



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**YENİ FTALOSİYANİN BİLEŞİKLERİNİN
ALZHEIMER HASTALIĞI ÜZERİNDE
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Didem AKKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Arzu ÖZEL

TRABZON-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Didem AKKAYA

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, aramızdan erken ayrılan teyzelerime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimde ilk olarak akademik tecrübelerini ve desteğini esirgemeyen, bana hep iyilikle yaklaşan hem akademik hem de hayat yolculuğumda zorlandığım noktalarda yardımını esirgemeyen çok sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ÖZEL'e;

Tezimin ilerleyişinde ve akademik hayatımın gelişiminde desteklerini esirgemeyen bu hayatta ikinci bir abim olan Sayın Doç. Dr. Burak BARUT'a; lisansüstü eğitim dönemimde ve mesleki yaşantımda şahsıma engin faydaları olan Biyokimya Ana Bilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma;

Bu tez kapsamında çalışma imkânı bulduğum Prof. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU, Doç. Dr. Suat SARI ve Dr. Öğr. Üyesi Rengin REİS'e;

Akademik zorlu basamaklarında birbirimize destek olarak ilerlediğim canım arkadaşlarım Arş. Gör. Gökçe SEYHAN ve Arş. Gör. Elif ŞİŞMAN'a;

Son olarak yürüdüğüm bu yolda desteklerini esirgemeyen, hayallerimin peşinden giderken bir kere bile şüphe duymayan canım aileme çok teşekkür ediyorum.

Bu uzun süreçte aramızdan ayrılan canım teyzelerime de buradan çok teşekkür ederim. Gönül isterdi ki bu uzun sürecin sonunu kutlayıp yeni maceralara adım atabilelim ama maalesef kaderin de planları olduğunu unutmuşuz.

Aileme layık bir evlat olabildiysem ne mutlu bana...

Arş. Gör. Didem AKKAYA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMA, SİMGE VE FORMÜLLER DİZİNİ	xi
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı	3
2.2. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi	4
2.2.1. Amiloid Beta Hipotezi	4
2.2.2. Tau Hipotezi	6
2.2.3. Oksidatif Stres Hipotezi	7
2.2.4. Kolinergik Hipotez	9
2.2.4.1. Kolinesterazlar	11
2.2.4.1.1. Asetilkolinesteraz	11
2.2.4.1.2. Bütirilkolinesteraz	12
2.3. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan İlaç Molekülleri	13
2.4. Ftalosiyeninler	16
2.5. Literatür Örnekleri	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Gereç	24
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	24
3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	24
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Bileşikler	25
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler	27

3.2. Yöntem	30
3.2.1. Kolinesteraz Enzimleri Moleküler Modelleme Çalışması	30
3.2.2. Kolinesteraz İnhibisyon Çalışmaları	30
3.2.3. Kolinesteraz Kinetik Çalışmaları	31
3.2.4. DNA Nükleaz Çalışmaları	32
3.2.4.1. Bileşiklerin Hidrolitik Nükleaz Aktivitesi	32
3.2.4.2. Bileşiklerin Oksidatif Nükleaz Aktivitesi	33
3.2.5. Hücre Kültürü	33
3.2.5.1. MTT Hücre Canlılık Testi	33
3.2.6. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. Kolinesteraz Enzimleri Moleküler Kenetleme Çalışması	35
4.1.1. İlaç Benzerliği ve Farmakokinetik Değerlendirmesi	35
4.1.2. Kolinesteraz Enzimleri ile Moleküler Yerleştirme	37
4.2. Bileşiklerin <i>in vitro</i> Kolinesteraz İnhibisyonu	38
4.3. Bileşiklerin Kinetik Çalışmaları	40
4.4. Bileşiklerin Nükleaz Aktivitesi	45
4.4.1. Bileşiklerin Hidrolitik Nükleaz Aktivitesi	45
4.4.2. Bileşiklerin Oksidatif Nükleaz Aktivitesi	46
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	47
4.5.1. <i>In vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
6. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar	24
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	25
Tablo 3. Bileşiklere ait bilgiler	26
Tablo 4. DE-C6-CN bileşiğinin ilaç benzerliği için hesaplanmış tanımlayıcıları	36
Tablo 5. DE-C6-CN bileşiğinin AChE ve BuChE için yerleştirme skorları ve ΔG değerleri	37
Tablo 6. Bileşiklerin AChE ve BuChE üzerinde inhibisyon çalışmaları	39
Tablo 7. Bileşiklerin AChE ve BuChE üzerinde selektif indeksleri	39
Tablo 8. Bileşiklerin AChE enzimine karşı kinetik parametreleri	40
Tablo 9. Bileşiklerin BuChE enzimine karşı kinetik parametreleri	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Amiloidojenik yol	5
Şekil 2. A β proteinlerinin AH'de oluşumu	6
Şekil 3. Tau proteininin hiperfosforilasyonu ve AH oluşumu	7
Şekil 4. Kolinergik sinir iletimi	10
Şekil 5. Donepezil yapısı	14
Şekil 6. Rivastigmin yapısı	14
Şekil 7. Galantamin yapısı	15
Şekil 8. Takrin yapısı	16
Şekil 9. Ftalosiyanın yapısı	16
Şekil 10. Metalloftalosiyanın türevleri (2-6)	17
Şekil 11. Furan-2-il-metoksi sübtitüe metaloftalosiyanın bileşikleri	18
Şekil 12. Ftalosiyanın Cu (II), Co (II) ve sitozin türevi içeren metillenmiş türevleri	19
Şekil 13. Tetra-kalkon sübtitüe metalsız ve metalli ftalosiyanınlar	19
Şekil 14. 4-{2-(2-tiyenil)etoksi} ftalosiyanın 4, 5, 6 ve 7 bileşikleri	20
Şekil 15. Ni (II), Zn (II), Co (II) ve Cu (II) içeren tetra-kalkon sübtitüe metaloftalosiyanın bileşikleri	20
Şekil 16. 1-metil-1H-imidazol-2-tiyol sübtitüent içeren metalsız, Zn (II) ve Ga (III) ftalosiyanınlar	21
Şekil 17. (4-izopropilbenzil)oksi sübtitüe ftalosiyanın bileşikleri	21
Şekil 18. Periferik tetra-({6-[3-(dietilamino)fenoksi]heksil}oksi sübtitüe Co (II), Cu (II), Mn (III) ftalosiyanın bileşikleri	22
Şekil 19. Metalsız, Cu (II) ve Ni (II) ftalosiyanın bileşikleri	23
Şekil 20. DE-C6-Zn ve DE-C6-Ni bileşiklerinin sentezi	26
Şekil 21. DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin sentezi	27
Şekil 22. DE-C6-CN bileşiği için SwissADME portalı tarafından oluşturulan ilaç benzerliği grafiği	35
Şekil 23. DE-C6-CN bileşiğinin AChE (A ve B) ve BuChE (C ve D) ile moleküler yerleştirme ile tahmin edilen bağlanma etkileşimleri	38

Şekil 24.	DE-C6-ZnQ bileşiğinin AChE inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği	41
Şekil 25.	DE-C6-ZnQ bileşiğinin BuChE inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği	41
Şekil 26.	DE-C6-NiQ bileşiğinin AChE inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği	42
Şekil 27.	DE-C6-NiQ bileşiğinin BuChE inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği	42
Şekil 28.	DE-C6-ZnQ bileşiğinin AChE inhibisyonunun Dixon grafiği	43
Şekil 29.	DE-C6-ZnQ bileşiğinin BuChE inhibisyonunun Dixon grafiği	43
Şekil 30.	DE-C6-NiQ bileşiğinin AChE inhibisyonunun Dixon grafiği	44
Şekil 31.	DE-C6-NiQ bileşiğinin BuChE inhibisyonunun Dixon grafiği	44
Şekil 32.	Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi	46
Şekil 33.	Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA oksidatif nükleaz aktivitesi	47
Şekil 34.	DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin SH-SY5Y hücre hattındaki sitotoksosite profili	48

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

Aβ	Amiloid Beta
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AH	Alzheimer Hastalığı
AICD	Amiloid Öncü Proteini Hücre İçi Alanı
AMPK	AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz
Asetil-KoA	Asetil-Koenzim A
APP	Amiloid Öncü Proteini
APPsα	Çözünür Amiloid Öncü Protein Alfa
APPsβ	Çözünür Amiloid Öncü Protein Beta
αCTF	α -Sekretaz ile Parçalanmış APP C-Terminal Ürünü
BCh	Bütirilkolin
BuChE	Bütirilkolinesteraz
βCTF	β -Sekretaz ile Parçalanmış APP C-Terminal Ürünü
CaMK	Ca ²⁺ / Kalmodulin Bağımlı Kinaz
CDK-5	Sikline Bağımlı Kinaz-5
ChAT	Kolin Asetil Transferaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit)
Dyrk 1A	Çift Özgüllü Tirozin-Fosforilasyonla Düzenlenen Kinaz 1A
EB	Etidyum Bromür
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ERK 1/2	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Protein Kinazlar 1 ve 2
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GSK-3β	Glikojen Sentaz Kinaz-3 β
JNK	Janus Kinaz
KBB	Kan Beyin Bariyeri

MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MARK	Mikrotübül Affinitesini Düzenleyen Kinaz
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-difenil tetrazolyum bromür
NACHR	Nikotinik Asetilkolin Reseptörü
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
p3	p3 Peptidi
PAS	Periferal Anyonik Bölge
PBS	Fosfat Tampon Sistemi
PKA	Protein Kinaz-A
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SFK	Src Ailesi Reseptör Olmayan Tirozin Kinaz
SH-SY5Y	İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TBS	Tris-HCl Tamponu
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör-alfa
TPKI	Tau Protein Kinaz-I
UV-Vis	Ultraviyole Visible
Simgeler	
α	Alfa
Å	Angström
β	Beta
γ	Gama
g	Gram
IC₅₀	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
κ	Kappa
K_i	İnhibisyon Sabiti
K_m	Michaelis Sabiti
M	Molar
mg	Miligram
mM	Milimolar
μL	Mikrolitre

μM	Mikromolar
V_{max}	Maksimal Hız
V_0	İlk hız

Formüller

H_2O	Su
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
O_2	Oksijen
OH^-	Hidroksil İyonu
$^1\text{O}_2$	Singlet Oksijen
O_2^-	Süperoksit Anyonu
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	Çinko (II) Asetat
NiCl_2	Nikel (II) Klorür

ÖZET

Yeni Ftalosiyanin Bileşiklerinin Alzheimer Hastalığı Üzerinde Etkinliklerinin İncelenmesi

Bu çalışmada suda çözünebilen periferal tetra-({6-[3-(dietilamonyum)fenoksi]heksil}oksi substitüe çinko ve nikel ftalosiyanin (DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ) bileşiklerinin Alzheimer hastalığına karşı ilaç olma potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda bileşiklerin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonları ve kinetikleri UV-Vis spektrofotometri ile belirlenmiştir. Bileşiklerin plazmid pBR322 DNA nükleaz özellikleri agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca bileşiklerin kolinesteraz enzimlerine karşı inhibisyonuna ait moleküler kenetleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin insan nöroblastoma hücre hattına (SH-SY5Y) karşı sitotoksik etkinlikleri [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür] (MTT) hücre canlılığı testi kullanılarak incelenmiştir. Moleküler kenetleme sonuçlarına göre DE-C6-CN ve AChE arasında BuChE'den daha güçlü bir afinite olduğu bulunmuştur. DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ, standart olarak kullanılan galantaminden daha yüksek inhibisyon etkilerine sahip ve her iki bileşik de Lineweaver-Burk grafiklerine göre AChE ve BuChE üzerinde yarışmalı inhibisyon göstermişlerdir. DE-C6-NiQ, SH-SY5Y hücrelerinde DE-C6-ZnQ'dan daha güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar, DE-C6-ZnQ'nun Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, Ftalosiyanin

ABSTRACT

Investigation of the Effects of New Phthalocyanine Compounds on Alzheimer's Disease

In this study, the aim was to investigate the potential of water-soluble peripheral tetra-({6-[3-(diethylammonium)phenoxy]hexyl}oxy substituted zinc and nickel phthalocyanine (DE-C6-ZnQ and DE-C6-NiQ) compounds as drugs against Alzheimer's disease. In this context, the inhibitions and kinetics of the compounds on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes were determined using UV-Vis spectrophotometry. The plasmid pBR322 DNA nuclease properties of the compounds were investigated using agarose gel electrophoresis. Molecular docking studies on the inhibition of cholinesterase enzymes by the compounds were also conducted. The cytotoxic activities of the compounds against the human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) were examined using the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) cell viability test. According to the molecular docking results, it was found that DE-C6-CN had a stronger affinity with AChE than BuChE. DE-C6-ZnQ and DE-C6-NiQ exhibited higher inhibitory effects compared to the standard galantamine, and both compounds showed competitive inhibition on AChE and BuChE according to Lineweaver-Burk plots. DE-C6-NiQ was found to have a stronger cytotoxic effect on SH-SY5Y cells compared to DE-C6-ZnQ. All these results indicate the potential of DE-C6-ZnQ in the treatment of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's Disease, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Phthalocyanine

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Demansın en yaygın türü olan Alzheimer hastalığı (AH), genetik faktörler ve yaşla yakından ilişkili, çok yüksek ölüm oranına sahip, ilerleyici ve yaygın olarak teşhis edilen nörodejeneratif bir hastalıktır (1). Yaşlılar arasında sıklıkla görülen demansın başlıca nedeni olan AH, epizodik bellekte geri dönüşü olmayan bir düşüşle başlar ve daha sonra genel bilişsel yeteneklerde kayıplara neden olur (2, 3). AH, kademeli davranış bozuklukları ile karakterize edilmektedir (4, 5). 65 yaş üstü insanların yaklaşık %12'si bu hastalıktan etkilenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünya çapında 48.6 milyondan fazla insanın bu hastalıkla yaşadığını tahmin etmektedir (6). Küresel olarak yaşlanan nüfusun sayısının artması, kronik dejeneratif hastalıkların, merkezi sinir sistemi hasarının ve AH gibi demansın görülme sıklığını artırmaktadır (7).

AH'nin patolojik özellikleri temel olarak serebral korteks ve hipokampüste çok sayıda senil plak birikimi, belirli beyin bölgelerinde işleyen nöronların ve sinapsların kaybı ve asetilkolin (ACh) eksikliği ile karakterizedir. Başlıca klinik belirtiler, davranış bozuklukları ve çeşitli nörolojik hastalıkların semptomlarının eşlik ettiği ilerleyici hafıza kaybı ve bilişsel gerilemedir. Günümüzde, AH için kolinerjik hipotez, amiloid beta (A β) birikimi hipotezi, tau proteini hipotezi ve oksidatif stres hipotezi gibi birçok hipotez vardır, ancak AH'nin kesin patogenezi hala belirsizliğini korumaktadır. AH, dünya çapında 50 milyon demans vakasının %60–70'ini oluşturmakta, bilişsel gerileme ile karakterize edilmekte ve uzun zamandır kolinerjik sistemin düzensizliği ile de ilişkilendirilmektedir (8, 9).

Kolinerjik hipotez, AH patogenezinde önemli olan ve hastalığın patogenezinine ilişkin en eski teoridir. ACh öğrenme, hafıza ve diğer yüksek davranışlarda rol oynayan önemli bir uyarıcı nörotransmitterdir. ACh seviyesi, ACh sentezini ve salınımını düzenleyen merkezi kolinerjik sinir sistemi tarafından etkilenebilir (10). Temel ön beyin kolinerjik nöronları öğrenme, hafıza ve bilişsel işlevde önemli olup (11), hafıza ve öğrenmeyle ilgili kortikal ve hipokampal alanlara hakimdirler. Ayrıca, hayatta kalmaları ve farklılaşmaları sinir büyüme faktörüne bağlıdır (12). Hipokampus, nikotinik asetilkolin reseptörleri (NACHR) bakımından zengin bir beyin bölgesidir (13). AH hastalarında her zaman derin ve erken bazal ön beyin kolinerjik nöronlarında dejenerasyon vardır. Demansın derecesi, bazal ön beyin ile hipokampus ve korteksin hedef dokuları arasındaki sinaptik kayıpla ilişkilidir ve bu da bellek azalmasının ana nedeni olarak kabul edilir (14). Son yıllardaki verilere göre, Alzheimer

hastalarının beyinlerinde ciddi nörodejenerasyon, kolinerjik nöronların azalması ve ciddi ACh eksikliği görülmektedir. Ayrıca kolin asetiltransferaz (ChAT) aktivitesi de önemli ölçüde azalmıştır. Bu veriler AH'nin patogeneğinde rol oynayan kolinerjik sistemdeki hasarın ciddiyetini daha da gözler önüne koymaktadır (15).

Bu nedenle, kolinerjik sistemi restore etmek şu anda AH tedavisi için klinik bir terapidir. Asetilkolinesteraz (AChE), A β üretimi sürecinde önemli bir enzim olan sekretaza doğrudan bağlanır ve ekspresyonunu artırır. Böylece bilişsel işlev bozukluğunu hızlandıran A β seviyesini artmış olur (16, 17). Ek olarak, anormal merkezi kolinerjik değişiklikler tau proteininin anormal fosforilasyonunu, sinir hücresi iltihabını, hücre apoptozunu, nörotransmitter ve nörohormon sistemi dengesizliğini ve diğer patolojik olayları da indükleyebilir, ancak etki mekanizması hala belirsizdir. AH sadece hastaların yaşam ve zihinsel kalitesinde ciddi ve geri dönüşü olmayan hasara neden olmakla kalmaz, aynı zamanda aileleri ve toplum üzerindeki ekonomik ve tıbbi yükü de artırmaktadır. AH tedavisi için yeni ilaç arayışı devam etmektedir (18).

Ftalosiyanimler, en bilinen sentetik porfirin analoglarıdır. Bu makrosiklikler, fotovoltajik hücreler, kimyasal sensörler, elektrokromik malzemeler, sıvı kristaller ve fotodinamik kanser tedavisi gibi birçok yüksek teknoloji uygulaması için yaygın olarak çalışılan bileşiklerdir. Son yıllarda, ftalosiyanimlerin enzim inhibitörü olarak kullanımı özellikle dikkat çekmektedir (19).

Bu tez çalışması kapsamında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU ve ekibi tarafından sentezlenen suda çözünebilir periferik tetra-({6-[3-(dietilamonyum)fenoksi]heksil}oksi substitüe çinko ve nikel ftalosiyanim (DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ) bileşiklerinin AH'nin tedavisinde kullanılmak üzere uygun bir kolinesteraz inhibitörü olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak bileşiklerin sentezlendiği ligandın kolinesteraz enzimlerine karşı moleküler kenetleme çalışması yapılmıştır. Daha sonra bileşiklerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkinlikleri spektrofotometrik yöntemlerle incelenmiştir. Daha sonra bu bileşiklerin DNA nükleaz aktiviteleri agaroz jel elektroforez yöntemleri ile belirlenmiştir. Ayrıca, ftalosiyanim türevi bileşiklerin insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) üzerindeki olası sitotoksik etkileri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromür (MTT) hücre canlılık testi ile incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı (AH), ilk olarak 1906 yılında Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmış yükü ağır nörodejeneratif bir bozukluktur (20). AH, şu anda dünya genelinde 50 milyon insanı etkileyen ve dünya yaşlı nüfusunun %5'ini oluşturan demansın en yaygın nedenidir. Bu sayının, 2050 yılına kadar daha da artabileceği öngörülmektedir (21).

Klinisyenler ve araştırmacılar, bu hastalığın patogenezi üzerinde uzun süredir araştırma yapmaktadır. Beyindeki hücresel ve moleküler patolojinin değişimi, klinik belirtilerden çok daha önce başlamış olabilir (22). AH net bir şekilde Amiloid beta (A β) birikimi ve nörofibriler tau demetlerinin belirgin hale geldiği durumda teşhis edilebilmekte ve hastalığın ilerlemesini engellemek için yeterli süre kalmamaktadır. Bu sebeple AH'yi biyobelirteçlerle tanımlamak ve ilerlemesini önleyebilmek için yeterince erken teşhis etmek son derece zordur. AH genellikle bilişsel değerlendirmeler yoluyla teşhis edilmektedir (23). AH teşhisi konulduğunda mevcut olan başlıca belirtiler hafıza kaybı, karışıklık ve düşünme ile iletişimde zorluklardır. Hastalık ilerledikçe, hastalar anksiyete, ajitasyon veya sanrılar gibi kişilik ve davranış değişiklikleri yaşayabilmektedir (24).

AH'nin iki ana türü vardır. Birincisi, 65 yaşından önce demans belirtileri başladığında ve bir AH teşhisi alındığında meydana gelen erken başlangıçlı AH'dir. Dünya genelinde erken başlangıçlı AH vakaların %5–10'unu oluşturur (21). Erken başlangıçlı AH'nin ana nedeni, belirli genlerdeki mutasyonların ailevi kalıtım aracılığıyla kolaylaştırdığı genetik yatkınlıktır. Buna karşılık, geç başlangıçlı veya sporadik AH, vakaların çoğunluğunu oluşturur, ancak bu AH türünün nedenleri daha az tanımlanmış ve çok faktörlüdür. Sporadik AH'nin gelişimine katkıda bulunan risk faktörlerinin çokluğu ve karmaşıklığı, araştırmacılar ve klinisyenler için bir bulmaca oluşturmakta ve etkili tedaviye bir engel oluşturmaktadır (24).

Ancak bu belirtiler ile AH'de gözlenen bilişsel bozukluklar arasındaki mekanistik bağlantı hala iyi anlaşılmamıştır. Biriken kanıtlar, nöronal sinapsların kaybının AH patogenezinin erken evresinde meydana geldiğini ve bilişsel gerileme ile ilişkilendirildiğini öne sürmektedir (20). Ayrıca, son araştırmalar A β ve tau proteininin nöronal sinapslarda etkili olduğunu ve hastalık ilerledikçe patolojik rollerini oynadıklarını öne sürmektedir (25, 26).

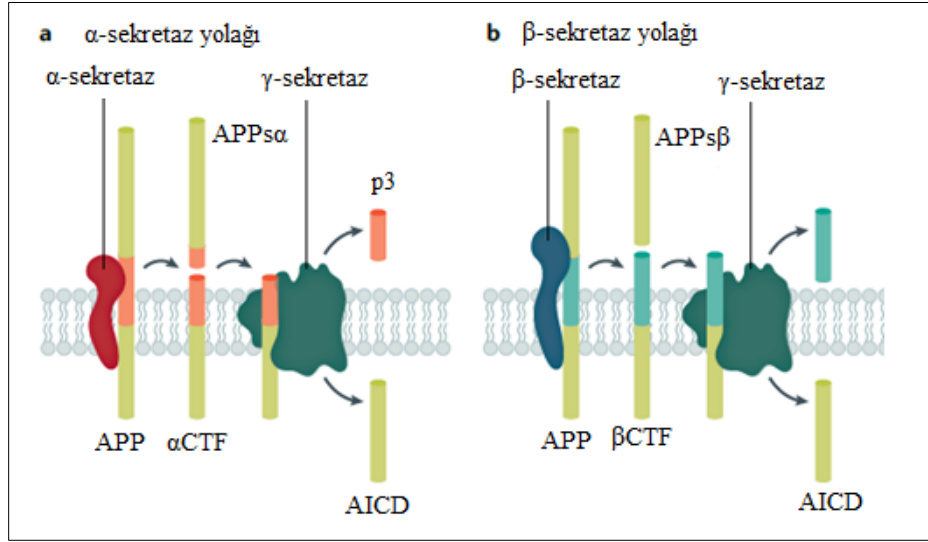
2.2. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi

2.2.1. Amiloid Beta Hipotezi

Bu hipotezde AH'ye sebep olan durum toksik A β 'nın merkezi sinir sisteminde birikmesidir. Sinir hücreleri diğer hücre tiplerine göre daha fazla A β üretir ve bu da hücreler arası sinyalleşme gibi merkezi sinir sisteminin normal fizyolojik faaliyetlerinde önemli rol oynar (27, 31).

A β 40–42 amino asitten oluşan kısa bir peptittir, A β 'nin öncüsü amiloid öncü proteindir (APP). Bu öncü protein nöronal sinapslarda yoğunlaşan ve beyinde yüksek oranda eksprese edilen tek geçişli bir transmembran proteindir. APP A β ile karşılaştırıldığında daha büyük bir öncü moleküldür. APP'nin fizyolojik işlevleri belirsizliğini korusa da beyin gelişimi, hafıza ve sinaptik plastisitede önemli bir rol oynamaktadır (28, 29). Sadece nöronları korumakla kalmaz, aynı zamanda hücreler arası etkileşimleri modüle ederek nöronların büyümesini ve sinaptik plastisiteyi düzenler (30). APP'deki mutasyonların, senil plaklar oluşturan ve periferik nöronlarda dejeneratif değişikliklere neden olan A β sentezinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (31).

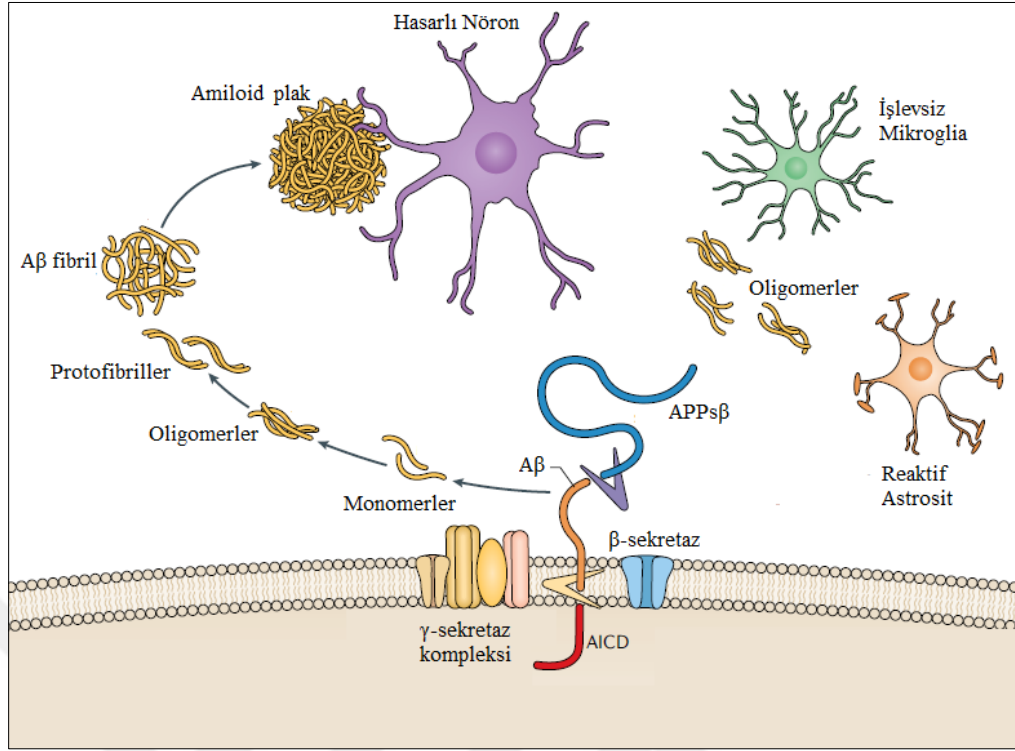
A β peptidleri, APP'nin amiloidojenik yol olarak da bilinen β -sekretazlar ve γ -sekretazlar tarafından bölünmesi sonucu üretilir. En bol bulunan A β türleri 27–43 amino asit uzunluğundadır. A β üretildikten sonra bir monomer olarak hücre dışı boşluğa salgılanır. Dizilimi nedeniyle, A β (özellikle A β 42) konsantrasyona bağlı bir şekilde meydana gelen yüksek bir agregatlaşma eğilimine sahiptir. A β 'ye ek olarak, amiloidojenik yolda çözünür amiloid öncü protein beta (APPs β), β -sekretaz ile parçalanmış APP C-terminal ürünü (β CTF) ve amiloid öncü proteini hücre içi alanı (AICD) gibi diğer moleküller de oluşur. APP'nin α -sekretaz tarafından parçalanması çözünür amiloid öncü protein alfa (APPs α) ve α -sekretaz ile parçalanmış APP C-terminal ürünü (α CTF) oluşturur ve A β oluşumunu önler; α CTF daha sonra γ -sekretaz tarafından p3 peptidi (p3) ve AICD'ye parçalanır (Şekil 1). Tüm hücreler A β üretmesine rağmen, sinaptik aktivite gösteren hücrelerde yüksek seviyelerde üretilir ve üretimi ve salınımı sinaptik aktivite tarafından düzenlenir (32).



Şekil 1. Amiloidojenik yol (Knopman'dan, 32)

Vücudun kronik strese verdiği yanıt, nöronal protein sentezi oranını artırır ve bu da fosfat gibi yan ürünlerin birikmesine yol açar. Protein sentez bölgesindeki yüksek fosfat konsantrasyonları APP'nin fosforilasyonunu teşvik edebilir. Dahası, β-sekretaz APP'nin fosforilasyonu işlemine katılır ve bu da daha fazla Aβ birikimine yol açar. Bununla birlikte, vücutta Aβ konsantrasyonunu stabilize eden süreç belirli koşullar altında kontrolden çıkabilir. Örneğin, doğal Aβ, fosforilasyon ve amiloid işleminden geçen ve Aβ konsantrasyonlarının artmasına yol açan ilave APP sentezini indükleyebilir. Bu arada, yüksek Aβ konsantrasyonları APP sentezini indükleyebilir ve periferik nöronlarda amiloidozu tetikleyebilir (31, 33).

Aβ peptitleri, kararlı bir ikincil yapı sergileyen yanlış katlanmış proteinlerdir. Ayrıca, Aβ'nın anormal birikimi beyinde nörotoksisiteye yol açar. Monomerik Aβ parçaları çözünabilir maddelerdir. Çözünmeyen oligomerler halinde toplanırlar ve daha sonra nörolojik plaklar oluştururlar. Bu durum da nöronları ve sinapsları olumsuz etkileyerek AH'nin oluşmasına sebebiyet verir (Şekil 2) (31, 33–34).



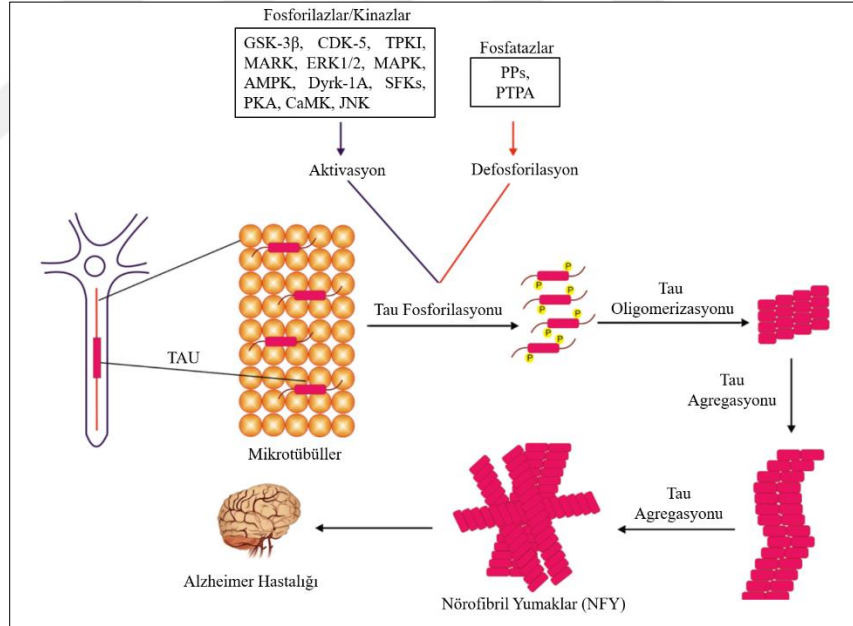
Şekil 2. Aβ proteinlerinin AH'de oluşumu (Panza'dan, 35)

2.2.2. Tau Hipotezi

Tau normalde akson sitoplazmasında bulunan mikrotübül ile ilişkili bir proteindir. Ancak aynı zamanda hem presinaptik hem de postsinaptik kompartmanlarda bulunur ve nükleer membranla ilişkilidir (36–38). Tau'nun ana işlevi hücre bütünlüğünün sürdürülmesinde temel faktörlerden biri olan mikrotübülleri stabilize etmektir ve bunu da bir tür tübülün bileşimini teşvik ederek yapar (37–39). Tau sinaptik aktivite ile hücre dışı boşluğa salınır ve postsinaptik nöronlar ve glia tarafından alınan bir moleküldür (32).

Tau, post translasyonel modifikasyonlara ve agregasyona yatkın hale gelebilir. Bu olduğunda, hücre gövdelerinde ve dendritlerde hiperfosforile bir formda birikir. Tau-tau etkileşimlerinin ve hiperfosforilasyonunun AH'deki rolünü tanımlamak için çeşitli moleküller incelenmiştir (40). Mikroglial hücreler ve astrositlerde bulunan, sinyalizasyonu sağlayan çok sayıda faktörün bu durumla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (41). Bu faktörler NF-kB salınımına ve TNF-α ve interlökinler gibi pro-inflamatuar aracılardan aşırı üretimine yol açarak beyin hücrelerinde inflamatuara ve nörotik hasara neden olmaktadır. İnflamatuar aracılardan aşırı ekspresyonu da mitojenle aktive olan protein kinazın (MAPK) aktivasyonuna yol açmakta, bu da sikline bağımlı kinaz-5'i (CDK-5) aktive etmektedir. Bu

kinazların aktivasyonu nihayetinde tau fosforilasyonuna yol açmaktadır. Bu bulgular, kinazların aşırı aktivasyonunun ve fosfatazların inaktivasyonunun tau hiperfosforilasyonunun indüklenmesine yol açacağını göstermiştir. Bu nedenle, glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) gibi kinazlar, CDK-5, tau protein kinaz-I (TPKI), mikrotübül afinitesini düzenleyen kinaz (MARK), hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinazlar 1 ve 2 (ERK1/2), MAPK, AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), çift özgülüklü tirozin-fosforilasyonla düzenlenen kinaz-1 A (Dyrk1A), Src ailesi reseptör olmayan tirozin kinaz (SFK'lar), protein kinaz-A (PKA), Ca²⁺/kalmodulin bağımlı kinaz (CaMK) ve Janus kinaz (JNK) tau hiperfosforilasyonundan sorumludur (Şekil 3). AH'de tau proteinleri hiperfosforile olarak çözünmeyen hücre içi nörofibriler yumaklara dönüşür ve beyin hücrelerinin mikrotübüllerine bağlanma ihtimali azalır. Bu hiperfosforile formlar birbirlerine bağlanarak, nöronal plastisiteyi bozan ve nörodejenerasyona neden olan nörofibril yumaklar adı verilen düğümler oluşturur (42).



Şekil 3. Tau proteinin hiperfosforilasyonu ve AH oluşumu (Sharma'dan, 42)

2.2.3. Oksidatif Stres Hipotezi

Beyin, yüksek düzeyde oksijen tüketir; ancak düşük düzeyde antioksidana sahiptir. Bu durum, beyni oksidatif strese karşı daha savunmasız hale getirir. Oksidatif stres, vücuttaki pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengesizliğin bir sonucudur (43).

Beyin sistemi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hasara karşı bir savunma olarak antioksidan faktörleri kullanır (44). ROS, temel olarak mitokondriyal elektron taşıma zincirinden, metal değerliğindeki değişikliklerden ve enzimatik reaksiyon süreçlerinden (ör. MAO-B, NADPH oksidaz) türetilen hidroksil iyonu (OH^-), süperoksit anyonu (O_2^-), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi türleri içerir. Normal fizyolojik koşullar altında, ROS sinyal yollarında ve transkripsiyon aktivasyonunda önemli bir rol oynar. Ancak, ROS sürekli olarak arttığında antioksidan aktiviteyi aşabilir, hücre biyolojik makromoleküllerine (fosfolipid tabaka, protein, nükleik asit) zarar verebilir, hücrenin normal işlevini bozabilir, mitokondriyi proapoptotik proteinler üretmesi için uyabilir ve nihayetinde merkezi sinir sisteminde nöronal apoptozu indükleyebilir (45).

Amiloid beta hipotezine göre, A β peptitleri güçlü sitotoksik etkilere sahiptir. A β peptitleri, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aktivitesini bozarak ekstrasellüler ROS oluşumuna ve nöronlara aşırı kalsiyum girişine neden olarak nihayetinde mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açar. Ayrıca, A β peptitlerinin birikimi A β lifleri ve ekstrasellüler senil plaklar oluşturur, bu da oksidatif strese neden olabilir ve hücre apoptozunu teşvik edebilir (46–47). Oksidatif stres, APP'nin modifikasyonunda ve ilgili sekretaz aktivitelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Oksidanlar ve oksidatif ürünler, oksidatif stres altında APP'nin ifadesini artırabilir, bu da A β 'nin birikmesine yol açabilir (48, 49, 52).

İntrasellüler nörofibril yumaklar, A β 'nin ikinci en belirgin patolojik özelliğidir ve hiperfosforlu tau içerirler. Tau'nun hiperfosforlanması, protein kinazlarının ve fosfatazların anormal aktivitesi tarafından başlıca nedenlerden biridir ve tau protein kinaz aktivasyonu ve fosfataz inhibisyonu tarafından düzenlenir (50). Oksidatif stres, tau fosforilasyonunu indükleyerek bu protein kinazlarını, özellikle GSK-3 β , doğrudan etkileyebilir. Oksidatif stres, tau fosforilasyonuna ve nörofibrilopatı oluşumuna katkıda bulunabilir. Patolojik koşullar altında, ROS'un normal fonksiyonu bozulur ve ardından CDK-5 ve GSK-3 β kinazları ile etkileşime girer, sonuçta hiperfosforilasyona uğrar. Daha sonra, mikrotübüllere bağlanma yeteneğini daha da bozar ve mikrotübüllerin depolimerizasyonunu hızlandırarak sinir sinyallerinin iletimini keser. Tau hiperfosforilasyonu patofizyolojisinde oksidatif stres, JNK aracılı apoptoz ve nöronal hücre döngü bozukluklarını beyinde indükleyebilir. Tau proteininin hiperfosforilasyonu, mikrotübül bozukluğu ve tau proteininin birikimi ROS üretimini teşvik edebilir (52, 53). Çalışmalar, fosforile tau oligomerlerinin nörotoksistekte

önemli faktörler olduğunu göstermiştir. Fosforile tau ayrıca peroksizom proteazomun taşınmasını engelleyebilir ve oksidatif stresin meydana gelmesini teşvik edebilir (52).

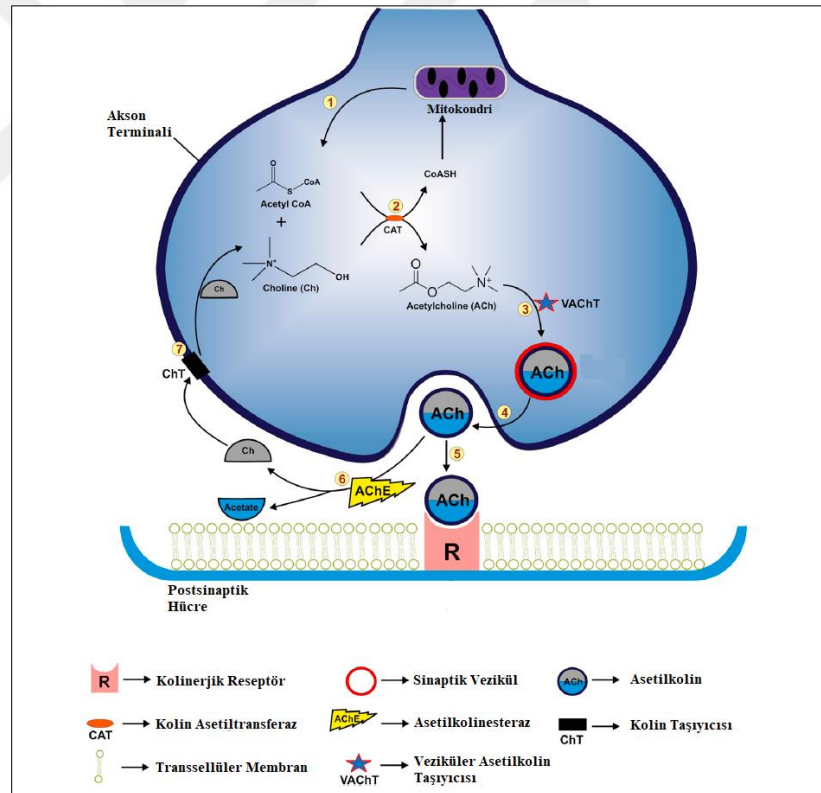
2.2.4. Kolinerjik Hipotez

AH'nin başlangıcı ve evrimiyle ilgili mekanizmalar arasında, üzerinde çok çalışılmış bir hipotez, AH patogeneziyle ilgili ilk teori olan kolinerjik hipotezdir. Genel olarak, AH taşıyıcılarının beyni, daha önce tanımlanan histopatolojik belirteçlere ek olarak, atrofi, sinaptik kayıp ve merkezi nörotransmisyonunda eksiklik gösterir. Bazal ön beyin nöronlarında genel bir dejenerasyon vardır. Hastalığın başlangıcında bazal çekirdekteki ve kortekste kolinerjik nöronlarda kayıp vardır, ancak AH'nin ileri evresinde bazal çekirdekteki kolinerjik nöronların %90'ından fazlası kaybolur (53). 1970'lerde beyindeki kolinerjik defisitlerin ACh sentezinden sorumlu olan ChAT enzimiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. ACh'nin bilişsel işlevdeki temel rolü nedeniyle, AH'nin kolinerjik hipotezi önerilmiştir. Beyinde ACh, hafıza, dikkat, duyuşsal bilgi, öğrenme ve diğer kritik işlevler gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alır. Kolinerjik nöronların dejenerasyonunun AH'de gerçekleştiği ve bilişsel işlevlerde değişime ve hafıza kaybına neden olduğu bulunmuştur. Beyinde bulunan ChAT; öğrenme, hafıza ve bilişsel işlevlerin nöromodülasyonunda önemli rolü olan bir nörotransmitter olan ACh'nin sentezinden sorumludur (54).

Kolinerjik sinir iletimi, ACh'nin sentezinde, depolanmasında, taşınmasında ve parçalanmasında rol oynayan proteinlere dayanır. Bu, kolinerjik nöronların sitoplazmasında kolin ve aktif asetatin yaklaşık %20'sinin sentezlendiği ve çoğunluğunun da terminal bölümlerde sentezlendiği bir süreçtir. Kolin nöronun dışından gelir (özellikle lesitin kaynaklı lipid parçalanmasından ve ACh hidrolizinden kaynaklanır) ve spesifik bir taşıma mekanizmasının müdahalesi ile akson terminali tarafından yakalanır. Asetil–koenzim A (asetil–KoA), mitokondride pirüvatın oksidasyonu ile oluşur. Kolinin asetil radikali ile esterleşmesi, yüksek konsantrasyonlarda kolinerjik sinir uçlarının sitoplazmasında bulunan çözünür bir enzim tarafından katalize edilir ve enzimin aktivitesi nöronal depolarizasyon, kalsiyum iyonlarının akışı ve enzimin fosforilasyonu tarafından düzenlenir (55, 56).

ACh'nin salınımı sinaptik keseciklerin ekzositozu ile gerçekleşir. Bu kesecikler, ön sinaptik zarla birleşerek sinaptik boşluğun içindeki nörotransmitter içeriğini ortadan kaldırır ve burada hem muskarinik hem de nikotinik reseptörleri aktive edebilir. Gömülü keseciklerin zarları geçici olarak sinir membranının yüzeyini genişletir ve ardından endositoz sürecine uğrayarak kesecik oluşturmayı sinir hücresi uç noktasının

sitoplazmasında geri yüklerler. Sinir impulsu nörotransmitter ACh'nin salınımını büyük ölçüde artırır. Salınım aktivitesi depolarizasyon kontrolünde olan yavaş kanalların açılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan kalsiyum iyonlarının girişi nedeniyle meydana gelir. ACh, sinaptik aralığı geçer; kısmen onu hidrolize eden AChE tarafından korunur. Bunun nedeni, bazı kanalların varlığı, fazla substratın inhibisyonu veya postsinaptik membranın belirli bileşenleri tarafından oluşabilir. ACh molekülü, aktif reseptör yüzeyinin anyonik bir bölgesine giren katyonik bir uca ve bir ester grubuna sahiptir; bu grup, yüzeyin esterofilik bir bölgesi tarafından sabitlenir. Kolinerjik reseptör kompleksinden parçalanmış ACh, sinaptik aralıkta bulunan ve muhtemelen bazal lamina ile ilişkili olan AChE etkisi altında hızla hidrolize edilir ve etkisiz hale getirilir. ACh, kolin ayrıştırıldıktan sonra, presinaptik koliner nöronlarda aktif bir taşıma sistemi aracılığıyla toplanır (Şekil 4) (55, 57, 58).



Şekil 4. Kolinerjik sinir iletimi (dos Santos'dan, 53)

Yapılan araştırmalarda, Alzheimer hastalığına yakalanan kişilerin beyinde ChAT seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir. ChAT enziminin azalması, ACh'nin AH'deki önemli rolü hakkında fikir oluşturmuştur. Ayrıca, AH sırasında nörodejenerasyonun meydana

geldiği hipokampal ve neokortikal bölgelerde ChAT enziminin büyük ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Alzheimer hastaları üzerinde yapılan çalışmalar kolin taşınması, ACh salınımı, nikotinik ve muskarinik reseptör ekspresyonu ve aksonal taşınma gibi kolinerjik anormalliklerin davranışsal işlev bozukluklarına önemli ölçüde katkıda bulunabileceğini öne sürmüştür. Bu bulgular, AH tedavisinde kolinerjik replasman tedavisinin birincil yaklaşım olması gerektiğini ortaya koymuştur. Kolinerjik hipotez, AH'nin erken evresinde kolinerjik nöronların etkilendiğini ve bazal ön beyinde ACh sentezinde yer alan kolinerjik işlevlerin kaybının bilişsel işlev bozukluklarına yol açtığını belirtmektedir (42).

2.2.4.1. Kolinesterazlar

Kolinesterazlar, ilk defa 1914'te Henry Dale tarafından öne sürülmüş olup, 1930'dan beri süren detaylı çalışmalar neticesinde serin hidrolaz sınıfına aittir. Bu enzimlerin aktif bölgede görev alan reaktif serisinin ve aktif bölgenin amino asit dizilimi, 1959 yılından itibaren belirlenebilmektedir.

Kolinesterazlar, ACh ve bütirilkolin (BCh) gibi kolin türlerinin ayrışma tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimler, plazma ve diğer vücut sıvılarında geniş bir dağılıma sahiptir. Substrat spesifikliğine göre ikiye ayrılmışlardır; bir tanesi seçici olarak ACh'i hidroliz eden asetilkolinesteraz (AChE; E.C. 3.1.1.7), diğeri ise ACh ve diğer kolin esterlerini hidroliz edebilen bütirilkolinesteraz (BuChE; E.C. 3.1.1.8) dır.

AChE ve BuChE'nin temel fonksiyonu kolinerjik sinirsel iletiminin sonlandırılmasıdır. Kolinesterazlar, hücre yenilenmesi, farklılaşması ve çeşitli etkenlere yanıt olarak ortaya çıkan stresle birlikte Aβ oluşumunda da görev almaktadır (114).

2.2.4.1.1. Asetilkolinesteraz

AChE (EC 3.1.1.7), karboksilesteraz enzim ailesine ait spesifik bir esterazdır. Ağırlıklı olarak nörotransmitter ACh'ı hidrolize eder. AChE, özellikle kırmızı kan hücrelerinde ve beyinde nöromusküler kavşaklarda ve kolinerjik beyin sinapslarında yüksek konsantrasyonlarda bulunur.

AChE sırasıyla bir, iki veya dört katalitik alt birim içeren G1, G2 ve G4 olarak da bilinen monomerik, dimerik ve tetramerik globüler formlarda bulunur. Yalnızca G1 çözünür olarak bulunurken, G4 hem çözünür hem de membrana bağlı olarak bulunur (59). Demanssız insan beyinde AChE, toplam kolinesteraz aktivitesinin %80'ini oluşturur ve oranları farklı beyin bölgelerinde değişen G1 ve G4 formlarında bulunur. Alzheimer hastalarının

beyinlerinde, büyük olasılıkla presinaptik terminallerin kaybına bağlı olarak belirli bölgelerde G4 membrana bağlı formun seviyesinde %90 oranında seçici bir azalma olurken, G1 formunun seviyeleri değişmeden kalır (60, 61).

AChE, x-ışını kristalografisi ile 20 Å derinliğinde olduğu gösterilen, ACh'nin difüze olduğu ve parçalandığı esas olarak hidrofobik bir aktif geçide sahiptir. ACh bu aktif bölgeye girdiğinde iki yere bağlanır: geçidin tabanına yakın bir katalitik bölge ve ortada bir kolin anyonik bağlanma bölgesi. ACh, kolin ve asetatı hidrolize olur ve böylece nörotransmitter işlevi sona erer. Bu oldukça verimli bir süreçtir, tek bir AChE birimi saniyede yaklaşık 1×10^5 ACh molekülünü parçalar. AChE, ACh için oldukça seçicidir ve düşük ACh konsantrasyonlarında daha yüksek katalitik aktiviteye sahiptir, bu da daha yüksek dozlarda substrat inhibisyonu ile sonuçlanır. AChE'nin periferik anyonik bölgesi (PAS), aktif bölge geçidinin girişinde bulunan alt bölge, AChE'nin substrat inhibisyonuna aracılık eder (61).

2.2.4.1.2. Bütirikolinesteraz

BuChE (EC 3.1.1.8), farklı kolin esterlerini hidrolize eden spesifik olmayan bir kolinesteraz enzimi türüdür ve insan karaciğeri, kan serumu, pankreas ve merkezi sinir sistemi başta olmak üzere vücudun her yerinde yaygın olarak bulunur. Beyinde, BuChE öncelikle glial hücreler ve endotel hücreleri ile ilişkilidir (61, 62).

BuChE, AChE ile yapısal homolojinin %65'ini paylaşmaktadır. Normalde, BuChE beyinde destekleyici bir rol oynar ve temporal kortekste yaklaşık %10 kolinesteraz aktivitesini oluşturur. AChE gibi, BuChE enzimi de nörotransmitter ACh'nin hidrolizinde rol oynar ve bu nedenle, kolinerjik eksiklikle karakterize bir hastalık olan AH'de uygun bir terapötik hedef olarak önerilmiştir. AChE ve BuChE farklı K_m (Michaelis-Menten sabiti) değerlerine ve dolayısıyla ACh konsantrasyonlarına farklı kinetik yanıtlara sahiptir. Düşük ACh konsantrasyonlarında AChE oldukça etkilidir ancak BuChE çok daha az etkilidir. Bununla birlikte, daha yüksek ACh konsantrasyonlarında, AChE substrat inhibisyonuna uğrarken, BuChE ACh'nin hidrolizinde oldukça verimli hale gelir (61, 63).

AChE ile karşılaştırıldığında normal memeli beyindeki düşük ekspresyonu nedeniyle, BuChE'nin insan beyindeki önemi ilk başta hafife alınmıştır. Ancak daha sonra yapılan çalışmalar BuChE'nin sinir sistemindeki önemini, özellikle de AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda beyindeki ACh seviyelerinin düzenlenmesindeki önemli rolünü doğrulamıştır. AH'de, AChE seviyeleri belirli beyin bölgelerinde %85'e kadar

düşerken, BuChE seviyeleri (özellikle G1 formu) hastalık ilerledikçe artar. AChE'nin BuChE'ye oranı AH'nin ilerlemesiyle değiştiğinde bu, BuChE'nin normalde oynadığı yardımcı rolü değiştirir ve bunun yerine BuChE'yi artan işlevsel öneme sahip bir enzim haline getirir (61, 64).

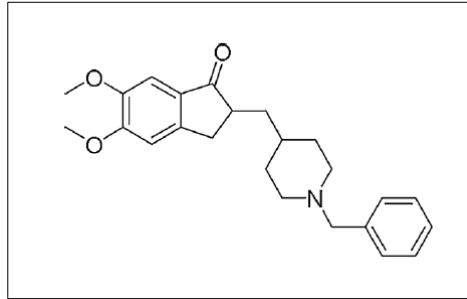
2.3. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan İlaç Molekülleri

AH ilaç keşfi, nörotransmitter olan ACh seviyelerinin anormal olduğunun tespit edilmesiyle başlamıştır. ACh, sinaptik iletişimde önemli bir rol oynar ve AH ile olası bir ilişkisi vardır. Bu ilişki, sinaptik ACh konsantrasyonunu artırmak amacıyla AChE aktivitesinin inhibisyonuyla gerçekleştirilmiştir (65, 69).

Dört AChE inhibitörü AH tedavisi için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Bu inhibitörlerden biri olan takrin şu anda pazarlanmamaktadır. Diğer üç AChE inhibitörü ise galantamin, rivastigmin ve donepezil dir (66). Bu AChE inhibitörleri, bilişsel fonksiyonlarda iyileşme sağlama ve günlük aktivitelerde geçici stabilizasyonu teşvik etme konusunda benzer etkilere sahiptirler (67). AChE inhibitörleri, AH'nin özgül biyolojik durumuna odaklanarak presinaptik kolinerjik hücre kaybını önlemeye ve kortekste ki postsinaptik kolinerjik nöronları korumaya yönelmiştir (68). Bu nedenle, AChE aktivitesini bloke ederek, kolinerjik iletimde artış sağlanmış ve bu, laboratuvar çalışmalarında ve klinik deneylerde daha iyi bilişsel işlevlerin gözlemlenmesiyle sonuçlanmıştır. Ancak, sistemik AChE inhibisyonuna bağlı olarak bazı davranışsal ve fizyolojik yan etkiler de gözlemlenmiştir (65). Kolinerjik hipotezle ilgili olarak, geliştirilen kolinesteraz inhibitörlerinin AH'nin bilişsel bozukluğunu yalnızca orta düzeyde hafiflettiği ve hastalığın ilerlemesini durdurmakta başarılı olamadığı birkaç sorun bulunmaktadır. AChE inhibitörleri yüksek dozlarda sadece AH ileri evrelerinde avantajlı olabilir ve tedavinin yan etki ve ilaç yükü riskine karşı dikkatle ayarlanması gerekebilir (42, 69).

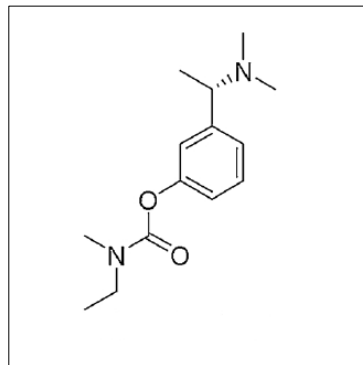
Donepezil, AH'nin tedavisinde dünya genelinde tercih edilen bir ilaçtır. Donepezil, diğer AChE inhibitörlerine kıyasla daha yüksek bir seçiciliğe sahiptir ve aynı zamanda bilişsel iyileşme açısından en etkili geri dönüşümlü AChE inhibitör aktivitesini sergileyen bir piperidin türevidir (Şekil 5). Bu özellikleri sayesinde, Alzheimer hastalarının bilişsel işlevlerini iyileştirmek için yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, donepezil, BuChE üzerinde AChE'ye göre yaklaşık 500–1000 kat daha yüksek bir seçiciliğe sahiptir. Bu, donepezilin

AChE'yi hedef alırken BuChE'yi neredeyse 10 kat daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği anlamına gelir. Bu, donepezilin tercih edilme nedenlerinden biri olabilir, çünkü BuChE'nin aktivitesinin artması AH ile ilişkilendirilen bazı patolojik süreçlerle bağlantılı olabilir ve BuChE inhibisyonunun, tedaviye ek fayda sağlayabileceği düşünülmektedir (69, 70).



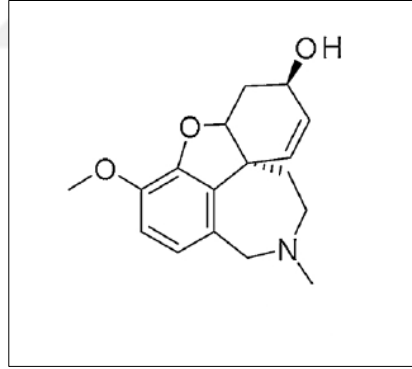
Şekil 5. Donepezil yapısı (Stanciu'dan, 58)

Rivastigmin, hafif ila orta şiddette AH'ye bağlı demansın tedavisi için önerilen bir ilaçtır (Şekil 6). AH'nin tedavi odaklarından biri, beyin ACh seviyelerini artırmak ve bu nörotransmitterin eksikliğini telafi etmektir. Beyinde ACh'yi parçalayan iki farklı kolinesteraz enzimi bulunur: AChE ve BuChE. Rivastigmin, diğer kolinesteraz inhibitörlerinden farklı olarak, geri dönüşümlü olarak bu iki enzimi de bloke ettiği ve sonuç olarak genel olarak ACh seviyelerini artırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, Alzheimer hastalarının bilişsel işlevlerini iyileştirmek ve semptomları hafifletmek için kullanılan bir ilaçtır (69, 71).



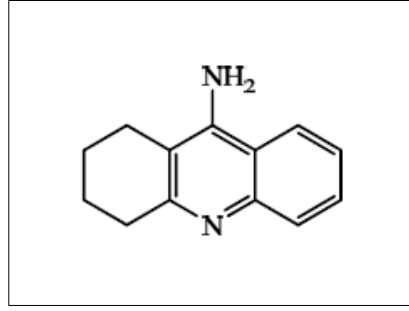
Şekil 6. Rivastigmin yapısı (Stanciu'dan, 58)

Galantamin hidrobromid, hafif ile şiddetli AH'yi tedavi etmek amacıyla bitki kaynaklarından izole edilmiş bir tersiyer alkaloiddir (Şekil 7). Galantamin, çift etkili bir ilaç olarak işlev görür; hem ACh–nikotinik reseptörlerin allosterik modülatörüdür hem de AChE'yi geri dönüşümlü yarışmalı bir şekilde inhibe eder (69, 72). Galantaminin bazı özellikleri, büyük bir eliminasyon hacmi, düşük protein bağlanması ve yüksek biyoyararlanmadır. Bu, galantaminin vücutta hızlı bir şekilde dağıldığını ve yüksek bir biyoyararlanım oranına sahip olduğunu gösterir. Kısa süreli çift kör, plasebo kontrollü çalışmalar, galantamin tedavisinin hafif–orta şiddetli AH olan bazı hastalarda bilişsel değerlendirmelerde ve genel değişim ölçümlerinde orta derecede kazanımlara yol açtığını göstermektedir. En etkili dozun 16–24 mg/gün arasında olduğu görünmektedir ve bu doz aralığı dünya çapındaki birçok bölgede önerilen optimal uygulanan dozudur. Diğer kolinesteraz inhibitörleri gibi, galantaminin terapötik etkisi benzer düzeydedir. Galantamin kullanan bazı bireylerde, dozun azaltılması ile daha iyi hale gelebilen hafif gastrointestinal yan etkiler gelişebilir. Bu nedenle, galantamin tedavisi altında olan hastaların yakından izlenmesi ve uygun doz ayarlamalarının yapılması önemlidir (69, 73).



Şekil 7. Galantamin yapısı (Massoulie'den, 59)

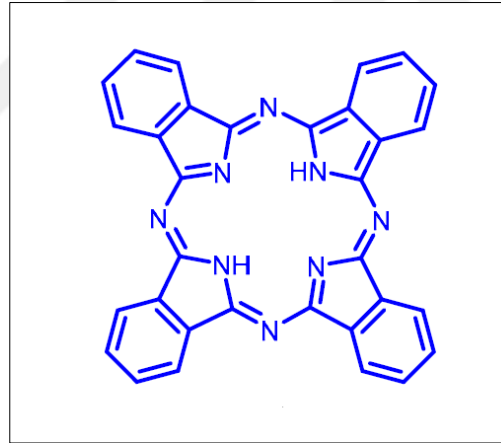
Takrin, AH için FDA onayı alan ilk ilaç olmasıyla dikkat çekmektedir (Şekil 8). 1993 yılında onaylandığında, hafif–orta şiddette AH'nin etkili bir tedavisi olarak görülüyordu. Özellikle, merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde ilacın kan beyin bariyerini (KBB) hızla geçişi büyük bir başarı olarak kabul ediliyordu. Ayrıca, yapılan çalışmalar Alzheimer hastalarında bilişsel performansı iyileştirebileceğini göstermiştir. Ancak, takrinin karaciğer hasarıyla ilişkilendirilmesi endişeleri nedeniyle 2013 yılında piyasadan çekilmiştir (69, 74).



Şekil 8. Takrin yapısı (Massoulie'den, 59)

2.4. Ftalosiyanınlar

Ftalosiyanınlar, isoindol gruplarıyla bağlı porfirin halkası içeren makrosiklik bileşiklerdir ve delokalize 18 π -elektron içeren iki boyutlu bir geometriye sahip, non-süstitüe iki pirol hidrojen atomuna sahiptir (Şekil 9) (75).



Şekil 9. Ftalosiyanın yapısı (Araujo'dan, 113)

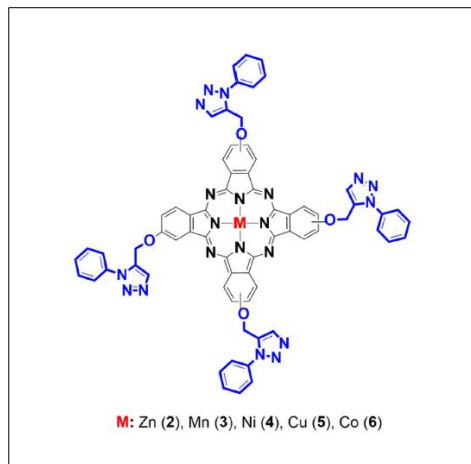
Ftalosiyanınlar ve metal kompleksleri, elektronik yapı özellikleri nedeniyle malzeme bilimde birçok uygulama için önemli kompleksler olarak kabul edilmiştir. Ftalosiyanınların özellikleri, farklı metallerin eklenmesi, eksenel ve çevresel ligandların değiştirilmesi ve süstitüentlerin kullanılması gibi yöntemlerle modüle edilebilir. Bu modifikasyonlar, elektrokromik cihazlar (76), fotoduyarlastırıcılar (77), güneş pilleri (78), katalizörler (79), ağır metal sensörleri (80) gibi önemli uygulama alanlarında kullanılmaya devam etmelerini sağlar (81).

Bilim insanları son yıllarda ftalosiyanin bileşiklerine, suda çözünür formlarının sentezlenebilmesi, antioksidan, antibakteriyel, DNA etkileşimi, enzim inhibisyonu, antikanser ve fotodinamik terapi gibi farmakolojik ve biyolojik uygulamalarda kullanılabilirliği nedeniyle ilgi duymaktadır (82–87). Bu uygulamalar arasında ftalosiyaninlerin enzim inhibitörü olarak kullanımı son yıllarda sıklıkla araştırılmaktadır. Bu uygulama alanlarında kullanım için ftalosiyanin komplekslerinin çözünürlüğünün sağlanması çok önemlidir. Ftalosiyanin komplekslerinin çözünürlüğü, bileşiklerin etkinliğini artırmak için kritik bir faktördür. Periferel, periferel olmayan veya eksenel pozisyonlarda çeşitli süstitüentlerin eklenmesi ve π elektron yoğunluğunun uzatılması, çözünürlük özelliklerini arttırmakla birlikte elektronik ve absorpsiyon özellikleri üzerinde de güçlü bir etkiye sahiptir (88).

2.5. Literatür Örnekleri

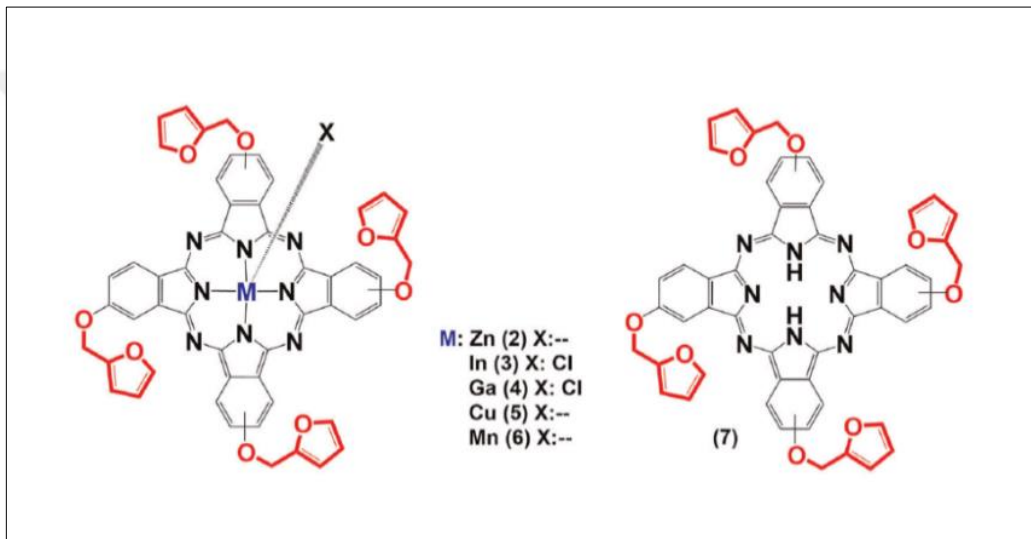
Bu bölümde ftalosiyanin bileşiklerinin AChE ve BuChE enzim inhibitör özelliklerini ortaya koyan literatürdeki çalışmalara yer verilmiştir.

Koçyiğit ve arkadaşları 2022 yılında periferel 1,2,3-triazol grubu süstitüe metalloftalosiyanin türevlerini sentezlemiştir. Ardından bileşiklerin AH üzerindeki etkisini araştırmak üzere AChE enzimine karşı inhibisyon etkinliğini incelemiştir. Bu yeni metalloftalosiyanin türevleri (2–6), $40.11 \pm 5.61 - 78.27 \pm 15.42 \mu\text{M}$ aralığında K_i değerleri ile AChE'yi etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Ayrıca, metal komplekslerinin kimyasal ve biyolojik aktivitelerini karşılaştırmak için teorik hesaplamalar incelendiğinde sonuçların uyumlu olduğu bulunmuştur (Şekil 10) (81).



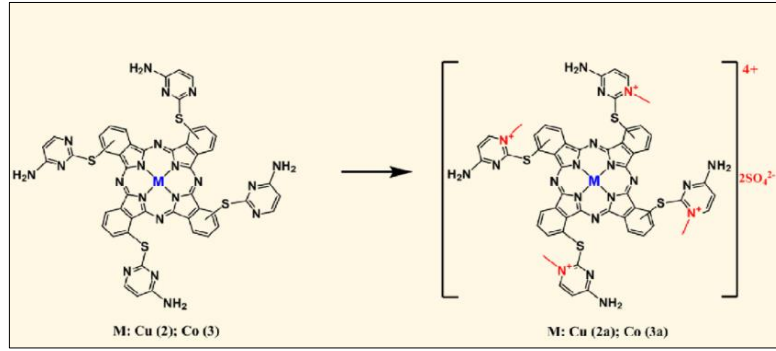
Şekil 10. Metalloftalosiyanin türevleri (2–6) (Koçyiğit'ten, 81)

2021 yılında Güzel ve arkadaşları tarafından furan-2-il-metoksi sübstitüe metaloftalosiyenin bileşiklerinin hazırlanması ve kolinesteraz enzim inhibisyon aktivitelerinin araştırılmasını rapor edilmiştir. Furan-2-il-metoksi gruplarının varlığı, komplekslerin çözünürlüğünün artmasına yardımcı olmuştur. Bileşiklerin AChE'ye karşı K_i değerleri $11.17 \pm 1.03 - 83.28 \pm 11.08 \mu\text{M}$ arasında kaydedilmiştir. BuChE'ye karşı ise, bileşikler $7.55 \pm 0.98 - 81.35 \pm 12.80 \mu\text{M}$ arasında K_i değerleri göstermiştir. Genel olarak, furan-2-il-metoksi sübstitüe ftalosiyeninler, AH tedavisi için potansiyel ajanlar olarak düşünülebileceği bildirilmiştir (Şekil 11) (89).



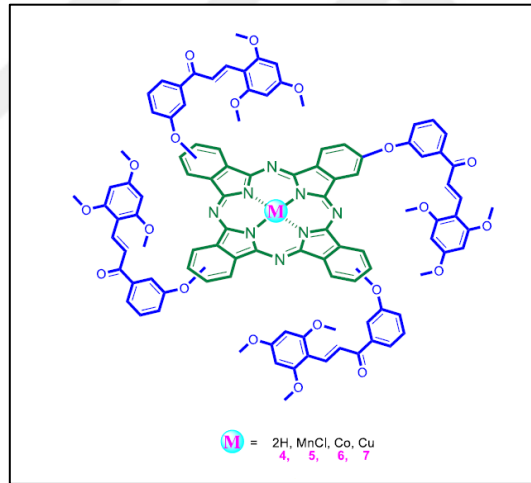
Şekil 11. Furan-2-il-metoksi sübstitüe metaloftalosiyenin bileşikleri (Güzel'den, 89)

Günsel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, başlangıç maddesi olarak yeni 3-(4-aminopirimidin-2-ylthio) ftalonitril (1) sentezlenmiş ve daha sonra, periferik olmayan tetra-sübstitüe Cu (II) ve Co (II) ftalosiyeninler ve sitozin türevi içeren metillenmiş türevleri sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin asetilkolinesterazı inhibe etme potansiyelleri incelendiğinde AH tedavisi için önemli terapötik ilaç olma kapasitelerinin olduğu kaydedilmiştir (Şekil 12) (75).



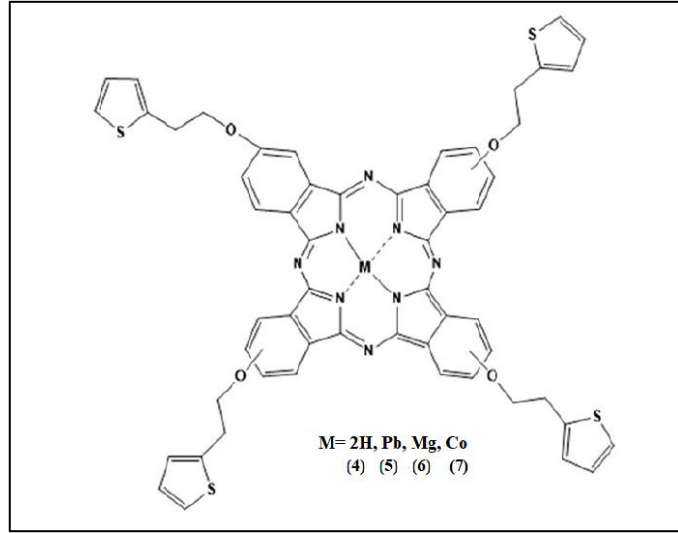
Şekil 12. Ftalosiyenin Cu (II), Co (II) ve sitozin türevi içeren metillenmiş türevleri (Günsel'den, 75)

Arslan ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladıkları çalışmada, tetra-kalkon sübstitüe metallsiz ve metalli (Mn (III), Co (II), Cu (II)) ftalosiyeninler ilk kez sentezlenmiştir ve AChE'ye karşı etkileşimleri araştırılmıştır. Sentezlenen bu ftalosiyeninlerin AChE'ye karşı önemli derecede inhibitör etki gösterdiği belirtilmiştir (Şekil 13) (90).



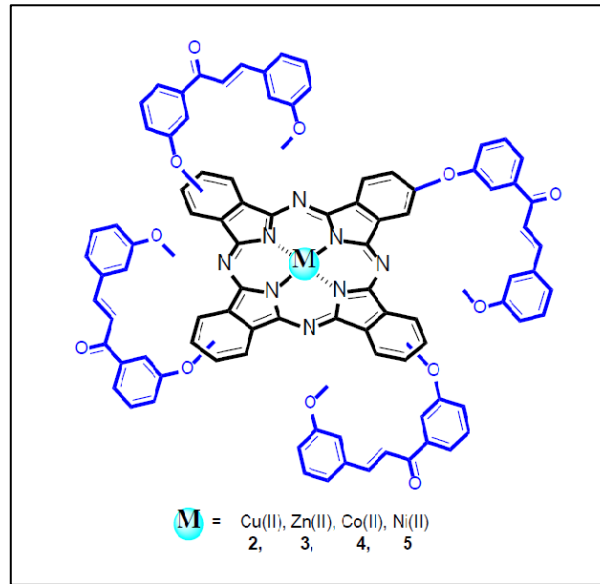
Şekil 13. Tetra-kalkon sübstitüe metallsiz ve metalli ftalosiyeninler (Arslan'dan, 90)

Demirbaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 4-{2-(2-tiyenil)etoksi}ftalonitril (3) ve onun tetra sübstitüe periferall metallsiz (4), Pb (II) (5), Mg (II) (6) ve Co (II) (7) ftalosiyeninleri sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin inhibitör özellikleri Ingkaninan'ın kolinesteraz enzimlerine karşı yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Test edilen bileşikler arasından (7) nolu ftalosiyenin AH için ilaç olabılme potansiyelinin daha yüksek bulunduğu belirtilmiştir (Şekil 14) (91).



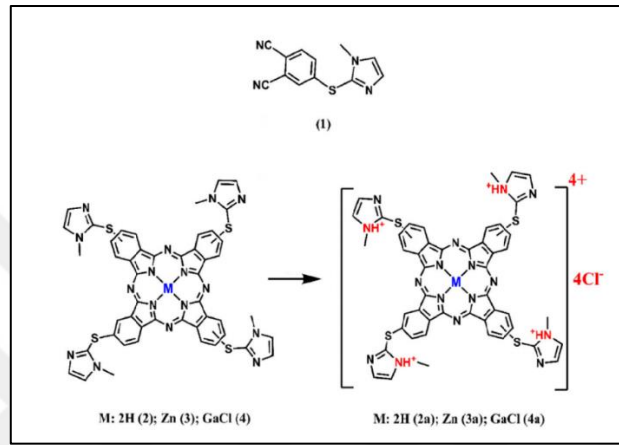
Şekil 14. 4-{-(2-tiyenil)etoksi} ftalosiyanın 4, 5, 6 ve 7 bileşikleri (Demirbaş'tan, 91)

Tekin ve arkadaşları merkezde Ni (II), Zn (II), Co (II) ve Cu (II) içeren daha önce sentezlenmiş tetra-kalkon süstitüe metaloftalosiyanın AH karşı antikolinerjik aktivitelerini incelemiştir. Bileşikler, Ellman'ın kolorimetrik prosedürü kullanılarak AChE ve BuChE inhibisyonları açısından değerlendirildiğinde Cu (II) ftalosiyanın bileşiği AChE'ye karşı en güçlü inhibitör aktiviteyi göstermiştir. Ayrıca, Zn (II) bileşiği ise, BuChE için en etkili inhibisyonu göstermiştir (Şekil 15) (92).



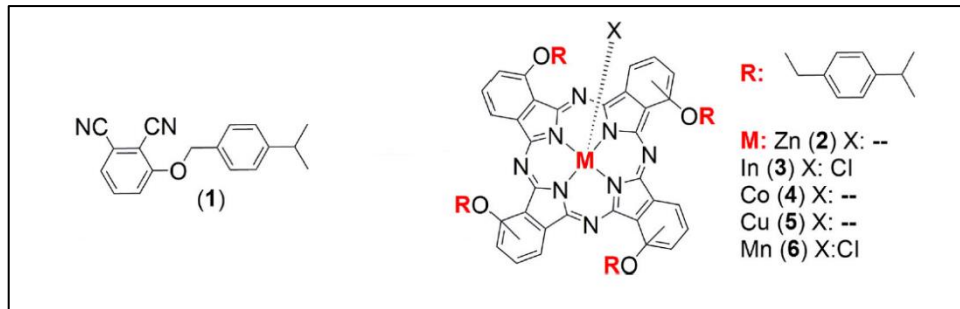
Şekil 15. Ni (II), Zn (II), Co (II) ve Cu (II) içeren tetra-kalkon süstitüe metaloftalosiyanın bileşikleri (Tekin'den, 92)

Günsel ve arkadaşlarının 1-metil-1H-imidazol-2-tiyol sübstituentleri içeren periferel metalsız, Zn (II) ve Ga (III) içeren ftalosiyeninler sentezlenmiştir. Ardından bu bileşiklerin AChE ve BuChE enzimlerine karşı inhibitör özellikleri incelenmiştir. Suda çözünabilen Ga (III) ftalosiyenin bileşiğinin AChE'ye karşı en iyi inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. Suda çözünabilen Zn (II) ftalosiyenin bileşiğinin ise BuChE enzimine karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (Şekil 16) (88).



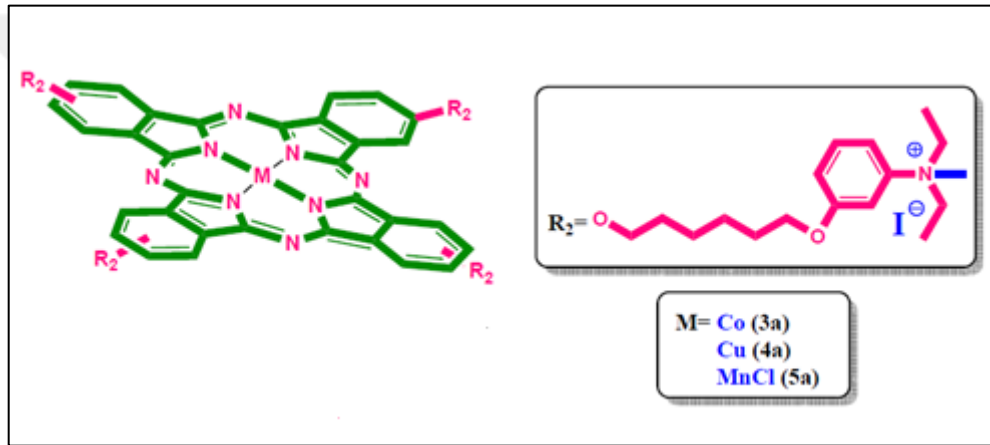
Şekil 16. 1-metil-1H-imidazol-2-tiyol sübstituent içeren metalsız, Zn (II) ve Ga (III) ftalosiyeninler (Günsel'den, 88)

Güzel ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, periferel olmayan (4-izopropilbenzil)oksi sübstitüe ftalosiyeninlerin hazırlanması, agregasyon çalışmaları ve kolinesteraz enzim inhibisyon özelliklerinin incelenmesi ilk kez rapor edilmiştir. Ftalosiyenin kompleksleri AChE'ye karşı $68.33 \pm 9.13 - 201.15 \pm 35.86 \mu\text{M}$ ve BuChE'ye karşı $86.25 \pm 13.65 - 237.54 \pm 24.7 \mu\text{M}$ aralığında K_i değerleri göstermiştir (Şekil 17) (93).



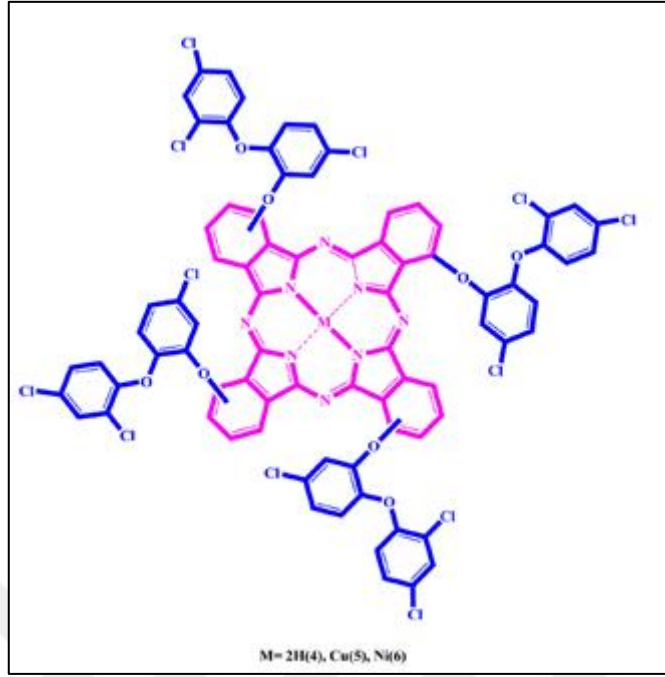
Şekil 17. (4-izopropilbenzil)oksi sübstitüe ftalosiyenin bileşikler (Güzel'den, 93)

Keleş ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı çalışmada, periferel tetra-({6-[3-(dietilamino)fenoksi]heksil}oksi süstitüe Co (II), Cu (II), Mn (III) ftalosiyeninler ve bunların suda çözünen türevleri hazırlanmıştır. Suda çözünebilen ftalosiyenin bileşiklerinin *in vitro* kolinesteraz inhibitör etkileri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak incelendiğinde bileşiklerin pozitif kontrol olarak kullanılan galantaminden daha yüksek inhibitör etkileri olduğu gösterilmiştir. Kinetik çalışmalarda, Co (II) ftalosiyenin bileşiğinin AChE için yarışmalı bir inhibitör olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiklerin terapötik potansiyeli *in vitro* çalışmalarla gösterilmiş olmasına rağmen verilerin daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği bildirilmiştir (Şekil 18) (94).



Şekil 18. Periferel tetra-({6-[3-(dietilamino)fenoksi]heksil}oksi süstitüe Co (II), Cu (II), Mn (III) ftalosiyenin bileşikleri (Keleş'ten, 94)

Barut ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladıkları çalışmada, periferel olmayan tetra triklosan (5-kloro-2-(2,4 diklorofenoksi) fenol) süstitüe metalsiz, Cu (II) ve Ni (II) ftalosiyeninler hazırlanmıştır. AChE ve BuChE inhibisyon özellikleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak araştırılırken bileşiklerin süpersarmal plazmid pBR322 DNA hidrolitik nükleaz etkileri de agaroz jel üzerinde araştırılmıştır. Cu (II) ftalosiyenin bileşiği sırasıyla 0.86 ± 0.01 ve 20.46 ± 2.47 μM IC_{50} değerleri ile en güçlü AChE ve BuChE inhibitör özelliklerini göstermiştir ve Cu (II) ftalosiyenin bileşiğinin selektif indeks değeri 23.79 olarak hesaplanmıştır. Bileşikler, süpersarmal plazmid DNA'ya karşı artan konsantrasyonlarda hidrolitik nükleaz etkisi göstermemiştir. Bu sonuçlar, Cu (II) ftalosiyenin bileşiğinin AH tedavisi için yeni bir inhibitör geliştirmek üzere daha ileri araştırmalar için öncü bir bileşik olabileceğini göstermiştir (Şekil 19) (95).



Şekil 19. Metalsiz, Cu (II) ve Ni (II) ftalosiyanın bileşikleri (Barut'tan, 95)

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada kolinesteraz enzimlerini inhibe etme potansiyelleri ortaya konulan ftalosiyanın bileşiklerinin seçilmesinin AH tedavisinde kullanılabilecek yeni bir ilaç molekülü olması açısından oldukça değerli olduğu düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında suda çözünebilen periferik tetra-({6-[3-(dietilamonyum)fenoksi]heksil}oksi substitüe Zn (II) ve Ni (II) ftalosiyanın (DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ) bileşiklerinin AH karşı ilaç olma potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda bileşiklerin ilaç olma potansiyellerini ortaya koymak için AChE ve BuChE inhibisyonları ve kinetik analizleri UV-Vis spektrofotometrik yöntemlerle ile belirlenmiştir. Bileşiklerin plazmid pBR322 DNA nükleaz özellikleri agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın son kısmında kolinesteraz enzimlerine karşı inhibisyon etki gösteren bileşiklerin SH-SY5Y hücre hattına karşı *in vitro* sitotoksik etkileri MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Marka/Model
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
CO ₂ inkübatörü	Nüve EC160
Derin dondurucu (–20 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (–80 °C)	Thermo Scientific 88400V
Elektroforez güç kaynağı	BioRad Power Pac™ Basic
Faz kontrast mikroskop	Leica DM1
Hassas analitik terazi	Ohaus PA 2140
Isıtıcı	Wisd Hotplate MSH-20A
Jel görüntüleme sistemi	Bio Rad Universal Hood Imager Gel
Laminar akış kabini	Mikrotest Class II A2
Magnetik karıştırıcı	Dragon MS-H-Pro
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific Multiskan Go
	Thermo Varioskan, Singapur
Otomatik pipetler	Socorex
pH metre	Ohaus Starter 300
Santrifüj	Nüve MF800R
Su banyolu çalkalayıcı	Memmert WNB 7–45
Vorteks	Visemix WM–10 Wisd
Yatay DNA elektroforezi	Biorad Wide Mini-Sub Cell GT System

3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Adı	Marka, Kodu
3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-difenil tetrazolyum bromür (MTT)	Sigma, M5655
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Sigma, D8130
Agaroz	Sigma, A9539
Asetik asit	Sigma, A6283
Asetilkolinesteraz	Sigma, C3389
Asetiltiyokolin iyodür (ATCI)	Sigma, A5751
Bromofenol mavisi	Sigma, B0126
Bütirilkolinesteraz	Sigma, C1057
Bütiriltiyokolin iyodür (BTCl)	Sigma, 20820
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, 472301
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Gibco, 11965092
Etidyum bromür (EB)	Sigma, E7637
Etilendiamin tetraasetik asit disodyum (EDTA-Na ₂)	Sigma, E5134
Fetal bovine serum	ATCC 30-2020
Galantamin	Sigma, G1660
Gliserol	Sigma, G5516
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma, 216763
İzopropanol	Sigma, I9516
Ksilen siyanol	Sigma, X4126
pBR322 plasmid DNA	Thermo Scientific, SD0041
Streptomisin/Penisilin	Gibco, 15240096
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, L3771
Tripsin/EDTA	Multicell, 3R5-542-EL
Trisma baz	Sigma, 93362

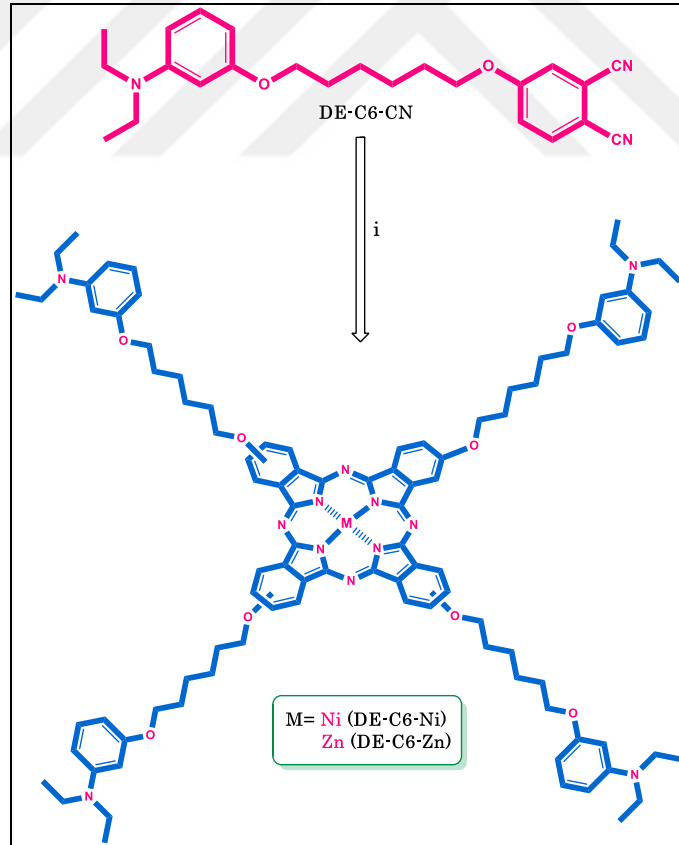
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Bileşikler

Bu çalışma kapsamında kullanılan bileşikler Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Anorganik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU

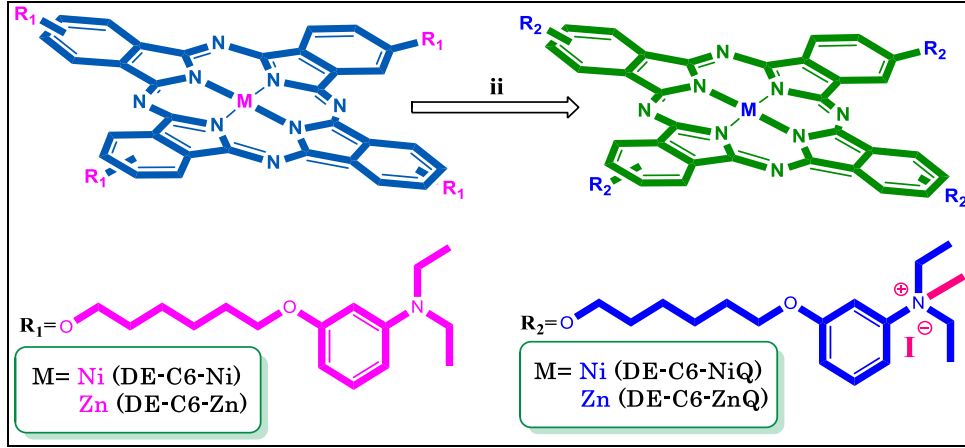
ve araştırma grubu tarafından sentezlenip, çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu bileşiklere ait bilgiler aşağıdaki Tablo 3'te sunulmuştur ve Şekil 20 ve 21'de kimyasal yapıları gösterilmiştir.

Tablo 3. Bileşiklere ait bilgiler

Bileşiğin Adı	Bileşiğin Kodu
Çinko (II) asetat	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
Nikel (II) klorür	NiCl_2
4-({6-[3-(Dietilamino)fenoksi]heksil}oksi)ftalonitril	DE-C6-CN
4-({6-[3-(Dietilamino)fenoksi]heksil}oksi) sübstitüe çinko (II) ftalosiyanın	DE-C6-Zn
4-({6-[3-(Dietilamino)fenoksi]heksil}oksi) sübstitüe nikel (II) ftalosiyanın	DE-C6-Ni
4-({6-[3-(Dietilamonyum)fenoksi]heksil}oksi) sübstitüe çinko (II) ftalosiyanın	DE-C6-ZnQ
4-({6-[3-(Dietilamonyum)fenoksi]heksil}oksi) sübstitüe nikel (II) ftalosiyanın	DE-C6-NiQ



Şekil 20. DE-C6-Zn ve DE-C6-Ni bileşiklerinin sentezi. (i) $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, NiCl_2 , n-pentanol, DBU, 160 °C.



Şekil 21. DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin sentezi. (ii) oda sıcaklığı, kloroform, iyodometan.

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

50 mM Tris-HCl (pH 8) Tamponu (TBS)

1.514 g trisma baz tartılmıştır. Saf su ile çözülüp hacmi 225 mL'ye tamamlandıktan sonra, seyreltik HCl ile pH 8'e ayarlanıp, saf su ile hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.

Yürütme Tamponu (10×TAE) (pH 8)

24.20 g trisma baz, 5.60 mL asetik asit, 10 mL 0.5 M EDTA son hacim 500 mL olacak şekilde saf su içerisinde çözülüp, 4 °C'de saklanmıştır.

% 0.8'lik Agaroza Jel

800 mg agaroz tartılıp, 100 mL TAE (1X) çözeltisi ilave edildikten sonra, ısıtıcı yardımıyla kaynatılarak çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra soğutulan çözeltiye 7 µL EB (5 mg/mL) ilave edilerek agaroz jel tankına dökülüp soğuması beklenmiştir.

Agaroz Jel Yükleme Boyası

1 g SDS (%10), 20 mg bromofenol mavisi (% 0.2), 20 mg ksilen siyanol (%0.2) ve 3 mL gliserol (%30) içerecek şekilde saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

50 mM Tris-HCl (pH 7) Tamponu

605.70 mg trisma baz tartılmıştır. Saf su ile çözülüp hacmi 75 mL'ye tamamlandıktan sonra seyreltik HCl ile pH 7'ye ayarlanıp, saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

%2 (h/h) H₂O₂ Çözeltisi

Stok H₂O₂ çözeltisinden 200 µL alınarak, saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

AChE Stok Enzim Çözeltisi

1 mg AChE tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 14.9 U/mL asetilkolinesteraz enzimi içermektedir. Bu enzim çözeltisi -20°C'de saklanmıştır.

BuChE Stok Enzim Çözeltisi

1 mg BuChE tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 12.62 U/mL bütirikolinesteraz enzimi içermektedir. Bu enzim çözeltisi -20°C'de saklanmıştır.

0.2 U/mL AChE Enzim Çözeltisi

Önceden hazırlanan AChE stok enzim çözeltisinden 134.23 µL alınarak 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

0.2 U/mL BuChE Enzim Çözeltisi

Önceden hazırlanan BuChE stok enzim çözeltisinden 158.48 µL alınarak 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

3 mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) Çözeltisi

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) maddesinden 12 mg tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl(pH 8) tamponunda çözündürülüp aynı tamponla hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

15 mM Asetiltiyokolin iyodür (ATCI) Çözeltisi

43.37 mg ATCI tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

60 mM Asetiltiyokolin iyodür (ATCI) Çözeltisi

173.48 mg ATCI tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

15 mM Bütiriltiyokolin iyodür (BTCl) İyodür Çözeltisi

45.17 mg BTCl tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

60 mM Bütiriltiyokolin iyodür (BTCl) Çözeltisi

180.68 mg BTCl tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürölüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

0.01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (10×PBS)

10 adet PBS tableti balon jogenin içersine konuldu, saf su ile hacmi 900 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 7.4'e ayarlanıp saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Otoklavlanan çözelti, +4 °C'de saklanmıştır.

Tripsin-EDTA Çözeltisi

200 mg tripsin, 40 mg EDTA tartıldı, PBS çözelti ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 0.22 µm çapındaki steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Antibiyotik Çözeltisi

1 mL streptomisin (10 mg/mL)/penisilin (10.000 U) alınıp saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 0.22 µm çapındaki steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Hücre Stoklama Besiyeri

Besiyeri içeriği 400 µL PBS, 100 µL gliserin ve 5 µL antibiyotik çözeltisi olacak şekilde oluşturulmuştur.

SH-SY5Y Hücreleri İçin Besiyeri

Besiyeri içeriği 10 mL PBS, 1 mL antibiyotik çözeltisi ve 89 mL DMEM çözeltisi olacak şekilde oluşturulmuştur.

MTT Çözeltisi

500 mg MTT tartılıp, üzerine 100 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ilave edilmiştir. Çözelti +4°C'de karanlıkta saklanmıştır.

%20 (h/h) DMSO Çözeltisi

Stok DMSO çözeltisinden 20 mL alınarak, saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

%0.5 (h/h) DMSO Çözeltisi

Stok DMSO çözeltisinden 500 µL alınarak, saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kolinesteraz Enzimleri Moleküler Modelleme Çalışması

Sentezlenen ftalosiyanın bileşiklerin başlangıç ligandı (DE-C6-CN) Maestro programında LigPrep ve MacroModel (2018-4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018) yazılımları ile OPLS4 kuvvet alanı kullanılarak eşlenik gradyan yöntemine göre küçültülerek modellenmiştir (96). AChE enzimi için (PDB id: 4M0E (98), çözünürlük: 2.00 Å) ve BuChE enzimi için ise (PDB id: 6I0B (97), çözünürlük: 2.38 Å) kristalografik yapıları, RCSB protein veri bankasından (www.rcsb.org) indirilmiştir. (98). Proteinler, Maestro Protein Hazırlama Sihirbazı (2021-4, Schrodinger LLC, New York, NY) kullanılarak hazırlanmıştır. Bu kapsamda Maestro Protein Hazırlama Sihirbazı (2021-4, Schrodinger LLC, New York, NY) ile sırasıyla ligand-enzim komplekslerindeki fazlalık moleküllerin çıkarılması, hidrojen atomlarının eklenmesi, bağ sıralarının verilmesi, kısmi yüklerin eklenmesi, iyonizasyon ve tautomerik durumların oluşturulması, hidrojen bağlarının eklenmesi ve kısıtlama minimalizasyonunun (ağır atomların yakınsaması için RMSD kesme: 0.3 Å) oluşturulması gerçekleştirilmiştir. AChE için -17.27, -42.32, 25.90 ve BuChE için 135.05, 112.49, 40.61 koordinatlarında merkezlenmiş 8000 Å³lük küpler olarak tanımlanan reseptör aktif bölgeleri için ızgara haritaları üretilmiştir. Moleküler yerleştirme, ligand başına 100 çalıştırma ile ekstra kesinlik modunda Glide (2021-4, Schrodinger LLC, New York, NY) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (99). Prime (2021-4, Schrodinger LLC, New York, NY) (100) kullanılarak ΔG bağlanma enerjilerini belirlemek için her reseptörden en iyi puan alan beş ligand-reseptör kompleksi için MM-GBSA hesaplamaları yapılmış olup bu süreçte VGSB solvasyon modeli kullanılmış, ligandlardan 4 uzaklığa kadar olan kalıntılar esnek tutulmuş ve OPLS4 forcefield parametrelerine göre örnekleme için minimizasyon kullanılmıştır. Pozlar Maestro üzerinde görsel olarak kontrol edilmiştir.

3.2.2. Kolinesteraz İnhibisyon Çalışmaları

AChE ve BuChE inhibisyon ölçümleri için spektrofotometrik bir yöntem olan Ellman metodu 96 kuyucuklu mikrotiplalarda yapılacak şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır. Deney sırasında enzim olarak elektrik balığından elde edilen AChE ve at serumundan elde edilen BuChE kullanılmıştır. Kolinesteraz aktivitesinin ölçülmesinde asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin iyodür substrat olarak kullanılırken; DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit) renklendirici madde olarak kullanılmıştır. DTNB bileşiği, hidroliz reaksiyonu sonucunda açığa çıkan tiyokolin yapısı ile sarı renkli bir kompleks

oluşturmaktadır ve bu kompleksin maksimum absorbands yaptığı 412 nm’de ölçümler alındı. Çalışmada kullanılan bileşikler 10 mM stok çözeltisi DMSO kullanılarak hazırlanmıştır. Kontrol ve bileşikler 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) ile çözülerek son konsantrasyonları 0.01–30 µM olacak şekilde dilüe edilmiştir. Çalışılan mikropatedeki tüm kuyucuklara 50 µL 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) pipetlendikten sonra son konsantrasyonları 0.01–30 µM olacak şekilde 25 µL bileşik çözeltileri eklenmiştir. Negatif kontrol olarak ayrılan kuyucuklara 25 µL 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) ilave edilmiştir. Daha sonra tüm kuyucuklara 125 µL 3 mM DTNB çözeltisi çok kanallı otomatik pipet yardımıyla ilave edilmiştir. Stok enzim çözeltisinden 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) ile 0.2 U/mL konsantrasyonunda enzim çözeltileri hazırlanmıştır ve 25 µL olacak şekilde mikropalakada belirlenen kuyucuklara ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında tüm kuyucuklara 25 µL 15 mM konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanan substratlar (asetiltiyokolin iyodür veya bütiriltiyokolin iyodür) eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Substratların hidrolizi ile meydana gelen tiyokolin, DTNB ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu meydana getirmiştir. Ölçümler 412 nm dalga boyunda, Thermo Scientific Multiskan Go cihazında spektrofotometrik olarak absorbands ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerin AChE ve BuChE inhibisyon yüzdeleri aşağıda verilen “Eşitlik 1” denkleminde göre hesaplanmış ve pozitif kontrol olarak kullanılan galantamin ile karşılaştırılmıştır. Deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

$$\% \text{ Inhibisyon} = \left(\frac{A_x - A_y}{A_x} \right) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

A_x = Bileşiklerin yer almadığı içeriğin absorbandsı

A_y = Bileşiklerin yer aldığı içeriğin absorbandsı

3.2.3. Kolinesteraz Kinetik Çalışmaları

Kinetik çalışmalarda, inhibisyon çalışmasında belirtilen deney protokolü uygulanmıştır. Fakat, inhibisyon yönteminden farklı olarak, bileşiklerin hesaplanan IC_{50} değerlerindeki konsantrasyonları baz alınarak dört adet konsantrasyon seçilmiştir. Konsantrasyonlardaki seçim şu şekilde olmuştur: Bileşiklerin hesaplanan IC_{50} değerlerindeki konsantrasyonundan düşük bir konsantrasyon, bileşiklerin hesaplanan IC_{50} değerlerindeki konsantrasyonları ve bileşiklerin hesaplanan IC_{50} değerlerindeki konsantrasyonlarından daha yüksek olan iki değer. Substrat çözeltileri ise seri seyreltmeler

ile 40–5 mM aralığındaki altı farklı konsantrasyonda kullanılmıştır. Ölçümler, inhibitör maddenin seçilen konsantrasyonları varlığında ve inhibitör madde olmaksızın beş farklı şekilde yapılmıştır. Testler sonucunda elde edilen absorbans değerlerinin, değişen substrat konsantrasyonlarına karşı Microsoft Office Excel–2013 bilgisayar programında analizleri gerçekleştirilmiş ve Lineweaver–Burk grafikleri ve Dixon grafikleri çizilmiştir.

3.2.4. DNA Nükleaz Çalışmaları

DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin DNA nükleaz çalışmaları süpersarmal pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemiyle belirlenmiştir. pBR322 plazmid DNA'nın, moleküllerin nükleaz aktivitesinin belirlenmesinde oldukça yaygın kullanılan bir DNA türü olduğu bilinmektedir. Süpersarmal plazmid DNA elektroforeze maruz bırakıldığında, süpersarmal formun en hızlı göç ettiği bilinmektedir. Maddelerle etkileşim sonrası tek bir zincirde kırılma meydana geldiğinde kırık form oluşur ve bu formun göç etmesi en uzundur. Çift zincirde kırılma meydana gelirse lineer form oluşur. Oluşan form, süpersarmal ve kırık form arasında olacak şekilde göç eder (101). Bu tez çalışması kapsamında DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA nükleaz aktivitesi oksidatif ajanların varlığında ve yokluğunda incelenmiştir.

3.2.4.1. Bileşiklerin Hidrolitik Nükleaz Aktivitesi

Bileşiklerin hidrolitik nükleaz aktivitesinin belirlenmesinde konsantrasyona bağlı olarak hidrolitik koşullarda denemeler gerçekleştirilmiştir. DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin 10 mM stok çözeltisi saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra 50 µM, 100 µM ve 500 µM olmak üzere üç farklı konsantrasyona seyreltme gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine 1 µL 250 ng pBR322 plasmid DNA, 7 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)) ve 2 µL bileşiklerin artan konsantrasyonları (10 µM, 50 µM ve 100 µM) ilave edilip, 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında, oluşturulan bu karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE'nin ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika jelde yürütülmüştür. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak metilen mavisi kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (102).

3.2.4.2. Bileşiklerin Oksidatif Nükleaz Aktivitesi

Bileşiklerin nükleaz etkinlikleri çeşitli ajanların varlığına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında yardımcı ajan olarak %2 (h/h) H₂O₂ çözeltisi kullanılarak oksidatif nükleaz aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışmada agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine 1 µL 250 ng pBR322 plasmid DNA, 5 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)), 2 µL H₂O₂ ve 2 µL bileşiklerin artan konsantrasyonları (10 µM, 50 µM ve 100 µM) ilave edilip, karışım 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında, karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika jelde yürütülmüştür. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak metilen mavisini kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (102).

3.2.5. Hücre Kültürü

Çalışma kapsamında kullanılan insan nöroblastoma (SH-SY5Y) (ATCC®CRL-2266) hücre hattı Acıbadem Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı’ndan temin edilmiştir. Hücreler -196 °C’de sıvı azot tankı içerisinde saklanmıştır. Hücre kültürü çalışmaları Acıbadem Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. MTT Hücre Canlılık Testi

DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin 10 mM stok çözeltisi DMSO kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra 5 farklı konsantrasyona (0.05–50 µM) seyreltme gerçekleştirilmiştir. Maruziyet besiyerleri çözücü oranı %0.01’i geçmeyecek şekilde oluşturulmuştur. Çalışmada negatif kontrol grubu için sadece besiyeri içeren hücreler, çözücü kontrol grubu için %0.5 (h/h) oranında DMSO ve pozitif kontrol grubu için de %20 (h/h) DMSO kullanılmıştır.

Hücre kültürü pasajının ardından sayımı gerçekleştirilerek 48 kuyucuklu mikroparka içerisine her kuyucuk için 1×10^5 hücre/100 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Sonra bileşiklerin farklı konsantrasyonları içeren maruziyet besiyerleri ilave edilmiş ve 24 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Bu süreler sonunda besiyerleri atılmıştır. 0.5 mg/mL MTT olacak şekilde hazırlanan besiyerinden her kuyucuk başına 100 µL konulmuştur. Plaka inkübatöre

alınarak 2 saat beklenmiştir. Bu süre sonrasında hücrelerin yüzeyinde bulunan besiyeri atılıp, 100 µL izopropanol ilave edilmiştir. Plaka 10 dakika çalkalayıcıda bekletilip, MTT'nin indirgenmesi sonucu oluşan mor renkli formazan mikroparka okuyucu spektrofotometre (Thermo Varioskan, Singapur) ile 570/690 nm'de ölçülmüştür. Deneyler her konsantrasyon için altı tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (103).

Canlılık için DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerine maruz bırakılan hücrelerin absorbansı, negatif kontrol ile muamele edilen hücrelerin canlılığına oranla % hücre canlılığı olarak tanımlanmıştır.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Sonuçların hesaplanmasında GraphPad Prism 6.0 ve Microsoft Excel Windows 13 programları kullanılmıştır. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından enzim inhibisyonu için Tukey testleri ile gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları karşılaştırmak için T-testi kullanıldı. P değeri <0.05 sitotoksosite testleri için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

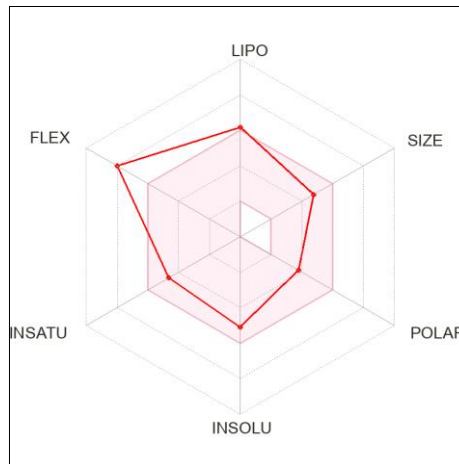
4. BULGULAR

4.1. Kolinesteraz Enzimleri Moleküler Kenetleme Çalışması

Ftalosiyanin bileşiklerinin sentezinin başlangıç maddesi olan DE-C6-CN bileşiğinin kolinesteraz enzimleri ile etkileşimlerinin moleküler düzeyde belirlenmesi amacıyla moleküler kenetleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. İlaç Benzerliği ve Farmakokinetik Değerlendirilmesi

DE-C6-CN ligandının ilaç benzerliği, lipofilisite için XLOGP3, boyut için moleküler ağırlık (MA), polarite için toplam polar yüzey alanı (TPYA), sulu çözünürlük için log S, doyumluk için toplam karbon sayısındaki sp³-hibritleşmiş karbonların yüzdesi ve esneklik için dönebilen bağ sayısı olmak üzere altı tanımlayıcı kullanılarak değerlendirilmiştir ve bu değerler SwissADME programı ile hesaplanmıştır (104,105). Sonuçlar incelendiğinde DE-C6-CN bileşiğinin kabul edilebilir moleküler ağırlığa, polariteye ve sulu çözünürlüğe sahip olduğunu, aynı zamanda dengeli bir doymuş karbon oranına sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 22). DE-C6-CN bileşiğinin lipofilikliği sınır çizgisindeyken, dönebilen bağ sayısının ilaç olma aralığının dışında olduğu görülmüştür (Şekil 22) ve bu durumun yapısal modifikasyonlarla optimize edilebilir olduğu tespit edilmiştir. DE-C6-CN bileşiği SwissADME tarafından sağlanan tanımlayıcılara ilişkin Lipinski'nin beş kuralına göre ilaç olma benzerliği yüksek çıkmıştır. Buna ek olarak, DE-C6-CN bileşiğinin yüksek oranda oral olarak emilebileceği ve effüzyon pompası (P-gp) için bir substrat olmadığı tahmin edilmiştir (Tablo 4).



Şekil 22. DE-C6-CN bileşiği için SwissADME portalı tarafından oluşturulan ilaç benzerliği grafiği

Tablo 4. DE-C6-CN bileşiğinin ilaç benzerliği için hesaplanmış tanımlayıcıları

Genel parametreler	MA	Ağır atom sayısı	Aromatik ağır atom sayısı	Csp3 oranı	Dönebilen bağ sayısı	H bağı akseptörü sayısı	H bağı donörü sayısı
	391.51	29	12	0.42	12	4	0
Lipofilisite	iLOGP	XLOGP3	WLOGP	MLOGP	Silicos-IT LogP	Konsensüs LogP	
	4.38	5.28	5.29	2.81	5.42	4.64	
Suda çözünürlük	ESOL LogS	ESOL çözünürlük (mg/mL)	ESOL çözünürlük (mol/L)	ESOL Sınıfı	Ali LogS	Ali Çözünürlük (mg/mL)	Ali Çözünürlük (mol/L)
	-5.11	3.05×10^{-3}	7.80×10^{-6}	Orta çözünür	-6.49	1.28×10^{-4}	3.27×10^{-7}
Farmako-kinetik	Gi Emilim	KBB geçişi	Pgp substratı	Cilt penetrasyon için Kp (cm/s)	CYP1A2 inhibitörü	CYP2C19 inhibitörü	CYP2C9 inhibitörü
	Yüksek	Hayır	Hayır	-4.94	Hayır	Hayır	Hayır
İlaç benzerlik	Lipinski İhlali	Ghose İhlali	Veber İhlali	Egan İhlali	Muegge İhlali	Biyoyararlanım Skoru	
	0	0	1	0	1	0.55	
Medisinal Kimya	PAINS uyarısı	Brenk uyarısı	Leadlikeness İhlali	Sentez edilebilirlik			
	1	0	3	2.87			

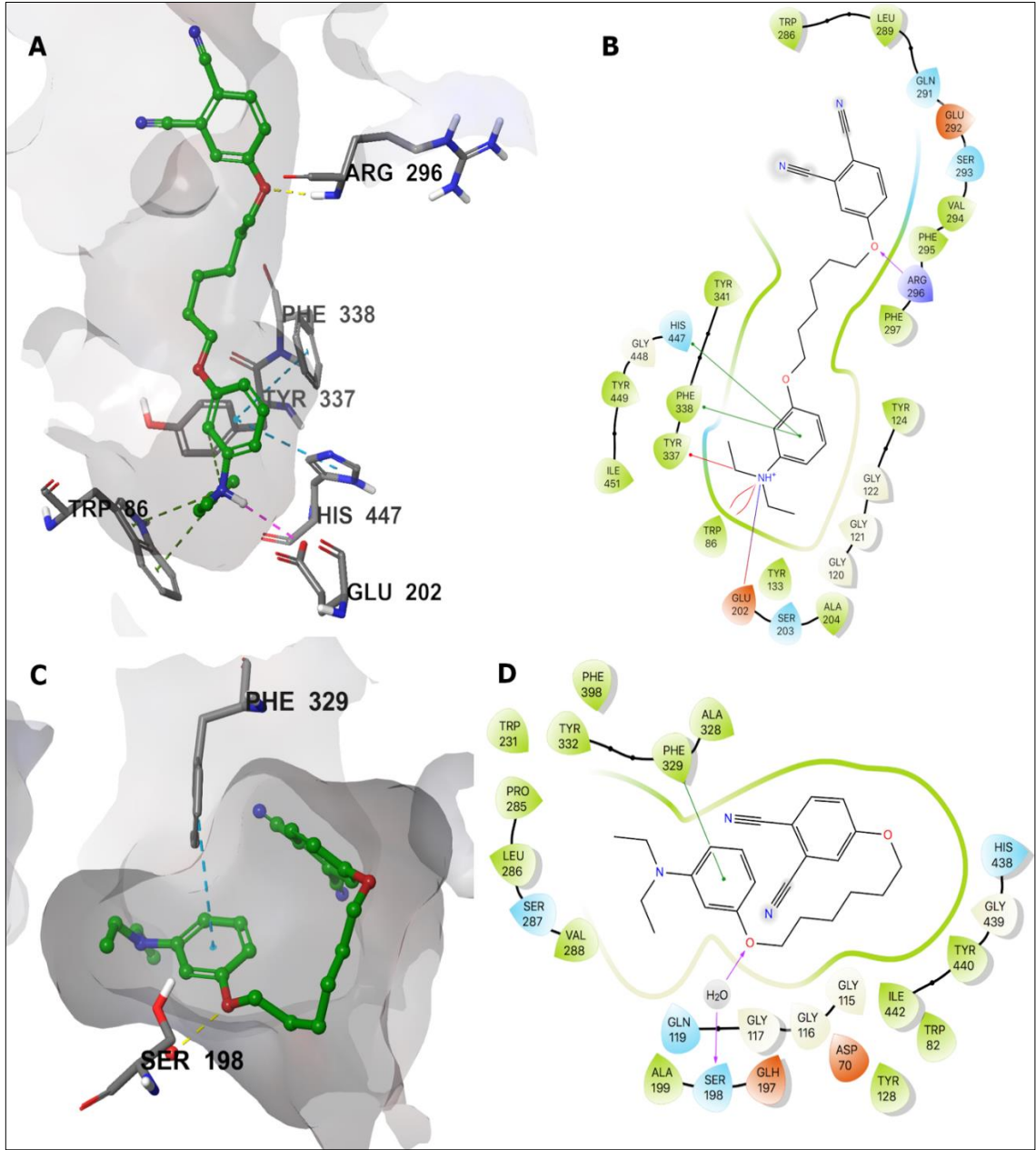
4.1.2. Kolinesteraz Enzimleri ile Moleküler Yerleştirme

DE-C6-CN bileşiği AChE ve BuChE enzimlerinin aktif bölgesine yerleştirilmiştir. Bu aktif bölge periferik (P) ve açılasyon (A) bölgeleri içeren yaklaşık 20 Å derinliğinde bir geçittir. P bölgesi geçitin giriş kısmında yer almaktadır ve substratların aktif bölge içerisine yerleşmesini sağlayan aromatik rezidülerle kaplıdır. A bölgesi ise substratları barındırmak için açıl ve kolin bağlama cepleri bulundurmaktadır. Bu bölgenin derininde substrat hidrolizinden sorumlu olan katalitik üçlü (serin, histidin ve glutamat) ve substratlar ile ara ürünlerini stabilize etmeyi sağlayan oksianyon deliği yer almaktadır (106).

Yerleştirme skorları ve ΔG değerleri DE-C6-CN ve AChE arasında BuChE'den daha güçlü bir afinite olduğunu açıkça göstermiştir (Tablo 5). DE-C6-CN bileşiğinin AChE ile öngörülen bağlanma modu, P bölgesinden geçidin altına kadar uzanan bileşik tarafından aktif bölgenin etkili bir şekilde işgal edildiğini göstermiştir (Şekil 23A). DE-C6-CN bileşiğinin anilin azotu aracılığıyla Trp86 ve Glu202 ile güçlü elektrostatik etkileşimler yaptığı öngörülmüştür. Azotun protonlanması ve Trp86'nın aromatik yan zinciriyle π -katyon etkileşimi yapması, substrattaki azotun yaptığı etkileşim yoluyla stabilize olduğu mekanizmaya benzemektedir. Diğer bir taraftan anilin benzen ise His447 (katalitik üçlü üyesi) ve Phe338 (açıl bağlama cebi) yan zinciri ile etkileşim halindedir. DE-C6-CN bileşiğinin AChE aktif bölgesine bağlanması, P bölgesi rezidüleri ile van der Waals (vdW) temasları yoluyla daha da stabil hale getirilmiştir (Şekil 23B). Ancak BuChE durumunda, bileşiğin anilin azotunun nötr olduğu ve katalitik üçlüye yakın olmadığı tahmin edilmiştir. DE-C6-CN bileşiği açıl ve kolin bağlama ceplerini işgal edecek şekilde bükülmüştür (Şekil 23C). Oksianyon deliği rezidüsü olan Ser198 ile bir hidrojen bağı ve açıl bağlama cebinde bulunan Phe329 ile etkileşim gözlenmiştir (Şekil 23D).

Tablo 5. DE-C6-CN bileşiğinin AChE ve BuChE için yerleştirme skorları ve ΔG değerleri

	Yerleştirme Skoru	ΔG (kcal/mol)
AChE	-11.2	-82.7
BuChE	-6.3	-56.1



Şekil 23. DE-C6-CN bileşiğinin AChE (A ve B) ve BuChE (C ve D) ile moleküler yerleştirme ile tahmin edilen bağlanma etkileşimleri

4.2. Bileşiklerin *in vitro* Kolinesteraz İnhibisyonu

AChE ve BuChE inhibisyonu deneyi sonucunda bileşiklerinin IC_{50} değerleri Microsoft Excel Windows 13 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak galantamin kullanılmıştır. DE-C6-Zn, DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin AChE'ye karşı IC_{50} değerleri sırasıyla $22.63 \pm 1.48 \mu M$, $0.83 \pm 0.26 \mu M$ ve $0.61 \pm 1.05 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. $Zn(CH_3COO)_2$, $NiCl_2$ ve DE-C6-

Ni bileşiklerinin IC₅₀ değerleri 50 µM'dan yüksek olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar incelendiğinde DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin AChE'yi inhibe etme potansiyellerinin yüksek olduğu görülmüştür. BuChE inhibisyonu deneyinin sonucunda ise DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin IC₅₀ değerleri 9.59 ± 0.57 µM ve 10.11 ± 0.87 µM olarak hesaplanırken, diğer bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin 50 µM'ın üstünde olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan galantaminin AChE'ye karşı IC₅₀ değeri 2.54 ± 0.03 µM'dır. BuChE'ye karşı IC₅₀ değeri ise 40.48 ± 0.06 µM olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada iki enzim üzerinde de galantaminden daha yüksek inhibe edici etki gösterdiği ortaya koyulan DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşikleri kinetik analizleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Bileşiklerin AChE ve BuChE üzerinde inhibisyon çalışmaları

	IC ₅₀ (µM)	
	AChE	BuChE
Zn(CH₃COO)₂	>50	>50
NiCl₂	>50	>50
DE-C6-Zn	22.63 ± 1.48	>50
DE-C6-Ni	>50	>50
DE-C6-ZnQ	0.83 ± 0.26	9.59 ± 0.57
DE-C6-NiQ	0.61 ± 1.05	10.11 ± 0.87
Galantamin	2.54 ± 0.03	40.48 ± 0.06

Bileşiklerin AChE ve BuChE'ye karşı selektif indeksleri incelendiğinde DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ sırasıyla 11.55 ve 16.57 olarak bulunmuştur. Standart olarak kullanılan galantamin bileşiğinin selektif indeksi ise 15.93 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 7. Bileşiklerin AChE ve BuChE üzerinde inhibisyon çalışmaları

	SI (BuChE/AChE)
Zn(CH₃COO)₂	-
NiCl₂	-
DE-C6-Zn	-
DE-C6-Ni	-
DE-C6-ZnQ	11.55
DE-C6-NiQ	16.57
Galantamin	15.93

4.3. Bileşiklerin Kinetik Çalışmaları

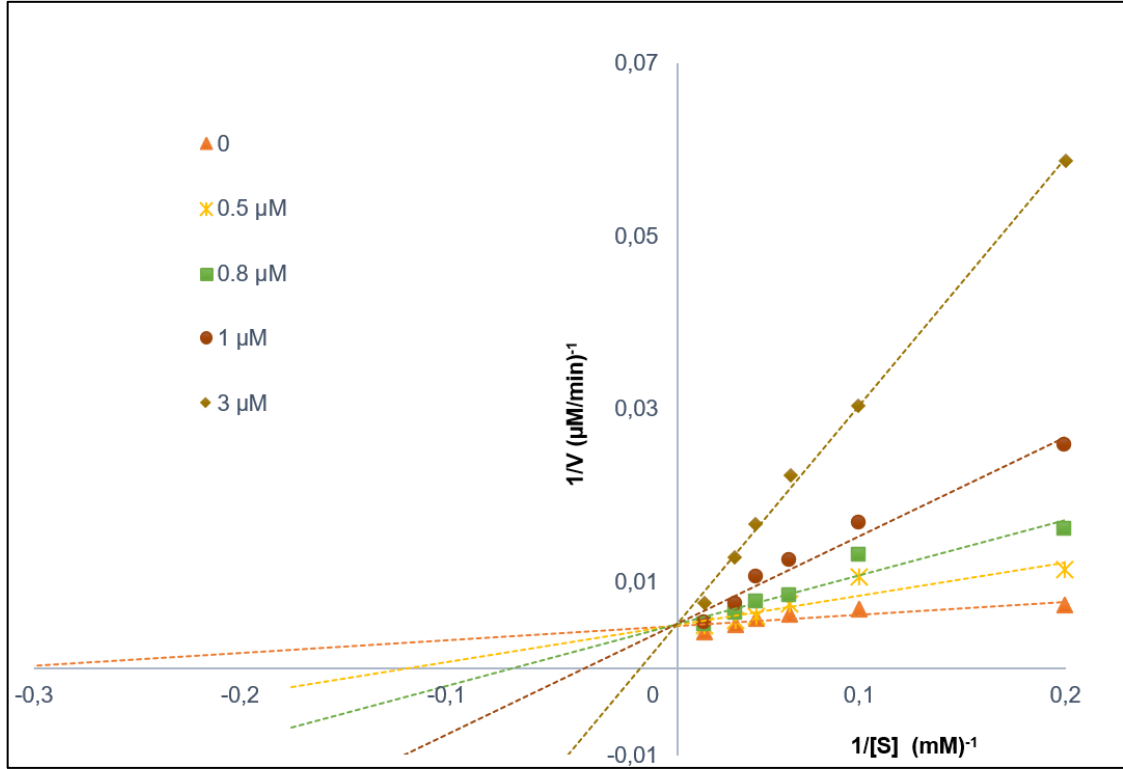
DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin AChE ve BuChE'ye karşı inhibisyon tipleri ve K_i sabitleri Lineweaver-Burk ve Dixon grafikleri kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 8, 9 ve Şekil 24-31'de verilmiştir. Lineweaver-Burk grafiği sonuçlarına göre bileşiklerin AChE ve BuChE'ye karşı yarışmalı inhibisyon özellik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 24-27). DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin AChE'ye karşı K_i değerleri sırasıyla $0.13 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ve $0.30 \pm 0.05 \mu\text{M}$ iken BuChE'ye karşı ise $3.40 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ve $4.80 \pm 0.04 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 8 ve 9, Şekil 28-31).

Tablo 8. Bileşiklerin AChE enzimine karşı kinetik parametreleri

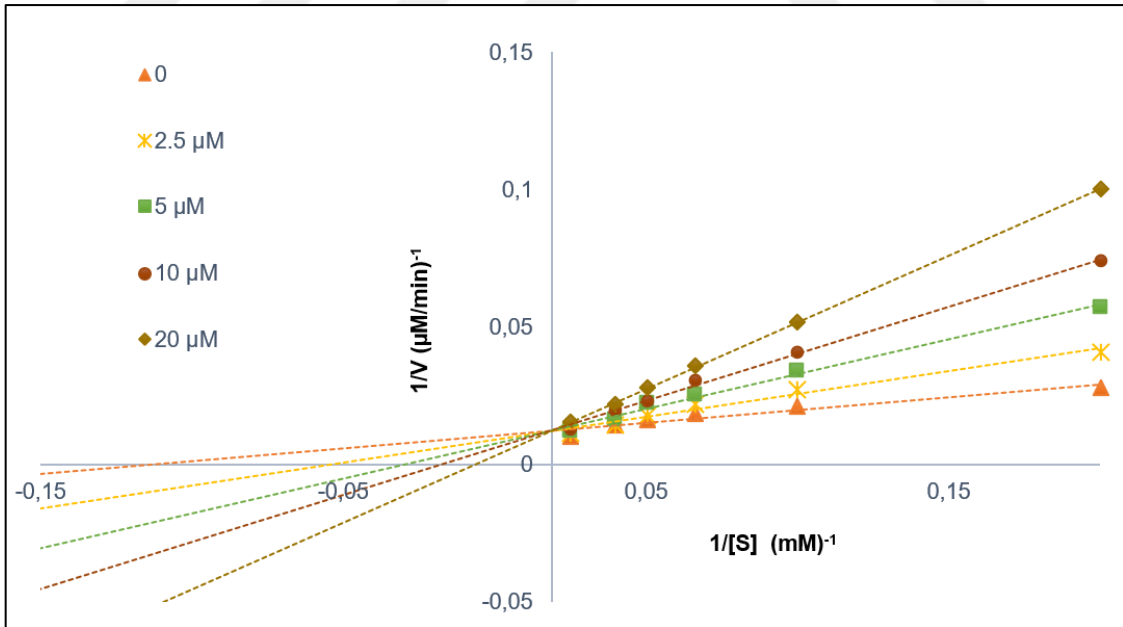
	İnhibisyon Tipi	İnhibisyon Sabiti
DE-C6-ZnQ	Yarışmalı	0.13 ± 0.02
DE-C6-NiQ	Yarışmalı	0.30 ± 0.05

Tablo 9. Bileşiklerin BuChE enzimine karşı kinetik parametreleri

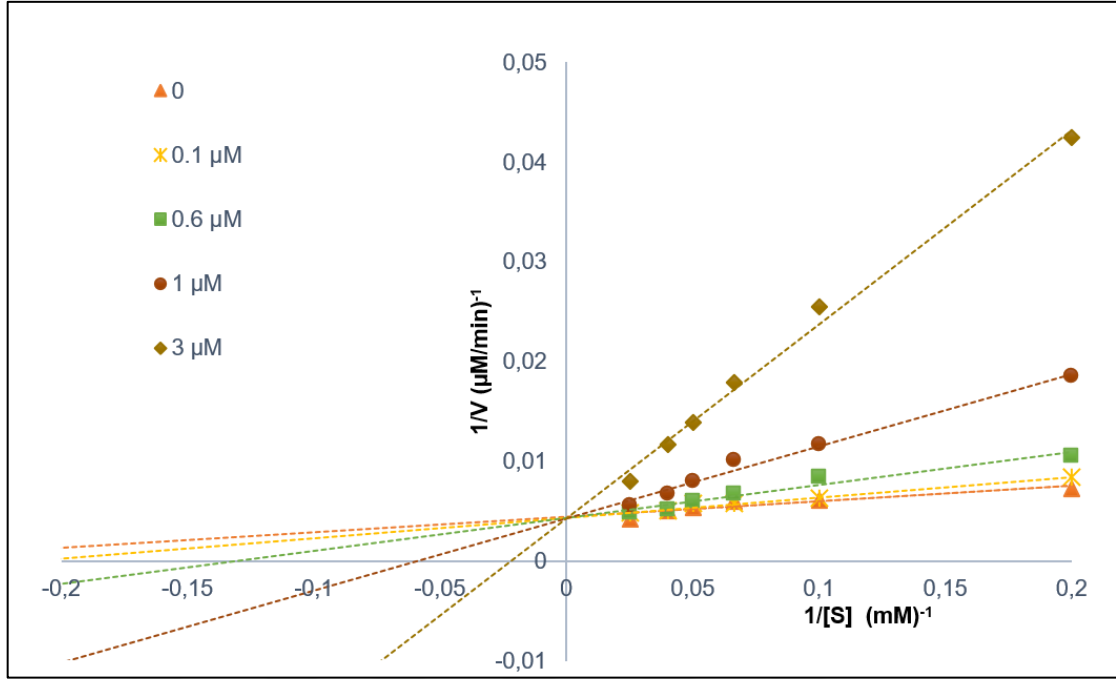
	İnhibisyon Tipi	İnhibisyon Sabiti
DE-C6-ZnQ	Yarışmalı	3.40 ± 0.03
DE-C6-NiQ	Yarışmalı	4.80 ± 0.04



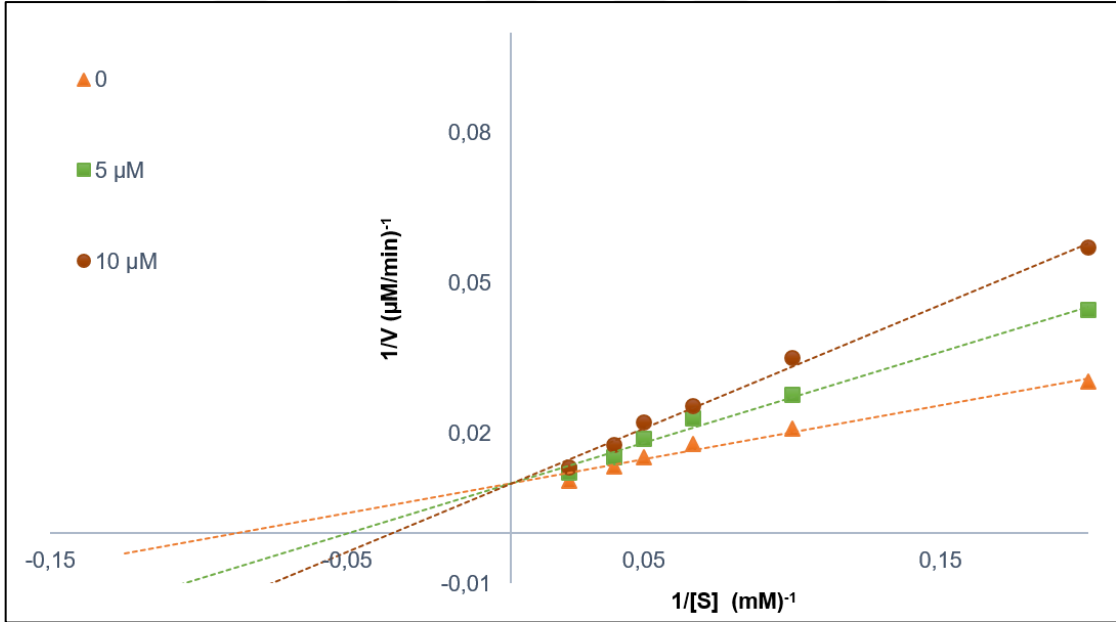
Şekil 24. DE-C6-ZnQ bileşiğinin AChE inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği



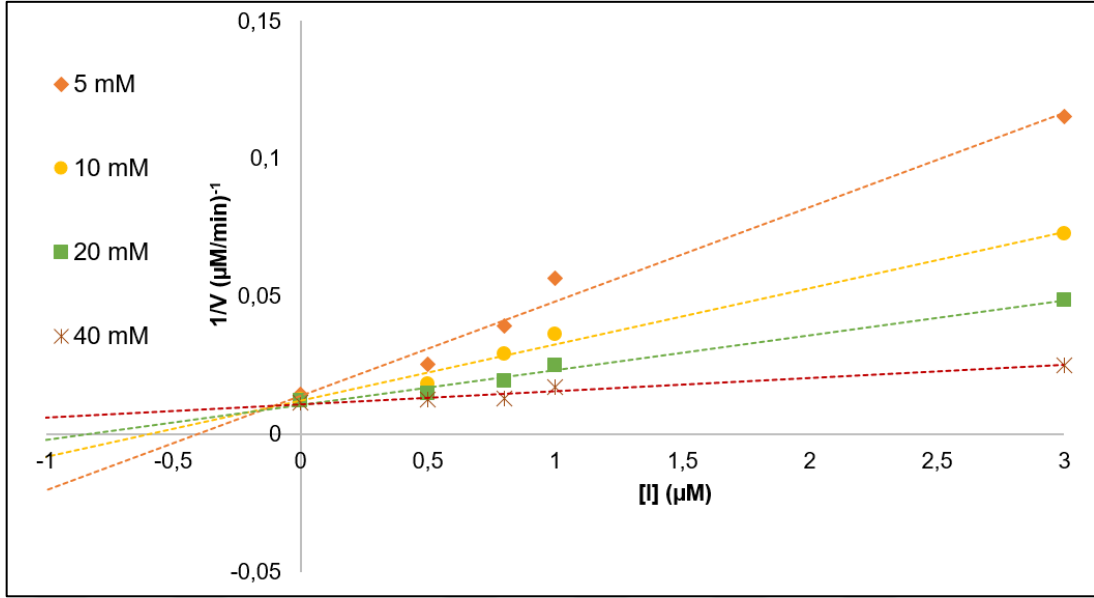
Şekil 25. DE-C6-ZnQ bileşiğinin BuChE inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği



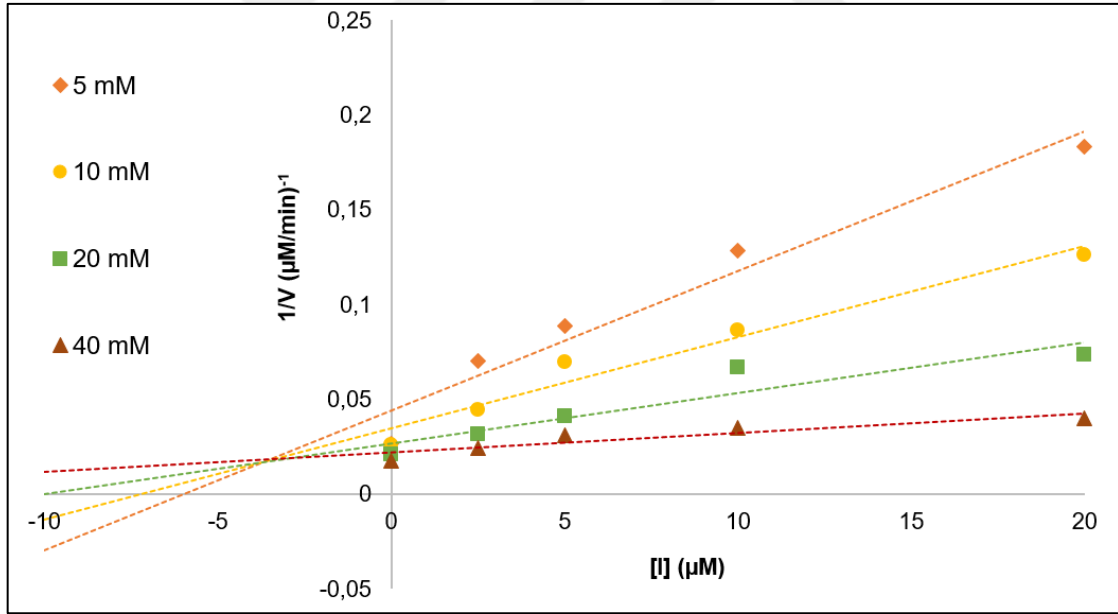
Şekil 26. DE-C6-NiQ bileşiğinin AChE inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği



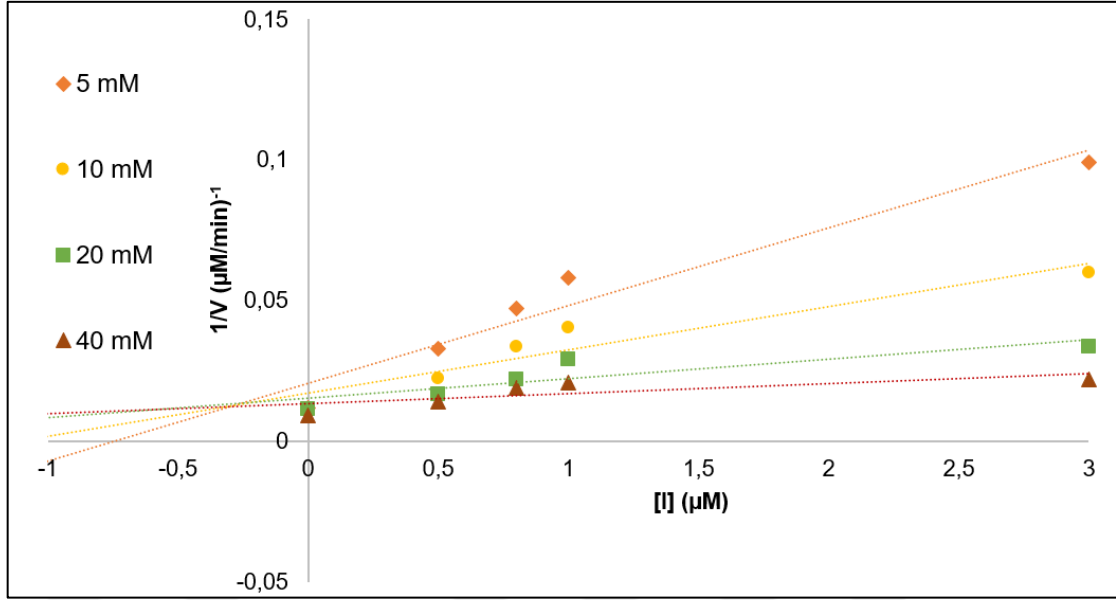
Şekil 27. DE-C6-NiQ bileşiğinin BuChE inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği



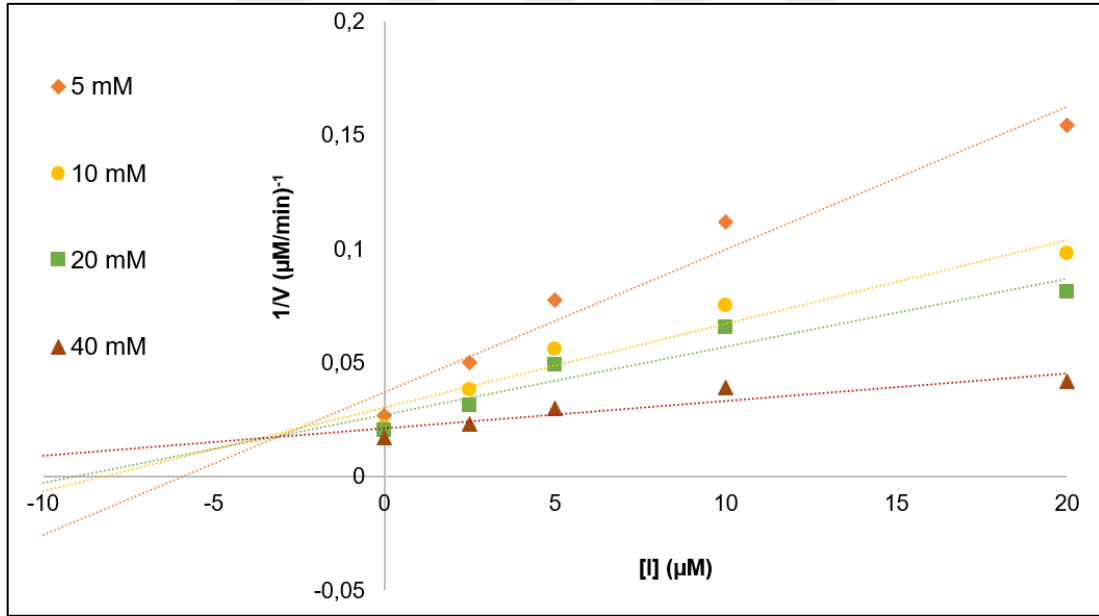
Şekil 28. DE-C6-ZnQ bileşiğinin AChE inhibisyonunun Dixon grafiği (0-0.5-0.8-1-3 μM inhibitör konsantrasyonu)



Şekil 29. DE-C6-ZnQ bileşiğinin BuChE inhibisyonunun Dixon grafiği (0-2.5-5-10-20 μM inhibitör konsantrasyonu)



Şekil 30. DE-C6-NiQ bileşiğinin AChE inhibisyonunun Dixon grafiği (0-0.1-0.6-1-3 μM inhibitör konsantrasyonu)



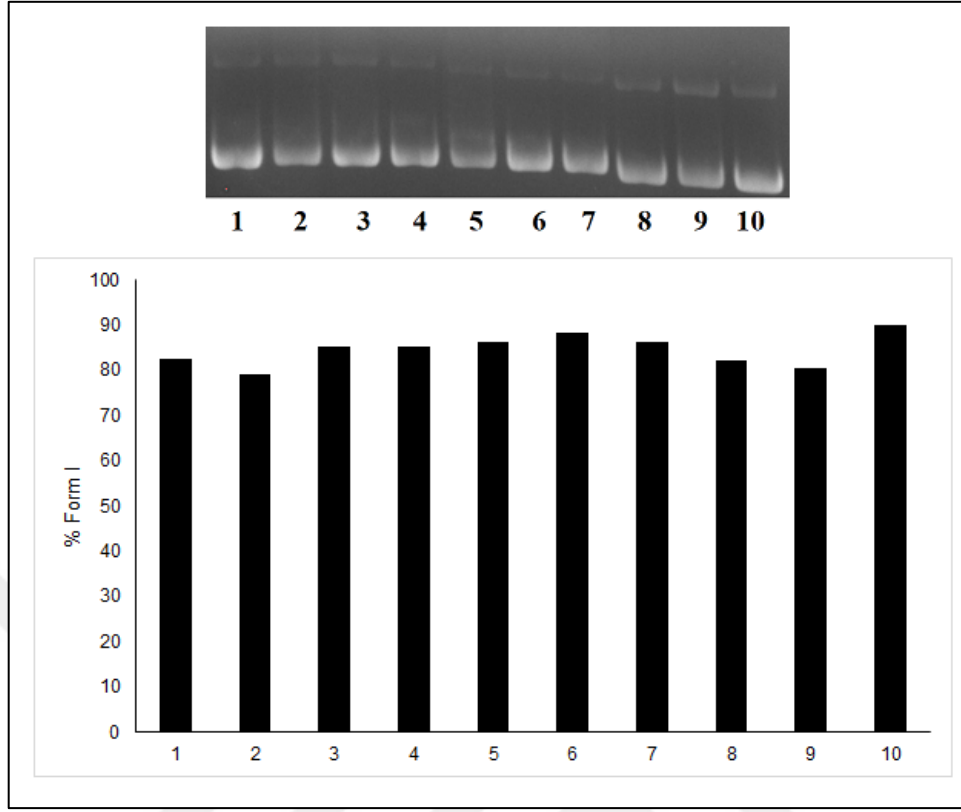
Şekil 31. DE-C6-NiQ bileşiğinin BuChE inhibisyonunun Dixon grafiği (0-2.5-5-10-20 μM inhibitör konsantrasyonu)

4.4. Bileşiklerin Nükleaz Aktivitesi

DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin süpersarmal pBR322 plasmid DNA nükleaz aktivitelerini belirlemek amacıyla agaroz jel elektroforez tekniği kullanılmıştır. Uygun şartların sağlanmasıyla gerçekleştirilen nükleaz reaksiyonları sonrasında elde edilen ürünler BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile analiz edilmiştir.

4.4.1. Bileşiklerin Hidrolitik Nükleaz Aktivitesi

DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin süpersarmal pBR322 plasmid DNA'nın fosfodiester bağlarını hidroliz ederek kesebilme etkinliğini incelemek için hidrolitik nükleaz deneyi yapılmıştır. Bileşiklerin hidrolitik nükleaz aktivitesinin sonuçları Şekil 32'de verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak metilen mavisi kullanılmıştır. DE-C6-ZnQ bileşiği için 100, 50 ve 10 μ M'da dikkate değer nükleaz aktiviteleri gözlenmemiştir. DE-C6-NiQ bileşiğinde de 100, 50 ve 10 μ M'da kayda değer bir nükleaz aktivitesi gözlenmemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan metilen mavisi bileşiğinin varlığında ise çalışılan tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole göre dikkate değer nükleaz aktiviteleri gözlenmemiştir. 37 °C'de 60 dakikalık inkübasyonda bekletilen bu deneyin sonucunda çalışmada kullanılan DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin karanlıkta önemli ölçüde DNA hasarı oluşturmadıkları gözlenmiştir.



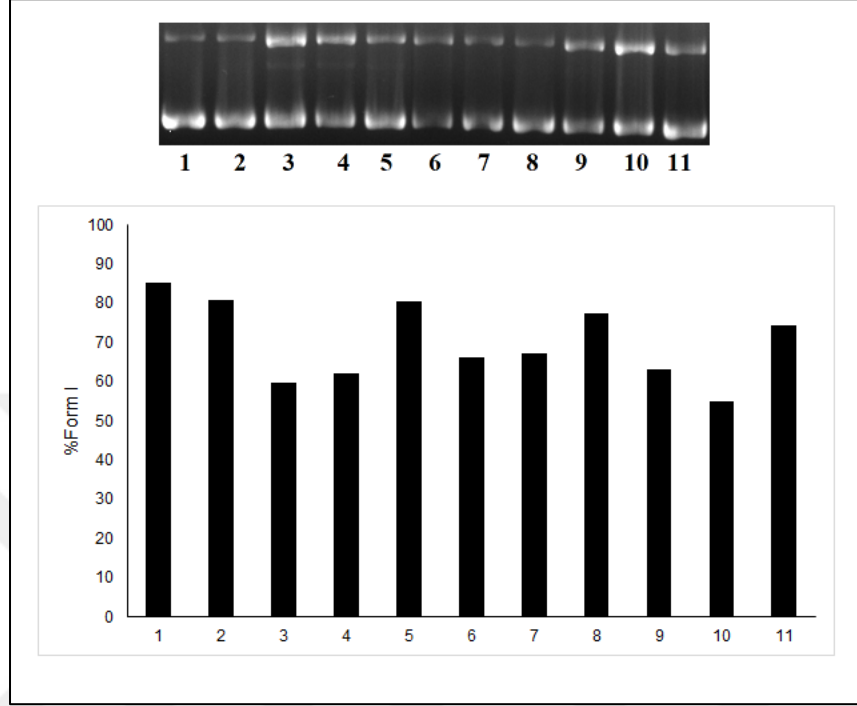
Şekil 32. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi (60 dakika 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2–4: DNA+ DE-C6-ZnQ (100 µM–50 µM–10 µM) + Tampon; bant 5–7: DNA + DE-C6-NiQ (100 µM–50 µM–10 µM) + Tampon; bant 8–10: DNA + metilen mavisi (100 µM–50 µM–10 µM) + Tampon.

4.4.2. Bileşiklerin Oksidatif Nükleaz Aktivitesi

DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin hidrolitik aktivitelerinin belirlenmesinin ardından oksidatif nükleaz etkilerinin incelenmesi için nükleaz reaksiyonları %2 (h/h) H₂O₂ ajanının ilavesiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların sonucu Şekil 33'te verilmiştir. Kullanılan bu ajan, DNA'ya tek başına ilave edildiğinde herhangi bir nükleaz aktivitesi göstermemiştir, ancak bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarıyla (100 ve 50 µM) birlikte ilave edildiklerinde negatif kontrole göre yüksek bir nükleaz özellik göstermişlerdir.

Ortamda H₂O₂ varlığında bileşiklerin 100 ve 50 µM konsantrasyonlarında negatif kontrole göre hasar gözlenirse de düşük konsantrasyonda herhangi bir hasar etkisi gözlenmemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan metilen mavisi varlığında ise 100, 50 µM'da bant yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ

bileşiklerinin ajan varlığında düşük konsantrasyonda dikkate değer oksidatif nükleaz aktivitesine sahip olmadığı gösterilmiştir.

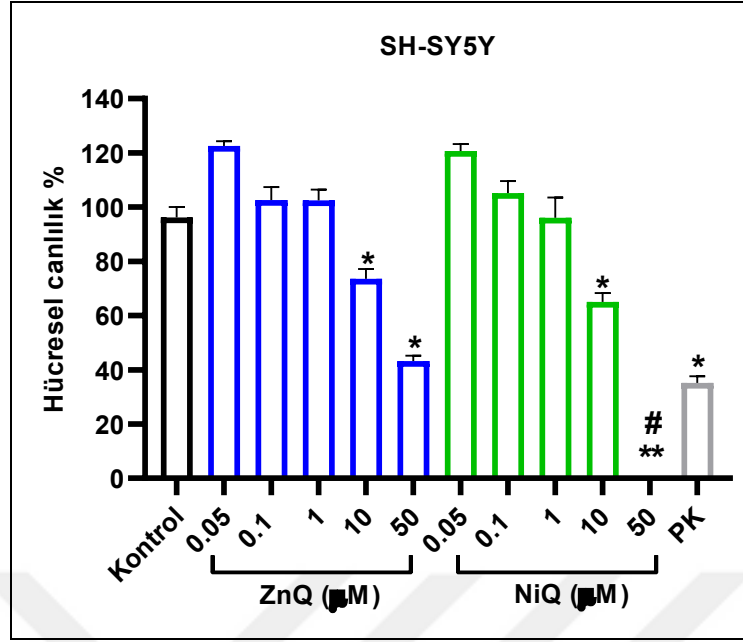


Şekil 33. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA oksidatif nükleaz aktivitesi (60 dakika 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2: DNA + %2 H₂O₂ + Tampon; bant 3–5: DNA + %2 H₂O₂ + Tampon + DE-C6-ZnQ (100 µM–50 µM–10 µM); bant 6–8: DNA+ %2 H₂O₂ + Tampon + DE-C6-NiQ (100 µM–50 µM–10 µM); bant 9–11: DNA +%2 H₂O₂ + Tampon + metilen mavisi (100 µM–50 µM–10 µM).

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.5.1. *In vitro* Sitotoksikite Çalışmaları

DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin SH-SY5Y hücre hattına karşı sitotoksik etkileri MTT hücre canlılık testiyle incelenmiştir. Çalışmaların sonuçları Şekil 34’te verilmiştir.



Şekil 34. DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin SH-SY5Y hücre hattındaki sitotoksosite profili. Kontrol ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; DE-C6-ZnQ (50 μM) ve DE-C6-NiQ (50 μM) # $p < 0.001$. Kontrol: Negatif kontrol (DMSO %0.5, h/h); PK: Pozitif kontrol (DMSO %20, h/h).

DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin sitotoksosite profillerini değerlendirmek için, bileşikler SH-SY5Y hücrelerine 24 saat boyunca 0.05–50 μM arasında uygulanmıştır. Bulgularımıza göre DE-C6-NiQ, SH-SY5Y hücre hattında DE-C6-ZnQ'dan daha güçlü bir sitotoksosite profili sergilemiştir ve bu durum en yüksek deneysel doz olan 50 μM 'de (Şekil 34) dikkat çekicidir ($p < 0.001$). Ayrıca, DE-C6-ZnQ bileşiği 0.05–1 μM dozlarında %122.60 $\pm$ 1.73, %102.62 $\pm$ 4.81 ve %102.47 $\pm$ 4.00 şeklinde SH-SY5Y hücre canlılığını negatif kontrole (%96.18 $\pm$ 3.84) göre artırmıştır. DE-C6-NiQ bileşiği ise 0.05 ve 0.1 μM dozlarında hücre canlılığını %120.65 $\pm$ 2.60 ve %105.17 $\pm$ 4.43 düzeyine kadar artırmıştır. Hücre canlılığı sonuçlarına göre, DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 41.84 $\pm$ 0.99 μM ve 19.45 $\pm$ 2.07 μM olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Demansın en yaygın türü olan AH, davranış bozukluğu ve hafıza ile zekanın kademeli olarak bozulması ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır (1). DSÖ, dünya çapında 48.6 milyondan fazla insanın bu hastalıkla yaşadığını tahmin etmektedir (6). Dünyada yaşlanan nüfus sayısının artması, kronik dejeneratif hastalıkların, merkezi sinir sistemi hasarının ve AH gibi demansın görülme sıklığını artırmaktadır (7). AH'nin patolojik özellikleri temel olarak beyinde senil plak birikimi, nöronların ve sinapsların kaybı ve asetilkolin eksikliği ile karakterizedir. Günümüzde, AH için kolinerjik hipotez, Aβ birikimi hipotezi, tau proteini hipotezi ve oksidatif stres hipotezi gibi birçok hipotez ortaya konulmuştur, ancak AH'nin kesin patogenezi hala belirsizliğini korumaktadır (9). Bu hastalıkta ilaç keşfi, nörotransmitter olan asetilkolin (ACh) seviyelerinin anormal olduğunun tespit edilmesiyle başlamıştır. ACh, sinaptik iletişimde önemli bir rol oynar ve AH ile olası bir ilişkisi vardır. Bu ilişki, sinaptik ACh konsantrasyonunu artırmak amacıyla AChE aktivitesinin inhibisyonu ile gerçekleştirilmiştir (69).

Bu çalışmada suda çözünebilen periferik tetra-({6-[3-(dietilamonyum)fenoksi]heksil}oksi substitüe çinko ve nikel ftalosiyanın (DE-C6-ZnQ ve n-DE-C6-NiQ) bileşiklerinin AH tedavisinde ilaç olma potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak kompleksin sentezinin gerçekleşmesini sağlayan ligand olan DE-C6-CN bileşiğinin AChE ve BuChE enzimlerine karşı moleküler kenetleme çalışması gerçekleştirilmiştir.

DE-C6-CN bileşiğinin ilaç özelliği değerlendirildiğinde kabul edilebilir moleküler ağırlık, polarite ve sulu çözünürlüğün yanı sıra dengeli bir doymuş karbon oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. DE-C6-CN bileşiğinin lipofilikliği sınır çizgisindeyken, dönebilen bağ sayısı ilaç olma aralığının dışında olduğu görülmüştür ve bunun da yapısal modifikasyonlarla optimize edilebilir olduğu tespit edilmiştir. DE-C6-CN, SwissADME tarafından sağlanan tanımlayıcılara ilişkin Lipinski'nin beş kuralına göre de ilaca benzerliği yüksek çıkmıştır. Buna ek olarak, DE-C6-CN bileşiğinin yüksek oranda oral olarak emildiği ve eflüks pompası (P-gp) için bir substrat olmadığı tahmin edilmiştir. Moleküller yerleştirme çalışmalarında metal komplekslerinin kullanımında yaşanan zorluklar nedeniyle bu çalışmada yalnızca başlangıç bileşiğine ait çalışmalar gerçekleştirilmiştir. DE-C6-CN bileşiği antikolinesteraz potansiyeli ve bunların moleküler mekanizmaları hakkında bilgi sağlamak için kolinesteraz aktif bölgesine yerleştirilmiştir. Kolinesteraz aktif bölgesi

yaklaşık 20 Å derinliğinde bir geçittir ve periferik ve açılasyon bölgelerinden (sırasıyla P bölgesi ve A bölgesi) oluşur. P bölgesi geçitin giriş kısmında yer almaktadır ve substratların aktif bölge içerisine yerleşmesini sağlayan aromatik rezidüleriyle kaplıdır. A bölgesi ise substratları barındırmak için açıl ve kolin bağlama cepleri bulundurmaktadır. Bu bölgenin derininde substrat hidrolizinden sorumlu olan katalitik üçlü (serin, histidin ve glutamat) ve substratlar ile ara ürünlerini stabilize etmeyi sağlayan oksianyon deliği yer almaktadır (106). Yerleştirme skorları ve serbest bağlanma enerjisi (ΔG) değerleri DE-C6-CN bileşiği ile AChE arasında BuChE'den daha güçlü bir afinite olduğunu açıkça göstermiştir. DE-C6-CN bileşiğinin AChE ile öngörülen bağlanma modu, P bölgesinden geçidin altına kadar uzanan molekül tarafından aktif bölgenin etkili bir şekilde işgal edildiğini göstermiştir. DE-C6-CN bileşiğinin anilin azotu aracılığıyla Trp86 ve Glu202 ile güçlü elektrostatik etkileşimler öngörülmüştür. Protonlanan ve Trp86'nın aromatik yan zinciriyle π -kasyon etkileşimi yapan azot, AChE'nin açılasyon mekanizmasından bilindiği gibi oldukça benzer bir şekilde konumlanır ve burada kolin nitronyum aracılığıyla aynı etkileşim yoluyla stabilize edilir. Öte yandan anilin benzen, His447 (katalitik üçlü üyesi) ve Phe338 (açıl bağlama cebi) yan zinciri ile istiflenmiştir. DE-C6-CN bileşiğinin AChE aktif bölgesine bağlanması, P bölgesi kalıntıları ile esas olarak van der Waals (vdW) etkileşimleri yoluyla daha da stabilize edilmiştir. BuChE'de ise, anilin azotunun nötr olduğu ve katalitik triada yakın olmadığı tahmin edilmiştir. Molekül esas olarak açıl ve kolin bağlama ceplerini işgal edecek şekilde bükülmüştür. Bir oksianyon deliği kalıntısı olan Ser198 ile H bağı ve açıl bağlama cebinde bulunan Phe329 ile istiflenme gözlenmiştir.

Bu çalışmada, nitril bileşiğinin enzimlerle etkileşimine ilişkin veriler elde edildikten sonra, bileşiklerin AChE/BuChE üzerindeki *in vitro* inhibitör etkileri spektroskopik bir yöntem olan Ellman metodu kullanılarak araştırılmıştır. Öncelikle çalışmada kullanılan metal tuzlarının enzim inhibisyon etkileri incelenmiş ve her iki tuzun IC_{50} değerlerinin 50 μM 'ın üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerin tersiyer amonyum formları (DE-C6-Zn ve DE-C6-Ni) incelendiğinde ise sadece DE-C6-Zn bileşiğinin AChE enzimine karşı IC_{50} değerinin $22.63 \pm 1.48 \mu M$ olduğu, DE-C6-Ni bileşiğinin ise IC_{50} değerlerinin hem AChE hem de BuChE enzimlerine karşı 50 μM 'ın üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Kuarternize amonyum tuzları türevli bileşikler olan DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin AChE ve BuChE enzimlerine karşı etkileri incelendiğinde pozitif kontrol olarak kullanılan galantamin bileşiğinden daha güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. AChE enzimine karşı DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin IC_{50} değerleri $0.83 \pm 0.26 \mu M$ ve $0.61 \pm 0.15 \mu M$

olarak bulunmuştur. Her iki bileşik de AChE'ye karşı galantamine göre yaklaşık 3.06 ve 4.16 kat daha yüksek inhibitör etki göstermiştir. Ayrıca, DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşikleri, pozitif kontrolle karşılaştırıldığında BuChE'ye karşı istatistiksel olarak anlamlı inhibitör özelliklere sahiptir. DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin SI değerleri sırasıyla 11.55 ve 16.57 olarak hesaplanmıştır. Galantaminin SI değeri DE-C6-ZnQ bileşiğinden daha yüksek ancak DE-C6-NiQ bileşiğinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. AChE ve BuChE üzerinde en iyi inhibitör etkileri gösteren bileşiklerin kinetik parametreleri Lineweaver-Burk ve Dixon grafikleri kullanılarak incelenmiştir. Lineweaver-Burk grafiği, Michaelis-Menten eşitliğinin çift taraflı ters çevrilmesiyle elde edilen bir grafikdir. Michaelis-Menten bağıntısı enzimler için uyarlandığında $1/V_0$ 'a karşılık $1/[S]$ grafiği çizildiğinde lineer bir çizgi elde edilir. Bu çizginin eğimi K_m/V_{max} , $1/V_0$ eksenini kestiği yer $1/V_{max}$ ve $1/[S]$ eksenini kestiği yer ise $-1/K_m$ 'ye karşılık gelmektedir. Doğrunun eğimi K_m/V_{max} 'a eşittir. Bu grafik, bir enzimin bir inhibitöre nasıl bağlandığını belirlemenin en kolay yoludur (107). Sonuçlar, DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin her iki enzimi de yarışmalı bir şekilde inhibe ettiğini açıkça göstermiştir. İnhibitör ve substrat konsantrasyonları artırıldığında, enzimin V_{max} değerinin değişmediği, ancak K_m değerinin arttığı gözlenmiştir. Bu durum, inhibitörün enzimin substratına benzer yapısal özellikler gösterdiğini ve aktif bölgeye bağlanmak için onunla yarıştığını ortaya koymuştur. Öte yandan, Dixon grafiği, inhibitör sabitini (K_i) belirlemek için $[I]$ ile $1/V_0$ 'nun grafiği çizilerek oluşturulmuştur. İnhibisyon tipini değerlendirmek için inhibitör konsantrasyonlarına denk gelen $1/V_0$ değerleri için lineer bir doğru oluşturacak şekilde grafik çizilir ve bu işlem substratın farklı konsantrasyonları için de tekrarlanarak grafik çizgilerinin kesişim noktasında x eksenine karşılık gelen değer K_i 'yi vermektedir (108). Bu hesaplama doğrultusunda, DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin K_i değerleri AChE üzerinde $0.13 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ve $0.30 \pm 0.05 \mu\text{M}$ iken, BuChE için K_i değerleri sırasıyla $3.40 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ve $4.80 \pm 0.04 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Koçyiğit ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada periferik 1,2,3-triazol grubu süstitüe Zn (II), Mn (III), Ni (II), Cu (II), Co (II) ftalosiyanın türevleri sentezlenmiş ve bu bileşiklerin AChE inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bileşiklerin AChE enzimine karşı $40.11 \pm 5.61 - 78.27 \pm 15.42 \text{ mM}$ aralığında K_i değerleri olduğu raporlanmıştır (81). Bir başka çalışmada ise, 2021 yılında Güzel ve arkadaşları tarafından furan-2-ilmetoksi süstitüe Zn (II), In (III), Ga (III), Cu (II), Mn (II) ftalosiyanın bileşiklerinin kolinesteraz enzim inhibisyon özellikleri incelenmiştir. AChE ve BuChE enzimlerine karşı yarışmalı inhibisyon gösteren bileşiklerden en yüksek inhibisyon gösteren bileşiğin Cu (II) kompleksi olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşiğin AChE ve BuChE

enzimlerine karşı K_i değerleri sırasıyla $11.17 \pm 1.03 \mu\text{M}$ ve $7.55 \pm 0.98 \mu\text{M}$ olarak tespit edilmiştir (89). Demirbaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 4-{2-(2-tiyenil)etoksi}ftalonitril ve bunun tetra sübstitüe periferale metallsiz, Pb (II), Mg (II) ve Co (II) ftalosiyeninleri sentezlenmiştir. Bu çalışmada, bileşiklerin AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda kullanılma potansiyelini belirlemek için ftalosiyeninlerin kolinesteraz inhibitör özellikleri araştırıldığında Co (II) kompleksi, sırasıyla 23.71 ± 0.39 ve $27.29 \pm 0.22 \mu\text{M}$ IC_{50} değerleri ile AChE ve BuChE enzimlerine karşı en güçlü inhibitör etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Lineweaver–Burk grafiği incelendiğinde, Co (II) kompleksinin AChE enzimine karşı yarışmasız inhibitör, BuChE enzimine karşı ise yarı yarışmalı inhibitör özellik göstermiştir (91). 2019 yılında Demirbaş ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, periferale tetra sübstitüe metallsiz, Pb (II), Ni (II) ve Co (II) ftalosiyeninlerin AChE/BuChE inhibitör etkileri nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde bileşiklerin terapötik potansiyelini belirlemek için incelenmiştir. Ni (II) kompleksi, $65.04 \pm 0.82 \mu\text{M}$ IC_{50} değeri ile AChE'ye karşı en yüksek inhibitör etkiye sahipken, Pb (II) kompleksi ise, $46.23 \pm 0.78 \mu\text{M}$ IC_{50} değeri ile en güçlü BuChE inhibitör etki göstermiştir. Kinetik analizler sonucunda, bu iki kompleksinde AChE/BuChE'yi artan substrat konsantrasyonları varlığında sabit V_{max} değeri ve artan K_m değerleri ile yarışmalı inhibitör özellik göstererek inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Bileşiklerin K_i değerleri AChE'ye karşı 28.23 ± 0.30 ve $31.04 \pm 0.50 \mu\text{M}$, BuChE'ye karşı 16.13 ± 0.44 ve $94.20 \pm 1.40 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Tüm bu sonuçlar ftalosiyenin bileşiklerinin sentezinde kullanılan metal iyonlarının ve ligandlarının kolinesteraz enzimleri üzerinde etki yarattığını ortaya koymaktadır. Çalışmamızda kullanılan tetra-({6-[3-(diethylamonyum)fenoksi]heksil}oksi sübstitüe ligandının bu enzimler üzerinde önemli inhibitör etki gösterdiği anlaşılmıştır.

Ftalosiyeninler dışında sentezlenen diğer bileşiklerde kullanılan nikel ve çinko metallerinin AChE ve BuChE enzim inhibisyonu çalışmaları incelendiğinde Ajayeoba ve arkadaşlarının 2019 yılında 3-hidroksibenzaldehit-4-nitrobenzoik asit hidrazon, Ni (II) ve Cu (II) komplekslerinin AChE inhibisyon aktivitesine bakıldığında ligandın aktivitesi $190 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ olarak ölçülmüştür. Cu (II) kompleksi $220 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ değerine sahipken, Ni (II) kompleksi $390 \pm 80 \mu\text{g/mL}$ ile en düşük inhibitör değere sahiptir (109). Huseynova ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise tiyosemikarbazon glioksalik asit ile yeni bir Zn (II) koordinasyon polimeri sentezlenmiştir ve bu kompleks, BuChE ve AChE enzimlerine karşı etkili bir inhibitör özellik göstermiştir. Zn kompleksinin K_i değerleri sırasıyla BuChE için $0.47 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ve AChE için $0.58 \pm 0.13 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır (110). Tüm bu sonuçlar

metal iyonlarının ve kullanılan bileşiklerin kolinesteraz enzimleri üzerindeki etkilerini göstermiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan Ni ve Zn metal komplekslerinin bu enzimler üzerindeki inhibitör etkilerinin kullanılan ligandlarla güçleneceği anlaşılmıştır.

Oksidatif stres, yaşlanmanın doğal bir parçası ve AH'deki önemli bir patolojik özelliktir, bu da bilişsel gerilemeye katkı sağlayabilir. AH riskine katkıda bulunan bir dizi faktör mevcuttur, bunlar arasında DNA hasarı da bulunmaktadır. DNA hasarı, onarımı ve yaşlanma arasında karmaşık bir ilişki bulunmaktadır. AH'de artan DNA hasarı ve yaşa bağlı olarak azalan DNA onarımı, hastalığın ilerlemesini şiddetlendirebilir. Ayrıca, çeşitli DNA hasarı türlerinin nörodejenerasyon ile ilişkilendirildiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle, araştırmaların DNA hasarı, onarımı ve AH dahil yaşa bağlı hastalıklar arasındaki ilişkiye odaklanması önemlidir (111). Bileşiklerin nükleaz aktivitesini tespit etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntem olan agaroz jel elektroforezi, çözünmüş biyomoleküllerin elektrik yüklerine oranla belirlenen hızda bir elektrik alanında göç etmelerine dayanmaktadır (112). Bu yöntem, genellikle molekülün büyüklüğü, şekli ve kimyasal yapısı gibi faktörlerden etkilenen moleküler göç prensibine dayanmaktadır. Elektrik alandaki moleküler göç, DNA'nın negatif yüklü olmasından kaynaklanarak, DNA'nın elektrik alanına yerleştirildiğinde anoda doğru hareket etmesiyle gerçekleşir. Bu göç sürecine elektrik alanın gücü, agaroz jel ve tamponun yoğunluğu ve DNA'nın büyüklüğü gibi çeşitli faktörler etki etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında ftalosiyanın bileşiklerinin nükleaz aktivitesi süpersarmal pBR322 plazmid DNA kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı bileşiklerin toksik etkileri üzerinde ön bir çalışma gerçekleştirmektir. Elektroforezde süpersarmal pBR322 plazmid DNA'nın göç özellikleri incelendiğinde, süpersarmal formun en hızlı hareket ettiği bilinmektedir. Maddelerle etkileşim sonucunda tek bir zincirde hasar meydana geldiğinde kırık form oluşmakta olup jel üzerinde en yavaş hareket eden form olma özelliğine sahiptir. Eğer maddeler ve bileşikler arasındaki maruziyet sonucunda çift zincirde hasar meydana gelirse, bu durumda lineer form adı verilen bir form oluşur. Oluşan bu form, genellikle süpersarmal ve kırık formların arasında yer alacak şekilde göç etmektedir (112). Bu çalışma kapsamında bileşiklerin ilk olarak DNA hidrolitik nükleaz etkileri incelendiğinde hem DE-C6-ZnQ hem de DE-C6-NiQ bileşikleri için 100, 50 ve 10 μM 'da dikkate değer nükleaz aktivite gözlenmemiştir. DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin hidrolitik nükleaz etkinliklerinin incelenmesinin ardından oksidatif nükleaz etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada oksidatif ajan olarak %2 (h/h) H_2O_2 kullanılmıştır. Kullanılan bu ajan, DNA'ya tek başına ilave edildiğinde herhangi bir nükleaz aktivitesi göstermemiştir,

ancak bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarıyla (100, 50 μ M) birlikte ilave edildiklerinde negatif kontrole göre yüksek bir nükleaz özellik göstermişlerdir. Ortamda H_2O_2 varlığında bileşiklerin 100 ve 50 μ M konsantrasyonlarında negatif kontrole göre hasar gözlenirse de düşük konsantrasyonda herhangi bir hasar etkisi gözlenmemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan metilen mavisi varlığında ise 100, 50 μ M’da bant yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin ajan varlığında düşük konsantrasyonda dikkate değer oksidatif nükleaz aktivitesine sahip olmadığı gösterilmiştir.

Bileşiklerin sitotoksik etkileri, hücre morfolojisinin bozulması, hücre büyüme hızında azalma veya hücre ölümü değerlendirilerek hücre kültürü sistemleri üzerinde *in vitro* olarak test edilmiştir. MTT testi, metabolizmanın canlılığına dayalı sitotoksisiteyi ölçmek için uygulanan nicel bir kolorimetrik yöntemdir. Bu yöntem hızlı, kolay ve yüksek doğruluğa sahiptir. Bu çalışmanın esası bir tetrazolyum tuzu olan sarı renkli MTT bileşiğinin, canlı hücrelerde Krebs döngüsü enzimlerinden olan süksinat dehidrojenaz tarafından parçalanarak mor renkli suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşümüdür. Bu kristallerin, DMSO ve izopropanol gibi organik bir çözücüde çözünmesi sonucu spektrofotometrik olarak ölçüm gerçekleştirilmektedir. Ölçülen absorbansın hücre canlılığı ilişkisi olduğu bilinmektedir (104). Bu çalışmada, DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin SH-SY5Y hücre hattına karşı sitotoksik etkileri MTT hücre canlılık testi kullanılarak araştırılmıştır. DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin sitotoksisite profillerini değerlendirmek için bileşikler SH-SY5Y hücrelerine 24 saat boyunca 0.05-50 μ M arasında uygulanmıştır. Bulgularımıza göre DE-C6-NiQ bileşiği, SH-SY5Y hücreleri için DE-C6-ZnQ bileşiğinden daha sitotoksik olduğu görülmüştür. Ayrıca, her iki bileşiğin 0.05–0.1 μ M konsantrasyonlarında SH-SY5Y hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Hücre canlılığı sonuçlarına göre DE-C6-ZnQ ve DE-C6-NiQ bileşiklerinin IC_{50} değerleri sırasıyla $41.84 \pm 0.99 \mu$ M ve $19.45 \pm 2.07 \mu$ M olarak bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen IC_{50} değerleri göz önüne alındığında, DE-C6-ZnQ bileşiğinin daha yüksek IC_{50} değerinin olması, bu bileşik ile bu konsantrasyonlara kadar güvenle çalışılabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, DE-C6-ZnQ bileşiğinin AChE/BuChE enzimi inhibitörü olarak, AH tedavisinde kullanılma potansiyelinin daha yüksek olduğu fikrini oluşturmaktadır. Bu araştırmanın devamında bileşiklerin AH’de rol oynadığı düşünülen diğer hipotezlere karşı etkinliğinin araştırılması ve bileşiklerin kan beyin bariyerini geçebilme ihtimallerinin incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Park HJ, Kwon H, Lee JH, Cho E, Lee YC, Moon M, Jung JW (2020). β -Amyrin ameliorates Alzheimer's disease-like aberrant synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Biomolecules and Therapeutics* 28(1): 74.
2. Hafez HS, Ghareeb DA, Saleh SR, Abady MM, El Demellawy MA, Hussien H, Abdel-Monem N (2017). Neuroprotective effect of ipriflavone against scopolamine-induced memory impairment in rats. *Psychopharmacology* 234: 3037–3053.
3. Osborn LM, Kamphuis W, Wadman WJ, Hol EM (2016). Astroglialosis: an integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 144: 121–141.
4. Garabadu D, Verma J (2019). Exendin-4 attenuates brain mitochondrial toxicity through PI3K/Akt-dependent pathway in amyloid beta (1–42)-induced cognitive deficit rats. *Neurochemistry International* 128: 39–49.
5. Semwal BC, Garabadu D (2020). 5-N-ethyl Carboxamidoadenosine stimulates adenosine-2b receptor-mediated mitogen-activated protein kinase pathway to improve brain mitochondrial function in amyloid beta-induced cognitive deficit mice. *NeuroMolecular Medicine* 22(4): 542–556.
6. Morales I, Cerda-Troncoso C, Andrade V, Maccioni RB (2017). The natural product curcumin as a potential adjuvant in Alzheimer's treatment. *Journal of Alzheimer's Disease* 60(2): 451–460.
7. Foveau B, Correia AS, Hébert SS, Rainone S, Potvin O, Kergoat MJ, LeBlanc AC (2019). Stem cell-derived neurons as cellular models of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 67(3): 893–910.
8. Puangmalai N, Thangnipon W, Soi-Ampornkul R, Suwanna N, Tuchinda P, Nobsathian S (2017). Neuroprotection of N-benzylcinnamide on scopolamine-induced cholinergic dysfunction in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neural Regeneration Research* 12(9): 1492.
9. Thompson KJ, Tobin AB (2020). Crosstalk between the M1 muscarinic acetylcholine receptor and the endocannabinoid system: A relevance for Alzheimer's disease? *Cellular Signalling* 70: 109545.
10. Bekdash RA (2021). The cholinergic system, the adrenergic system and the neuropathology of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences* 22(3): 1273.

11. Hu Y, Qu ZY, Cao SY, Li Q, Ma L, Krencik R, Liu Y (2016). Directed differentiation of basal forebrain cholinergic neurons from human pluripotent stem cells. *Journal of Neuroscience Methods* 266: 42–49.
12. Latina V, Caioli S, Zona C, Ciotti MT, Borreca A, Calissano P, Amadoro G (2018). NGF-dependent changes in ubiquitin homeostasis trigger early cholinergic degeneration in cellular and animal AD-model. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12: 487.
13. Café-Mendes CC, Garay-Malpartida HM, Malta MB, de Sá Lima L, Scavone C, Ferreira ZS, Marcourakis T (2017). Chronic nicotine treatment decreases LPS signaling through NF- κ B and TLR-4 modulation in the hippocampus. *Neuroscience Letters* 636: 218–224.
14. Fahnestock M, Shekari A (2019). ProNGF and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience* 13: 129.
15. Bowen DM, Smith CB, White Pamel A, Davison AN (1976). Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain: a Journal of Neurology* 99(3): 459–496.
16. Campanari ML, Garcia-Ayllon MS, Belbin O, Galceran J, Lleo A, Saez-Valero J (2014). Acetylcholinesterase modulates presenilin-1 levels and γ -secretase activity. *Journal of Alzheimer's Disease* 41(3): 911–924.
17. Ramos-Rodriguez JJ, Pacheco-Herrero M, Thyssen D, Murillo-Carretero MI, Berrocoso E, Spires-Jones TL, Garcia-Alloza M (2013). Rapid β -amyloid deposition and cognitive impairment after cholinergic denervation in APP/PS1 mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 72(4): 272–285.
18. Chen ZR, Huang JB, Yang SL, Hong FF (2022). Role of cholinergic signaling in Alzheimer's disease. *Molecules* 27(6): 1816.
19. Güzel E, Koçyiğit ÜM, Taslimi P, Erkan S, Taskin OS (2021). Biologically active phthalocyanine metal complexes: Preparation, evaluation of α -glycosidase and anticholinesterase enzyme inhibition activities and molecular docking studies. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 35(6): 1–9.
20. Querfurth HW, LaFerla FM (2010). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine* 362(4): 329–344.
21. World Health Organization (2017). Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025.
22. DeTure MA, Dickson DW (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 14(1): 1–18.

23. Apostolova LG (2016). Alzheimer disease. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology* 22(2 Dementia): 419.
24. Greene AN, Solomon MB, Privette Vinnedge LM (2022). Novel molecular mechanisms in Alzheimer's disease: The potential role of DEK in disease pathogenesis. *Frontiers in Aging Neuroscience* 14: 1018180.
25. Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM (2017). Synaptic impairment in Alzheimer's disease: a dysregulated symphony. *Trends in Neurosciences* 40(6): 347–357.
26. Chen Y, Fu AK, Ip NY (2019). Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: Mechanisms and therapeutic strategies. *Pharmacology and Therapeutics* 195: 186–198.
27. Fukumoto H, Tomita T, Matsunaga H, Ishibashi Y, Saido TC, Iwatsubo T (1999). Primary cultures of neuronal and non-neuronal rat brain cells secrete similar proportions of amyloid β peptides ending at A β 40 and A β 42. *Neuroreport* 10(14): 2965–2969.
28. Sadleir KR, Kandalepas PC, Buggia-Prévot V, Nicholson DA, Thinakaran G, Vassar R (2016). Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A β generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* 132: 235–256.
29. Nalivaeva NN, Turner AJ (2013). The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Letters* 587(13): 2046–2054.
30. Storey, Cappai (1999). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the A β peptide. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 25(2): 81–97.
31. Ma C, Hong F, Yang S (2022). Amyloidosis in Alzheimer's disease: Pathogeny, etiology, and related therapeutic directions. *Molecules* 27(4): 1210.
32. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, Jones DT (2021). Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers* 7(1): 33.
33. Maltsev AV, Santockyte R, Bystryak S, Galzitskaya OV (2014). Activation of neuronal defense mechanisms in response to pathogenic factors triggering induction of amyloidosis in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 40(1): 19–32.
34. Westermarck P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, Ikeda SI, Sipe JD (2007). A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid* 14(3) 179–183.
35. Panza F, Lozupone M, Logroscino G, Imbimbo BP (2019). A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 15(2): 73–88.

36. Gallardo G, Holtzman DM (2019). Amyloid- β and tau at the crossroads of Alzheimer's disease. *Tau Biology* 187–203.
37. Pooler AM, Noble W, Hanger DP (2014). A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology* 76: 1–8.
38. Eftekharzadeh B, Daigle JG, Kapinos LE, Coyne A, Schiantarelli J, Carlomagno Y, Hyman BT (2018). Tau protein disrupts nucleocytoplasmic transport in Alzheimer's disease. *Neuron* 99(5): 925–940.
39. Kadavath H, Hofele RV, Biernat J, Kumar S, Tepper K, Urlaub H, Zweckstetter M (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(24): 7501–7506.
40. Friedhoff P, Schneider A, Mandelkow EM, Mandelkow E (1998). Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry* 37(28): 10223–10230.
41. Iqbal K, Liu F, Gong CX (2016). Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nature Reviews Neurology* 12(1): 15–27.
42. Sharma P, Srivastava P, Seth A, Tripathi PN, Banerjee AG, Shrivastava SK (2019). Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology* 174: 53–89.
43. Cho CH, Kim EA, Kim J, Choi SY, Yang SJ, Cho SW (2016). N-Adamantyl-4-methylthiazol-2-amine suppresses amyloid β -induced neuronal oxidative damage in cortical neurons. *Free Radical Research* 50(6): 678–690.
44. Ferreira MES, de Vasconcelos AS, da Costa Vilhena T, da Silva TL, da Silva Barbosa A, Gomes ARQ, Percário S (2015). Oxidative stress in Alzheimer's disease: should we keep trying antioxidant therapies?. *Cellular and Molecular Neurobiology* 35: 595–614.
45. Schieber M, Chandel NS (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* 24(10): 453–462.
46. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* 14: 450–464.
47. Sutherland GT, Chami B, Youssef P, Witting PK (2013). Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product?. *Redox Report* 18(4): 134–141.
48. Tamagno E, Guglielmotto M, Monteleone D, Tabaton M (2012). Amyloid- β production: major link between oxidative stress and BACE1. *Neurotoxicity Research* 22: 208–219.

49. Murray IV, Liu L, Komatsu H, Uryu K, Xiao G, Lawson JA, Axelsen PH (2007). Membrane-mediated amyloidogenesis and the promotion of oxidative lipid damage by amyloid β proteins. *Journal of Biological Chemistry* 282(13): 9335–9345.
50. Congdon EE, Sigurdsson EM (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 14(7): 399–415.
51. Dias-Santagata D, Fulga TA, Duttaroy A, Feany MB (2007). Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *The Journal of Clinical Investigation* 117(1): 236–245.
52. Bai R, Guo J, Ye XY, Xie Y, Xie T (2022). Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews* 77: 101619.
53. dos Santos P, Leide C, Ozela PF, de Fatima de Brito Brito M, Pinheiro AA, Padilha EC, Izabel L (2018). Alzheimer's disease: a review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. *Current Medicinal Chemistry* 25(26): 3141–3159.
54. Breijyeh Z, Karaman R (2020). Comprehensive review on Alzheimer's disease: Causes and treatment. *Molecules* 25(24): 5789.
55. Chen XQ, Mobley WC (2019). Exploring the pathogenesis of Alzheimer disease in basal forebrain cholinergic neurons: converging insights from alternative hypotheses. *Frontiers in Neuroscience* 13: 446.
56. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76(1): 116–129.
57. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM (2016). Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Current neuropharmacology* 14(1) 101–115.
58. Stanciu GD, Luca A, Rusu RN, Bild V, Beschea Chiriac SI, Solcan C, Ababei DC (2019). Alzheimer's disease pharmacotherapy in relation to cholinergic system involvement. *Biomolecules* 10(1): 40.
59. Massoulié J, Anselmet A, Bon S, Krejci E, Legay C, Morel N, Simon S (1999). The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chemico-Biological Interactions* 119: 29–42.
60. Siek GC, Katz LS, Fishman EB, Korosi TS, Marquis JK (1990). Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. *Biological Psychiatry* 27(6): 573–580.

61. Lane RM, Kivipelto M, Greig NH (2004). Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clinical Neuropharmacology* 27(3): 141–149.
62. Glick D, Ben Moyal L, Soreq H (2003). Genetic variation in butyrylcholinesterase and the physiological consequences for acetylcholinesterase function. *Butyrylcholinesterase: Function and Inhibition* 55–67.
63. Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, Quinn B (2002). Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiology of Disease* 9(1): 88–93.
64. Rinne JO, Kaasinen V, Järvenpää T, Nägren K, Roivainen A, Yu M, Kurki T (2003). Brain acetylcholinesterase activity in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 74(1): 113–115.
65. Abeyasinghe AADT, Deshapriya RDUS, Udawatte C (2020). Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions. *Life Sciences* 256: 117996.
66. Lleó A (2007). Current therapeutic options for Alzheimer's disease. *Current Genomics* 8(8): 550–558.
67. Parsons CG, Danysz W, Dekundy A, Pulte I (2013). Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotoxicity Research* 24: 358–369.
68. Marucci G, Buccioni M, Dal Ben D, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F (2021). Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 190: 108352.
69. Punyakoti P, Behl T, Sehgal A, Yadav S, Sachdeva M, Anwer MK, Tuli HS (2023). Postulating the possible cellular signalling mechanisms of antibody drug conjugates in Alzheimer's disease. *Cellular Signalling* 102: 110539.
70. Cacabelos R (2007). Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 3(3): 303–333.
71. Kandiah N, Pai MC, Senanarong V, Looi I, Ampil E, Park KW, Christopher S (2017). Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clinical Interventions in Aging* 697–707.

72. Krátký M, Štěpánková Š, Vorčáková K, Švarcová M, Vinšová J (2016). Novel cholinesterase inhibitors based on O–aromatic N, N–disubstituted carbamates and thiocarbamates. *Molecules* 21(2): 191.
73. Razay G, Wilcock GK (2008). Galantamine in Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics* 8(1): 9–17.
74. Crismon ML (1994). Tacrine: first drug approved for Alzheimer's disease. *Annals of Pharmacotherapy* 28(6): 744–751.
75. Günsel A, Yıldırım A, Taslimi P, Erden Y, Taskin–Tok T, Pişkin H, Yarasir MN (2022). Cytotoxicity effects and biochemical investigation of novel tetrakis–phthalocyanines bearing 2–thiocytosine moieties with molecular docking studies. *Inorganic Chemistry Communications* 138: 109263.
76. Güzel E, Orman EB, Köksoy B, Çelikbıçak Ö, Bulut M, Özkaya AR (2019). Comparative electrochemistry and electrochromic application of novel binuclear double-decker rare earth metal phthalocyanines bearing 4–(hydroxyethyl) phenoxy moieties. *Journal of the Electrochemical Society* 166(10): H438.
77. Ogbodu RO, Nitzsche B, Ma A, Atilla D, Gürek AG, Höpfner M (2020). Photodynamic therapy of hepatocellular carcinoma using tetra–triethylenesulfonyl zinc phthalocyanine as photosensitizer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 208: 111915.
78. Yıldız B, Güzel E, Akyüz D, Arslan BS, Koca A, Şener MK (2019). Unsymmetrically pyrazole–3–carboxylic acid substituted phthalocyanine–based photoanodes for use in water splitting photoelectrochemical and dye–sensitized solar cells. *Solar Energy* 191: 654–662.
79. Jiang Y, Lu Y, Lv X, Han D, Zhang Q, Niu L, Chen W (2013). Enhanced catalytic performance of Pt–free iron phthalocyanine by graphene support for efficient oxygen reduction reaction. *Acs Catalysis* 3(6): 1263–1271.
80. Beduoğlu A, Sevim AM, Koca A, Altındal A, Bayır ZA (2020). Thiazole–substituted non–symmetrical metallophthalocyanines: synthesis, characterization, electrochemical and heavy metal ion sensing properties. *New Journal of Chemistry* 44(14): 5201–5210.
81. Koçyiğit ÜM, Taslimi P, Tüzün B, Yakan H, Muğlu H, Güzel E (2022). 1, 2, 3–Triazole substituted phthalocyanine metal complexes as potential inhibitors for anticholinesterase and antidiabetic enzymes with molecular docking studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 40(10): 4429–4439.

82. Günsel A, Kobyaoglu A, Bilgili AT, Tüzün B, Tosun B, Arabaci G, Yarasir MN (2020). Novel biologically active metallophthalocyanines as promising antioxidant–antibacterial agents: Synthesis, characterization and computational properties. *Journal of Molecular Structure* 1200: 127127.
83. Günsel A, Bilgili AT, Tüzün B, Pişkin H, Atmaca GY, Erdoğan A, Yarasir MN (2019). Synthesis of tetra–substituted phthalocyanines bearing 2–(ethyl (m–tolyl) amino) ethanol: Computational and photophysicochemical studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 373: 77–86.
84. Günsel A, Atmaca GY, Taslimi P, Bilgili AT, Gülçin İ, Erdoğan A, Yarasir MN (2020). Synthesis, characterization, photo–physicochemical and biological properties of water–soluble tetra–substituted phthalocyanines: antidiabetic, anticancer and anticholinergic potentials. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 396: 112511.
85. Tekbaba A, Özpinar SÇ, Tunca H, Sevindik TO, Doğru A, Günsel A, Yarasir MN (2021). Synthesis, characterization and investigation of algal oxidative effects of water–soluble copper phthalocyanine containing sulfonate groups. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 26: 355–365.
86. Barut B, Biyiklioglu Z, Yalçın CÖ, Abudayyak M (2020). Non–aggregated axially disubstituted silicon phthalocyanines: Synthesis, DNA cleavage and in vitro cytotoxic/phototoxic anticancer activities against SH–SY5Y cell line. *Dyes and Pigments* 172: 107794.
87. Mamedova G, Mahmudova A, Mamedov S, Erden Y, Taslimi P, Tüzün B, Gulcin I (2019). Novel tribenzylaminobenzolsulphonylimine based on their pyrazine and pyridazines: Synthesis, characterization, antidiabetic, anticancer, anticholinergic, and molecular docking studies. *Bioorganic Chemistry* 93: 103313.
88. Günsel A, Taslimi P, Atmaca GY, Bilgili AT, Pişkin H, Ceylan Y, Gülçin İ (2021). Novel potential metabolic enzymes inhibitor, photosensitizer and antibacterial agents based on water–soluble phthalocyanine bearing imidazole derivative. *Journal of Molecular Structure* 1237: 130402.
89. Güzel E, Koçyiğit ÜM, Taslimi P, Erkan S, Taskin OS (2021). Biologically active phthalocyanine metal complexes: Preparation, evaluation of α –glycosidase and anticholinesterase enzyme inhibition activities, and molecular docking studies. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 35(6): 1–9.

90. Arslan T, Ceylan MB, Baş H, Biyiklioglu Z, Senturk M (2020). Design, synthesis, characterization of peripherally tetra-pyridine-triazole-substituted phthalocyanines and their inhibitory effects on cholinesterases (AChE/BuChE) and carbonic anhydrases (hCA I, II and IX). *Dalton Transactions* 49(1): 203–209.
91. Demirbaş Ü, Barut B, Yalçın İ, Değirmencioğlu İ, Yıldırım S, Özel A (2019). Synthesis, characterization, and investigation of cholinesterase inhibitory properties of novel phthalocyanines. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 56(5): 1553–1559.
92. Tekin A, Arslan T (2022). Investigation of cholinesterase inhibitor effects of some chalcone substituted metallophthalocyanines. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi* 12(2): 703–711.
93. Güzel E, Koçyiğit ÜM, Taslimi P, Gülçin İ, Erkan S, Nebioğlu M, Şişman İ (2022). Phthalocyanine complexes with (4-isopropylbenzyl) oxy substituents: preparation and evaluation of anti-carbonic anhydrase, anticholinesterase enzymes and molecular docking studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 40(2): 733–741.
94. Keleş T, Biyiklioglu Z, Akkaya D, Özel A, Barut B (2022). Synthesis and in vitro α -glucosidase and cholinesterases inhibitory actions of watersoluble metallophthalocyanines bearing ({6-[3-(diethylamino) phenoxy] hexyl} oxy groups. *Turkish Journal of Chemistry* 46(3): 786–795.
95. Barut B, Demirbaş Ü (2020). Synthesis, anti-cholinesterase, α -glucosidase inhibitory, antioxidant and DNA nuclease properties of non-peripheral triclosan substituted metal-free, copper (II), and nickel (II) phthalocyanines. *Journal of Organometallic Chemistry* 923: 121423.
96. Lu C, Wu C, Ghoreishi D, Chen W, Wang L, Damm W, Harder ED (2021). OPLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space. *Journal of Chemical Theory and Computation* 17(7): 4291–4300.
97. Cheung J, Gary EN, Shiomi K, Rosenberry TL (2013). Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and teritrem B show peripheral site flexibility. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 4(11): 1091–1096.
98. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Bourne PE (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research* 28(1): 235–242.
99. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, Mainz DT (2006). Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of

- hydrophobic enclosure for protein–ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 49(21): 6177–6196.
100. Jacobson MP, Pincus DL, Rapp CS, Day TJ, Honig B, Shaw DE, Friesner RA (2004). A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 55(2): 351–367.
101. Fu XB, Zhang JJ, Liu DD, Gan Q, Gao HW, Mao ZW, Le XY (2015). Cu (II)–dipeptide complexes of 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole: Synthesis, DNA oxidative damage, antioxidant and in vitro antitumor activity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 143: 77–87.
102. Barut B (2016). Suda çözünür Ti (IV) ftalosiyanın bileşiklerinin DNA bağlanma, DNA kesim, antioksidan, antimikrobiyal aktivitelerinin ve topoizomerez I inhibisyonunun incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
103. Abudayyak M, Guzel E, Özhan G (2017). Nickel oxide nanoparticles are highly toxic to SH-SY5Y neuronal cells. *Neurochemistry International* 108: 7–14.
104. Lovering F, Bikker J, Humblet C (2009). Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *Journal of Medicinal Chemistry* 52(21): 6752–6756.
105. Ritchie TJ, Ertl P, Lewis R (2011). The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. *Drug Discovery Today* 16(1–2): 65–72.
106. Rosenberry TL, Brazzolotto X, Macdonald IR, Wandhammer M, Trovaslet-Leroy M, Darvesh S, Nachon F (2017). Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study. *Molecules* 22(12): 2098.
107. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA (2019). Harper's Illustrated Biochemistry. Harper'ın Resimli Biyokimyası. 1st ed. Çeviren: Yücel D, Güneş Tıp Kitabevleri Ltd.Sti., İstanbul, 76–78
108. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM (2008). Lehninger Principles of Biochemistry. Lehninger Biyokimyanın Temelleri. 5th ed. Çeviren: Elçin YM, Palme Yayınevi Ltd.Sti., Ankara, 201.
109. Ajayeoba TA, Akinyele OF, Ayeni AO, Olawuni IJ (2019). Synthesis, characterisation and acetylcholinesterase inhibition activity of nickel (II) and copper (II)

- complexes of 3-Hydroxybenzaldehyde-4-nitrobenzoic acid hydrazone. American Journal of Applied Chemistry 7(2): 64–71.
110. Huseynova M, Medjidov A, Taslimi P, Aliyeva M (2019). Synthesis, characterization, crystal structure of the coordination polymer Zn (II) with thiosemicarbazone of glyoxalic acid and their inhibitory properties against some metabolic enzymes. Bioorganic Chemistry 83: 55–62.
111. Ionescu-Tucker A, Cotman CW (2021). Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 107: 86–95.
112. Barut B, Demirbaş Ü, Özel A, Kantekin H (2017). Novel water soluble morpholine substituted Zn (II) phthalocyanine: Synthesis, characterization, DNA/BSA binding, DNA photocleavage and topoisomerase I inhibition. International Journal of Biological Macromolecules 105: 499–508.
113. Araújo AR, Tomé AC, Santos CI, Faustino MA, Neves MG, Simões MM, Cavaleiro JA (2020). Azides and porphyrinoids: Synthetic approaches and applications. Part 2–Azides, phthalocyanines, subphthalocyanines and porphyrazines. Molecules 25(7): 1745.
114. Muhcu T (2020). 5(6) konumunda fenoksi grubu içeren yeni benzimidazol bileşiklerinin sentezi ve kolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Rize.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Didem AKKAYA
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi :
Telefon (İş)
Yazışma Adresi (İş)

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	-	-
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı	-
Lisans	Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü	2017
Lise	Keşap Anadolu Öğretmen Lisesi	2012

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya AbD	2020-

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Biyokimya

YAYINLAR (Tez yazım kurallarına göre yazılmalıdır)

1. Seyhan G, Akkaya D, Kolci K, Reis R, Yazıcı N, Barut EN, Barut B (2023). Insights into the biological activity and cytotoxic mechanism of Epimedium pubigerum. Chemistry and Biodiversity 20(11): e202301003.

2. Akkaya D, Barut B, Sari S, Reis R, Fazli H, Biyiklioglu Z, Özel A (2023). Synthesis and biological evaluation of novel zinc (II) and nickel (II) phthalocyanines as cholinesterase inhibitors. *Journal of Organometallic Chemistry* 995: 122742.
3. Yalazan H, Akkaya D, Seyhan G, Barut B, Kantekin H (2023). Novel different furoic acid-linked axial silicon phthalocyanines: Design, syntheses, cholinesterases, tyrosinase inhibitory, and DNA damage studies. *Applied Organometallic Chemistry* 37(4): e7040.
4. Barut B, Yalçın CÖ, Altun Y, Akkaya D, Barut EN, Baş H, Biyiklioglu Z (2023). Evaluation of photodynamic therapy effects of novel zinc (II) phthalocyanine through a possible interaction with toll-like receptor signaling pathway. *Applied Organometallic Chemistry* 37(4): e7039.
5. Sari S, Önder S, Akkaya D, Sabuncuoğlu S, Zengin M, Barut B, Karakurt A (2023). Azole derivatives inhibit wildtype butyrylcholinesterase and its common mutants. *Drug Development Research* 84(5): 1018–1028.
6. Alagöz MA, Akkaya D, Arslan G, Uludağ B, Özdemir Z, Barut B, Sari S (2022). Design, synthesis, and biological evaluation of some benzothiazolone derivatives as cholinesterase inhibitors. *ChemistrySelect* 7(46): e202203250.
7. Sari S, Akkaya D, Zengin M, Sabuncuoğlu S, Özdemir Z, Alagöz MA, Barut B (2022). Antifungal azole derivatives featuring naphthalene prove potent and competitive cholinesterase inhibitors with potential CNS penetration according to the in vitro and in silico studies. *Chemistry and Biodiversity* 19(7): e202200027.
8. Yalazan H, Tüzün B, Akkaya D, Barut B, Kantekin H, Yıldırım S (2022). Quinoline-fused both non-peripheral and peripheral ZnII and MgII phthalocyanines: Anti-cholinesterase, anti- α -glucosidase, DNA nuclease, antioxidant activities, and in silico studies. *Applied Organometallic Chemistry* 36(7): e6696.
9. Biyiklioglu Z, Baş H, Akkaya D, Barut B (2022). Synthesis and biological evaluation of peripherally tetra-({6-[3-(dimethylamino) phenoxy] hexyl} oxy) substituted water-soluble phthalocyanines as cholinesterases inhibitors. *Applied Organometallic Chemistry* 36(4): e6580.

10. Keleş T, Biyiklioglu Z, Akkaya D, Özel A, Barut B (2022). Synthesis and in vitro α -glucosidase and cholinesterases inhibitory actions of watersoluble metallophthalocyanines bearing ({6-[3-(diethylamino) phenoxy] hexyl} oxy groups. Turkish Journal of Chemistry 46(3): 786–795.

BİLDİRİLER

1. Akkaya D, Barut B, Sarı S, Özel A (2023). Evaluation of cholinesterases inhibitory effects of some azole derivatives. 6th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara, 11–13 Ekim 2023, 53–53.
2. Uzunkaya Ç, Gökkaya İ, Akkaya D, Barut B, Renda G (2023). Biological activity studies on *Alchemilla pseudocartalinica* juz. PSE Meeting 2023, Antalya, 12–15 Ekim 2023, 105–105.
3. Akkaya D, Reis R, Sarı S, Biyiklioglu Z, Özel A, Barut B (2023). Anticholinesterase properties of novel phthalocyanines. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, İzmir, 4–6 Mayıs 2023, 270–270.
4. Seyhan G, Akkaya D, Reis R, Kolci K, Yazıcı Bektaş N, Barut EN, Barut B (2023). In vitro investigation of biological activities of *Epimedium pubigerum* (DC.) Moren and Decne. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, İzmir, 4–6 Mayıs 2023, 271–271.
5. Ersoy S, Akkaya D, Gökkaya İ, Barut B, Renda G (2023). Comparison of antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* L. extracts and commercial products. The 9th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, Ankara, 3–5 Mayıs 2023, 96–96.
6. Akkaya D, Barut B, Sarı S, Sabuncuoğlu S (2021). *In vitro* and *in silico* investigations for the anticholinesterase effects of some imidazole derivatives. TBS International Biochemistry Congress–32nd National Biochemistry Congress, Gaziantep, 27–30 Ekim 2021, 113–113.
7. Yalazan H, Akkaya D, Barut B, Yıldırım S, Kantekin H (2021). Kinolin grubu içeren periferik ve non-periferik çinko ve magnezyum ftalosiyanın bileşiklerinin sentezi, asetilkolinesteraz (AChE), butirilkolinesteraz (BuChE) ve glukozidaz enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri. 33. Ulusal Kimya Kongresi, Tekirdağ, 7–9 Ekim 2021, 23–23.

