



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**BAZI FTALOSİYANİN BİLEŞİKLERİNİN
KOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRLERİ OLMA
POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

Berna USTA

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 aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

TARİH
Berna USTA
(İmza)

TEŞEKKÜR

Çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ÖZEL'e; ve tezimin ilerleyişinde desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Burak BARUT'a; çalışmalarım sırasında fikir ve tecrübelerinden yararlandığım sevgili Araş. Gör. Didem AKKAYA'ya;

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren bana desteklerini esirgemeyen, maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Berna USTA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

vii

ŞEKİLLER DİZİNİ

viii

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

ix

ÖZET

x

ABSTRACT

xi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Demans

3

2.1.1. Alzheimer Hastalığı

3

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

4

2.1.3. Alzheimer Hastalığında Tanı

10

2.1.4. Alzheimer Hastalığında Tedavi

11

2.2. Ftalosiyaninler

13

2.2.1. Ftalosiyaninlerin Tarihçesi

14

2.2.2. Ftalosiyaninlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

15

2.3. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

17

2.4. DNA Nükleaz Aktivitesi

21

3. GEREÇ VE YÖNTEM

25

3.1. Gereç

25

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

25

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

26

3.1.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

26

3.2.3. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Ftalosiyanin

Bileşikleri ile İnhibisyon Çalışmaları

28

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Ftalosiyaninler

28

3.2.2. IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

29

3.2.3. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Kinetik Çalışmaları	31
3.3. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	32
3.3.1. Bileşiklerin DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi	32
3.3.2. Bileşiklerin FRAP Aktivitesi	32
3.4. Bileşiklerin Hidrolitik Nükleaz Aktivitesi	33
3.5. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
4.1. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Ftalosiyanın Bileşikleri ile İnhibisyon Çalışmaları	34
4.1.1. IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	34
4.1.2. İnhibisyon Türlerinin ve İnhibisyon Sabitlerinin Belirlenmesi	34
4.2. Bileşiklerin DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi	40
4.3. Bileşiklerin FRAP Aktivitesi	41
4.4. Bileşiklerin Hidrolitik Kesim Etkinliği	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
6. KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	58

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Reaktif oksijen türleri ve serbest radikal olmayan türler	18
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	25
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan cihazlar	26
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan bileşiklerin isimleri ve moleköl ağırlıkları	29
Tablo 5.	Ftalosiyanın bileşiklerinin AChE ve BChE üzerinde gösterdiği IC ₅₀ değerleri	34
Tablo 6.	Bileşiklerin inhibiyon türünü ve Ki değerlerini gösteren tablo	40
Tablo 7.	Bileşiklerin DPPH radikal süpürme aktivitesi (%)	40
Tablo 8.	Bileşiklerin FRAP aktivitesi (%)	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. 2018-2050 yıllar arası Türkiye’deki tahmini demanslı hasta sayısı	4
Şekil 2. Alzheimer hastalığının ilerlemesinin şematik gösterimi	5
Şekil 3. Tau proteininin birikim evreleri	6
Şekil 4. Alzheimer hastalığında protein birikiminin şematik sunumu	7
Şekil 5. Asetilkolinesteraz enziminin, asetilkolini asetat ve koline hidrolizi	8
Şekil 6. Presinaptik nöronlarda gerçekleşen kolinerjik olaylar	9
Şekil 7. Alzheimer hastalığında nörodejenerasyona sebep olan yolakların şematik gösterimi	10
Şekil 8. Alzheimer hastalığının nöropatolojik özellikleri	11
Şekil 9. Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanılan FDA onaylı ilaçlar	12
Şekil 10. Porfirin ve ftalosiyanin arasındaki yapısal ilişki	13
Şekil 11. İlk metalsiz ftalosiyanin sentezinin şematik gösterimi	14
Şekil 12. Diesbach ve Van Der Weid tarafından gerçekleştirilen reaksiyon	14
Şekil 13. Metalsiz ve metalli ftalosiyanin	16
Şekil 14. Ftalosiyaninlerde merkez atom olarak kullanılabilen metaller	17
Şekil 15. Serbest radikallerin hücrede sebep olduğu hasarlar	19
Şekil 16. Antioksidanların moleküllerle etkileşim yolları	19
Şekil 17. Antioksidanların sınıflandırılması	20
Şekil 18. DNA’nın yapısı	21
Şekil 19. Nükleazların katalize ettiği DNA bölünmesi	22
Şekil 20. Hidrolitik ve oksidatif kesimin gösterimi	23
Şekil 21. DM-C8-OH ftalosiyanin bileşiğinin sentezi	28
Şekil 22. Öncül bileşikten sentezlenen DM-C8-SiQ ve DM-C8-ZnQ ftalosiyanin bileşiklerinin yapıları	29
Şekil 23. Kolinesteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan Ellman reaksiyonu	30
Şekil 24. DM-C8-SiQ kodlu bileşiğin AChE enzimi üzerindeki inhibiyon grafikleri	35

Şekil 25. DM-C8-ZnQ kodlu bileşiğin AChE enzimi üzerindeki inhibiyon grafikleri	36
Şekil 26. DM-C8-OH kodlu bileşiğin BChE enzimi üzerindeki inhibiyon grafikleri	37
Şekil 27. DM-C8-ZnQ kodlu bileşiğin BChE enzimi üzerindeki inhibiyon grafikleri	38
Şekil 28. DM-C8-SiQ kodlu bileşiğin BChE enzimi üzerindeki inhibiyon grafikleri	39
Şekil 29. BHA standart grafiği	41
Şekil 29. DM-C8-SiQ ve DM-C8-ZnQ bileşiklerinin pBR322 plazmid DNA hidrolitik kesim etkinliği	42

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

Aβ	Amiloid beta
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AChI	Asetilkolin iyodür
AH	Alzheimer hastalığı
APP	Amiloid öncü protein
Apo E	Apolipoprotein E
ASL	Arteriyel spin etiketleme
BACE 1	Betasekretaz 1
BChE	Bütirilkolinesteraz
BChI	Bütirilkolinyodür
BHA	Bütirillenmiş hidroksianisol
ChE	Kolinesteraz
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTNB	5,5'-dithiobis (2-nitro-benzoik asit)
EB	Etidyum bromür
FDA	Amerika Birleşik Devletleri İlaç ve Gıda Dairesi
fMRG	Fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme
FRAP	Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç aktivitesi
IR	İnfrared/Kızılötesi Işın
IL-b1	İnterlökin
MALDI-TOF MS	Matriks destekli lazer desorpsiyon kütle spektrometresi
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MPcs	Metaloftalosiyenin
NFT	Nörofibriler yumak
NK	Negatif kontrol
NMDA	Anti -N- metil- D- aspartat
NMR	Nükleer manyetik rezonans

NOS	Nitrik oksit sentetazlar
NO	Nitrikoksit
PET	Pozitron emisyon tomografisi
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritma değeri
RIS	Radyonükleid görüntüleme çalışmaları
ROS	Reaktif oksijen türleri
S	Substrat konsantrasyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sMRI	Yapısal manyetik rezonans görüntüleme
SWI	Duyarlılık ağırlıklı görüntüleme
TAE	Tris-asetik asit-EDTA
TCA	Trikloroasetik asit
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
TNB	5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
UV -vis	Ultraviyole
V	Reaksiyon hızı

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
g	Gram
IC₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
K_i	İnhibisyon sabiti
K_m	Michaelis sabiti
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
nm	Nanometre

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar

Formüller

$\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}_2$	o-dibromobenzenin
$(\text{C}_8\text{H}_4\text{N}_2)_4\text{H}_2$	Ftalosiyanin
$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$	Ftalik asit
$\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_3$	Ftalik anhidrit
CuCN	Bakır siyanür
DM-C8- OH	8-[3-(dimetilamino)fenoksi]oktan-1-ol
DM-C8-SiQ	Bis[8-[3-(trimetilamino)fenoksi]oktanoksi] ftalosiyanimato silisyum (IV) iyodür
DM-C8-ZnQ	2(3),9(10),16(17),23(24)-Tetrakis-8-[3-(trimetilamino) fenoksi] oktanoksi ftalosiyanimato çinko(II) iyodür
FeCl_3	Demir(III) klorür
HCl	Hidroklorik asit
H_2O	Su
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Potasyum ferrisiyanür

ÖZET

Bazı Ftalosiyanın Bileşiklerinin Kolinesteraz İnhibitörleri Olma Potansiyellerinin İncelenmesi

Bu tez çalışmasında 8-[3(trimetilamino)fenoksi]oktanoksi grubu içeren silisyum (IV) ftalosiyanın (DM-C8-SiQ), 8-[3(trimetilamino)fenoksi]oktanoksi grubu içeren çinko (II) ftalosiyanın (DM-C8-ZnQ) ve 8-[3-(Dimetilamino)fenoksi]oktan-1-ol (DM-C8-OH) bileşiğinin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerinde inhibisyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda bileşiklerin antioksidan aktivite potansiyelinin araştırılması için 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesi ve demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) aktivitesi çalışılmıştır. Bileşiklerin plazmid pBR322 DNA nükleaz özellikleri agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Tüm bu çalışmaların sonucunda 8-[3-(Dimetilamino)fenoksi]oktan-1-ol (DM-C8-OH) ve 8-[3(trimetilamino)fenoksi] oktanoksi grubu içeren çinko (II) ftalosiyanın (DM-C8-ZnQ) bileşiğinin Alzheimer hastalığının tedavisi için ilaç olma potansiyellerinin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, Ftalosiyanın, İnhibisyon

ABSTRACT

Investigation of Potential of Some Phthalocyanine Compounds as Cholinesterase Inhibitors

In this thesis, inhibition studies of silicon (IV) phthalocyanine containing 8-[3-(trimethylamino) phenoxy]octanoxy group and zinc (II) phthalocyanine containing 8-[3-(trimethylamino)phenoxy]octanoxy group on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes were carried out. In addition, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and iron (III) ion reducing antioxidant power (FRAP) activity were studied to investigate the antioxidant activity potential of the compounds. Plasmid pBR322 DNA nuclease properties of the compounds were examined using agarose gel electrophoresis method. As a result of all these studies, it was determined that 8-[3-(Dimethylamino)phenoxy]octan-1-ol (DM-C8-OH) and 8-[3-(trimethylamino)phenoxy]octanoxy group containing zinc (II) phthalocyanine (DM-C8-ZnQ) compounds have the potential to be drugs for the treatment of Alzheimer's Disease.

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

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH) nöronların dejenerasyonu ve bilişsel işlevlerde düşüş ile karakterize, dünya çapında yaşlı nüfusu etkileyen kronik ve ilerleyici bir hastalıktır. Hastalığın yaşla beraber insidansı ve prevelansı artmaktadır (1). Dünyada ölüm nedenleri arasında altıncı sırada yer alan bu hastalığın küresel toplam maliyetinin 1.3 trilyon ABD doları olduğu tahmin edilmektedir (2, 3). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre 2019 yılında tahmin edilen demanslı hasta sayısı 55 milyondur ve bu sayının 2050 yılında 139 milyona yükselmesi beklenmektedir (3).

Alzheimer hastalığı için henüz tamamen tedavi edici bir yöntem bulunmamaktadır. Ancak, hastalığın semptomlarını hafifletmek ve ilerlemesini yavaşlatmak için çeşitli tedaviler mevcuttur. İlaç tedavileri, AH'nin semptomlarını kontrol etmek için kullanılan en yaygın tedavi yöntemidir. Bu ilaçlar, beyindeki nörotransmitterlerin dengesini düzenleyerek, hastalığın semptomlarını hafifletmeye çalışırlar. Asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri ve anti-N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonistleri, bu ilaçların en yaygın sınıfları arasındadır (4).

Alzheimer hastalığının tedavisi için şimdiye kadarki en başarılı yaklaşım kolinerjik hipotezdir. Bu hipoteze göre hastalığın asıl nedeni beyindeki düşük asetilkolin (ACh) seviyesidir. ACh beyinde kolinerjik iletimde görev alır. Kolinesterazlar (ChE) ise ACh hidrolizini katalize eder (5). Terapötik bir yaklaşım olarak hastalarda ChE'ler inhibe edilir ve böylece beyindeki ACh seviyesi artırılır (6). Bu doğrultuda ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), memantin, donepezil, galantamin ve rivastigmin adlı ilaçları onaylamıştır (7). Ancak bu ilaçlar semptomatiktir, AH'nin ilerlemesini geciktirememekte veya önleyememektedir (8). Bu nedenle hücre ölümlerini ve hastalığın ilerlemesini engelleyecek yeni ilaç tasarımlarına ihtiyaç artmaktadır.

Serbest radikaller, dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulunan moleküller olarak tanımlanırken, antioksidanlar ise bu serbest radikallerin istenmeyen etkilerini azaltan endojen veya eksojen bileşikler olarak tanımlanır. Sağlıklı bir organizmada antioksidanlar ve serbest radikaller arasında bir denge mevcuttur. Ancak bu denge reaktif türler lehine bozulduğunda oksidatif stres meydana gelir. Oksidanlar vücudun olağan metabolizmasının yan ürünü olarak veya sigara dumanı, alkol, çevresel kirleticiler, demir ve civa gibi ağır metallere maruziyet sonucu dış kaynaklı üretilebilir. Beyin özellikle yüksek oksijen tüketimi nedeniyle oksidatif hasara karşı hassastır. Alzheimer hastalığında antioksidan enzimlerin

aktivitesinde olumsuz değişiklikler meydana gelir. Bu nedenle oksidatif hasar birikmeye başlar. Bu oksidanların yüksek seviyeleri deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına sebep olur. Alzheimer hastalarının beyin plaklarında oksidatif türler patolojik bir özelliktir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) amiloid-beta ($A\beta$) plak oluşumu ve klinik semptomlardan önce varlığının arttığına dair kanıtlar mevcuttur. Antioksidanlar ise detoksifikasyon yoluyla beyin hücrelerinde serbest radikal hasarını azaltmaya yardımcı olur. Antioksidan özelliklere sahip birçok madde, bugün sinir sistemi hastalıklarının tedavisine yönelik olarak araştırılmaktadır (9, 10).

Ftalosiyanimler, 18 π elektron sistemine sahip, güçlü kimyasal ve fiziksel özellikleri olan, yeşil-mavi renkte, aromatik makromoleküllerdir (11, 12). Ftalosiyanimlerin merkezi boşluğuna farklı metaller eklenerek kimyasal yapıları değiştirilebilir (13). Günümüzde ftalosiyanimler kimyasal sensör, biyolojik görüntüleme, optik veri depolama, katalizör, yarı iletkenler, fotodinamik terapi vb. gibi teknolojik ve endüstriyel alanlarda kullanılmakta olup, aynı zamanda antioksidan, antimikrobiyal, enzim inhibisyonu, DNA etkileşimi, antikanser gibi *in vitro* biyolojik alanlarda da çalışmalara konu olmaktadır (12).

Bu tez çalışması kapsamında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Zekeriya Bıyıklıoğlu ve ekibi tarafından sentezlenen 8-[3 (trimetilamino) fenoksi]oktanoksi grubu içeren silisyum(IV) ftalosiyanim ve 8-[3 (trimetilamino)fenoksi]oktanoksi grubu içeren çinko(II) ftalosiyanim bileşiğinin AH tedavisinde kullanılmak üzere uygun ChE inhibitörleri olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda ilk olarak bileşiklerin inhibisyon etkileri yüzde elli inhibisyon yaptığı (IC_{50}) değerleri belirlenerek incelenmiştir. Etkin bulunan inhibitörlerin ileri inhibisyon çalışmaları ChE enzimlerinin inhibisyon kinetiği ile çalışılmıştır. Aynı zamanda bileşiklerin antioksidan etkiye sahip olup olmadığının belirlenmesi amacıyla 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesi ve demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) aktivitesi çalışılmıştır. Son olarak bileşiğimizin DNA nükleaz aktivite çalışması yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demans

Uluslararası Hastalık Sınıflandırması ve ICD-11'in son revizyonuna göre demans "*önceki bilişsel işlevsellik düzeyinden düşüşle karakterize edinilmiş bir beyin sendromu*" olarak tanımlanmaktadır (14). Demans, bir hastalıktan ziyade, daha çok ortaya çıkan semptomları ifade eder. Diğer adıyla majör nörobilişsel bozukluk olarak bilinir ve kişinin günlük yaşam aktivitelerini, sosyal becerilerini, davranış, hafıza ve düşünme yeteneklerini olumsuz yönde etkiler (15).

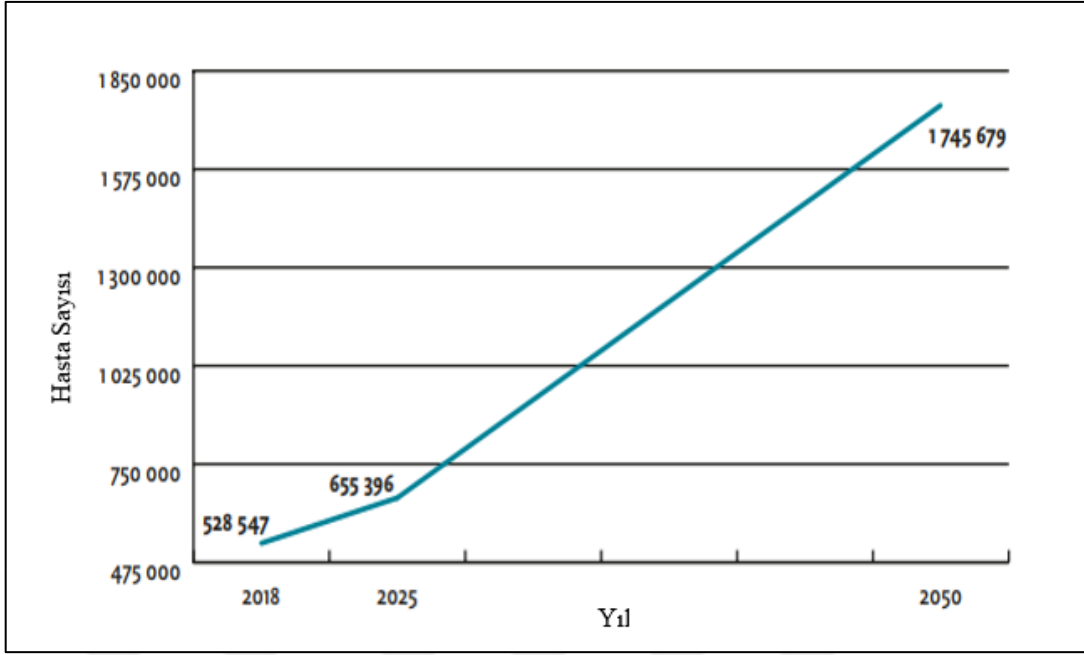
Beklenen yaşam süresinin uzamasıyla beraber yaşa bağlı hastalıklarda da ciddi artış meydana gelmektedir. Dünya üzerinde 703 milyondan fazla 65 yaş üstü insan yaşamaktadır ve bunların yaklaşık 50 milyonu demanstan muzdariptir. Nörolojik hastalıklar arasında demans en yüksek küresel ekonomik maliyete sahiptir ve bu sebeple hastalığı önlemek büyük önem taşımaktadır (16).

Demans, altında yatan patolojilerine göre; AH, vasküler demans, frontotemporal lobar dejenerasyon, Lewy cisimcikli demans ve genç başlangıçlı demans olmak üzere baş alt tipe ayrılmıştır (14, 15).

2.1.1 Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, hatırlamada güçlük, davranış anormallikleri, bilişsel işlev bozukluğu ve dil becerilerinde gerileme ile karakterize yaygın nörodejeneratif bozukluklardan biridir. Alzheimer Hastalığı demans vakalarının yaklaşık %60-70'inden sorumludur (7). Hastalık genellikle yakın geçmişi hatırlamada güçlkle başlar, saldırganlık ve depresyon gibi anormal davranışlar da görülebilir (17). Semptomlar yaş ile beraber ilerler ve geri döndürülemez (18, 19). Ancak hastalık yaşlılığın kaçınılmaz bir parçası değildir (20).

Dünya üzerinde yaklaşık 55 milyon insan AH'den etkilenmektedir ve bu sayının 2030 yılında 78 milyona, 2050 yılına kadar da 139 milyona yükselmesi beklenmektedir. Tüm bu hastaların küresel toplam maliyeti 2019 yılında 1.3 trilyon dolar iken bu rakamın 2030 yılında yaklaşık 2.8 trilyon dolara yükseleceği tahmin edilmektedir (21). Hastalık 65 yaş sonrasında, her 5 yılda bir ikiye katlanmakla birlikte 65 yaş öncesi AH riski genellikle ailesel gen mutasyonlarına bağlanmaktadır (22).



Şekil 1. 2018 - 2050 yıllar arası Türkiye’deki tahmini demanslı hasta sayısı (Bintener’den, 23)

Türkiye’deki duruma baktığımızda 2018 yılında demanslı kişi sayısı 528.547 olarak belirlenmiştir. Bu sayının 2050 yılında üç katından daha fazla olacak şekilde 1.745.679'a ulaşacağı tahmin edilmektedir. Bu sayı, Avrupa’daki demanslı hasta sayının 2050 yılında iki katına yükseleceği tahmininin üstündedir. Bu önemli yükselişin sebebinin, 65 yaş üzeri nüfustaki artıştan kaynaklı olacağı tahmin edilmektedir (23).

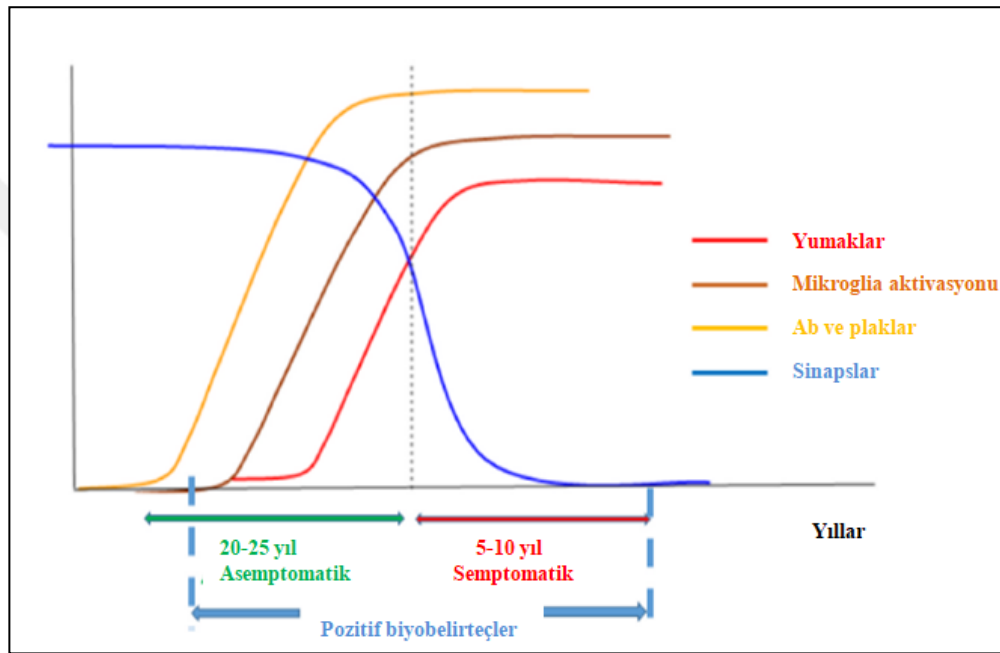
2.1.2 Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

Hastalığın başlangıç evresinde hastalar yakın zamandaki olayları hatırlamada zorluk yaşarlar. Bu durum kısa süreli hafıza kaybı olarak da değerlendirilebilir. İlerleyen aşamalarda hasta konuşma bozukluğu sebebiyle iletişim sorunları, öz bakımda yetersizlik, uyku sorunları ve davranışsal anormallikler gibi semptomlardan muzdarip hale gelir. Bu rahatsızlıklar başlangıçta hafiftir ancak zamanla hastanın günlük yaşantısını oldukça zorlu hale getirir. İlerleyen evrede ise hasta ailesini tanıyamayacak hale gelebilir ve beyin fonksiyonları zamanla azalarak kaybolur ve hastayı ölüme sürükler (17, 24).

Alzheimer hastalığının patolojik seyri, semptom göstermeden uzun yıllar önce başlar. Beyinde amiloid-beta ($A\beta$) plakları ve tau yumakları yavaş yavaş birikmeye başlar ancak hastanın bilişsel işlevleri bu aşamada normaldir. Erken dönemde $A\beta$ plak oluşumu beyinde yaygın olarak görünür, tau birikimi odaksal olarak başlar ve beyin boyunca yayılır.

Bunu hastalığın klinik olarak ilerlemesi izler. Tau birikiminin beyindeki yeri ve yoğunluğu, hastanın gösterdiği semptomlar ve hastalığın şiddeti ile yakından ilişkilidir (25).

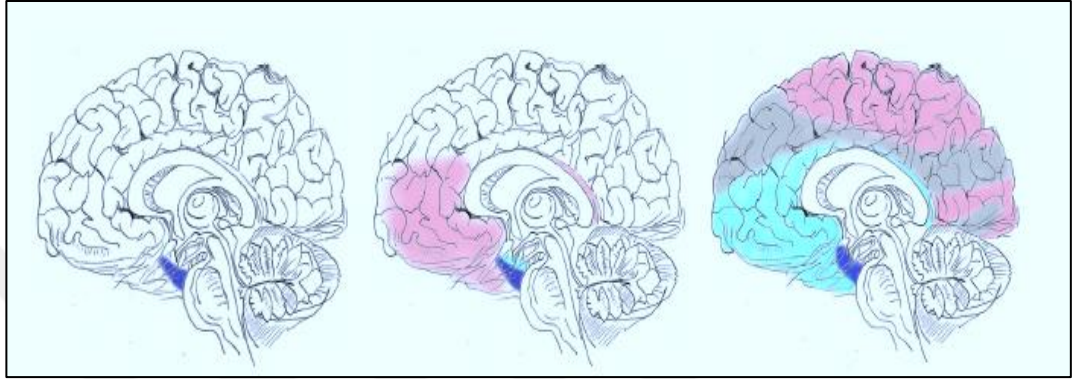
Alzheimer hastaları üzerinde yapılan biyobelirteç çalışmaları, A β -oligomerlerin varlığının bilişsel bozuklukların ortaya çıkmasından yaklaşık yirmi yıl veya daha uzun süre önce ortaya çıktığını göstermiştir. İlk belirtiler ortaya çıktığında dendritik dikenlerde ve sinapslarda önemli ölçüde bozulma görülür (26).



Şekil 2. Alzheimer hastalığının ilerlemesinin şematik gösterimi (Oumata'dan, 22)

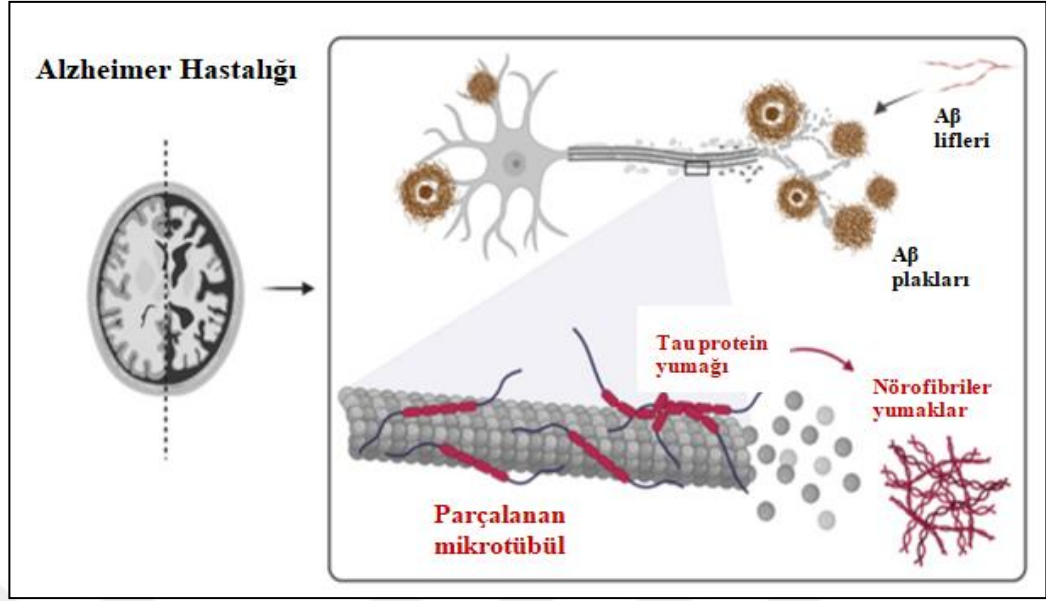
Alzheimer hastalığı için yaşlanma, metaller ve pestisitler, travmatik beyin yaralanmaları ve genetik faktörler olmak üzere çeşitli risk faktörleri mevcuttur. Aynı zamanda kadın cinsiyeti de AH'nin risk faktörlerinden biridir. Amerika Birleşik Devletleri'nde mevcut 5.3 milyon Alzheimer hastasının yaklaşık yüzde 60'ını kadınlar oluşturur. Kadınlarda 45 yaş sonrası AH'ye yakalanma riski erkeklerin yaklaşık iki katıdır. Hastalığın kesin nedeni belli olmamakla beraber bazı hipotezler öne sürülmüştür. Bunlar; amiloid kaskad hipotezi, kolinerjik hipotez, hiperfosforile tau hipotezi ve nöroinflamasyon hipotezidir. Bu hipotezler kısmen birbirlerini desteklemektedir (22, 27). Aynı zamanda oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve metal iyonlarının dengesizliği de AH patolojisine katkıda bulunur (28).

Nörodejeneratif birçok hastalıkta hastalığa özgü proteinler beynin farklı bölgelerinde çözünmeyen agregatlar şeklinde birikir. Genellikle bu birikme hastalığın henüz semptomatik olmayan erken evresinde başlar. Alzheimer hastalığının nöropatolojisinde de amiloid peptidlerinin hücre dışı plak oluşumu ve hiperfosforile tau proteinin fibriller birimi öne çıkan iki agregattır (27).



Şekil 3. Tau proteinini birikim evreleri (Nascimento'dan, 29)

Amiloid hipotezi şu zamana kadar en çok kabul görülen hipotezlerden biri olmuştur. Amiloid öncü protein (APP), 639-770 amino asitten oluşan ve beyinde yaygın olarak sentezlenen bir proteindir. Nöronal gelişim ve sinaptogenezin düzenlenmesinde rol oynar. Hastalık durumlarında beta sekretaz 1 (BACE-1) ve γ -sekretaz enzimleri bu proteini parçalar ve farklı uzunluklarda $A\beta$ peptidleri oluşur. Oluşan bu peptidlerden bazıları ($A\beta_{40/42}$) nörotoksik özelliğe sahiptir. Normalde bu peptidler uzaklaştırılmak için hücre dışına atılır ancak bu peptidler suda çözünmez ve hücre dışında kolayca agregat oluşturur. Bu oluşan agregatlara plak adı verilir ve hastalığın erken dönemlerinde gözlemlenebilir (22, 30). Oluşan bu plaklar iyon kanallarında bozulmaya, glukoz-enerji metabolizmasında oksidatif strese, kalsiyum dengesinde değişikliklere ve AChE transmembran kanalında tıkanmalara yol açar. Aynı zamanda bu agregatlar hücreler arası iletişimi de engeller. $A\beta$ oligomerleri hücre içinde de birikerek ROS'ların oluşmasına ve otofajinin bozulmasına da neden olabilir. Tüm bu süreçlerin hepsi nöronlarda hücre ölümüne sebep olur (27, 30, 31).



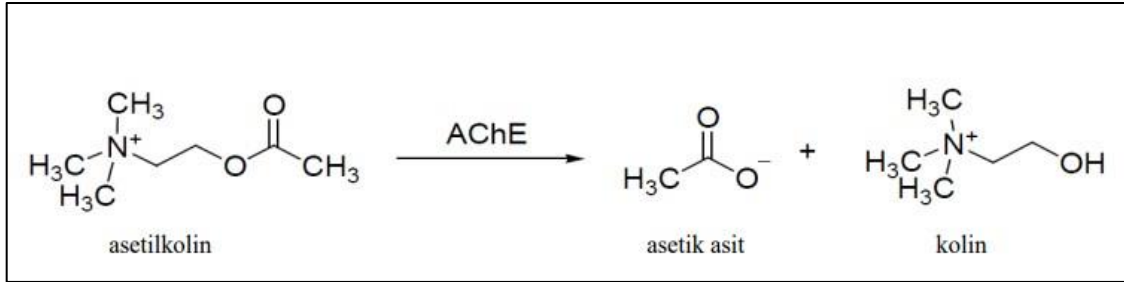
Şekil 4. Alzheimer hastalığında protein birikiminin şematik sunumu (Çetin'den, 27)

Tau proteini hücrenin iskeletini oluşturan mikrotübülün yapısında yer alır ve hücrenin stabilitelerini korumada yardımcıdır. Ancak tau gereğinden fazla fosforillendiğinde mikrotübül parçalanır ve tau proteini yapıdan ayrılır. Ayrılan bu taular, birbirlerine yapışarak hücre içi yumak oluştur (30). Aβ peptidlerinin birikimi ve beyin glukoz metabolizmasındaki anormallikler de tau proteininin hiper fosforilasyonuna yol açar ve böylece hücre içi nörofibriler yumakların (NFT) oluşumuna zemin hazırlanır (32). Aynı zamanda son yıllarda Aβ peptidininin tau proteininin yanlış katlanmasına ve birleşmesine yol açtığı bunun da bilişsel gerilemeye sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca fosforile tau proteininin AChE aktivitesini artırdığı da bildirilmiştir (24).

Kolinerjik hipotez AH'nın patolojisinde bir diğer öne çıkan yaklaşımdır. Bu hipotez Alzheimer hastalarının beyinlerinde düşük olan ACh seviyelerini korumayı hedefler (27). ACh, sağlıklı bir beyin için önemli olan ve kolinerjik nöronlar tarafından üretilen bir nörotransmitterdir. Korteks, bazal ganglionlar ve bazal ön beyin boyunca aktiviteye sahiptir (21). Hafıza, uyku, konsantrasyon, bilişsel ve öğrenme işlevlerinin fonksiyonu için önem arz eder. Bu nedenle AH'de yaşanan bu sorunların kolinerjik nöronlardaki hasarla ilişkili olduğu düşünülmüştür.

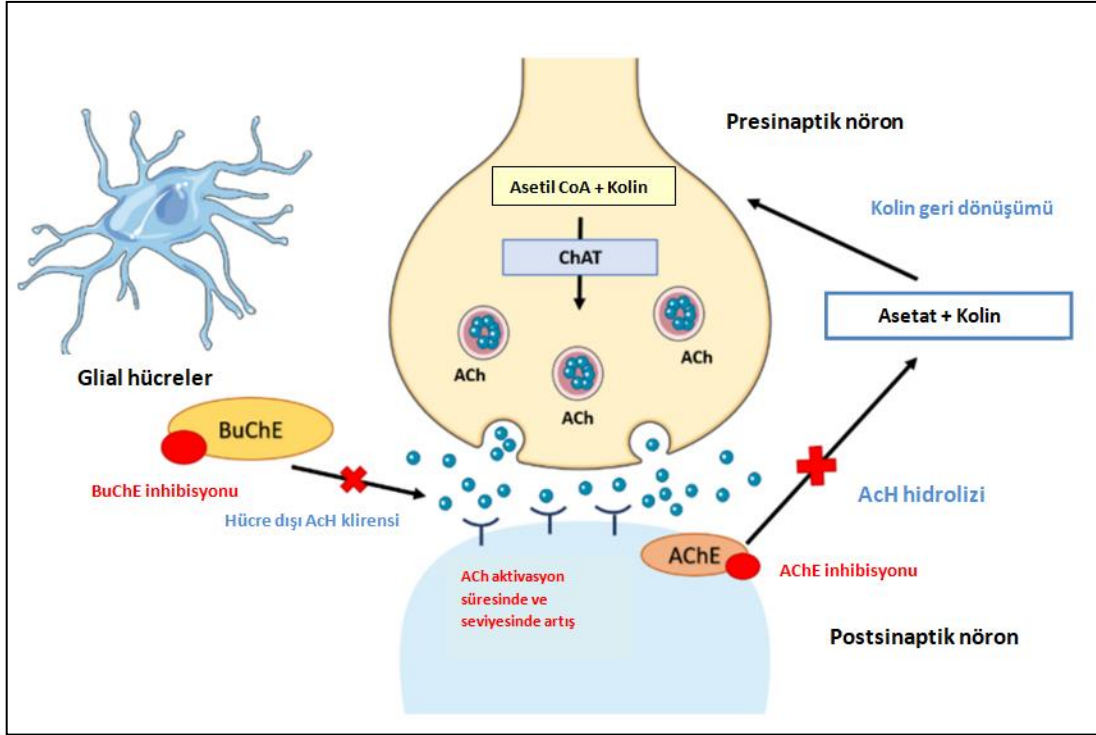
İnsan vücudunda iki önemli ChE türü bulunmaktadır. AChE , kanda ve beyindeki nöronlarda yaygın olan, esas olarak merkezi sinir sisteminde bulunan ve ACh'yi hidrolize eden enzimdir. BChE ise sinir sisteminde ve ağırlıklı olarak karaciğerde bulunur ve

bütirilkolini (BCh) ve ACh'yi hidrolize eder (33). Bu iki tip ChE enzimi yaklaşık %70 benzerlik gösterir (34). Sağlıklı bir beyinde normal AChE/BChE oranı 4/1'dir. Ancak hastalığın ilerlemesiyle beraber AChE seviyeleri yaklaşık yarı yarıya azalırken, BChE oranı %30-60 oranında artar. Bu durum BchE'nin hastalığın ilerleyen evresinde, ACh hidrolizine katkı sağladığını düşündürmektedir (35, 36).



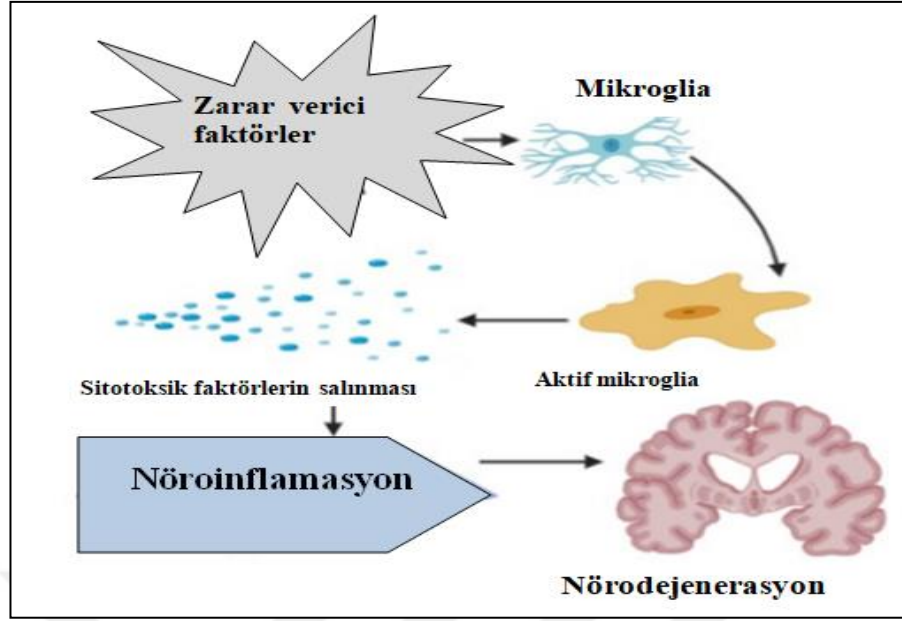
Şekil 5. AChE enziminin, ACh'i asetat ve koline hidrolizi (Koçancı'den, 37)

Sağlıklı bir beyinde, nöronlarda AChE veziküller aracılığıyla presinaptik membrana alınır. Sinaptik boşluğa salındıktan sonra ACh, AChE enzimi tarafından hidrolize uğrar ve asetik asit ve koline ayrışır. İnhibitör varlığında ise, AChE görevini yapamaz, bu sayede ACh parçalanmaz ve postsinaptik nörona doğru yoluna devam eder (31). Alzheimer hastalığında AChE enziminin aktivitesi normalden yüksektir. Bu da asetilkolinin daha fazla parçalanmasına ve beyindeki konsantrasyonunun azalmasına neden olur. Ayrıca bu enzimlerin senil plakların ve nörofibriler yumakların oluşumuna da katkıda bulunduğu ve inhibisyonlarının toksik Aβ plaklarının agregasyonunu azaltarak AH'nin ilerlemesini yavaşlattığı bildirilmiştir (6, 28, 34).



Şekil 6. Presinaptik nöronlarda gerçekleşen kolinerjik olaylar (Min'den, 38)

Nöroinflamasyon AH patogeneğinde rol oynayan önemli yollardan biridir. Son çalışmalar, merkezi sinir sistemi iltihabının hastalığın oluşmasından yıllar önce başladığını göstermektedir. Bu enflamatuar mekanizmada astrositler ve mikroglialar yer alır. Alzheimer hastalığının erken evresinde mikroglial hücreler aktive olur ve ölü hücre kalıntılarını ve A β peptidlerini fagosite ederek ortadan kaldırır. Aynı zamanda bu agregatların çevresinde bir bariyer oluşturarak, daha geniş alanlara yayılmalarını engellerler. Ancak bu aktivasyonun A β plakları tarafından kronikleştirilmesi uzun süreli enflamasyona neden olur. Bu durum mikroglialardan proinflamatuar tümör nekroz faktör (TNF-a) ve interlökin b1(IL-b1) gibi stokinlerin salınmasını artırırken, antienflamatuar sitokinlerin salınımı engeller. Bütün bunların sonucunda ROS'lar oluşur ve mikroglial hücrelerin fagositik etkisi azalır. Mikroglialar gibi astrositler de A β maruziyeti sonucu enflamatuar sitokinler üretir. Nihayetinde nöroinflamasyon ve nöron ölümü gerçekleşir (39).



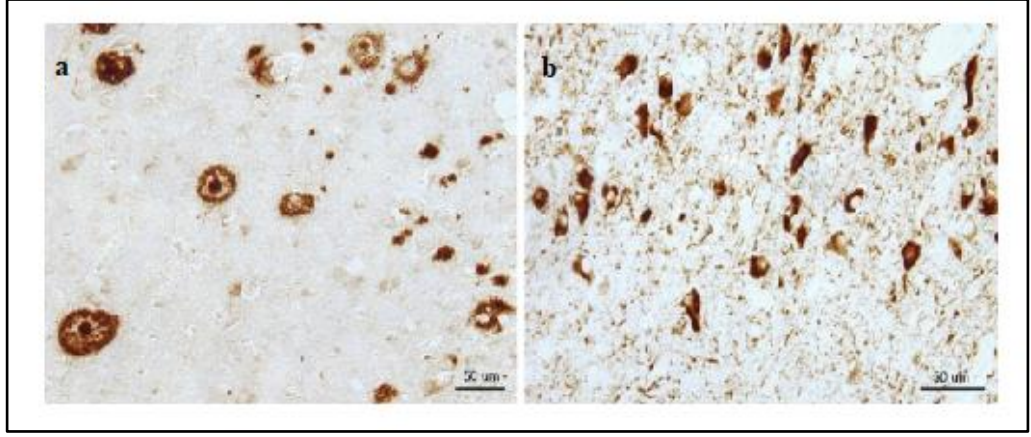
Şekil 7. Alzheimer hastalığında nörodejenerasyona sebep olan yolların şematik gösterimi (Ahmad'dan, 16)

Alzheimer hastalığının risk faktörleri arasında apolipoprotein E (Apo E) poliformizmi de yer almaktadır. Apo E allelinin varlığında hastalık riski artar. Apo E beyinde astrositler tarafından üretilen, kolesterol ve trigliserit metabolizmasında rol alan yağ bağlayıcı bir proteindir. Üç adet izoformu vardır. Bunlardan ApoE4 izoformu, plak birikimini ve nöroinflamasyonu artırarak ve A β klirensinde azalmaya sebebiyet vererek AH riskini artırır. Apo E2 ekspresyonu ise azalmış AH ile ilişkilidir (22, 32).

2.1.3. Alzheimer Hastalığında Tanı

Alzheimer hastalığının belirtileri oldukça yavaş ortaya çıkar, ilerleme hızı ve belirtiler kişiden kişiye farklılık gösterebilir (40).

Hastalığın tanısı zihinsel ve bilişsel muayenelerle beraber; patolojik olarak da A β senil plakları ve nörofibriler yumakların varlığının belirlenmesi sonucu konmaktadır. Çünkü bu agregatların varlığı AH'nin ayırt edici özelliklerindendir (25, 34). Alzheimer hastalığı tanısında bu proteinlerin birikimini ve nöronlardaki kayıpları ölçmek için bazı görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. Bunlar; manyetik rezonans görüntüleme (MRG), fonksiyonel MRG (fMRI), yapısal MRG (sMRI), radyonükleid görüntüleme çalışmaları (RIS), arteriyel spin etiketleme (ASL), duyarlılık ağırlıklı görüntüleme (SWI) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi tekniklerdir.



Şekil 8. Alzheimer hastalığının nöropatolojik özellikleri. **(a)** Amiloid- β senil plaklarının yerini belirlemek için AH beyin dokusu kesitinin immünohistokimyası. **(b)** Fosforile tau'nun nörofibriler yumakları (Plascencia-Villa'dan, 2).

Beyin omurilik sıvısı da hastalığın patolojisinde bulunan fosforile tau, A β 42 ve ubikuitin biyobelirteçlerini içerir. Kanda A β proteini ve izoprostanlar, idrarda ise nörol iplik proteini, hastalığın biyobelirteçlerindendir (32).

2.1.4. Alzheimer Hastalığında Tedavi

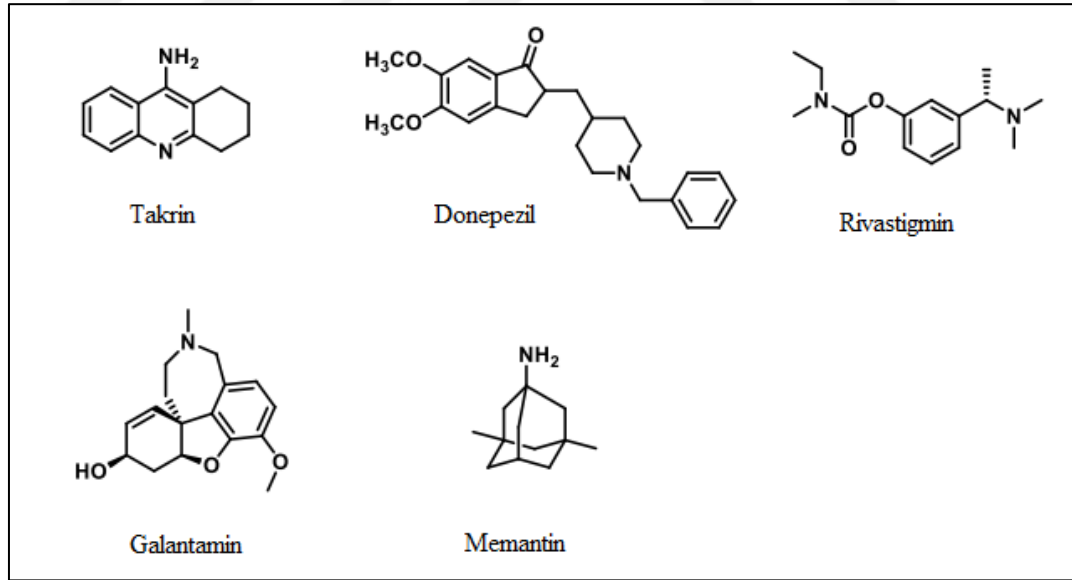
Alzheimer hastalığının kesin tedavisi, 1902 yılında hastalığın tanımlanmasından bu yana hala bulunamamıştır. Mevcut ilaçlar, hasta bireylerde sadece semptomatik bir hafifleme sağlamaktadır, A β plaklarının ve tau yumaklarının oluşumunu engellemezler (35). Hastalığın ana patolojileri olan amiloid plakları ve tau yumaklarının yanında sahip olduğu enflamasyon, immün düzensizlik, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres gibi fizyolojik bozulmalar, hastalığın karmaşık patolojisini ortaya koymakta ve tedaviyi güçleştirmektedir (36).

Şu an için FDA tarafından onaylanmış olan mevcut ilaçlar üç sınıfta incelenebilir. Bunlardan ilki ChE inhibitörleridir. İnhibitörler bir enzimin aktivitesini durduran veya yavaşlatan genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir (41). Şu ana kadar mevcut ChE inhibitörleri galantamin, rivastigmin, takrin ve donepezildir. Bu ilaçlar ACh'in kolin ve asetat bileşenlerine parçalanmasını engelleyerek, beyindeki mevcut ACh seviyesini korumayı veya artırmayı hedefler. Böylece nöromusküler kavşaklarda ACh seviyesi ve etki süresi artmış olur (42). Hastalığın hafif-orta seviyelerinde kullanılmaktadır.

Bir inhibitörün enzimi inhibisyonu geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir. Geri dönüşümsüz inhibisyonunda inhibitörler enzime kovalent bağlanma yaparlar ve enzimin

aktif merkezindeki amino asit yapısını değiştirebilir. Geri dönüşümlü inhibisyonlarda ise inhibitörler enzime hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar veya hidrojen bağı gibi kovalent olmayan yollarla bağlanır (41, 43). Donepezil ve galantamin AChE'ı geri dönüşümlü olarak inhibe ederken, rivastigmin AChE ve BChE'i geri dönüşümsüz olarak inhibe eder (28). Takrin ise karaciğer toksisitesine sebep olduğu için ilaç pazarından çekilmiştir. Ancak mevcut ChE inhibitörlerinin uzun dönem ve artan doza bağlı kullanımının gastrointestinal sistemde mide bulantısı, ishal, kusma gibi yan etkilerinin olduğu belirtilmiştir (27, 44).

İkinci grupta bir NMDA antagonisti olan memantin yer alır. Glutamat, NMDA reseptörlerine bağlanan bir nörotransmitterdir. Glutamat NMDA reseptörüne bağlandığında, nöronal hücrede sodyum ve kalsiyum akışını düzenleyerek hafıza ve öğrenme işlevlerine katkıda bulunur. Ancak reseptörlerin glutamat tarafından aşırı uyarılması, eksitotoksisiteye sebep olarak, nöron ölümüne neden olur. Memantin, NMDA reseptör blokeri olarak görev alır. Glutamat aracılı nörotoksisiteyi inhibe ederek hareket eder (28, 45) ve hastalığın ileri seviyesinde kullanılmaktadır (7).



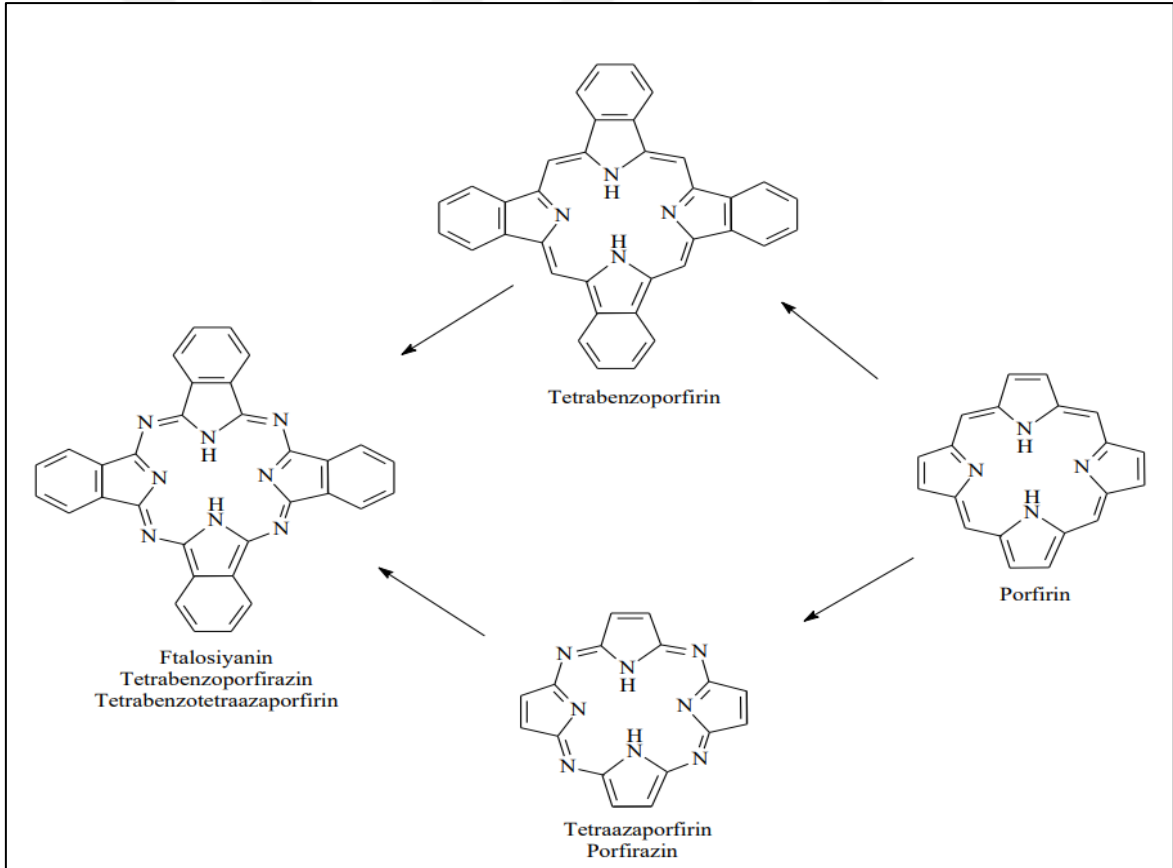
şekil 9. Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanılan FDA onaylı ilaçlar (Liu'dan, 46)

Son olarak FDA 2021 yılında bir anti-amiloid antikoru olan Aducanumab'a AH tedavisi için onay vermiştir. İlaç intravenöz olarak uygulanır, kan beyin bariyerini geçerek Aβ peptidinin n-terminaline bağlanarak etki gösterir. Hastalığın hafif demans evresi için endikedir (47, 48).

Hastalığın beynin işlevlerini henüz koruyabildiği erken evrede, ilerleyişinin engellenmesi için, hastalığı modifiye edici ilaçların geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır. Şu anda mevcut ilaçlar sadece semptomik ilaçlardır ve hastalığın orta ve ileri evresi için onaylanmıştır (44).

2.2. Ftalosiyaninler

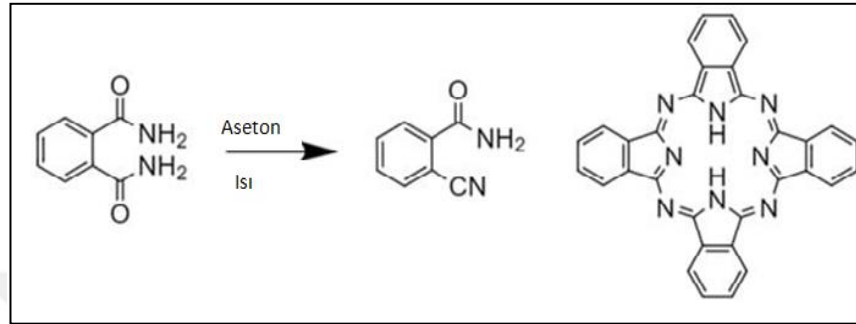
Ftalosiyaninler, $(C_8H_4N_2)_4H_2$ moleküler formülüne sahip, yeşil- mavi renkte aromatik makrosiklik bileşiklerdir. Azot atomları ile birbirine bağlanmış dört izoindol alt grubuna ve 18 π elektron sistemine sahip iki boyutlu bileşiklerdir (11). Yapısal olarak klorofil, hemoglobin, B12 vitamini gibi porfirinlere benzer. Ancak doğada bulunmazlar ve tamamen sentetik yollarla üretilirler (49).



Şekil 10. Porphirin ve ftalosiyanin arasındaki yapısal ilişki (Telseren'den, 49)

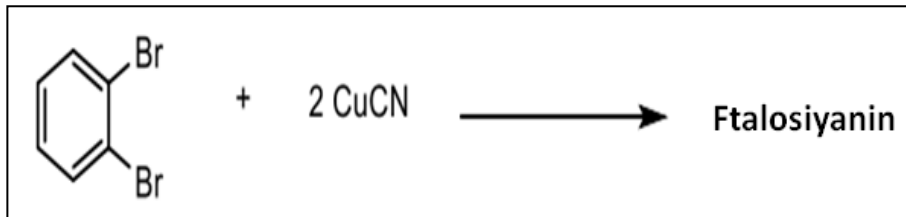
2.2.1. Ftalosiyanın Tarihçesi

1907 yılında, A.V. Braun ve J. Tcherniac tarafından, asetondaki ftalamidden orto-siyanobenzamidin hazırlanması esnasında bir yan ürün olarak tesadüfen ilk metal içermeyen ftalosiyanın keşfedilmiştir.



Şekil 11. İlk metalsiz ftalosiyanın sentezinin şematik gösterimi (Carobeli'den, 50)

Ftalosiyanın ismi, Yunanca kaya yağı anlamına gelen 'nafta' koyu mavi anlamına gelen 'siyanin' ve sentezlendiği ilk öncü olan ftalik asit (C₈H₆O₄) kelimelerinden türetilmiştir (51). Yaklaşık 20 yıl sonra Diesbach ve Van Der Weid, bakır siyanür (CuCN) ile o-dibromobenzenin (C₆H₄Br₂) bileşiğini piridin içinde 200 °C'de ısıtarak mavi renkli, çözünmeyen, kararlı bir ürün ortaya çıkarmış, ancak yapılarını aydınlatamamışlardır (52).



Şekil 12. Diesbach ve Van Der Weid tarafından gerçekleştirilen reaksiyon (Oliveira'dan, 52)

1928 yılında ise bir boya şirketi olan Scottish Dyes, Ltd. firmasında, tesadüfi olarak yeni bir demir ftalosiyanın üretilmiştir. Ürün ftalik anhidrit (C₈H₄O₃) ve ftalimidin amonyaktan üretimi sırasında, ürünün demir reaktörünün dışına kazara sızmasıyla ortaya çıkmıştır. Ortaya çıkan bu mavi yeşil ürün, boya şirketinde dikkat çekmiştir. Bu maddenin demir ile ftalimidin bir yan ürünü olarak ortaya çıktığı, organik çözücülerde çözünmeyen

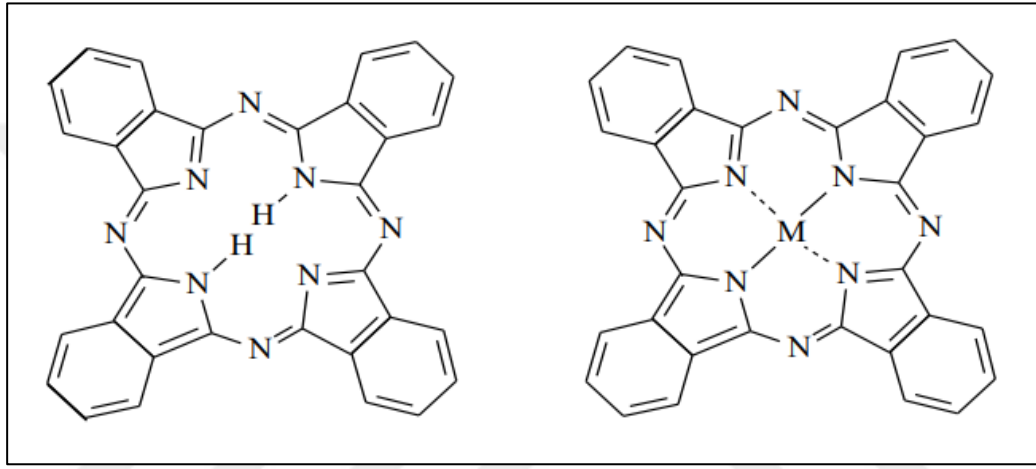
oldukça kararlı bir bileşik olduğu ve bir pigment olarak potansiyele sahip olduğu şirket tarafından gösterilmiştir. Patent şirketten Dandridge, Drescher ve Thomas'a, 1929 yılında verilmiştir. Aynı yıl Profesör Reginald P. Linstead ve arkadaşları bu bileşiğin yapısını aydınlatmış ve ismini tetraazabenzoporfirin olarak açıklamışlardır (50, 52).

2.2.2. Ftalosiyanın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Ftalosiyanın kararlı bir kimyasal yapıya sahiptir. Bu kararlı yapısının sebebi, moleküler yapılarındaki aromatiklik ve koordine kovalent bağlanma yapabilmelerinden ileri gelmektedir. Genellikle kuvvetli asit ve alkali, ışık gibi çözücülere karşı oldukça kararlı ve yüksek sıcaklıklara karşı oldukça dayanıklıdır. Bu kimyasal yapıları sebebiyle ftalosiyanın boyalar ve pigmentler, gaz sensörleri, katalizörler, güneş pilleri gibi endüstriyel ve teknolojik alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca ftalosiyanın antimikrobiyal, antioksidan, antikanser, tümör görüntüleme, kemik iliği temizleme, enzim inhibisyonu, fotodinamik terapi (PDT) gibi çeşitli biyolojik etkilere sahip olduğu da rapor edilmiştir (12, 53). Son yıllarda ftalosiyanın, ısı ve ışığa karşı sahip olduğu yüksek kimyasal kararlılık, yüksek fototoksisite, tümör hücre seçiciliği, reaktif oksijen üretim kapasitesi ve vücuttan hızlı atılımı sebebiyle fotodinamik terapide üzerinde çalışılan bileşiklerden olmuştur. Eklenerek farklı substitüentlerle fiziksel ve kimyasal yapısı değişebilen ftalosiyanın, araştırmacıları yeni ve farklı çeşitlerde ftalosiyanın sentezlemeleri için teşvik etmektedir (50).

Ancak ftalosiyanın bir dezavantajı suda ve organik çözücülerde düşük bir çözünürlük sergilemeleri ve agregat oluşturmalarıdır. İki veya daha fazla ftalosiyanın molekülü, moleküler çekim sonucu üst üste yığılarak bir kümeleşme meydana getirir. Bu nedenle monomer yapı, dimer veya oligomer yapılara dönüşebilir. Oluşan bu yığın halindeki yapıya agregat adı verilir. Agregatı oluşturan ftalosiyanın molekülleri arasında herhangi bir kimyasal etkileşim yoktur (54, 55). Ancak bu durum ftalosiyanın çözünürlüğünü olumsuz etkiler. Özellikle ikame edilmemiş ftalosiyanın ve metaloftalosiyanın çözünme daha düşüktür (56). Düşük çözünürlük tıbbi ve teknolojik uygulamalarda zorluklara sebep olur (57, 58). Özellikle enzim inhibisyonu, fotodinamik terapi gibi biyolojik alanlarda bu komplekslerin çözünürlüğünün artması, uygulamanın etkinliğini artıracaktır. Bu durum ftalosiyanın bileşiğine, çözünürlüğünün artmasını sağlayacak olan çeşitli alt grupların eklenmesi ile çözülebilir.

Ftalosiyeninlerin fiziksel ve kimyasal yapıları, merkezi atomun boşluğundaki metal atomuna ve ftalosiyenin iskeletinin periferal veya periferal olmayan konumlarındaki alt bileşenlerin yapısına göre değişim gösterir. Eklenerek farklı alt gruplar ile bileşiğin çözünürlüğü de değiştirilebilir. İlk sentezlenen ftalosiyeninler daha kararlı yapıya sahip olmalarına rağmen, yeni sentezlenen ftalosiyeninler daha yüksek çözünürlüğe ve daha düşük bozunma sıcaklıklarına sahiptir. Ftalosiyeninlerin günümüzde kolayca sentezlenebilmesi, araştırmacıların dikkatini çekmiş ve yeni uygulama alanlarının açılmasına neden olmuştur.



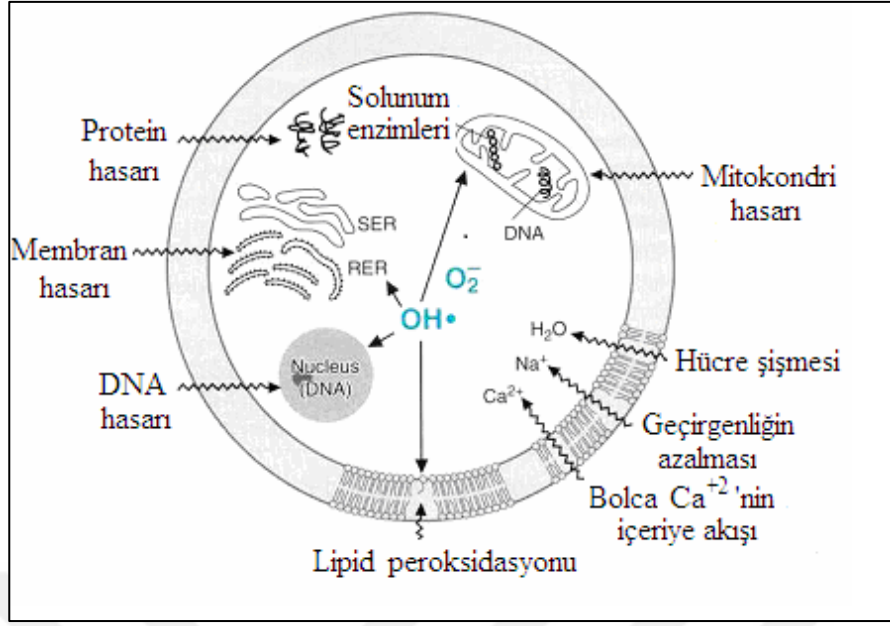
Şekil 13. Metallsız ve metalli ftalosiyenin (Ömeroğlu'dan, 59)

Ftalosiyeninler neredeyse bütün metallerle koordine olabilirler. Merkezdeki iki hidrojen atomu metaller ve yarı metaller ile yer değiştirerek metaloftalosiyeninleri oluşturur. Ftalosiyenin bileşiğinin halkasına ve çevresine eklenen bu moleküller, halkalar arası mesafeyi artırır ve moleküler etkileşimi azaltır. Sonuç olarak molekül daha çözünür hale gelir. Özellikle biyolojik ve farmakolojik uygulamalarda etkinliğin sağlanması için çözünür ftalosiyeninlerin sentezine ihtiyaç vardır (60, 61).

Tablo 1. Reaktif oksijen türleri ve serbest radikal olmayan türler (Gülçin'den, 63)

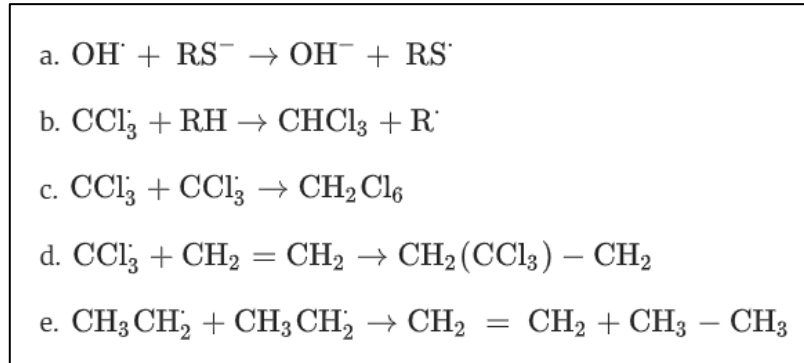
Reaktif oksijen türleri		Reaktif nitrojen türleri	
Hidroksil radikali	HO·	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Süperoksit radikali	O ₂ ^{·-}	Singlet oksijen	¹ O ₂
Hidroperoksil radikali	HOO·	Ozon	O ₃
Lipid radikali	L·	Lipid hidroperoksit	LOOH
Lipid peroksil radikali	LOO·	Hipoklorit	HOCl
Peroksil radikali	ROO·	Peroksinitrit	ONOO ⁻
Lipid alkoksil radikali	LO·	Dinitrojen trioksit	N ₂ O ₃
Azot dioksit radikali	NO ₂ ·	Nitröz asit	HNO (HNO) ₂
Nitrik oksit radikali	NO·	Nitril klorür	NO ₂ Cl
Nitrosil katyonu	NO ⁺	Nitroksil anyonu	NO ⁻
Tiil radikali	RS·	Peroksinitröz asit	ONOOH
Protein radikali	P·	Gülme gazı	N ₂ O

Reaktif oksijen türleri nötrofiller, makrofajlar ve monositler tarafından yabancı organizmalara karşı savunmak için, bağışıklık sistemi tarafından da üretilirler. Bu sayede enfeksiyonlara karşı savunmada rol oynarlar. Aynı zamanda hücresel homeostaz, sinyal iletimi ve hücre farklılaşması için de gereklidirler. Ancak ROS'ların aşırı üretiminin membran lipitleri, nükleik asitler, karbonhidratlar, hücre duvarı ve proteinler üzerinde zararlı etkileri vardır. Bu etkiler gen mutasyonuna, doku hasarına ve erken yaşlanmaya neden olur. Kademeli olarak gerçekleşen bu oksidatif hasar nihayetinde hücre ölümü ile sonuçlanır. Tüm bu süreçlerin sonunda çeşitli hastalıklar meydana gelir. ROS'ların kanser, diyabet, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, felç gibi 100'den fazla hastalığa katkıda bulunduğu bilinmektedir (63).



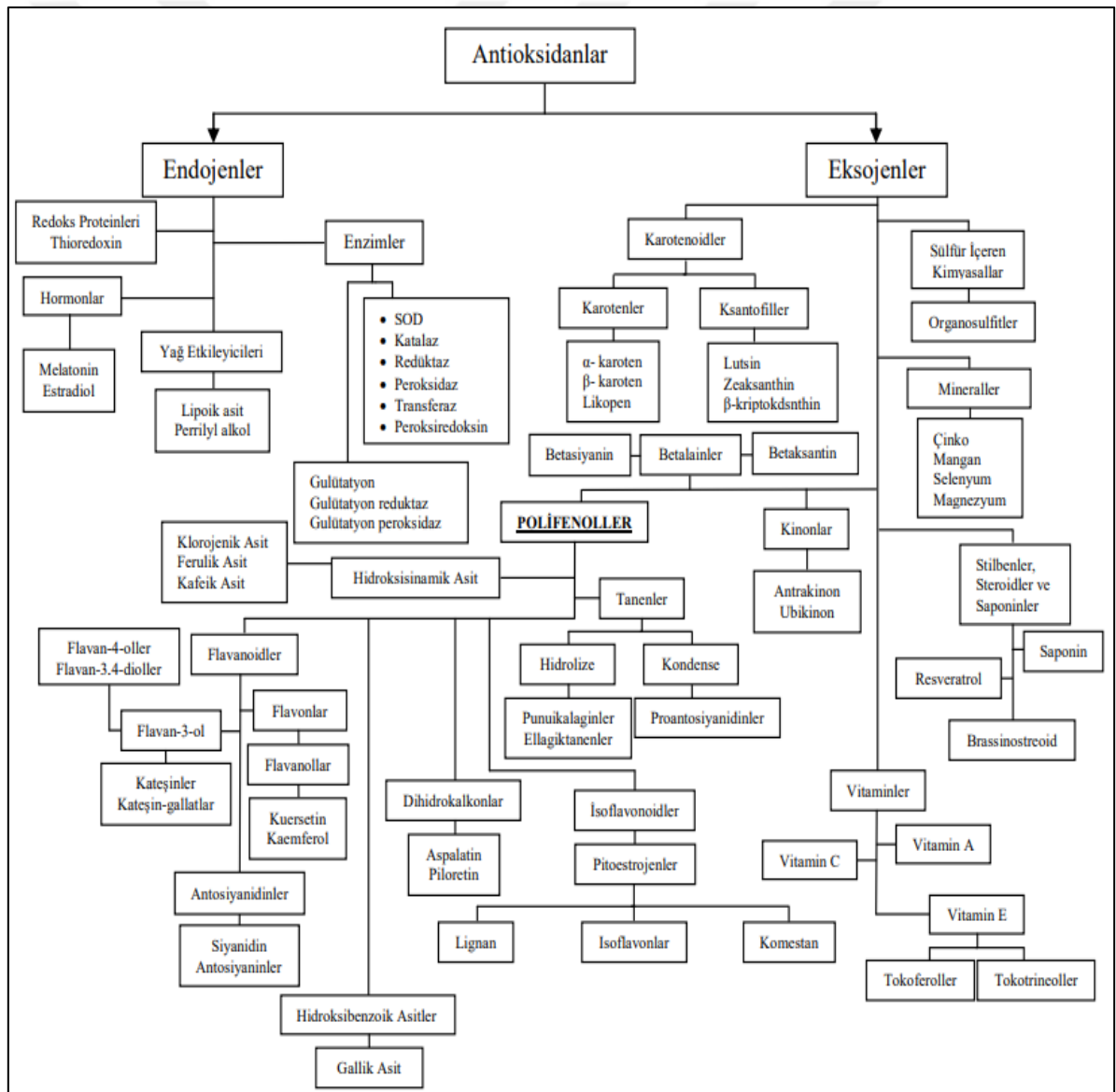
Şekil 15. Serbest radikallerin, hücrede sebep olduğu hasarlar (Akkaya'dan, 64)

Vücudun doğal işleyişi sırasında ROS'ların oluşumu kaçınılmazdır. Sağlıklı bir organizmada, vücudun doğal işleyişi sırasında ortaya çıkan bu serbest radikallerle savaşan bileşikler bulunur. Bu bileşiklere antioksidan, bu savunma sistemine ise antioksidan savunma sistemi denir. Antioksidanlar serbest radikalleri engelleyebilir, nötralize edebilir ve detoksifikasyonunu sağlayabilirler. Antioksidanların serbest radikallerle reaksiyonu çok hızlı bir şekilde gerçekleşir. Bu sayede radikalleri etkisiz hale getirerek, vücudun savunma sistemine katkıda bulunur ve hastalıkların oluşumunu engellerler. Antioksidanların, moleküllerle etkileşime girebileceği farklı yollar Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16. Antioksidanların moleküllerle etkileşim yolları. **(a)** Elektron bağışı/kabulü **(b)** Hidrojenin uzaklaştırılması. **(c)** Kendini yok etme **(d)** Katılma reaksiyonu **(e)** Oksidantı azaltma yolu (Gülçin'den, 63).

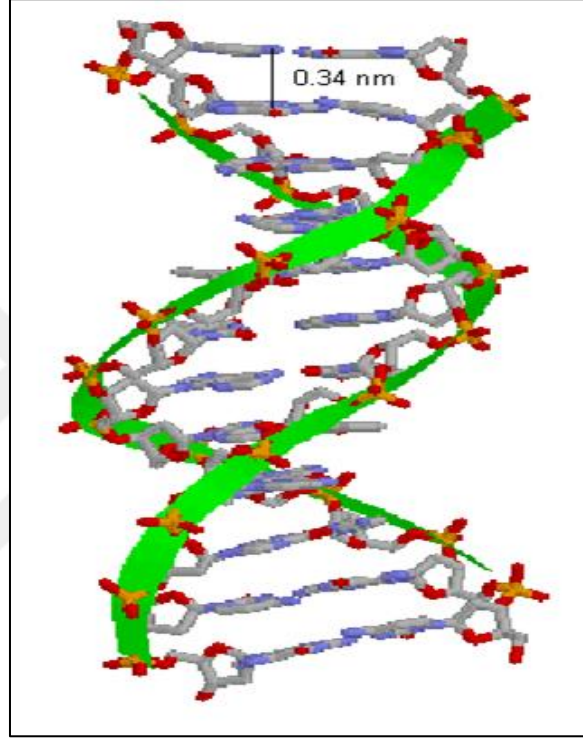
Antioksidanlar vücudun kendisi tarafından üretildiği gibi dışarıdan besinler yoluyla da alınabilir. Gıdaların bozulmasını engellemek ve raf ömrünü uzatmak için kullanılan doğal ve sentetik antioksidanlar da mevcuttur. Bazı antioksidanlar, belirli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak da kullanılmaktadır (65). Sağlıklı bir bünyede serbest radikaller ve antioksidan sistemler denge halindedir. Ancak antioksidan sistemlerin yetersiz kaldığı veya serbest radikallerin arttığı durumlarda denge bozulur. ROS'a sürekli maruz kalan organizmada oksidatif stres dediğimiz süreç başlar. Oksidatif stres lipid peroksidasyonu, DNA, RNA hasarı ve mitokondriyal disfonksiyona neden olarak hastalık süreçlerini başlatır. Antioksidanların sınıflandırılması Şekil 17'de gösterilmiştir (66).



Şekil 17. Antioksidanların sınıflandırılması (Okan'dan, 67)

2.4. DNA Nükleaz Aktivitesi

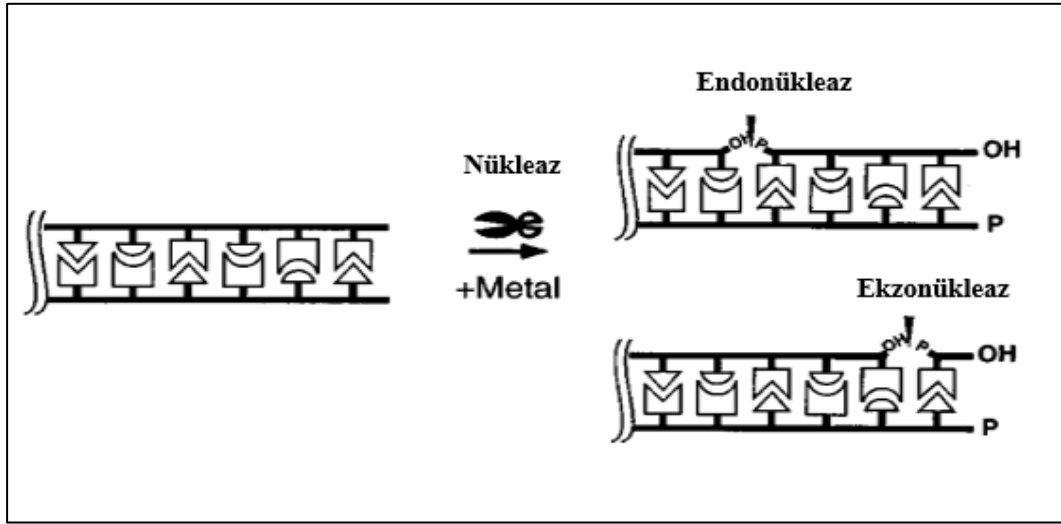
DNA genetik bilginin aktarımında rol alan, iki adet sarmal zincirden oluşmuştur. Her bir insan h ccresinde, yaklaşık 2 m uzunluğundaki DNA,  apı ortalama 10  m olan bir çekirdeğe sıkıştırılmış halde bulunur. DNA'nın çift sarmallı yapısı ona eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikler kazandırır. Bu  ift sarmal yapı genetik bilginin depolanma şeklidir, ancak bu bilgiyi kopyalamak veya ifade etmek için bu zincirin açılması gerekir (68).



şekil 18. DNA'nın yapısı (Gowda'dan, 69)

DNA radyasyon, ultraviyole (UV) ışını, reaktif oksijen türleri gibi tehlikeli ajanlar tarafından sürekli bir saldırıya maruz kalır. Bunun yanında DNA'nın replikasyonu ve rekombinasyonu sırasında ortaya çıkan içsel hatalar da mümkündür. Tüm bu saldırılar sonucunda DNA hasara uğrar ve başta kanser olmak üzere, nörodejenerasyon, yaşlanma gibi çeşitli patolojilere katkıda bulunur. Hücreler tarafından hayati öneme sahip olan DNA'nın korunması için çeşitli onarım mekanizmaları mevcuttur. Bunlardan biri olan nükleazlar, hasarlı nükleotidlerin onarımı veya ortadan kaldırılmasında önemli rol oynar. Nükleazların gerçekleştirdiği görevler arasında, kırılan çift iplikçiğin onarımı, DNA replikasyonu, uyumsuzluk onarımı, baz ve nükleotid eksizyon onarımı örnek verilebilir. DNA zincirleri arasındaki fosfodiester bağları kuvvetli hidrolitik stabilit ye sahiptir ve bu sebeple hidrolizi

için enzim katalizörlerine ihtiyaç duyarlar. Nükleazlar, DNA'nın şekerleri ve fosfatları arasındaki fosfodiester bağlarını koparan bir makas gibi düşünülebilir. DNA'nın ucunda meydana gelen bölünmeleri katalizleyenlere ekzonükleazlar, orta veya iç kısmındaki bölünmeleri katalizleyen nükleazlara endonükleazlar denir (70, 71).



Şekil 19. Nükleazların katalize ettiği DNA bölünmesi (Nishino'dan, 70)

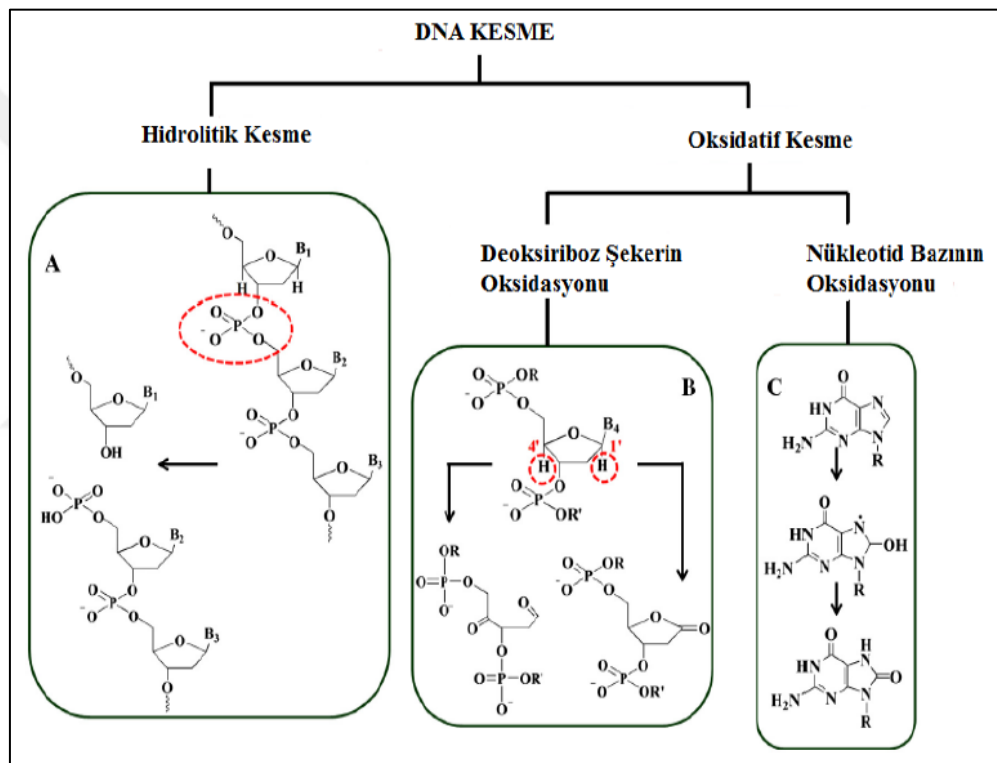
Nükleazların hücrenin programlı ölümünde (apoptoz) de önemli rolleri vardır. DNA'nın yıkımı apoptosiz sürecinde hem hücrenin ölümünü hem de fagositik yutulmayı kolaylaştırır. Hücreye özgü nükleazlar, ölmekte olan hücrenin DNA'sını parçalar. Daha sonra bu atıkları fagosite eden hücrenin lizozomlarında, kalan DNA parçaları, atık-yönetim nükleazları tarafından yok edilir (72).

DNA'nın bölünmesi canlı organizmanın devamı için hayati bir gerekliliktir. Örneğin topizomeraz enzimi replikasyon ve transkripsiyon süreci için DNA çift veya tek sarmalının bölünmesini indükler. Yine yukarıda bahsettiğimiz gibi hücrenin apoptozisine katkıda bulunan endonükleazlar da DNA'nın bölünmesini sağlar. Birçok kanser ilacı da hücreyi apoptozise sürükleyerek antitümör etkiye katkıda bulunur. DNA'nın bölünmesi hidrolitik, oksidatif ve fotokimyasal kesim olmak üzere üç farklı yolla gerçekleşir.

Hidrolitik bölünme su varlığında DNA'daki fosfodiester bağlarının kırılması olarak tanımlanabilir. Ancak DNA'nın hidrolize karşı oldukça kararlı olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmada Lewis asitleri gibi davranan metal iyonları hidrolizi kolaylaştırmaktadır. DNA'yı hidrolize eden enzimlerin aktif bölgelerinde genelde Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} ve Fe^{2+}

gibi metal iyonlar bulunmaktadır. Bu sebeple bu tür metal iyonları içeren bileşikler fosfodiesterlerin hidrolizi için uygundur denilebilir (69, 73).

Oksidatif bölünme, nükleobazların oksidasyonu veya şeker hidrojeninin ayrılması yoluyla deoksiribozun hidrolizini ifade eder. Bu bölünme hem nükleik baz düzeyinde hem de karbonhidrat düzeyinde olabilir. Oksidatif bölünmeye H_2O_2 , hidroksil radikali veya DNA parçalama ajanları gibi harici ürünler eşlik eder. Bu bölünmede deoksiriboz şekeri veya nükleobazların tümü zarar görebilir. Hidrolitik ve oksidatif bölünmelerin her ikisinde de DNA parçaları bağlanamaz (69).



Şekil 20. Hidrolitik ve oksidatif kesimin gösterimi (Barut'dan, 73)

Fotokimyasal bölünme, nükleaz aktivitesinin ışık yoluyla uyarılması anlamına gelir. Fotokimyasal olarak üretilen radikaller şeker halkasından hidrojen atomunun ayrılmasına, elektron transferine, baz eklentilerinin oluşumuna, singlet oksijen üretimine sebep olabilir. Görünür veya UV ışınları ile nükleazlar aktive olur. Bu sayede transkripsiyon gibi işlemler incelenebilir, nükleik asit yapıları fotoayak izi, foto dizileme gibi proseslerde kullanılabilir. Aynı zamanda ışık yoluyla ilaçlara karşı duyarlı hale getirilen DNA, antitümör tedaviler için

yararlı olabilir. Işıkla başlatılan DNA hasarı iki türe ayrılır; tip 1’de tek elektronlu süreçler varken, tip 2’de singlet oksijen oluşumu vardır (69).

DNA’nın verimli ve bozunmaz bir şekilde, yüksek bir seçicilikle hidrolitik kesimi yeni ilaçların tasarımı için son zamanlarda yoğun bir şekilde çalışılan alanlardandır. Üstelik DNA’nın hidrolitik kesimi, diğer kesim yollarına göre radikal içermemesi açısından daha güvenli bir yoldur (73). DNA molekülü özellikle antikanser ve antiviral ilaçlar için hedef moleküldür. Şu an için sispilin ve türevleri kanser tedavisi için en yaygın şekilde kullanılan metal türevi ilaçtır. Ancak mevcut ilaca direnç ve sahip olduğu toksite sebebiyle ciddi yan etkileri vardır. Bu sebeple daha güvenli ve etkili ilaç tasarımlarına ihtiyaç vardır (74).

Son yıllarda geçiş metal kompleksleri ile nükleik asitlerin etkileşimi sıklıkla araştırılmaktadır. Bu sebeple metalo-nükleaz aktivitelerinin modellenmesi önem taşımaktadır. Fosfodiester bağlarının bölünmesine aracılık eden ajanlar olarak geçiş metal kompleksleri sıklıkla kullanılmaktadır. Metal komplekslerinin DNA’yı çok çeşitli yollarla bağlama ve parçalama potansiyelleri olduğu bulunmuştur. Bunun sebebi geçiş metallerinin sahip oldukları Lewis asitlikleri ve yüksek yük yoğunluklarıdır (75).

İtalosiyenin bileşikleri de sahip oldukları singlet oksijen verimi ve suda çözünürlüğü sebebiyle bir nükleaz aktivitesi sergileme potansiyeline sahiptir. Aynı zamanda literatürde italosiyenin bileşiklerinin nükleaz aktivitesi gösterdiği çalışmalar mevcuttur (76). Günümüz çağında vücutta kullanılacak terapötik moleküllerin çevresel ve toksik açıdan güvenilir ve temiz olması da oldukça önemlidir. Bu sebeple sentezlenen italosiyenin bileşiğimizin enzim inhibisyon çalışmasının yanında, antioksidan aktivitesi ve nükleaz aktivite çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Adı	Marka, Kodu
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	Sigma-Aldrich, G7384
5,5’dithiobis (2-nitro-benzoik asit) (DTNB)	Sigma-Aldrich, D8130
Agaroz	Sigma-Aldrich, A9539
Asetiltiyokolin iyodür (AChI)	Sigma-Aldrich, A5751
Asetilkolinesteraz (AChE)	Sigma-Aldrich, C3389
Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)	Sigma-Aldrich, A5751
Bütiriltiyokolin iyodür (BChI)	Sigma-Aldrich, 20820
Bütirilkolinesteraz (BChE)	Sigma-Aldrich, C1075
Demir (III) klorür (FeCl ₃)	Sigma-Aldrich, F2877
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, 472301
Etidyum bromür (EB)	Sigma-Aldrich, E7637
Galantamin	Sigma-Aldrich, G1660
Gallik asit	Sigma-Aldrich, G7384
HCl	Merck 1.09973
pBR322 plasmid DNA	Thermo Scientific, SD0041
Potasyum ferrisiyanür (K ₃ [Fe(CN) ₆])	Sigma-Aldrich, 244023
Trikloroasetik asit (TCA)	Fischer–Scientific, BP555
Trisma baz	Sigma-Aldrich, 93362

Çalışmada kullanılan aksiyal pozisyonlarda 8-[3-(trimetilamino) fenoksi] oktanoksi grubu içeren silisyum (IV) ftalosiyanın (DM-C8-SiQ) ve periferik pozisyonlarda 8-[3-(trimetilamino) fenoksi] oktanoksi grubu içeren çinko (II) ftalosiyanın (DM-C8-ZnQ) bileşiklerinin sentezi ve karakterizasyonu Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Zekeriya Bıyıklıoğlu ve çalışma grubu tarafından

gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin yapıları IR, NMR, MALDI-TOF MS ve UV-Vis spektroskopik teknikleri kullanılarak aydınlatılmıştır.

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Marka, Model
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Derin Dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Elektroforez güç kaynağı	BioRad Power PacTMBasic
Hassas terazi	Ohaus PA 2140
Jel görüntüleme sistemi	Bio Rad Universal Hood Imager Ge
Manyetik karıştırıcı	Dragon MS-H-Pro
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific Multiskan Go
Otomatik pipetler	Socorex
pH metre	Ohaus Starter 300
Vorteks	Visemix WM-10 Wisd
Yatay DNA elektroforezi	Biorad Wide Mini-Sub Cell GT System

3.1.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

50 mM Tris- HCl (pH 8) tamponunun hazırlanması

pH= 8’de 50 mM’lık 250 mL Tris- HCl tamponu hazırlamak için 1. 514 gram Tris tartıldı. Yaklaşık 200 mL saf suyun içine alındı. Daha sonra seyreltik HCl damlatılarak pH’ı 8’e kadar düşürüldü.

3 mM DTNB çözeltisinin hazırlanması

DTNB bileşiğinden ihtiyacımız olan 35 mL için 42 gram tartıldı. Daha sonra hazırlanan bu çözelti kapaklı tüp içine alındı ve Tris tamponu ekleyerek çözüldü. Çözelti bir sonraki çalışma için +4 °C ‘de muhafaza edildi.

15 mM AChI çözeltisinin (substrat) hazırlanması

AChI’dan 3 mL’lik hacim için 0.013 gram tartıldıktan sonra pH 8 tamponunda çözüldü ve daha sonra çözelti tamponla 3 mL’ye tamamlandı.

15 mM BChI çözeltisinin (substrat) hazırlanması

BChI'dan 3 mL'lik hacim için 0.0135 gram tartıldıktan sonra pH 8 tamponunda çözüldü ve daha sonra çözelti tamponla 3 mL'ye tamamlandı.

AChE enzim çözeltisinin hazırlanması

AChE enzim çözeltisinden (0.2 ünite/mL) 89.5 µL alındıktan sonra pH=8 tamponu ile 3 mL'ye tamamlandı. Enzimler çalışmanın olduğu gün buzlukta çıkarıldı ve oda sıcaklığına getirilerek hazırlandı.

BChE enzim çözeltisinin hazırlanması

BChE enzim çözeltisinden (0.2 ünite/mL) 31.75 µL alındıktan sonra pH=8 tamponu ile 3 mL'ye tamamlandı. Enzimler çalışmanın olduğu gün buzlukta çıkarıldı ve oda sıcaklığına getirilerek hazırlandı.

Ftalosiyanın çözeltilerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan ftalosiyanın inhibitörlerinin derişimi 25 mM olacak şekilde belli miktarlarda tartıldıktan sonra DMSO içinde çözüldü. Daha sonra çalışacağımız ftalosiyaninleri gerekli molariteler (5, 10, 20, 40 ve 100 µM) için saf su ile seyreltildi.

0.2 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması

3.2 mg DPPH tartıldı. Metanol ile çözülüp hacmi 40.576 mL'ye tamamlandı.

%1'lik K₃[Fe(CN)₆] çözeltisinin hazırlanması

100 mg K₃[Fe(CN)₆] tartıldı. Saf su ile çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

%10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması

1 g TCA tartıldı. Saf su ile çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

%0.15'lik FeCl₃ çözeltisinin hazırlanması

15 mg FeCl₃ tartıldı. Saf su ile çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

%0.8'lik Agaro Jel

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

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 tamamlandı.

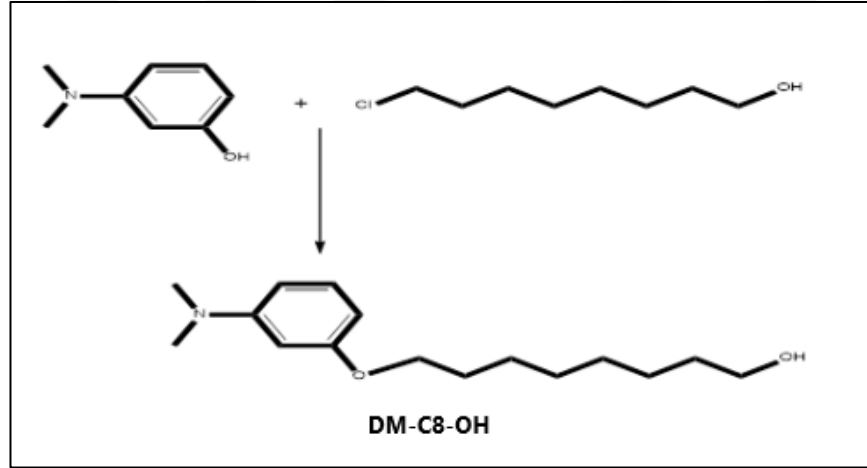
50 mM Tris-HCl (pH 7) tamponu

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

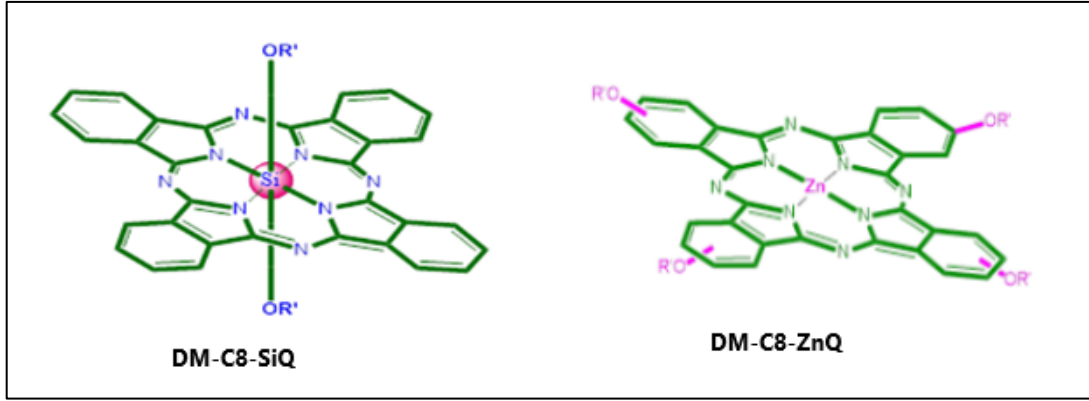
3.2. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Ftalosiyanın Bileşikleriyle İnhibisyon Çalışmaları

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Ftalosiyaninler

AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyon çalışmasında kullanılan ftalosiyanın bileşikler içerdikleri yan gruplara göre dört gruba ayrılmıştır. Çalışmada kullanılan bileşiklerin isimleri ve molekül ağırlıkları Tablo 4'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Bileşiklerin sentezinde kullanılan öncül maddenin yapısı Şekil 21, sentezlenen bileşikler ise Şekil 22'de gösterilmiştir.



Şekil 21. DM-C8-OH ftalosiyanın bileşiğinin sentezi



Şekil 22. Öncül bileşikten sentezlenen DM-C8-SiQ ve DM-C8-ZnQ ftalosiyanın bileşiklerinin yapıları

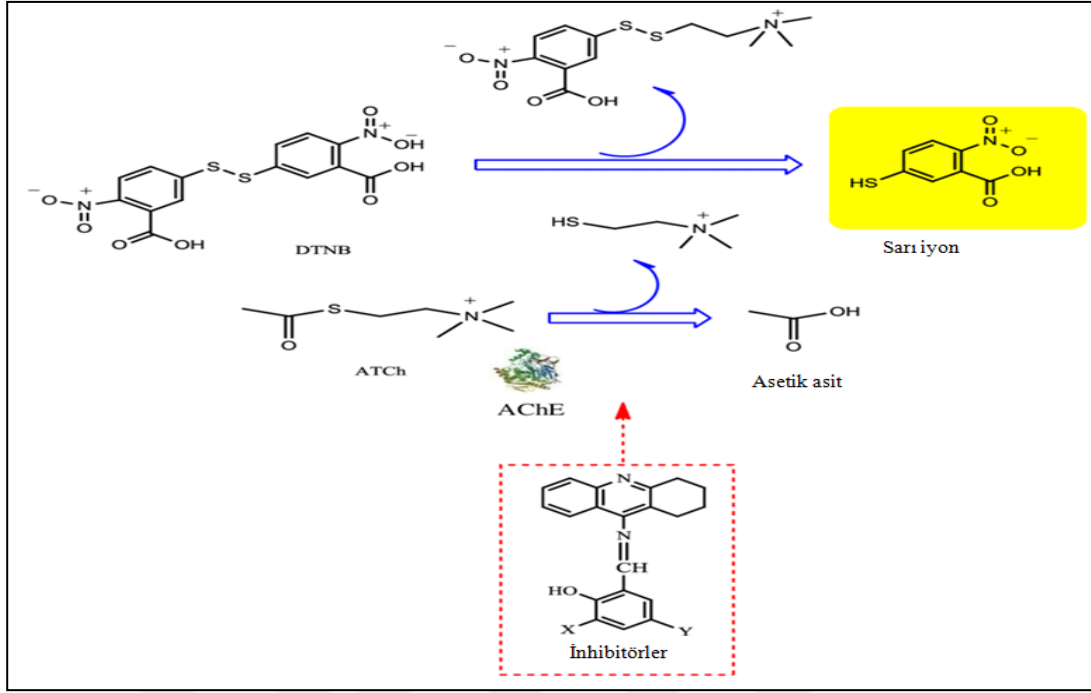
Tablo 4. Çalışmada kullanılan bileşiklerin isimleri ve molekül ağırlıkları

Bileşiklerin İsimleri	Kısa Kodları	Molekül Ağırlıkları
2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-8-[3 (trimetilamino) fenoksi] oktanoksi ftalosiyaninato çinko(II) iyodür	DM-C8-ZnQ	2199 g/mol
Bis 8-[3-(trimetilamino) fenoksi]oktanoksi ftalosiyaninato silisyum (IV) iyodür	DM-C8-SiQ	1353 g/mol
8-[3-(dimetilamino)fenoksi]oktan-1-ol	DM-C8- OH	265 g/mol

3.2.2. IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

IC₅₀ değeri bir inhibitörün, enzimi inhibe etme gücünü gösterir. Küçük IC₅₀ değerleri, söz konusu enzim üzerinde daha etkili bir inhibisyonu ifade eder (77).

AChE ve BChE akviteleri literatürde bulunan Ellman metodu kullanılarak ölçülmüştür (78). Bu metoda göre AChE enzimi, substratı olan AChI'yı, BChE enzimi ise substratı olan BChI'yı hidrolize eder. Bu hidroliz sonucu ortaya çıkan tiyokolin, Ellman reaktifi olarak bilinen DTNB ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) bileşiğini oluşturur. Oluşan bu bileşiğin absorbanı 412 nm dalga boyunda ölçülerek belirlenir.



Şekil 23. Kolinesteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan Ellman reaksiyonu (Ellman'dan, 78)

AChE aktivitelerinin tayini için öncelikle ftalosiyanın bileşiklerimizin son konsantrasyonu 5, 10, 20, 40 ve 100 μM olacak şekilde tampon çözelti ile hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara sırasıyla 50 μL 50 mM Tris-HCl tamponu, tüm bileşiklerin çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan örnek çözeltilerinden 25 μL , 125 μL 3 mM DTNB ve 25 μL 0.2 U/mL AChE enzimi eklendi. Sonrasında 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika inkübe edildi ve 412 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Daha sonra kuyulara 25 μL AChI substratımız eklendi ve son ölçümü yine 412 nm dalga boyunda ölçüldü.

BChE aktivitelerinin tayini için öncelikle ftalosiyanın bileşiklerimizin son konsantrasyonu 5, 10, 20, 40 ve 100 μM olacak şekilde tampon çözelti ile hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara sırasıyla 50 μL 50 mM Tris-HCl tamponu, tüm bileşiklerin çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan örnek çözeltilerinden 25 μL , 125 μL 3mM DTNB ve 25 μL 0.2 U/mL BChE enzimi eklendi. Sonrasında 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika inkübe edildi ve 412 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Daha sonra kuyulara 25 μL BChI substratımız eklendi ve son ölçümü yine 412 nm dalga boyunda ölçüldü.

Enzimatik olmayan reaksiyonları belirlemek için aynı deneme, 25 μL enzim çözeltisi yerine, 25 μL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl) kullanılarak tekrarlandı. Pozitif

kontrol olarak 20 µL galantamin çözeltisi ile absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen verilerden yola çıkarak enzim inhibisyonu “Eşitlik 1” denklemine göre hesaplandı;

$$\% IC_{50} = (A_0 - A_1/A_0) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

A₀: kontrol; bileşik içermeyen absorbans değerini, A₁; bileşiklerin farklı konsantrasyonlarının absorbans değerini ifade etmektedir.

3.2.3. Asetilkolinesteraz ve Bütilkolinesteraz Enzimlerinin Kinetik Çalışmaları

Bir kimyasal reaksiyonun hızını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; sıcaklık, pH, enzim ve substrat derişimi, inhibitör veya aktivatör varlığı gibi etkenlerdir (43). Tezimizde gerçekleştirdiğimiz enzimlerin kinetik çalışmalarının amacı, reaksiyon hızına etki eden faktörlerden substrat derişiminin etkisini incelemektir. Bu nedenle diğer değişkenler sabit tutulurken, farklı substrat konsantrasyonları ve inhibitör varlığı/yokluğunun reaksiyon hızına etkisi incelenmiştir.

Asetilkolinesteraz enziminin kinetik parametrelerinin tayin edilmesi için 96 kuyucuklu plakalara sırasıyla 50 µL 50 mM Tris-HCl tamponu, tüm ftalosiyanın bileşiklerinin çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan örnek çözeltilerinin 25 µL’si, 125 µL 3mM DTNB, 25 µL 0.2 U/mL AChE enzimi eklendi ve 25 °C’de 10 dakika inkübe edildi. 412 nm’de kör ölçümü alındı. Süre sonunda kuyulara 25 µL AChI substrat çözeltisi (son konsantrasyon 2.5 ile 80 mM arasında olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda) eklenerek reaksiyon başlatıldı. Ardından son ölçümü yine 412 nm dalga boyunda ölçüldü. Negatif kontrol olarak 25 µL kullanılan ftalosiyanın bileşiğı çözeltisi yerine 25 µL tampon çözeltisi eklendi.

Bütilkolinesteraz enziminin kinetik parametrelerinin tayin edilmesi için 96 kuyucuklu plakalara sırasıyla 50 µL 50 mM Tris-HCl tamponu, tüm ftalosiyanın bileşiklerinin çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan örnek çözeltilerinin 25 µL’ si, 125 µL 3mM DTNB, 25 µL 0.2 U/mL BChE enzimi eklendi ve 25 C’de 10 dakika inkübe edildi. 412 nm’de kör ölçümü alındı. Süre sonunda kuyulara 25 µL BChI substrat çözeltisi (son konsantrasyon 2.5 ile 80 mM arasında olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda) eklenerek reaksiyon başlatıldı. Ve son ölçümü yine 412 nm dalga boyunda ölçüldü. Negatif kontrol olarak 25 µL kullanılan ftalosiyanın bileşiğı çözeltisi yerine 25 µL tampon çözeltisi eklendi.

Ölçümler, inhibitör madde varlığında ve inhibitör madde olmaksızın iki farklı şekilde gerçekleştirildi. Testler sonucunda elde edilen absorbans değerlerinin, değişen substrat konsantrasyonlarına karşı Microsoft Office Excel-2013 bilgisayar programında analizleri gerçekleştirildi daha sonra Lineweaver-Burk ve Dixon grafikleri çizildi.

3.3. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

3.3.1. Bileşikler DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi

Bileşiklerin DPPH radikal süpürme aktivitesi spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirildi (79). Öncelikle DMSO’da bileşiklerin stok çözeltisi 5 mM olacak şekilde hazırlandı. Sonrasında deneyde kullanılmak amacıyla 12.5-100 µM çalışma çözeltileri hazırlandı ve 0.2 mM DPPH’nın metanoldeki çözeltisi üzerine eklendi. Karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında 517 nm değerinde absorbans ölçüldü. Numunelerin artan konsantrasyonuna karşı DPPH radikal süpürme aktivitesi “Eşitlik 2” denklemine göre hesaplandı. Çalışmada pozitif kontrol olarak gallik asit kullanıldı. Tüm deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

$$\text{Formül : \% İnhibisyon} = (A_0 - A_1/A_0) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2})$$

A₀: DPPH çözeltisinin absorbansı, A₁:Numunelerin ilavesi sonrasında DPPH çözeltisinin absorbansı

3.3.2. Bileşiklerin FRAP Aktivitesi

Bileşiklerin FRAP aktivitesi Oyaizu ve arkadaşlarının geliştirdiği Fe⁺³’ün Fe⁺²’ye indirgenmesine dayanan metot kullanılarak araştırıldı (80). Çalışmada kullanılan çözeltiler taze hazırlandı. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak BHA kullanıldı. Standart grafik oluşturmak üzere BHA’nın 100, 200, 400, 600 ve 1000 µM konsantrasyonları tercih edildi. Bu metotta öncelikle 250 µL bileşik (2000 µM), 250 µL fosfat tamponu (200 mM, pH 6.6) ve 250 µL K₃[Fe(CN)₆] (%1) çözeltileri karıştırıldı. Ardından bu karışım su banyosu kullanılarak 50°C’de 20 dakika inkübe edildi. Bu sürenin ardından 250 µL TCA (%10) ilave edilip 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmından 200 µL alınıp üzerine 200 µL FeCl₃ (%0.15) ilave edildikten sonra 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda 700 nm’de absorbanslar ölçülmüş olup sonuçlar µM BHA eş değeri (BHA_E)/mM bileşik cinsinden verildi.

3.4. Bileşiklerin Hidrolitik Nükleaz Aktivitesi

Bileşiklerin hidrolitik nükleaz aktivitesinin belirlenmesinde konsantrasyona bağlı olarak hidrolitik koşullarda denemeler gerçekleştirildi. Bileşiklerinin 1mM stok çözeltisi DMSO kullanılarak hazırlandı. Daha sonra 10 µM, 50 µM ve 250 µM olmak üzere üç farklı konsantrasyona seyreltme gerçekleştirildi. Bu çalışmada agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturuldu. Kuyu içeriğine 1 µL 250 ng pBR322 plasmid DNA, 7 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl pH 7) ve 2 µL bileşiklerin son konsantrasyonları (1 µM, 10 µM ve 50 µM) ilave edilip, 37 °C’de 30, 60 ve 90 dakika inkübe edildi. Bu süre sonrasında, oluşturulan bu karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklendi. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika jelde yürütüldü. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak metilen mavisi kullanıldı. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplandı (73).

3.5. 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 kullanılmıştır. P değeri < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. AChE ve BChE Enzimlerinin Ftalosiyanın Bileşikleriyle İnhibisyon Çalışmaları

4.1.1. IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

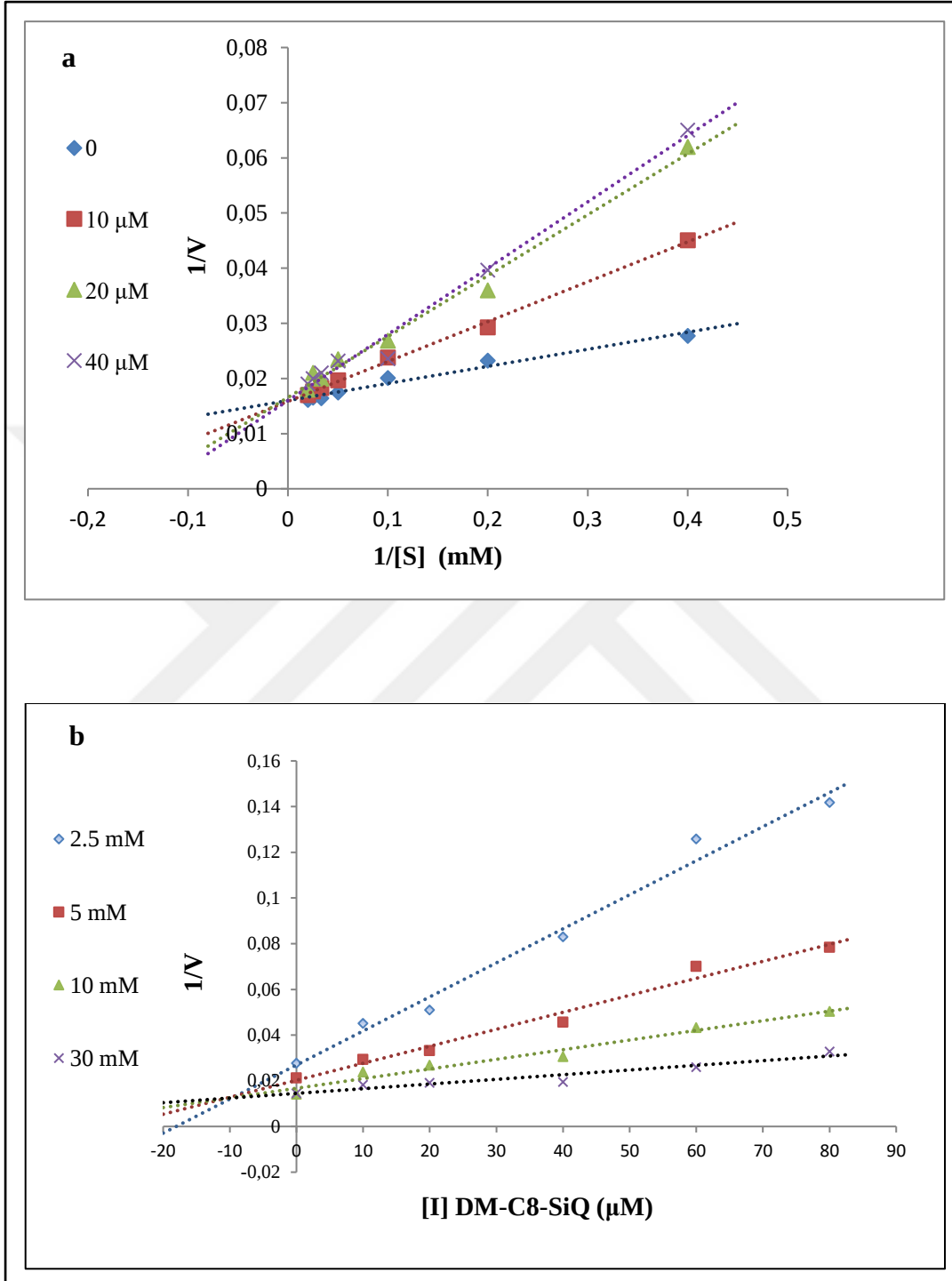
AChE ve BChE enzimlerinin ftalosiyanın bileşikleriyle yapılan inhibisyon tayini Bölüm 3.3.2’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Deney sonucunda IC₅₀ değerleri Microsoft Excel Windows 13 programı kullanılarak hesaplanmış olup, sonuçlar Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Ftalosiyanın bileşiklerinin AChE ve BChE üzerinde gösterdiği IC₅₀ değerleri

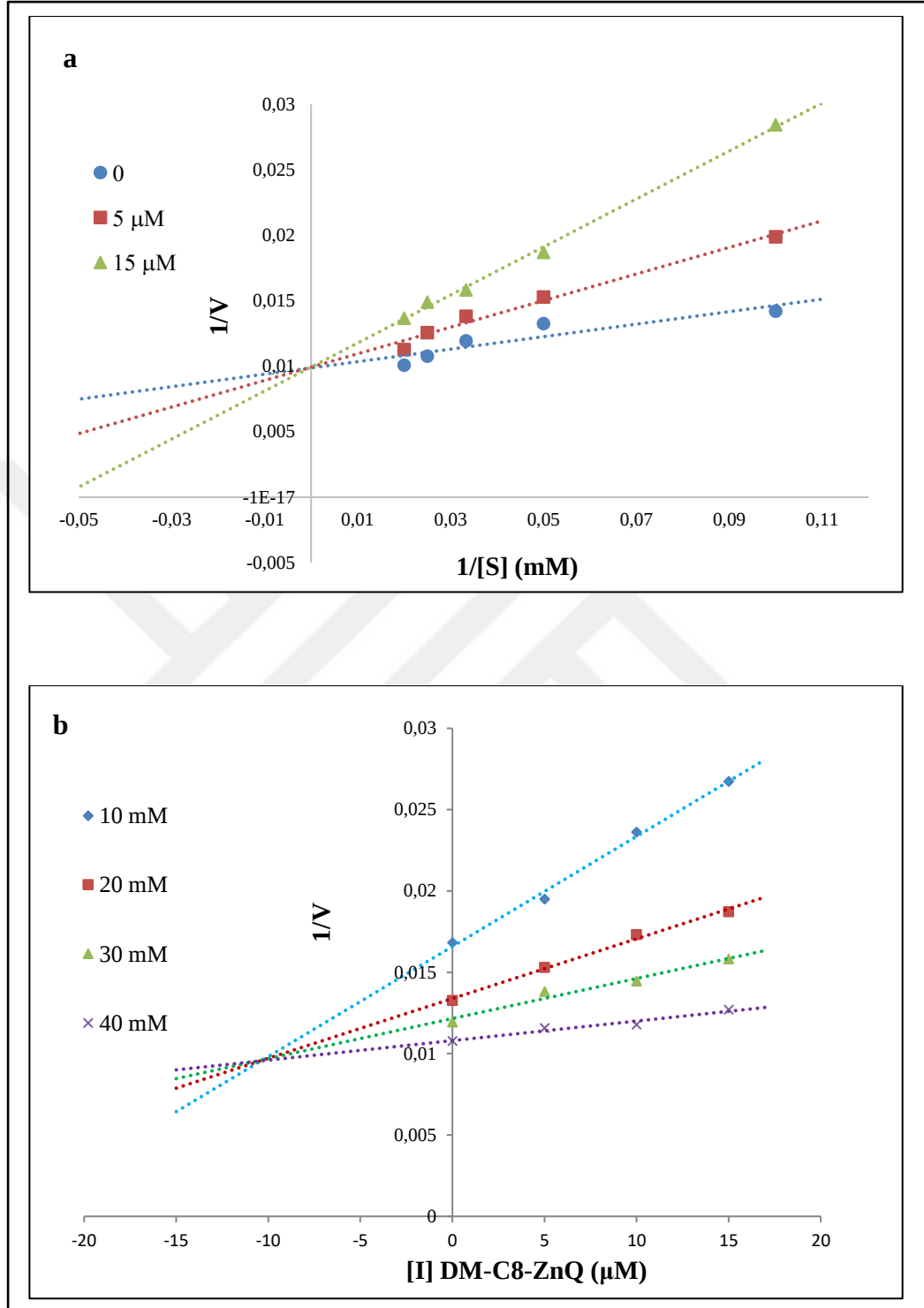
	IC ₅₀ (µM)	
	AChE	BChE
DM-C8-SiQ	14.15 ± 0.91	48.26 ± 1.08
DM-C8-ZnQ	12.08 ± 0.07	52.48 ± 2.05
DM-C8- OH	> 100	11.94 ± 0.71
Galantamin	2.54 ± 0.06	40.85 ± 0.83

4.1.2. İnhibisyon Türlerinin ve İnhibisyon Sabitlerinin Belirlenmesi

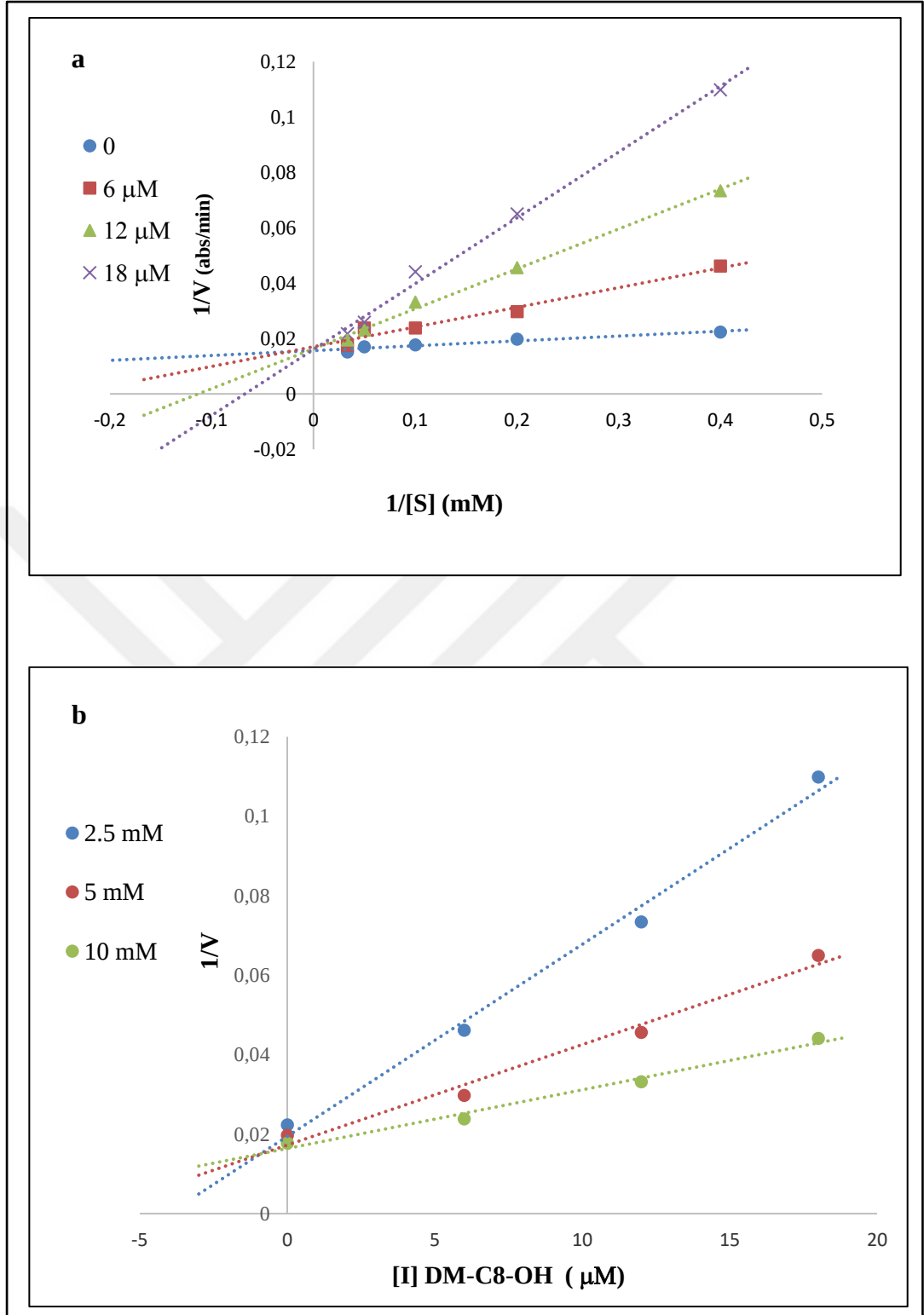
DM-C8-SiQ ve DM-C8-ZnQ bileşiklerinin AChE ve BChE’ye karşı, DM-C8- OH bileşiğinin ise BChE’ye karşı inhibisyon tipleri ve K_i sabitleri Lineweaver-Burk ve Dixon grafikleri çizilerek belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 6 ve Şekil 23-27’de verilmiştir. Çizilen Lineweaver-Burk grafikleri, bize ftalosiyanın bileşiklerimizin AChE ve BuChE üzerinde yarışmalı inhibisyona sahip olduğunu göstermiştir.



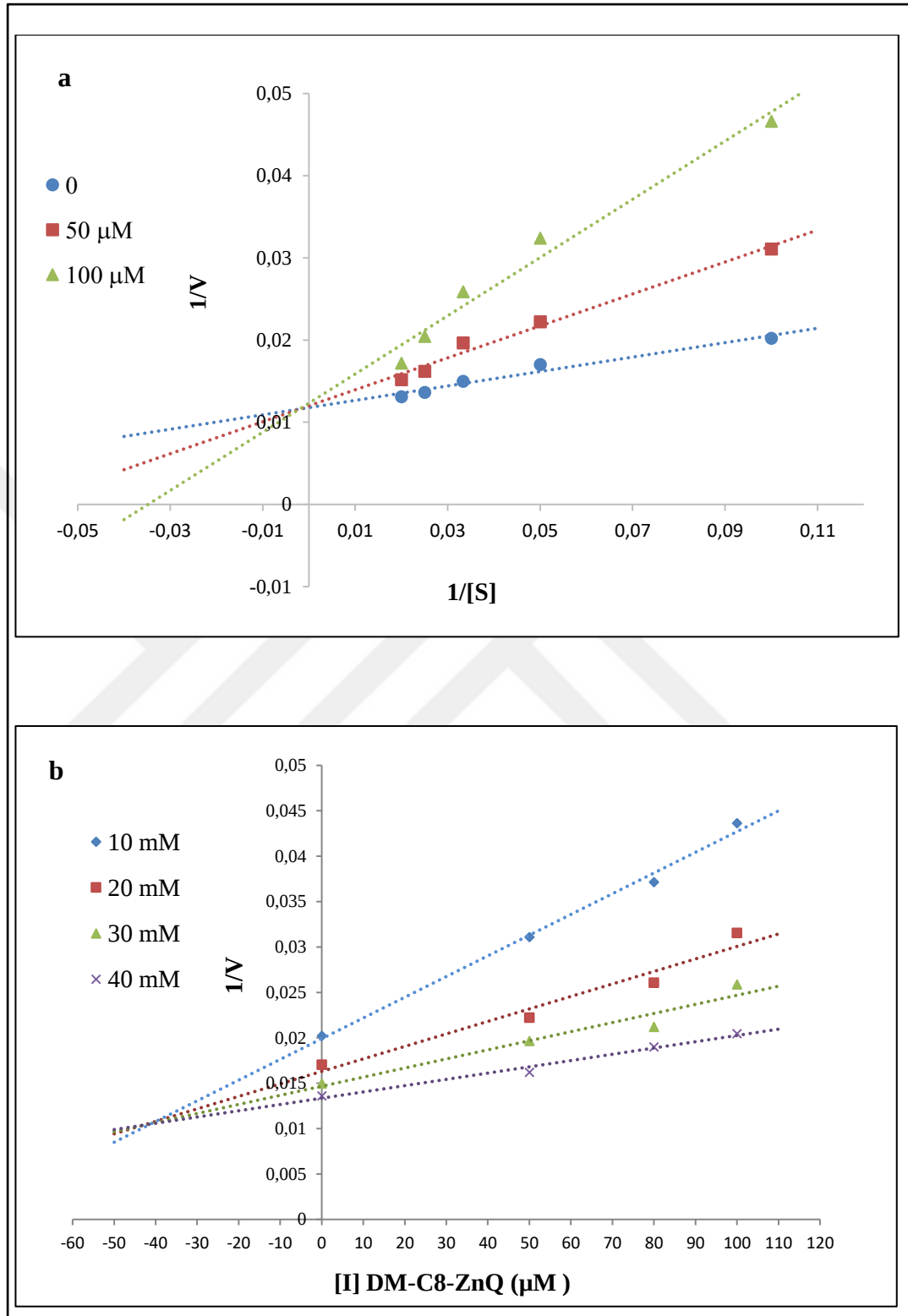
Şekil 24. DM-C8-SiQ kodlu bileşiğin AChE enzimi üzerindeki inhibisyon grafikleri. **(a)** DMC8-SiQ kodlu bileşiğin AChE'nin inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği. $[S]$, substrat konsantrasyonu (mM); V , reaksiyon hızı ($1/V$). İnhibitör konsantrasyonları solda gösterilmektedir. **(b)** DM-C8-SiQ bileşiğinin inhibisyon sabitinin (K_i) hesaplanması için ikincil grafik.



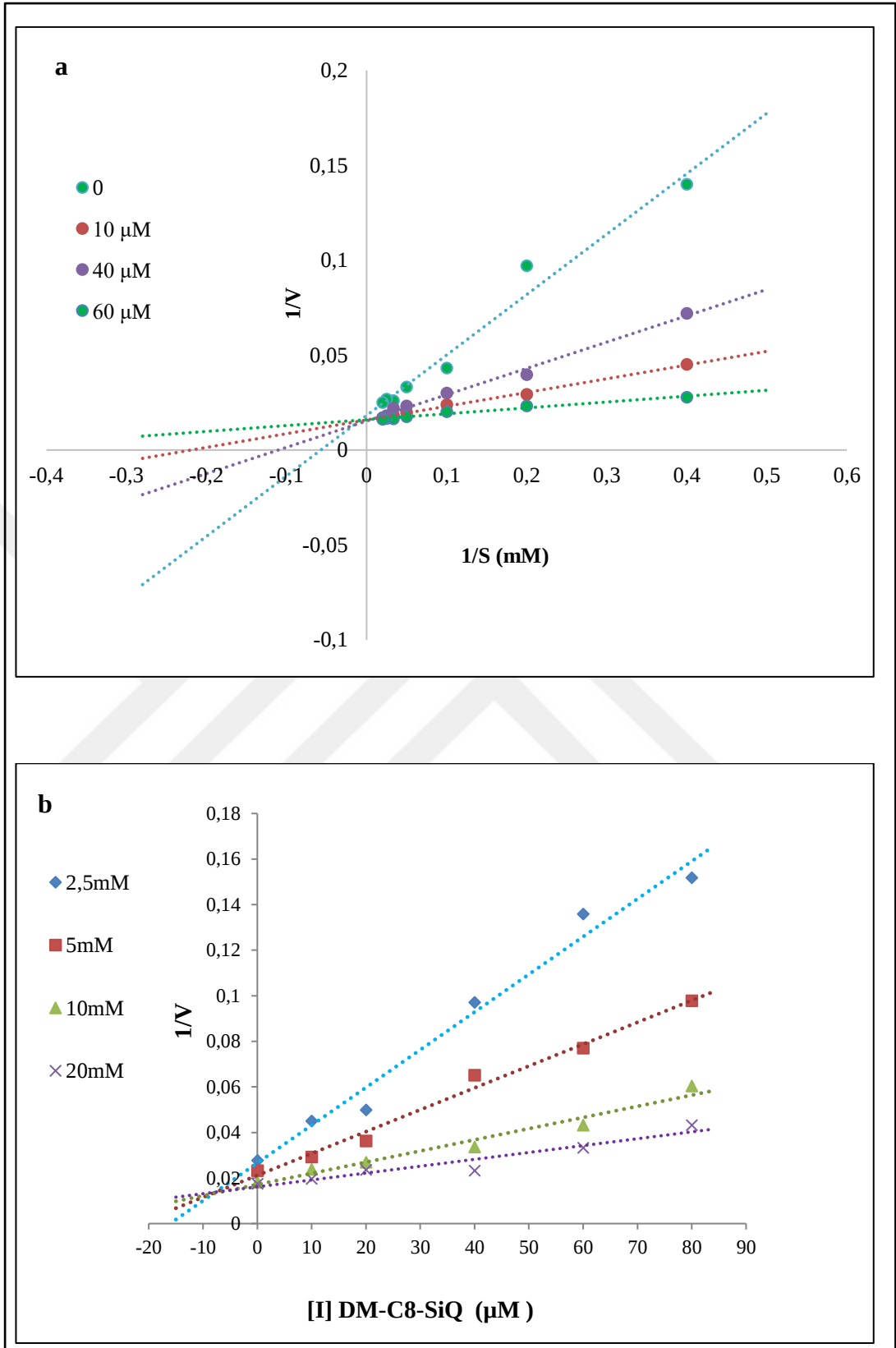
Şekil 25. DM-C8-ZnQ kodlu bileşiğin AChE enzimi üzerindeki inhibiyon grafikleri. **(a)** DM-C8-ZnQ kodlu bileşiğin AChE'nin inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği. **(b)** DM-C8-ZnQ kodlu bileşiğinin inhibisyon sabitinin (K_i) hesaplanması için ikincil grafik.



Şekil 26. DM-C8-OH kodlu bileşiğin BChE enzimi üzerindeki inhibiyon grafikleri. **(a)** DM-C8-OH kodlu bileşiğin BChE'nin inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği. **(b)** DM-C8-OH bileşiğinin inhibisyon sabitinin (K_i) hesaplanması için ikincil grafik.



Şekil 27. DM-C8-ZnQ kodlu bileşiğin BChE enzimi üzerindeki inhibiyon grafikleri. **(a)** DM-C8-ZnQ kodlu bileşiğin BChE'nin inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği. **(b)** DM-C8-ZnQ bileşiğinin inhibisyon sabitinin (K_i) hesaplanması için ikincil grafik.



Şekil 28. DM-C8-SiQ kodlu bileşiğin BChE enzimi üzerindeki inhibiyon grafikleri. **(a)** DM-C8-SiQ kodlu bileşiğin BChE'nin inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği. **(b)** DM-C8-SiQ kodlu bileşiğin inhibisyon sabitinin (K_i) hesaplanması için ikincil grafik.

Çalışılan ftalosiyanin bileşiklerimizin AChE ve BChE enzimleri üzerindeki inhibisyon türleri ve inhibisyon sabitleri (K_i) Tablo 6’da ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

Tablo 6. Bileşiklerin inhibisyon türünü ve K_i değerlerini gösteren tablo

Bileşik	AChE K_i değeri (μM)	BChE K_i değeri (μM)	İnhibisyon türü
DM-C8-SiQ	9.4 ± 0.41	7.5 ± 0.08	Yarışmalı inhibisyon
DM-C8-ZnQ	10.3 ± 0.67	40.5 ± 0.91	Yarışmalı inhibisyon
DM-C8- OH	-	0.95 ± 0.07	Yarışmalı inhibisyon

4.2. Bileşiklerin DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi

Bileşiklerin DPPH radikal süpürme aktivitesi sonuçları Tablo 7’de verilmiştir. Tablo 7’de de görüldüğü gibi DM-C8-SiQ ve DM-C8-ZnQ bileşiklerinin pozitif kontrol olarak kullanılan gallik asit ile kıyaslandığında düşük antioksidan özellik gösterdiği ortaya konulmuştur. DM-C8-SiQ bileşiği $100 \mu\text{M}$ ’da $\%20.55 \pm 3.06$ radikal süpürme etkinliği göstermiştir. Aynı konsantrasyonda DM-C8-ZnQ bileşiği ise $\%27.12 \pm 1.55$ süpürme aktivitesi göstermiştir.

Tablo 7. Bileşiklerin DPPH radikal süpürme aktivitesi (%).

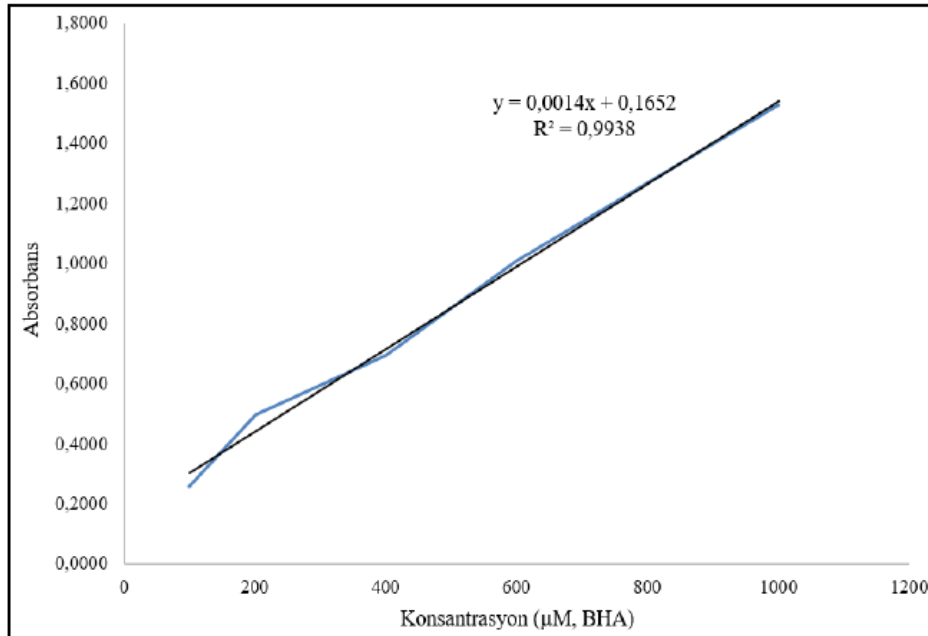
Bileşik	12.5 μM	25 μM	50 μM	100 μM
DM-C8-SiQ	4.24 ± 1.01	6.45 ± 0.75	10.86 ± 1.59	20.55 ± 3.06
DM-C8-ZnQ	3.04 ± 0.54	8.47 ± 1.97	17.61 ± 0.73	27.12 ± 1.55
Gallik asit	45.72 ± 1.07	71.47 ± 0.96	87.47 ± 1.13	94.07 ± 1.54

4.3. Bileşiklerin FRAP Aktivitesi

Bileşiklerin FRAP aktivitesi sonuçları Tablo 8’de verilmiştir. Standart grafik oluşturmak üzere BHA’nın 100, 200, 400, 600 ve 1000 μM konsantrasyonları kullanılmıştır. Standart grafiğe ait sonuçlar Şekil 29’da sunulmuştur. Tablo 8’de de görüldüğü gibi DM-C8-SiQ ve DM-C8-ZnQ bileşiklerinin FRAP aktivitesi değerleri 37.71 ± 6.32 μM BHAE/ mM bileşik ve 40.99 ± 3.27 μM BHAE/ mM bileşik olarak tespit edilmiştir. Her iki bileşik kendi arasında kıyaslandığında FRAP etkinliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiş olup benzer etkinliğe sahip olarak belirlenmiştir.

Tablo 8. Bileşiklerin FRAP aktivitesi (%).

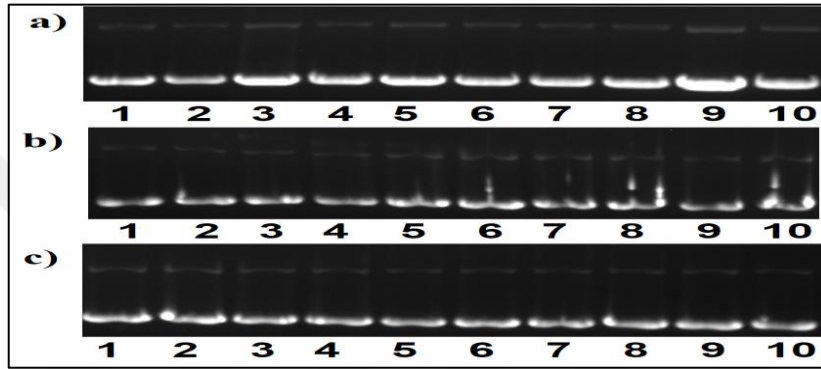
Bileşik	μM BHAE/ mM bileşik
DM-C8-SiQ	37.71 ± 6.32
DM-C8-ZnQ	40.99 ± 3.27



Şekil 29. BHA standart grafiği

4.4. Bileşiklerin Hidrolitik Kesim Etkinliği

DM-C8-SiQ ve DM-C8-ZnQ bileşiklerinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA'nın fosfodiester bağlarını hidroliz ederek kesebilme etkinliğini incelemek için konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hidrolitik kesim deneyi yapılmıştır. Bileşiklerin hidrolitik kesim aktivitesinin sonuçları Şekil 30'da verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak metilen mavisi kullanılmıştır. Her iki bileşik için de hem artan konsantrasyona hem de inkübasyon süresine rağmen pBR322 plazmid DNA üzerinde herhangi bir hasar gözlemlenmemiştir.



Şekil 30. DM-C8-SiQ ve DM-C8-ZnQ süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik kesim etkinliği **a)** 30 dakika, **b)** 60 dakika, **c)** 90 dakika 37 °C. Bant 1: DNA kontrol; bant 2-4: DNA+ DM-C8-SiQ (50 μ M – 10 μ M – 1 μ M); bant 5-7: DNA + DM-C8-ZnQ (50 μ M – 10 μ M – 1 μ M); bant 8-10: DNA + metilen mavisi (50 μ M – 10 μ M – 1 μ M).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez kapsamında Prof. Dr. Zekeriya Bıyıklıoğlu ve çalışma arkadaşları tarafından sentezlenen ftalosiyanın bileşiklerinin AChE ve BChE enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Bu iki enzim üzerindeki inhibisyonu belirlemek için IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Düşük IC_{50} değeri daha yüksek inhibisyonu gösterir ve bir inhibitörün etkinliği için önemli bir parametredir (81). Ayrıca çalışılan bileşiklerin Lineveawer-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon türleri ve K_i sabitleri hesaplanmıştır. K_i sabiti, enzim- inhibitör kompleksi için söz konusu olan ayrışma sabitidir. Düşük K_i değeri, enzimi inhibe etmek için daha az inhibitör miktarı gerektiğini gösterir (43).

İnhibitörün, enzimin substratı ile yarışıp, enzimin aktif kısmına bağlandığı inhibisyon türüne yarışmalı inhibisyon denir. Bu inhibisyon türünde inhibitör ve substrat enzimin aktif kısmına bağlanmak için birbiri ile rekabet ederler. İnhibitör ile substrat yapısal olarak benzerliğe sahiptir. Bu tip geri dönüşümlü inhibisyonlarda inhibitörler enzime hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar ve hidrojen bağı gibi kovalent olmayan yollarla bağlanır. Çalıştığımız tüm ftalosiyanın bileşiklerinin Lineveawer-Burk grafikleri bize maddelerimizin yarışmalı inhibitör özellik sergilediğini göstermektedir. Sonuç olarak ftalosiyanın bileşiklerimiz AChE ve BChE enzimini yarışmalı olarak inhibe etmiştir.

AChE ve BChE enzimlerinin aktif merkezlerindeki aminoasit içerikleri aydınlatılmıştır. Asetilkolinesterazın aktif bölgeleri; katyon bağlayıcı bölge, açıl bağlayıcı bölge, anyonik substrat bağlanma bölgesi, esteratik bölge, oksianyon çukuru ve periferik anyonik bölge şeklinde ifade edilmiştir (82, 83). Çalıştığımız ftalosiyanın bileşiklerinde Zn, Si gibi metaller ve çeşitli alt gruplar bulunmaktadır. Enzimin aktif bölgesinde bulunan, yan zincirinde aromatik halka ve -OH grubu içeren çeşitli aminoasitler ile ftalosiyanın bileşiklerimiz arasında hidrojen bağı, π - π etkileşimi gibi farklı türde kimyasal etkileşimler olabilir.

Bileşiklerimiz AChE ve BChE üzerinde inhibisyon etki göstermişlerdir. Bileşikler; AChE üzerinde 9.4 ± 0.41 ile 10.3 ± 0.67 μ M, BChE üzerinde ise 0.95 ± 0.07 ile 40.5 ± 0.91 μ M arasında değişen K_i değerleri ile inhibisyon etkisi göstermiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan galantaminin AChE'ye karşı IC_{50} değeri 2.54 ± 0.06 μ M iken BuChE'ye karşı IC_{50} değeri ise 40.85 ± 0.83 μ M olarak bulunmuştur. Bileşiklerimizin AChE üzerindeki IC_{50} değerleri DM-C8-ZnQ ve DM-C8-SiQ bileşikleri için sırayla 12.08 ± 0.07 μ M ve 14.15 ± 0.91 μ M olarak ölçülmüştür. DM-C8-OH bileşiğinin AChE üzerindeki IC_{50} değeri ise 100

μM 'ın üzerinde bulunmuştur. DM-C8-ZnQ bileşiği AChE üzerinde 12.08 ± 0.07 IC_{50} değeri ile en güçlü inhibisyon özelliği gösterirken K_i değeri 10.3 ± 0.67 μM olarak ölçülmüştür. BChE üzerindeki IC_{50} değerleri DM-C8-ZnQ, DM-C8-SiQ ve DM-C8-OH bileşiklerimiz için sırayla 52.48 ± 2.05 μM , 48.26 ± 1.08 μM ve 11.94 ± 0.71 μM olarak ölçülmüştür. DM-C8-OH bileşiğimiz BChE üzerinde 11.94 ± 0.71 μM IC_{50} değeri ile standart inhibitör galantaminden önemli ölçüde yüksek inhibisyon özellik göstermiştir. Çalışılan ftalosiyanin bileşikleri AChE ve BChE enzimlerinin aktif bölgesine bağlanarak, substratları olan AChI ve BChI'nın enzime bağlanmasını engellemiş ve böylece yarışmalı inhibisyon özellik göstermişlerdir.

Literatüre baktığımızda çeşitli ftalosiyanin bileşikleri ile kolinesteraz inhibisyonu, antioksidan aktivitesi ve nükleaz aktivitesi çalışmaları yapıldığı görülmektedir. 2020 yılında Barut ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda ftalonitril ve periferik olmayan tetra triklosan [5-kloro-2-(2,4-diklorofenoksi)fenol] süstitüe ftalosiyanin ve onun metaloftalosiyanin türevlerinin AChE ve BChE üzerindeki inhibisyon etkilerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmaya göre, bakır (II) içeren bileşikler sırasıyla 0.86 ± 0.01 ve 20.46 ± 2.47 μM IC_{50} değerleri ile güçlü bir AChE ve BChE inhibitör özelliği göstermiştir. Yine metaloftalosiyanin türevinin en iyi DPPH aktivitesi göstermiş olup, bileşiklerin hiçbirisi DNA üzerinde nükleaz aktivitesi göstermemiştir (12).

Ağırtaş ve arkadaşları önce 4-[1-({2-[bis(2-hidroksipropil) amino] etil} (2-hidroksipropil) amino] propan-2-il} oksi) ftalonitril] (BHHP) bileşiğini sentezlemiş daha sonra bu bileşiğin metal tuzları ile reaksiyonundan çinko, kobalt ve bakır ftalosiyanin komplekslerini elde etmişlerdir. Bileşiklerin nükleaz aktiviteleri ve DPPH radikali süpürme aktiviteleri incelenmiştir. Bakır ftalosiyanin tüm konsantrasyonlarda en iyi DPPH aktivitesini gösterirken tüm metaloftalosiyaninlerin iyi birer nükleaz aktivitesi gösterdiği görülmüştür (76). 2021 yılında yine Ağırtaş ve arkadaşları dört periferik 3,4,5-trimetoksibenziloksi süstitüentleri içeren yeni metaloftalosiyaninleri [M: Zn (II), Co (II), Ni (II)] sentezlemiş ve bileşiklerin DPPH aktiviteleri incelendiğinde tetrakis [(3,4,5-trimetoksibenziloksi) ftalosiyaninato] kobaltın en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (84).

Periferik 1,2,3-triazol grubu süstitüe metaloftalosiyanin türevlerinin AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisini araştıran bir başka çalışma, Koçyiğit ve arkadaşları tarafından 2022 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu yeni metaloftalosiyanin türevleri, 40.11 ± 5.61 ile 78.27

$\pm 15.42 \mu\text{M}$ aralığında K_i değerleri ve 44.31 ile 88.78 μM arasında değişen IC_{50} değerleri ile çalışmada kullanılan standart AChE inhibitörü takrinden daha yüksek inhibitör özelliği göstermiştir (13).

2019 yılında Demirbaş ve arkadaşları ftalonitril bileşiği ve periferik tetra süstitüe metalsiz ftalosiyenin, kurşun (II), nikel (II) ve kobalt (II) ftalosiyenlerinin kolinesterazlar üzerindeki inhibisyon etkisini araştırmıştır. Bileşikler arasında nikel (II) ftalosiyenin $65.04 \pm 0.82 \mu\text{M}$ IC_{50} değeri ile AChE üzerinde, kurşun (II) ftalosiyenin ise $46.23 \pm 0.78 \mu\text{M}$ IC_{50} değeri ile BChE üzerinde en güçlü inhibitör etkisi göstermiştir. Ayrıca kurşun (II) ve nikel (II) ftalosiyenlerinin K_i değerleri AChE'ye karşı sırayla $28.23 \pm 0.30 \mu\text{M}$ ve $31.04 \pm 0.50 \mu\text{M}$, BChE'ye karşı $16.13 \pm 0.44 \mu\text{M}$ ve $94.20 \pm 1.40 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmış ve kolinesteraz enzimlerine karşı yarışmalı inhibitörler olduğu gösterilmiştir (85).

Tekin ve Arslan tetra-kalkonlarla süstitüe edilmiş, iç çekirdeğinde Ni(II), Zn(II), Co(II) ve Cu(II) içeren metaloftalosiyenlerin kolinesteraz inhibisyonları açısından değerlendirilmiştir. Bu kompleksler AChE'ye karşı 1.243 ± 0.11 ile $2.369 \pm 0.15 \mu\text{M}$, BChE'ye karşı ise 2.865 ± 0.08 ile $3.372 \pm 0.13 \mu\text{M}$ arasında değişen IC_{50} değerleri göstermiştir. CuPcs AChE'ye karşı, ZnPcs de BChE için en etkili inhibisyonu göstermiştir (86).

Keleş ve arkadaşları tarafından periferik tetra-{6-[3-(dietilamino) fenoksi]heksil}oksi süstitüe kobalt(II), bakır(II), mangan(III) ftalosiyenlerin suda çözünür türevleri hazırlanmış ve AChE ve BChE enzimi üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmıştır. Bileşiklerin IC_{50} değeri AChE için $0.65 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ile $1.35 \pm 0.01 \mu\text{M}$ arasında iken BChE için $0.29 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ve $3.57 \pm 0.03 \mu\text{M}$ arasında değişmekle birlikte, çalışmada kullanılan galantaminden oldukça yüksek inhibitör etki göstermişlerdir (87).

Günsel ve arkadaşları 1-metil-1H-imidazol-2-tiliyol süstitüentleri taşıyan yeni periferik [metalsiz, çinko (II), galyum (III) klorür] ftalosiyenlere dayanan suda çözünür hidroklorür formlarını sentezlemiş ve AChE ve BChE üzerinde inhibisyon etkisini araştırmışlardır. Bu bileşikler arasında, suda çözünür galyum klorür ftalosiyenin $47.71 \pm 9.14 \mu\text{M}$ K_i değeri ve $68.22 \mu\text{M}$ IC_{50} değeri ile AChE üzerinde; çinko ftalosiyenin $20.12 \pm 3.75 \mu\text{M}$ K_i ve $19.24 \mu\text{M}$ IC_{50} değerleri ile BChE enzimlerine karşı en iyi inhibitör özellik göstermişlerdir (60). Yine Günsel ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı başka bir çalışmada periferik olmayan pozisyonlarda 4-(trifluorometiltiyol) fenoksi süstitüentleri taşıyan yeni metaloftalosiyenleri [çinko (II), bakır (II) ve kobalt (II) ftalosiyenler] sentezlemiş ve

bileşiklerin DPPH aktivitesini incelemiştir. Kobalt (II) ftalosiyanın en iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (88).

2018 yılında Alıcı ve arkadaşları tarafından metalsiz, 4-metoksi-fenoksi ikame edicileri taşıyan, periferal olmayan [1(4), 8(11), 15(18), 22(25)] veya periferal [2(3), 9(10), 16(17), 23(24)] pozisyonlarında çinko ve kobalt ftalosiyanınların sentezini gerçekleştirmişlerdir. Bileşiklerin DPPH radikal süpürme yeteneği ve güç aktivitesini azaltma antioksidan yöntemleri uygulanarak araştırılmıştır. Diğer bileşikler orta dereceli DPPH süpürme aktivitesi gösterirken kobalt ftalosiyanın oldukça yüksek DPPH aktivitesi göstermiştir. Aynı zamanda tüm ftalosiyanın bileşiklerinin indirgeyici güç aktiviteleri, kontrol grubu olan ve antioksidan özellik gösterdiği bilinen BHT (bütillenmiş hidroksitoluen) ve askorbik asitten daha yüksek bulunmuştur (89).

Çalışmamızda kullanılan ftalosiyanın bileşikleri AChE ve BChE üzerinde inhibisyon etki göstermiştir. Sonuçlarımız literatürde var olan çalışmaları desteklemektedir. DM-C8-ZnQ bileşiği AChE üzerinde $12.08 \pm 0.07 \mu\text{M}$ IC₅₀ değeri ile bileşikler arasında en güçlü inhibitör özellik gösterirken, DM-C8-OH bileşiğimiz BChE üzerinde $11,94 \pm 0.71 \mu\text{M}$ IC₅₀ değeri ile standart inhibitör galantaminden önemli ölçüde yüksek inhibisyon özellik göstermişlerdir.

Oksidatif stres; kanser, norödejeneratif hastalıklar, yaşlanma, diyabet gibi birçok kronik hastalığın patolojisinde rol oynamaktadır. Antioksidanlar ise oksidatif stresi azaltarak hastalıklara karşı bir direnç oluşturur. Bu nedenle antioksidanlar bugün tıp dünyasında sıklıkla araştırılmakta ve yeni antioksidan maddelerin sentezi önem taşımaktadır. DPPH süpürme testi, bir radikal olan DPPH'nın, hidrojen atomu veya elektronu verebilen bir antioksidanın varlığında temizlenmesi prensibine dayanır. DPPH'nın mor rengi, antioksidan varlığında sarıya döner ve bu değişim spektrofotometrik olarak ölçülebilir (89). Bileşiklerimizin, artan konsantrasyonlarda DPPH süpürücü etkisi artmasına rağmen, aynı konsantrasyondaki kontrol çözeltisi gallik asitle kıyaslandığında düşük bir DPPH süpürücü etki göstermiştir. Bu etkinlik gallik asit > DM-C8-ZnQ > DM-C8-SiQ şeklinde sıralanabilir.

Bir başka antioksidan aktivite ölçüm yöntemi ise indirgeyici güç kapasitesidir. Bu prensibe göre antioksidan madde, Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye indirgeyebilir. Bu reaksiyonda, antioksidan bileşiğin gücüne bağlı olarak yeşilden maviye bir renk değişimi görünür (90). Sonuçlar μM BHA eş değeri (BHA_E)/ mM bileşik cinsinden verilmiştir. Bileşiklerimizin indirgeyici güç

aktivitesi DM-C8-SiQ için $37.71 \pm 6.32 \mu\text{M}$ DM-C8-ZnQ için $40.99 \pm 3.27 \mu\text{M}$ olarak bulunmuş olup aralarında istatistiksel anlamda bir fark görülmemiştir.

Son olarak ftalosiyanın bileşiklerimizin DNA üzerinde bir hasar oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi amacı ile süpersarmal pBR322 plasmid DNA'nın fosfodiester bağları üzerinde hidrolitik kesim deneyi agaroz jel elektroforezi kullanılarak yapılmıştır. Deneyde artan zamana ve konsantrasyona karşılık herhangi bir DNA hasarı gözlemlenmemiştir. Bu da bileşiklerimizin DNA üzerinde herhangi bir toksik etkisi olmayacağını düşündürmüştür.

Tüm bu sonuçlar sonuçlar, çalışılan ftalosiyanın bileşiklerinin AH'nin tedavisi için önem taşıyan kolinesteraz inhibitörleri olma potansiyelleri açısından değerlendirilebilir olduğunu göstermektedir. Bileşiklerimiz çalışılan antioksidan testlerinde düşük bir antioksidan özellik sergilemişlerdir. Ancak DNA üzerinde herhangi bir hasar göstermemişlerdir. Bileşiklerin ilaç olma potansiyelinin belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Monteiro AR, Barbosa DJ, Remião F, Silva R (2023). Alzheimer's disease: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and disease-modifying drugs. *Biochemical Pharmacology* 211.
2. Plascencia-Villa G, Perry G (2022). Neuropathologic Changes Provide Insights into Key Mechanisms of Alzheimer Disease and Related Dementia. *American Journal of Pathology* 192.
3. Gauthier S, Webster C, Servaes S, Morais JA, Rosa-Neto P. (2022) World Alzheimer Report 2022: Life after diagnosis: Navigating treatment, care and support. London, England: Alzheimer's Disease International.
4. Atri A, Frölich L, Ballard C, Tariot PN, Molinuevo JL, Boneva N, Windfeld K, Raket LL, Cummings JL (2018). Effect of idalopirdine as adjunct to cholinesterase inhibitors on change in cognition in patients with Alzheimer disease three randomized clinical trials. *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 319), American Medical Association, pp 130–142.
5. Sharma K (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Molecular Medicine Reports* 20: 1479.
6. Zahedi NA, Mohammadi-Khanaposhtani M, Rezaei P, Askarzadeh M, Alikhani M, Adib M, Mahdavi M, Larijani B, Niakan S, Tehrani MB, et al. (2023). Dual functional cholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Design, synthesis, in vitro, and in silico evaluations of coumarin-dihydropyridine derivatives. *Journal of Molecular Structure* 1276.
7. Neha, Parvez S (2023). Emerging therapeutics agents and recent advances in drug repurposing for Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews* 85.
8. Jaipaea S, Saehlim N, Sutcharitruk W, Athipornchai A, Ingkaninan K, Saeeng R (2023). Synthesis of piperine analogues as AChE and BChE inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry Letters* 53: 216–221.
9. Juszczak G, Mikulska J, Kasperek K, Pietrzak D, Mrozek W, Herbet M (2021). Chronic stress and oxidative stress as common factors of the pathogenesis of depression and alzheimer's disease; the role of antioxidants in prevention and treatment. *Antioxidants* 10.

10. Sinyor B, Mineo J, Ochner C (2020). Alzheimer's Disease, Inflammation, and the Role of Antioxidants. *Journal of Alzheimer's Disease Reports* 4: 175–183.
11. Biyiklioglu Z, Keleş T, Sahin H (2022). Synthesis and acetylcholinesterase enzyme inhibition properties of axially disubstituted silicon phthalocyanines and their quaternized derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry* 977: 122468.
12. 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.
13. 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 & dynamics* 40: 4429–4439.
14. Martínez VG, Salas AA, Ballestín SS (2022). Vitamin Supplementation and Dementia: A Systematic Review. *Nutrients* 14.
15. Gauthier S, Rosa-Neto P, Morais JA, & Webster C. (2021) World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia. Alzheimer's Disease International. London, England.
16. Ahmad MA, Kareem O, Khushtar M, Akbar M, Haque MR, Iqbal A, Haider MF, Pottoo FH, Abdulla FS, Al-haidar MB, et al. (2022). Neuroinflammation: A Potential Risk for Dementia. *International Journal of Molecular Sciences* 23.
17. Kumar V, Saha A, Roy K (2020). In silico modeling for dual inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) enzymes in Alzheimer's disease. *Computational Biology and Chemistry* 88: 107355.
18. Uzairu SM, Tijani Y, Gadaka MA, Modu B, Watafua M, Ahmad HA, Zakariya UA, Ibrahim A, Daja A, Zanna H, et al. (2022). Kinetics and computational study of butyrylcholinesterase inhibition by methylrosmarinate: relevance to Alzheimer's disease treatment. *Heliyon* 8.
19. Taqui R, Debnath M, Ahmed S, Ghosh A (2022). Advances on plant extracts and phytocompounds with acetylcholinesterase inhibition activity for possible treatment of Alzheimer's disease. *Phytomedicine Plus* 2.

20. World Health Organization (2021). Global status report on the public health response to dementia. WHO, Geneva.
21. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, et al. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 141: 1917.
22. Oumata N, Lu K, Teng Y, Cavé C, Peng Y, Galons H, Roques BP (2022). Molecular mechanisms in Alzheimer's disease and related potential treatments such as structural target convergence of antibodies and simple organic molecules. *European Journal of Medicinal Chemistry* 240: 114578.
23. Bintener C, Miller O, Georges J (2020). Dementia in Europe Yearbook 2019: Estimating the prevalence of Dementia in Europe. *Alzheimer Europe* 88–89.
24. Ferreira JPS, Albuquerque HMT, Cardoso SM, Silva AMS, Silva VLM (2021). Dual-target compounds for Alzheimer's disease: Natural and synthetic AChE and BACE-1 dual-inhibitors and their structure-activity relationship (SAR). *European Journal of Medicinal Chemistry* 221: 113492.
25. Coomans EM, Tomassen J, Ossenkoppele R, Golla SS V, Den Hollander M, Collij LE, Weltjens E, Van Der Landen SM, Wolters EE, Windhorst AD, et al. (2022). Genetically identical twins show comparable tau PET load and spatial distribution. *Brain* 145: 3571–3581.
26. Oumata N, Lu K, Teng Y, Cavé C, Peng Y, Galons H, Roques BP (2022). Molecular mechanisms in Alzheimer's disease and related potential treatments such as structural target convergence of antibodies and simple organic molecules. *European Journal of Medicinal Chemistry* 240.
27. Cetin S, Knez D, Gobec S, Kos J, Pišlar A (2022). Cell models for Alzheimer's and Parkinson's disease: At the interface of biology and drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 149: 112924.
28. Alhazmi HA, Albratty M (2022). An update on the novel and approved drugs for Alzheimer disease. *Saudi Pharmaceutical Journal* 30: 1755–1764.

29. Nascimento ALCS, Fernandes RP, Carvalho ACS, Frigieri I, Alves RC, Chorilli M (2022). Insights for Alzheimer's disease pharmacotherapy and current clinical trials. *Neurochemistry International* 159: 105401.
30. Asher S, Priefer R (2022). Alzheimer's disease failed clinical trials. *Life Sciences* 306: 120861.
31. Dai R, Sun Y, Su R, Gao H (2022). Anti-Alzheimer's disease potential of traditional chinese medicinal herbs as inhibitors of BACE1 and AChE enzymes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 154: 113576.
32. Meghana G, Gowda D, Chidambaram SB, Osmani RA (2023). Amyloid β pathology in Alzheimer's disease: A nano delivery approach. *Vibrational Spectroscopy* 126: 103510.
33. Jabeen F, Rehman ZU, Shah S, Alharthy RD, Jalil S, Khan IA, Iqbal J, El-Latif AAA (2023). Deep learning-based prediction of inhibitors interaction with Butyrylcholinesterase for the treatment of Alzheimer's disease. *Computers and Electrical Engineering* 105: 108475.
34. Malik AA, Ojha SC, Schaduengrat N, Nantasenamat C (2022). ABCpred: a webserver for the discovery of acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitors. *Molecular diversity* 26: 467–487.
35. Noufi P, Khoury R, Jeyakumar S, Grossberg GT (2019). Use of Cholinesterase Inhibitors in Non-Alzheimer's Dementias. *Drugs & aging* 36: 719–731.
36. Koca M, Güller U, Güller P, Dağalan Z, Nişancı B (2022). Design and Synthesis of Novel Dual Cholinesterase Inhibitors: In Vitro Inhibition Studies Supported with Molecular Docking. *Chemistry & Biodiversity* 19: e202200015.
37. Koçancı FG, Aslim B (2016). Structure and Functions of Acetylcholinesterase and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Plants. *Manas Journal of Agriculture and Life Science MJAL* (Vol. 6).
38. Min SLS, Liew SY, Chear NJY, Goh BH, Tan WN, Khaw KY (2022). Plant Terpenoids as the Promising Source of Cholinesterase Inhibitors for Anti-AD Therapy. *Biology* 11.
39. Hampel H, Caraci F, Cuello AC, Caruso G, Nisticò R, Corbo M, Baldacci F, Toschi N, Garaci F, Chiesa PA, et al. (2020). A Path Toward Precision Medicine for Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Immunology* 11.

40. Arslan T, Buğrahan Ceylan M, Baş H, Biyiklioglu Z, Senturk M (2019). Design, synthesis, characterization of peripherally tetra-pyridine-triazole-substituted phthalocyanines and their inhibitory effects on cholinesterases (AChE/BChE) and carbonic anhydrases (hCA I, II and IX). Dalton Transactions 49: 203–209.
41. Çetin M (2021). Çeşitli 1,2,4-Triazol Halkası İçeren Heterosiklik Bileşiklerin Asetilkolinesteraz ve Bütilkolinesteraz Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
42. Singh R, Sadiq NM (2023). Cholinesterase Inhibitors In: StatPearls [Online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544336/> [Accessed 11 May 2023].
43. Çat M (2019). Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılabilecek yeni sentezlenmiş bileşikler ile asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonunun incelenmesi Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Ankara.
44. Behl T, Kaur I, Sehgal A, Singh S, Sharma N, Gupta S, Albratty M, Najmi A, Alhazmi HA, Bungau S (2023). AChE as a spark in the Alzheimer's blaze – Antagonizing effect of a cyclized variant. Ageing Research Reviews 83: 101787.
45. Verma A, Kumar Waiker D, Bhardwaj B, Saraf P, Shrivastava SK (2022). The molecular mechanism, targets, and novel molecules in the treatment of Alzheimer's disease. Bioorganic Chemistry 119: 105562.
46. Liu Y, Uras G, Onuwaje I, Li W, Yao H, Xu S, Li X, Li X, Phillips J, Allen S, et al. (2022). Novel inhibitors of AChE and A β aggregation with neuroprotective properties as lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease. European Journal of Medicinal Chemistry 235: 114305.
47. Cummings J, Aisen P, Apostolova LG, Atri A, Salloway S, Weiner M (2021). Aducanumab: Appropriate Use Recommendations. Journal of Prevention of Alzheimer's Disease 8: 398–410.
48. Padda IS, Parmar M (2023). Padda I, Parmar M (2023). Aducanumab: StatPearls [Online]. Available from: <http://europepmc.org/books/NBK573062> [Accessed 8 May 2023].

49. Telseren H (2022). Biyolojik uygulamalara yönelik ftalosiyanın-bodipy konjugatlarının sentezi. Yüksek Lisans Tezi , İstanbul Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.
50. Carobeli LR, Meirelles LE de F, Damke GMZF, Damke E, de Souza MVF, Mari NL, Mashiba KH, Shinobu-Mesquita CS, Souza RP, da Silva VRS, et al. (2021). Phthalocyanine and Its Formulations: A Promising Photosensitizer for Cervical Cancer Phototherapy. *Pharmaceutics* 2021, Vol 13, Page 2057 13: 2057.
51. Demir E, Silah H, Uslu B (2022). Phthalocyanine Modified Electrodes in Electrochemical Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 52: 425–461.
52. Oliveira RS de, Silva N da (2017). Phthalocyanine–sulfonamide conjugates - synthesis and biological activity Portugal : Universidade de Aveiro.
53. Çakır V, Arslan T (2022). Synthesis and biological evaluation of new silicon(IV) phthalocyanines as carbonic anhydrase and cholinesterase inhibitors. *Inorganica Chimica Acta* 530.
54. Ceylan J (2010). Perfloroalkoksi süstitüe ftalosiyanın kompleksleri Yüksek Lisans Tezi İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
55. Yiğit C (2015). Amin Süstitüe Ftalosiyanınlar Yardımıyla Schiff Bazı Metal Komplekslerinin Sentezi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Sakarya.
56. Spesia MB, Durantini EN (2022). Evolution of Phthalocyanine Structures as Photodynamic Agents for Bacteria Inactivation. *The Chemical Record* 22: e202100292.
57. Kırbaç E, Erdoğan A (2020). New non-peripherally substituted zinc phthalocyanines; synthesis, and comparative photophysicochemical properties. *Journal of Molecular Structure* 1202: 127392.
58. Günsel A, Bilgiçli AT, Kandemir C, Sancak R, Arabacı G, Nilüfer Yarasır M (2020). Comparison of novel tetra-substituted phthalocyanines with their quaternized derivatives: Antioxidant and antibacterial properties. *Synthetic Metals* 260.
59. Ömeroğlu İ (2014). Periferel Tetra Süstitüe Metallsız ve Metalli Ftalosiyanınların Sentezi , Karakterizasyonu ve Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans

Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.

60. Günsel A, Taslimi P, Atmaca GY, Bilgiçli AT, Pişkin H, Ceylan Y, Erdoğan A, Yarasir MN, 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.

61. Farajzadeh N, Özdemir S, Tollu G, Altuntaş Bayır Z, Burkut Koçak M (2022). Biological properties of hexadeca-substituted metal phthalocyanines bearing different functional groups. *Journal of Inorganic Biochemistry* 234: 111888.

62. Verma C, Ebenso EE, Quraishi MA, Rhee KY (2021). Phthalocyanine, naphthalocyanine and their derivatives as corrosion inhibitors: A review. *Journal of Molecular Liquids* 334.

63. Gulcin İ (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* 94: 651–715.

64. Akkaya Ş (2016). Ferrosen Birimi İçeren Benzimidazol Türevli Bileşiklerin DNA Bağlanma , DNA Kesim ve Antioksidan Aktivitelerinin Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Trabzon.

65. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 178: 687–704.

66. Karabulut H, Şükrü GÜLAY M (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University* 1: 65–76.

67. Okan OT, Varlıbaş H, Öz M, Deniz İ (2013). Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler. *Kastamonu Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi* 13: 48–59.

68. Deweese JE, Osheroff N (2009). The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Research* 37: 738–748.

69. Gowda S, Mathew BB, Sudhamani CN, Bhojya Naik HS, Naik HSB (2014). Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *Biomedicine and Biotechnology* 2: 1–9.

70. Nishino T, Morikawa K (2002). Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors. *Oncogene* 21: 9022–9032.

71. Iyama T, Wilson DM (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* 12: 620–636.
72. Samejima K, Earnshaw WC (2005). Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology* 6: 677–688.
73. Barut B (2016). Suda Çözünür Ti (IV) Ftalosiyanin Bileşiklerinin DNA Bağlanma, DNA Kesim, Antioksidan, Antimikrobiyal Aktivitelerinin ve Topoizomeraz I İnhibisyonunun İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon .
74. Macías B, Villa M V., Lapresa R, Alzuet G, Hernández-Gil J, Sanz F (2012). Mn(II) complexes with sulfonamides as ligands.: DNA interaction studies and nuclease activity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 115: 64–71.
75. Cowan JA (2001). Chemical nucleases. *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 634–642.
76. Ağırtaş MS, Cabir B, Yıldırım Ü, Özdemir S, Gonca S (2021). Synthesis, antioxidant, DNA cleavage and antimicrobial properties of phthalocyanine complexes bearing the poly-hydroxyl groups. *Chemical Papers* 75: 1749–1760.
77. Caldwell GW, Yan Z, Lang W, Masucci JA (2012). The IC 50 Concept Revisited. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12: 1282–1290.
78. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88–95.
79. Barut EN, Barut B, Engin S, Yıldırım S, Yaşar A, Türkş S, Özel A, Sezen FS (2017). *Alchillea millefolium*’un antioksidan kapasitesi, anti-asetilkolinesteraz aktivitesi ve fare beyin homojenatında lipid peroksidasyonu üzerine inhibitör etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry* 42: 493–502.
80. Oyaizu M (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 44: 307–315.

81. Aykul S, Martinez-Hackert E (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry* 508: 97–103.
82. Cengiz T (2019). Yeni sentezlenen kumarin türevi ve benzeri bileşiklerin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
83. Aktaş D (2022). Meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*) Ekstrelerinin ve Bazı Aktif Bileşenlerinin Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
84. Salih Ağrtaş M, Cabir B, Özdemir S (2013). Novel metal (II) phthalocyanines with 3,4,5-trimethoxybenzyloxy- substituents: Synthesis, characterization, aggregation behaviour and antioxidant activity. *Dyes and Pigments* 96: 152–157.
85. Demirbaş Ü, Barut B, Özel A, Kantekin H (2019). Synthesis, characterization and investigation of cholinesterase inhibitory properties of novel peripherally tetra substituted metal-free and metallo-phthalocyanines. *Journal of Molecular Structure* 1187: 8–13.
86. Tekin A, Arslan T (2022). Investigation of Cholinesterase Inhibitor Effects of Some Chalcone Substituted Metallophthalocyanines. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi* 12: 703–711.
87. Keleş T, Biyiklioğlu Z, Akkaya D, Özel A, Barut B (2022). Synthesis and in vitro α -glucosidase and cholinesterases inhibitory actions of water soluble metallophthalocyanines bearing ({6-[3-(diethylamino)phenoxy]hexyl}oxy groups. *Turkish Journal of Chemistry* 46: 786–795.
88. Günsel A, Kobayaoğlu A, Bilgiçli 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.
89. Hande Alici E, Günsel A, Akin M, Bilgiçli AT, Arabaci G, Nilüfer Yarasir M (2018). Synthesis, characterization, antioxidant and antibacterial properties of non-peripherally and peripherally tetra-substituted phthalocyanines. *Journal of Coordination Chemistry* 71: 3077–3089.

90. Günsel A, Bilgiçli AT, Kandemir C, Sancak R, Arabaci G, Nilüfer Yarasir M (2020). Comparison of novel tetra-substituted phthalocyanines with their quaternized derivatives: Antioxidant and antibacterial properties. *Synthetic Metals* 260: 116288.

