sekiz bileşiğin ADMET analizleri gerçekleştirilmiştir. İlaç adayı olabilecek 1h'nin hesaplamalı sonuçlarının oldukça dikkate değer olduğu belirlenmiştir.

Moleküler docking yönteminde, in vitro deneysel aktiviteleri ölçmek için kullanılan Donepezil'in öncelikle hesaplamaları yapıldı. Ardından, her iki enzime (AChE ve BChE) karşı en iyi aktivite değerine sahip olan **1h**'nin etkileşimleri Tablo 4.1. ve 4.2.'de incelendi. Moleküler dockingde önemli bir bağlanma parametresi olan docking skor değeri dikkate alındığında, her iki enzimle elde edilen sonuçlar Tablo 5.1. ve Tablo 5.2.'de sunulmuştur.

İlk hedef olan AChE için Tablo 4.1.'de en iyi sonuçları veren bileşiğin **1h** olduğu belirlendi. Benzer şekilde, *in silico* yaklaşımlarla elde edilen sonuçlarda, en iyi bağlanma parametre değerine sahip bileşiğin **1h** olduğu tespit edildi. Tablo 5.1.'de, **1h**'nin docking skor değeri -6.807 kcal/mol olarak kaydedilmiştir. Ek olarak, **1h**'nin 4EY7 kristal yapısıyla etkileşime giren 2D etkileşim diyagramı Tablo 5.1.'de sunulmuştur. **1h**, AChE hedefinin aktif bağlanma bölgesine yerleştirildiğinde, Trp86 amino asit kalıntısıyla π-π yığılma etkileşimi ve Tyr124 amino asit kalıntısıyla hidrojen bağlanması aracılığıyla etkileşim kurmuştur.

Tablo 5 1. 2D etkileşim diyagramı, docking skoru ve MM/GBSA değerleri, Donepezil ve 1h'nin AChE (PDB Kimliği: 4EY7) ile in silico yaklaşımlar kullanılarak etkileşimde bulunması durumunda şu şekildedir:

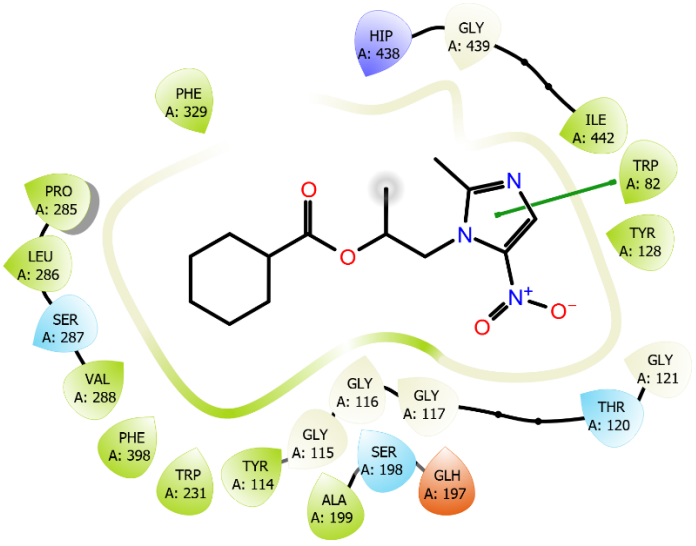
Ligand	2D Interaction Diagram	Docking score (kcal/mol)	XP Gscore (kcal/mol)	MM/GBSA ΔG_{Bind}(kcal/mol)
1h		-6.807	-6.807	-47.79
Donepezil		-16.484	-16.487	-80.12

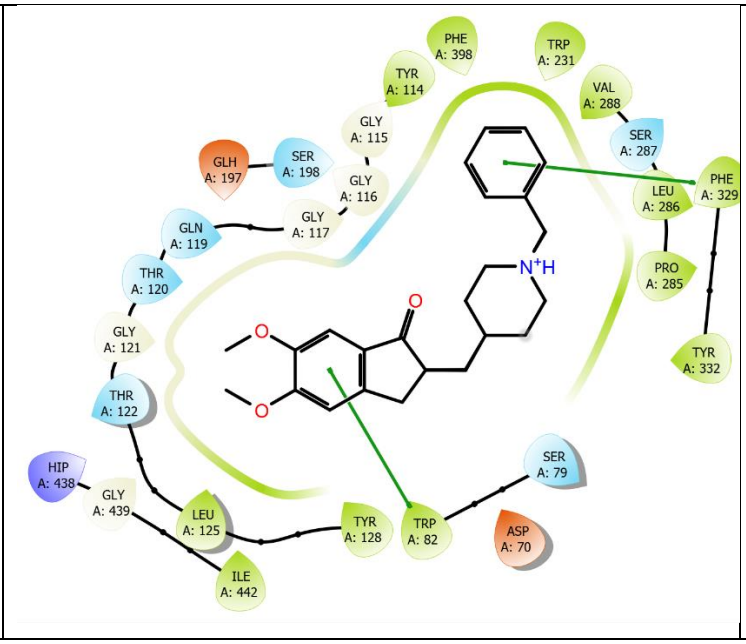
Tablo 5.1., Donepezil'in AChE ile etkileşimindeki 2 boyutlu etkileşim diyagramını ve docking skor değerini sunmaktadır. Donepezil-AChE (4EY7) kompleksinde Donepezil ile amino asit kalıntıları Tyr337, Trp86 ve Trp286 arasında bir π-π yığılma etkileşimi bulunurken, Donepezil ve Phe295 amino asit kalıntısı arasında bir hidrojen bağı

bulunmaktadır. AChE ile etkileşime giren Donepezil'in docking skor değeri -16.484 kcal/mol'dur. MM/GBSA analizi sonucunda Tablo 5.1.'de komplekslerin ΔGBind enerjileri, yani AChE ile etkileşime giren **1h** ve Donepezil'in sırasıyla -47.79 ve -80.12 kcal/mol olduğu belirlenmiştir.

İkinci bir amaç olarak, *in silico* hesaplamalar, deneysel aktiviteleri analiz edilen bileşikler için BChE üzerinde gerçekleştirildi. Bu çalışmalar, *in vitro* sonuçları desteklemek amacıyla yapıldı.

Tablo 5 2. Donepezil ve MNZ-8'in BuChE (PDB Kimliği: 4BDS) ile etkileşime girerken in silico yaklaşımlar kullanılarak elde edilen 2 boyutlu etkileşim diyagramı, docking skoru ve MM/GBSA değerleri

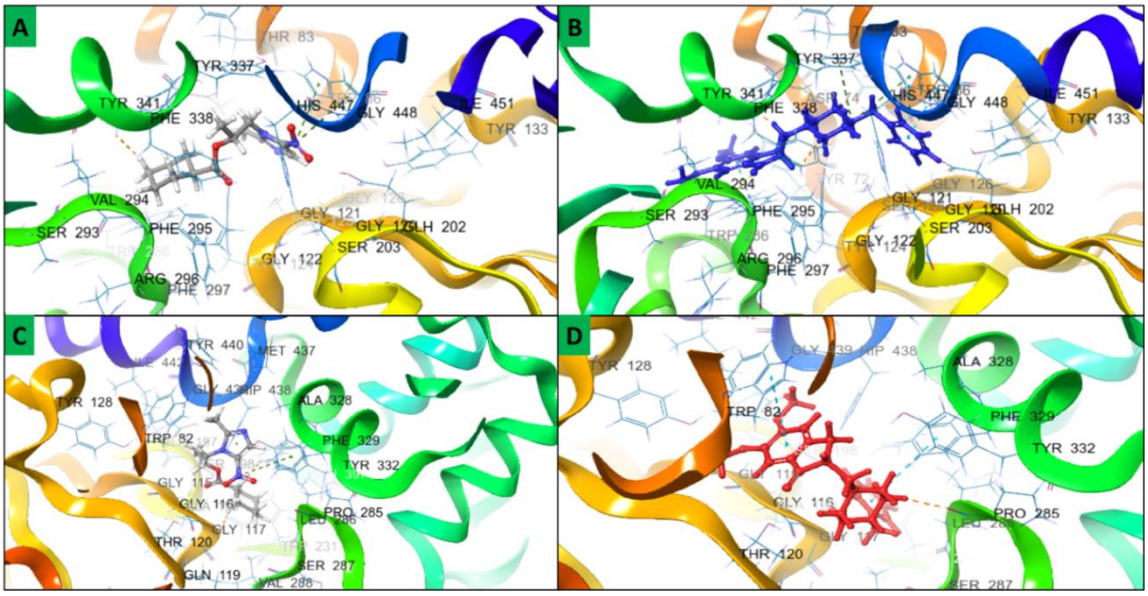
Ligand	2D Interaction Diagram	Docking score (kcal/mol)	XP Gscore (kcal/mol)	MM/GBSA ΔG_{Bind} (kcal/mol)
1h		-5.626	-5.626	-47.86

Donepezil		-6.726	-6.729	-51.99

BChE hedefiyle etkileşime giren **1h** ve Donepezil'in 2 boyutlu etkileşim diyagramları ve bağlanma skoru değerleri Tablo 5.2.'de sunulmaktadır. Tablo 5.2.'de, **1h** bileşiğinin BChE'nin aktif cep bölgesinde yerleştiği ve Trp82 ile pi-pi yığılma etkileşimi yaptığı belirlenmiştir. Ayrıca, **1h**'nin 4BDS ile etkileşim skorunun diğer bileşiklerden daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Bu, *in vitro* sonuçları desteklediğini kanıtlar.

1h ile BChE hedefi arasındaki etkileşim sonucu bağlanma skoru -5.626 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Karşılaştırma bileşiği Donepezil ile BChE arasındaki bağlanma skoru ise -6.726 kcal/mol olarak belirlenmiştir. İki değerin birbirine yakın olduğu düşünüldüğünde, **1h** bileşiğinin Donepezil ile karşılaştırılabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Ayrıca, *in silico* yaklaşımlarla BChE üzerindeki etkileşimleri Tablo 5.2.'de MM/GBSA analiziyle incelenmiştir. Tablo 5.2.'de serbest bağlanma enerjisi değerleri olarak verilen bu değerlerin birbirine oldukça yakın olduğu söylenebilir. BChE ile etkileşime giren **1h** bileşiğinin değeri -47.86 kcal/mol iken, Donepezil'in değeri -51.99 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.1. (A) **1h** bileşiğinin AChE ile (PDB Kimliği: 4EY7) 3 boyutlu etkileşim diyagramı. (B) Donepezil bileşiğinin AChE ile (PDB Kimliği: 4EY7) 3 boyutlu etkileşim diyagramı. (C) **1h** bileşiğinin BChE ile (PDB Kimliği: 4BDS) 3 boyutlu etkileşim diyagramı. (D) Donepezil bileşiğinin BChE ile (PDB Kimliği: 4BDS) 3 boyutlu etkileşim diyagramı.

Şekil 5.2., hem Donepezil hem de **1h**'nin her iki hedefle olan etkileşimlerinin 3 boyutlu etkileşim diyagramlarını göstermektedir. 3 boyutlu helikal yapının aktif bağlanma bölgesine yerleştirildiği ve helikal yapı ile etkileşime girdiği belirlenmiştir. Ayrıca, Şekil 5.1.'de, bağlanma bölgesinde olması gereken amino asit kalıntıları ile etkileşime girdiği sunulmuştur. *In silico* yaklaşımlarda, ADMET özellikleri Schrödinger Maestro 12.8'in QikProp arayüzü ile hesaplanmıştır. İlaç tasarımında ADMET özelliklerinin hesaplanması, bu bileşiklerin ilaç adayı olup olmayacağı konusunda araştırmacılara ön bilgi sağlar. Bu nedenle, bu aşama temel ilaç eleme kriterlerinden biridir. İn vitro olarak sentezlenen ve incelenen bileşiklerin ilaç benzeri özellikleri ADMET ile değerlendirilmiş ve Tablo 5.3.'de sunulmuştur.

Tablo 5 3. Sentezlenen tüm bileşiklerin ADMET analizi

Özellikler	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g	1h	Önerilen Değerler
Moleküler ağırlık	213.139	255.273	239.230	281.311	227.219	269.300	253.257	295.338	<500
Hidrojen bağ donörü	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	≤ 5
Hidrojen bağ alıcısı	4.500	4.500	4.500	4.500	4.500	4.500	4.500	4.500	≤ 10
PSA	94.431	86.739	91.818	88.101	92.685	87.062	89.997	87.348	7-200
İnsan oral emilim yüzdesi	76.096	88.355	82.426	90.594	78.436	87.058	84.642	93.600	>80% is high, <25% is low
Beş kuralı	0	0	0	0	0	0	0	0	<4
QPlogPo/w	0.720	1.874	1.427	2.227	1.075	2.120	1.756	2.661	-2.0 to 6.5
QPlogS	-1.303	-2.162	-2.227	-2.619	-1.867	-2.692	-2.595	-3.380	> -5.7
QPloghERG	-3.376	-3.291	-3.995	-3.429	-3.461	-3.538	-3.963	-3.862	Below -5
QPPCaco	323.999	657.497	429.471	672.287	335.086	517.688	445.791	713.856	<25 poor >500 great
QPlogBB	-0.961	-0.747	-1.021	-0.758	-0.999	-0.876	-1.005	-0.799	-3 to 1.2
QPlogKhsa	-0.692	-0.337	-0.460	-0.164	-0.537	-0.185	-0.316	0.021	-1.5 to 1.5

Tablo 5.3.'e göre, Qikprop arayüzü ile hesaplanan ADMET değerlerinin sekiz bileşik için belirlenen değerler arasında olduğu yorumlanabilir. Tüm bileşiklerin iyi bir insan oral emilimi gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, tüm bileşiklerin moleküler ağırlık kuralını ihlal etmediği belirlenmiştir. Tablo 5.3.'e göre Lipinski'nin beş kuralına da uyulduğu tespit edilmiştir. Su çözünürlüğü, oktanol/su dağılım katsayısı, hidrojen bağ alıcısı ve donörü, PSA gibi ADMET özellikleri tabloda belirtilen aralıklarda sunulmaktadır. QPlogHERG, QPPCaco, QPlogBB ve QPlogKhsa'nın kabul edilebilir aralıklarda olduğu Tablo 4'te sunulmuştur. Tüm bileşikler Caco-2 geçirgenliği gösterirken, QPlogBB değerleri referans aralıklar içerisindedir. Sekiz bileşiğin QPlogKhsa değerleri kabul edilen değerler arasındadır. Yani, sekiz bileşik için hesaplanan tüm parametrelerin

kabul edilebilir aralıklar içinde olduğu ADMET tahmin analizi sonucunda belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Ağırgöl, B.A., Yılmaz, U., Işleten, F., Semerci, E., Kutsal, C. (2008). Correlation of Serum Butyrylcholinesterase Activity with Preoperative Anxiety and Lipid Levels. *Turkish Journal Of Biochemistry,* 33(1), 9-13.

Ahmed, M., Rocha, J.B.T., Mazzanti, C.M., Morsch, A.L., Cargnelutti, D., Corrêa, M., Schetinger, M.R. vd. (2007). Malathion, carbofuran and paraquat inhibit Bungarus sindanus (krait) venom acetylcholinesterase and human serum butyrylcholinesterase in vitro. *Ecotoxicology,* 16(4), 363.

Akasofu, S., Kimura, M., Kosasa, T., Sawada, K., & Ogura, H. (2008). Study of neuroprotection of donepezil, a therapy for Alzheimer's disease. *Chemico-Biological Interactions*, 175(1–3), 222–226.

Annapurna, V., Senciall, I., Davis, A.J., Kutty, K.M. (1991). Relationship between serum pseudocholinesterase and triglycerides in experimentally induced diabetes mellitus in rats. *Diabetologia,* 34(5), 320-324.

Bautista-Aguilera, O. M., Esteban, G., Chioua, M., Nikolic, K., Agbaba, D., Moraleda, I., ... & Unzeta, M. (2014). Multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: design, synthesis, biochemical evaluation, ADMET, molecular modeling, and QSAR analysis of novel donepezil-pyridyl hybrids. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 1893–1910.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2014). Biyokimya. *Palme Yayıncılık,* 241-247, Ankara.

Birks, J. S., & Grimley Evans, J. (2015). Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015(4), CD001191. https://doi.org/10.1002/14651858.CD001191.pub3.

Boyd, R. J., Avramopoulos, D., Jantzie, L. L., & McCallion, A. S. (2022). Neuroinflammation represents a common theme amongst genetic and environmental risk factors for Alzheimer and Parkinson diseases. *Journal of Neuroinflammation,* 19, 223. https://doi.org/10.1186/s12974-022-02584-x.

Boztas, M., Taslimi, P., Yavari, M.A., Gulcin, I., Sahin, E., Menzek, A. (2019). Synthesis and biological evaluation of bromophenol derivatives with cyclopropyl moiety: Ring opening of cyclopropane with monoester. *Bioorg Chem*, 89, 103017. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103017.

Brion, J.-P., Anderton, B. H., Authelet, M., Dayanandan, R., Leroy, K., Lovestone, S., ... & Touchet, N. (2001). Neurofibrillary tangles and tau phosphorylation. *Biochemical Society Symposia*, 67, 81–88. https://doi.org/10.1042/bss0670081.

Busciglio, J., Gabuzda, D. H., Matsudaira, P., & Yankner, B. A. (1993). Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(5), 2092–2096. https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.2092.

Butterfield, D. A., Swomley, A. M., & Sultana, R. (2013). Amyloid β-Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(8), 823–835. https://doi.org/10.1089/ars.2012.5027.

Clifford, E. (1984). Enzyme Nomenclature 1984: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzyme-catalysed Reactions.

Darvesh, S., David A. Hopkins, Changiz Geula (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 131–138.

Darvesh, S., Hopkins, D. (2003). Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 463(1), 25-43.

Darvesh, S., ve diğerleri. (2008). Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase profiles in Alzheimer's disease brain. *Chemico-biological interactions*, 175(1-3), 208-214.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95. https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9.

Elman, C.L., Courtney, I.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M. (1951). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.

Elzahhar, P. A., Nematalla, H. A., Al-Koussa, H., Abrahamian, C., El-Yazbi, A. F., Bodgi, L., ... & Elrewiny, M. A. (2023). Inclusion of Nitrofurantoin into the Realm of Cancer Chemotherapy via Biology-Oriented Synthesis and Drug Repurposing. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(12), 4565–4587. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01408.

Fan, L., Mao, C., Hu, X., Zhang, S., Yang, Z., Hu, Z., ... & Xu, Y. (2020). New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*, 10. https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01312.

Gabr, M. T., & Abdel-Raziq, M. S. (2018). Design and synthesis of donepezil analogues as dual AChE and BACE-1 inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 80, 245–252.

Gaudig, M., Richarz, U., Han, J., Van Baelen, B., & Schauble, B. (2011). Effects of Galantamine in Alzheimer Disease: Double-blind Withdrawal Studies Evaluating Sustained Versus Interrupted Treatment. *Current Alzheimer Research*, 8(7), 771–780. https://doi.org/10.2174/156720511797633205.

Gauthier, S. (2001). Cholinergic adverse effects of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Drugs & Aging*, 18(11), 853-862.

Goel, P., Chakrabarti, S., Goel, K., Bhutani, K., Chopra, T., & Bali, S. (2022). Neuronal cell death mechanisms in Alzheimer's disease: An insight. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15. https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.937133.

Gregson, J., Qizilbash, N., Iwagami, M., Douglas, I., Johnson, M., Pearce, N., & Pocock, S. (2019). Blood pressure and risk of dementia and its subtypes: a historical cohort study with long-term follow-up in 2.6 million people. *European Journal of Neurology*, 26(11), 1479–1486. https://doi.org/10.1111/ene.14030.

Greig, N. H., Utsuki, T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H. W., Perry, T., ... & Lahiri, D. K. (2001). A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase. *Current Medical Research and Opinion*, 17(2), 159–165. https://doi.org/10.1185/0300799039117057.

Hammoudi, N. E. H., Sobhi, W., Attoui, A., Lemaoui, T., Erto, A., & Benguerba, Y. (2021). In silico drug discovery of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase enzymes inhibitors based on Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) and drug-likeness evaluation. *Journal of Molecular Structure*, 1229, 129845. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129845.

Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., ... & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141(6), 1917–1933. https://doi.org/10.1093/brain/awy132.

Huang, W., Tang, L., Shi, Y., Huang, S., Xu, L., Sheng, R., Wu, P., Li, J., Zhou, N., Hu, Y. (2011). Searching for the multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease: discovery of quinoxaline-based hybrid compounds with AChE, H3R and BACE 1 inhibitory activities, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(23), 7158-7167.

Huang, W.-J., Zhang, X., & Chen, W.-W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports*, 4, 519–522. https://doi.org/10.3892/br.2016.630.

Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., & Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Current Alzheimer Research*, 7(7), 656–664. https://doi.org/10.2174/156720510793611592.

Jońca, J., Żuk, M., Wasąg, B., Janaszak-Jasiecka, A., Lewandowski, K., Wielgomas, B. vd. (2015). New insights into butyrylcholinesterase activity assay: serum dilution factor as a crucial parameter. *PLoS One*, 10(10), e0139480.

Karantzoulis, S., & Galvin, J. E. (2011). Distinguishing Alzheimer's disease from other major forms of dementia. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 11(11), 1579–1591. https://doi.org/10.1586/ern.11.155.

Keha, E. ve Küfrevioğlu Ö. (2007). Biyokimya, *Aktif Yayınevi*, 5.

Kelly, J. (1999). Alzheimer's disease: the tacrine legacy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(3), 127–129. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01344-9.

Kinney, J.W., Bemiller, S.M., Murtishaw, A.S., Leisgang, A.M., Salazar, A.M., & Lamb, B.T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 4, 575–590. https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014.

Kishi, T., Matsunaga, S., Oya, K., Nomura, I., Ikuta, T., & Iwata, N. (2017). Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(2), 401–425. https://doi.org/10.3233/JAD-170424.

Kumar, K., Kumar, A., Keegan, R. M., & Deshmukh, R. (2018). Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 297–307. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.053.

Kutty, K.M., Jocob, J.C., Hutton, C.J., Davis, P.J., Peterson, S.C. (1975). Serum beta-lipoproteins: studies in a patient and in guinea pigs after the ingestion of organophosphorus compounds, *Clinical Biochemistry*, 8(6), 379-383.

Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *J Am Chem Soc*, 56, 658–666. https://doi.org/10.1021/ja01318a036.

Lippens, G., Sillen, A., Landrieu, I., Amniai, L., Sibille, N., Barbier, P., ... & Wieruszeski, J.-M. (2007). Tau Aggregation in Alzheimer's Disease. *Prion*, 1(1), 21–25. https://doi.org/10.4161/pri.1.1.4055.

Lockridge, O., Masson, P.J.N. (2000). Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*, 21(1-2), 113-126.

Massoulie, J., Pezzement, S., Bon, S., Krejci, E. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases, *Progress in Neurobiology*, 41(1), 31–91.

Mohan, C., Lang, K., Mutneja, M. (2014). An Introduction to Inhibitors and Their Biological Applications (1st ed.). USA: EMD Millipore.

Moini, J. (2019). Chapter 2: Chemical Basics of Life. *Anatomy and Physiology for Health Professionals,* Sayfa: 46-47.

Ofek, K., Soreq, H. (2013). Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. *Chemico-biological interactions*, 203(1), 113-119.

Oropesa, A.L., Gravato, C., Sánchez, S., Soler, F. (2013). Characterization of plasma cholinesterase from the white stork (Ciconia ciconia) and its in vitro inhibition by anticholinesterase pesticides, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97, 131-138.

Patel, O. P. S., Jesumoroti, O. J., Legoabe, L. J., & Beteck, R. M. (2021). Metronidazole-conjugates: A comprehensive review of recent developments towards synthesis and medicinal perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 210, 112994. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112994.

Pesaresi, A., Lamba, D., Vezenkov, L., Tsekova, D., & Lozanov, V. (2022). Kinetic and structural studies on the inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by a series of multitargetdirected galantamine-peptide derivatives. *Chemico-Biological Interactions*, 365, 110092. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110092.

Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers Olomouc,* 155(3), 219-229.

Qin, Y.-J., Wang, P.-F., Makawana, J. A., Wang, Z.-C., Wang, Z.-N., Yan-Gu, & Jiang, A.-Q. (2014). Design, synthesis and biological evaluation of metronidazole–thiazole derivatives as antibacterial inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(22), 5279–5283. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.054.

Rocha-Garduño, G., Hernández-Martínez, N. A., Colín-Lozano, B., Estrada-Soto, S., Hernández-Núñez, E., Prieto-Martínez, F. D., ... & Navarrete-Vázquez, G. (2020). Metronidazole and Secnidazole Carbamates: Synthesis, Antiprotozoal Activity, and Molecular Dynamics Studies. *Molecules*, 25(4), 793. https://doi.org/10.3390/molecules25040793.

Saxena, A., Redman, A.M., Jiang, X., Lockridge, O., Doctor, B. (1997). Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36(48), 14642-14651.

Shirinzadeh, H., Dilek, E., Alım, Z. (2022). Evaluation of Naphthalenylmethylen Hydrazine Derivatives as Potent Inhibitors on Antiatherogenic Enzymes, Paraoxonase I and Acetylcholinesterase Activities. *ChemistrySelect*, 7. https://doi.org/10.1002/slct.202104489.

Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., Silakari, O., Singh, D. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors As Alzheimer Therapy: From Nerve Toxins To Neuroprotection. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Sayfa: 165-188.

Sussman, J. L. (1991). Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology, 7.

Taha, M., Rahim, F., Uddin, N., Khan, I. U., Iqbal, N., Anouar, E. H., Salahuddin, M., Farooq, R. K., Gollapalli, M., Khan, K. M., & Zafar, A. (2021). Exploring indole-based-thiadiazole derivatives as potent acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzyme inhibitors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 1025–1036. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.065.

Ullah, H., Jabeen, M., Rahim, F., Hussain, A., Khan, F., Perviaz, M., ... & Nabi, M. (2023). Synthesis, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory potential and molecular docking study of thiazole bearing thiourea analogues. *Chemical Data Collections*, 44, 100988. https://doi.org/10.1016/j.cdc.2022.100988.

Ullah, H., Rahim, F., Zada, H., Hayat, S., Khan, F., Khan, M. S., ... & Khan, M. U. (2023). Synthesis, molecular docking, and bioactivity study of isoquinoline-sulfonamide hybrid analogues: A promising acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitor candidate. *Chemical Data Collections*, 46, 101048. https://doi.org/10.1016/j.cdc.2023.101048.

Yang, S., Yang, X., Zhu, S., Wang, M., Wang, X. (2012). Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 1.

Yong, J., Lu, C., & Wu, X. (2016). Synthesis of Metronidazole Derivatives Containing Pyridine Ring and Anticancer Activity. *Letters in Organic Chemistry*, 13(4), 283–288. https://doi.org/10.2174/1570178613041604131202220.

Zhao, X. J., Gong, D. M., Jiang, Y. R., Guo, D., Zhu, Y., & Deng, Y. C. (2017). Multipotent AChE and BACE-1 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Design,

synthesis and bio-analysis of 7-amino-1, 4-dihydro-2H-isoquilin-3-one derivates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 138, 738–747.

Zilbeyaz, K., Stellenboom, N., Guney, M., Oztekin, A., Senturk, M. (2018). Effects of aryl methanesulfonate derivatives on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32.

Zivkovic, A.R., Decker, S.O., Zirnstein, A.C., Sigl, A., Schmidt, K., Weigand, M.A vd. (2018). A sustained reduction in serum cholinesterase enzyme activity predicts patient outcome following sepsis. *Mediators of Inflammation*.

Zubenko, G., Marquis, J., Volicer, L., Direnfeld, L., Langlais, L., Nixon, P., Zubenko, R. (1986). Cerebrospinal fluid levels of angiotensin-converting enzyme, acetylcholinesterase, and dopamine metabolites in dementia associated with Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a correlative study. *Biological Psychiatry*, 21(14), 1365-1381.

Żurek, E., Szymański, P., & Mikiciuk-Olasik, E. (2013). Synthesis and biological activity of new donepezil-hydrazinonicotinamide hybrids. *Drug research*, 63(3), 137–144.

ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Tunceli/Merkez'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Tunceli Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda, lise eğitimini ise Tunceli Fen Lisesi'nde tamamladı. 2018 yılında Eskişehir Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden mezun oldu. 2019 yılının ilk çeyreğinde Elazığ Medicalpark Hastanesi'nde mesul müdür olarak çalıştı, ardından Tunceli Devlet Hastanesi'ne atandı. İller arası tayin ile İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne, daha sonra ise il içi tayin ile İzmir Bayraklı Şehir Hastanesi'ne geçti. Halen İzmir Bayraklı Şehir Hastanesi'nde eczacı olarak görev yapmaktadır.