



T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PİPERİDİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN ASETİLKOLİNESTERAZ,
BÜTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON
ETKİLERİNİN ve ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Levent ÇOŞKUN

NİSAN 2021
GÜMÜŞHANE

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**PİPERİDİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN ASETİLKOLİNESTERAZ,
BÜTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON
ETKİLERİNİN ve ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Levent ÇOŞKUN

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

“Biyoteknoloji Anabilim Dalı”

Yüksek Lisans Programında Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 19.02.2021

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 19.04.2021

NİSAN 2021

TEZ BEYANNAMESİ

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlamış olduğum “Piperidin Türevi Bileşiklerin Asetilkolinesteraz, Bütirikolinesteraz Enzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin ve Antibakteriyel Aktivitelerinin İncelenmesi” isimli tez çalışmasında; bütün bilgi ve belgeleri genel akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel ve yazılı bütün bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğumu, başka kaynaklardan yararlandığım bilgileri metin ve kaynaklarda eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksi durumda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 19/04/2021

Levent ÇOŞKUN

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PİPERİDİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN ASETİLKOLİNESTERAZ,
BÜTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON
ETKİLERİNİN ve ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Levent ÇOŞKUN

Gümüşhane Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA

2021, 52 sayfa

Alzheimer son zamanlarda çok yaygın olarak görülen bir demans hastalığıdır ve kesin tedavisi yoktur. Beyindeki nörotransmitterlerin azalmasına neden olan bu hastalıkta en fazla azalma gösteren nörotransmitter asetilkolindir. Hastalığın tedavisi ya da engellenebilmesi için asetilkolinin yıkımı azaltılmalıdır bu ise ancak asetilkolini yıkan astilkolinesterazın (AChE) inhibisyonu ile mümkündür. Bilimsel araştırmalarla henüz bütirilkolinesterazın (BChE) farmakolojik rolü kesin olarak belirlenmiş olmasada, enzimin dejeneratif değişiklikler ile beyindeki asetilkolin hidrolizi sırasında dengeleyici bir role sahip olabileceği bildirilmiştir. Tedavi amacıyla günümüzde Takrin ve Rivastigmin gibi

kolinesteraz inhibitörleri kullanılmakta olup bilinen birçok yan etkileri bulunmaktadır. Piperidin yapısında bulunan ve Alzheimer tedavisinde ilaç olarak kullanılan donepezil ise diğer ilaçlara göre daha seçicidir, yan etkileri daha az görülmektedir ve merkezi sinir sistemindeki asetilkolinesterazlara yüksek oranda özgül olması ilacın önemli bir üstünlüğüdür. Donepezil gibi birçok piperidin türevi farmakolojik olarak aktif bileşiklerin ve önemli ilaçların temel yapısını oluşturmaktadır.

Çalışmamızda piperidin türevi olan (1-metil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon, (1-etil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiklerinin AChE ve BChE enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak incelenerek, IC₅₀ ve k_i değerleri hesaplanmış ve inhibisyon türleri belirlenmiştir. Aynı zamanda bileşiklerin 7 farklı suş üzerindeki antibakteriyel aktiviteside belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak Ampisilin/Sulbaktam ve basitrasin kullanılmıştır.

(1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiği için IC₅₀ değerleri (AChE: 4.584 µM; BChE: 51.448µM) ve k_i değerleri (AChE: 0.00344±0.00071; BChE: 0.05406±0.01009) olarak; (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiği için IC₅₀ değerleri (AChE: 4,312 µM; BChE: 47.968 µM) ve k_i değerleri (AChE: 0.003047±0.00060; BChE: 0.04404±0.05109) olarak hesaplanmıştır. Maddelerin inhibisyon türleri yarışmasız olarak belirlenmiştir. Piperidin türevi iki bileşiğinde AChE enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin çok daha yüksek olduğu, BChE enzimini ise daha düşük düzeyde inhibe ettikleri belirlenmiştir. BChE; AChE eksikliğinde ve yokluğunda kolinerjik iletimde koregülatör olarak görev yaptığından dolayı bu tip ikili inhibitörlerin, AChE seçici ajanlardan daha uzun süreli etkinlik sağlayabileceği ve dolayısıyla Alzheimer hastalığı açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda bu bileşiklerin çalışılan suşların çoğu üzerinde antibiyotiklerden daha yüksek zon çapı oluşturmaları ve güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olmaları dolayısıyla elde edilen tüm sonuçların farmakoloji alanında etken maddelerin tespitinde ve yapılacak yeni çalışmalar için yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer, Antibakteriyel, İnhibitör, Kolinesteraz, Piperidin

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION of INHIBITION EFFECTS on ACETYLCHOLINESTERASE, BUTYRYLCHOLINESTERASE ENZYMES and ANTIBACTERIAL ACTIVITIES of PIPERIDINE DERIVED COMPOUNDS

Levent ÇOŞKUN

Gümüşhane University

The Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA

2021, 52 pages

Alzheimer's is a very common dementia disease recently and there is no cure. Acetylcholine is the neurotransmitter that decreases most in this disease, which causes a decrease in neurotransmitters in the brain. The degradation of acetylcholine must be reduced in order to treat or prevent the disease, but this is only possible with the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), which degrades acetylcholine. Although the pharmacological role of butyrylcholinesterase (BChE) has not been determined with scientific research yet, it has been reported that the enzyme may have a balancing role during degenerative changes and acetylcholine hydrolysis in the brain. Cholinesterase inhibitors such as Tacrine and Rivastigmine are currently used for treatment and they have many known side effects. Donepezil, which is in the structure of piperidine and used as a drug in the treatment of Alzheimer's, is more selective than other drugs, with less side effects. its high specificity for

acetylcholinesterases in the central nervous system is an important advantage of the drug. Many piperidine derivatives such as donepezil constitute the basic structure of pharmacologically active compounds and important drugs.

In our study, the inhibition effects of piperidine derivative (1-methyl-4-hydroxy-4-phenylpiperidin-3yl)methanone, (1-ethyl-4-hydroxy-4-phenylpiperidin-3yl)methanone compounds on AChE and BChE enzymes were examined *in vitro*, IC_{50} and k_i values were calculated and inhibition types were determined. At the same time, the antibacterial activity of the compounds on 7 different strains was determined. Ampicillin / Sulbactam and bacitracin were used as positive controls.

IC_{50} values (AChE: 4.584 μ M; BChE: 51.448 μ M) and k_i values (AChE: 0.00344 \pm 0.00071; BChE: 0.05406 \pm 0.01009) for (1-methyl-4-hydroxy-4-phenylpiperidin-3yl)methanone compound; IC_{50} values (AChE: 4.312 μ M; BChE: 47.968 μ M) and k_i values (AChE: 0.003047 \pm 0.00060; BChE: 0.04404 \pm 0.05109) for (1-ethyl-4-hydroxy-4-phenylpiperidin-3yl)methanone compound were calculated. The inhibition types of the substances were determined as noncompetitive. It was determined that the inhibition effects on the AChE enzyme were much higher in the two compounds of piperidine derivatives, and they inhibited the BChE enzyme at a lower level. Since BChE acts as a correlator in cholinergic transmission in the deficiency and absence of AChE, it is thought that such dual inhibitors may provide longer-term efficacy than AChE selective agents and are therefore important for Alzheimer's disease. At the same time, it is thought that all the results obtained may be a guide for the determination of active substances in the field of pharmacology and for new studies to be carried out, since these compounds form a higher zone diameter than antibiotics on most of the strains studied and have strong antibacterial activity.

Keywords: Alzheimer, Antibacterial, Inhibitor, Cholinesterase, Piperidin

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgisini ve tecrübelerini benimle paylaşan, her daim beni yalnız bırakmayan değerli hocam Doç. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca çalışma ortamı sağladığım Gümüşhane Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümüne ve Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezine, maddelerin sentezini yapıp veren Gümüşhane Üniv. Sağlık Bilimleri Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Ahmet Afşin KAYA'ya, iki bakteri türünün temininde bize destek sağlayan Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e, çalışmam süresince yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşım Öğr. Gör. Cuma ZEHİROĞLU'na teşekkür ederim.

Eğitim öğretim hayatım süresince üzerimde maddi ve manevi emeği çok olan ailemin her bir bireyine teşekkür ederim. Çalışmam süresince göstermiş olduğu destek ve sabrından dolayı eşim Nermin Çoşkun'a ve sevgisiyle beni her an sıcacık saran ve kucaklayan, evimizin neşesi, biricik kızımız Erva Çoşkun'a sonsuz teşekkür ederim.

Levent ÇOŞKUN

Gümüşhane, 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VIII
İÇİNDEKİLER	IX
ŞEKİLLER DİZİSİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.1.1. Enzimler	1
1.1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Mekanizması	1
1.1.1.2. Enzim İnhibisyonu	2
1.1.2. Kolinesteraz Enzimleri	3
1.1.2.1. Asetilkolinesteraz Enzimi.....	3
1.1.2.2. Bütirilkolinesteraz Enzimi.....	4
1.1.3. Kolinesteraz Enzimi ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi	6
1.1.4. Kolinesteraz İnhibitörleri	8
1.1.5. Piperidin Yapısı ve Klinik Önemi.....	10
1.1.6. Önceki Çalışmalar	11
1.1.7. Çalışmanın Amacı	13
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	15
2.1. Numunelerin Temini	15
2.2. Test Bakterilerinin Temini	15
2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	16
2.4. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar	16
2.5. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	17
2.5.1. Asetilkolinesteraz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler .	17
2.5.2. Bütirilkolinesteraz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	17
2.5.3. Antibakteriyel Aktivite Tayininde Kullanılan Besiyeri ve Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması.....	17
2.6. Kolinesteraz Enzim Aktivitesi Tayini	18
2.6.1. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi.....	18

2.6.2.	Bütirilkolinesteraz Enzim Aktivitesi	18
2.7.	Kolinesteraz Enzimleri Üzerinde Yapılan Kinetik Çalışmalar	19
2.7.1.	IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması ile İlgili Çalışmalar.....	19
2.7.2.	K _i Değerlerinin Bulunması ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar	20
2.8.	Antibakteriyel Aktivite Tayin Yöntemi	20
2.8.1.	Disk Difüzyon Yöntemi	20
3.	BULGULAR	21
3.1.	Kolinesteraz Enzimleri Üzerinde Yapılan Kinetik Çalışma Sonuçları	21
3.1.1.	Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Piperidin Türevi Maddeler ile İlgili Sonuçlar	21
3.1.2.	Bütirilkolinesteraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Piperidin Türevi Maddeler ile İlgili Sonuçlar	24
3.1.3.	Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Donepezil ile İlgili Sonuçlar.....	27
3.2.	Antibakteriyel Aktivite Sonuçları.....	28
4.	TARTIŞMA.....	34
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	45
6.	KAYNAKLAR.....	47
	ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1.	Asetilkolinesterazın hidroliz reaksiyonu.....	4
Şekil 1.2.	Bütirilkoliesterazın hidroliz reaksiyonu.....	5
Şekil 1.3.	Asetilkolinesteraz enziminin sinir hücreleri aksiyon boyunca kimyasal işlevi (Yıldız 2013)	8
Şekil 1.4.	Piperidin.....	11
Şekil 2.1.	(1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon	14
Şekil 2.2.	(1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon.....	14
Şekil 3.1.	(1-metil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı inhibitör konstrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Konsantrasyon] grafiği	21
Şekil 3.2.	(1-metil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	22
Şekil 3.3.	(1-etil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı inhibitör konstrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[Konsantrasyon] grafiği	22
Şekil 3.4.	(1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	23
Şekil 3.5.	(1-metil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin BChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı inhibitör konstrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Konsantrasyon] grafiği	24
Şekil 3.6.	(1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin BChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	25
Şekil 3.7.	(1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin BChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı inhibitör konstrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[Konsantrasyon] grafiği	25
Şekil 3.8.	(1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiğinin BChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	26
Şekil 3.9.	Donepezilin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı inhibitör konstrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[Konsantrasyon] grafiği	27

Şekil 3.10.	Donepezilin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	28
Şekil 3.11.	Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği etanol (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) <i>S. aureus</i> ATCC 29213 üzerinde oluşturdıkları inhibisyon zonları.....	30
Şekil 3.12.	Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) <i>E. coli</i> 35218 üzerinde oluşturdıkları inhibisyon zonları	30
Şekil 3.13.	Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği etanol (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) <i>E. coli</i> 25922 suşu üzerinde oluşturdıkları inhibisyon zonları	31
Şekil 3.14.	Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği etanol (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) <i>Klebsiella pneumoniae</i> üzerinde oluşturdıkları inhibisyon zonları.....	31
Şekil 3.15.	Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği etanol (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) <i>E. faecalis</i> üzerinde oluşturdıkları inhibisyon zonları.....	32
Şekil 3.16.	Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği etanol (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) <i>P.aeruginosa</i> üzerinde oluşturdıkları inhibisyon zonları	32
Şekil 3.17.	Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği etanol (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) <i>P. putida</i> üzerinde oluşturdıkları inhibisyon zonları	33
Şekil 4.1.	Sentezlenen 9-(1- (sübsitüe-benzil) piperidin-4-il)-2-kloro-9H-purin-6-amin türevleri için genel kimyasal yapı (Kang vd. 2013).....	35
Şekil 4.2.	2-(1-((4-florofenil) sülfonil)piperidin-4-il)-3- ((1-metil-1,2,5,6-tetrahidropiridin-3-il) metil) tiazolidin-4-on bileşiği kimyasal yapısı (Kumar vd. 2015).....	36
Şekil 4.3.	Piperidinonların sentez reaksiyonu (Parlar, 2019).....	36
Şekil 4.4.	2,6-disübsitüe piperidin-4-on bileşiği genel yapısı ve bileşik kod numaraları ve R grupları (Pandey ve Chawla 2012).....	41
Şekil 4.5.	4-Hidroksi-4-fenil piperidin türevi bileşikler R ve X grupları (Rafiq vd., 2013)	42

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1.	Kullanılan bakteriler ve kodları	16
Tablo 2.2.	Yararlanılan alet ve cihazlar	16
Tablo 2.3.	Asetilkolinesteraz enzim aktivite tayin yöntemi için kullanılan küvet içeriği ve miktarları	18
Tablo 2.4.	Bütirilkolinesteraz enzim aktivitesi tayin yöntemi için kullanılacak küvet içeriği ve miktarları	19
Tablo 3.1.	Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin IC ₅₀ değerleri, k _i değerleri ve inhibisyon türleri	23
Tablo 3.2.	Bütirilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin IC ₅₀ değerleri, k _i değerleri ve inhibisyon türleri	26
Tablo 3.3.	Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren donepezilin IC ₅₀ değeri, k _i değeri ve inhibisyon türü	28
Tablo 3.4.	Etanolde ve DMSO'da çözünen (1-metil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin (30 mg/mL) ve pozitif kontrollerin (Ampisilin/Sulbaktam, Basitrasin) 7 bakteri suşuna karşı oluşturdıkları inhibisyon zon çapları	29
Tablo 3.5.	Etanolde ve DMSO da çözünen (1-etil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin (30 mg/mL) ve pozitif kontrollerin (Ampisilin/Sulbaktam, Basitrasin) 7 bakteri suşuna karşı oluşturdıkları inhibisyon zon çapları	29

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
ATP	: Adenozin trifosfat
BChE	: Bütilkolinesteraz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DTMB	: (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)
EC	: Enzim kod numarası
IC ₅₀	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
GTP	: Guanizin trifosfat
μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

1.1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmlarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir (Robinson, 2015). İlk keşfedilen enzim, 1833 yılında Payen ve Persoz tarafından, arpadan izole edilmiş olan nişastanın şekere dönüşümünü katalize eden amilazdır. Bu keşif 20. yüzyılın başlarında ticari ekmek yapım ve bira üretim tekniklerinin yanı sıra fermantatif enzimlerin gelişimine öncüllük etmiştir. İlk olarak Sumner 1926'da ürenin amonyak ve karbonata hidrolizini katalize eden bir enzim olan kristalize üreazı izole ederek kristallendirmiştir (Sumner, 1926).

1.1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Mekanizması

Substratlar enzimlerin etki ederek ürüne dönüştürdükleri maddelerdir. Enzimler adlandırılırken substrat adının sonuna “-az” eki getirilerek veya onları bulan kişilerin adlarıyla tanınmaktadırlar (Örneğin, üreaz, tripsin ve pepsin gibi). Bu isimler enzimlerin bilgilerini tam olarak karşılayamadığından dolayı Uluslararası Biyokimya birliği tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmış ve 4 rakamlı enzim kod numarası (EC) ile adlandırılmıştır. Enzimler 7 ana grup altında sınıflandırılmıştır. (Tipton ve Boyce, 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2012; Tao vd., 2020).

Bunlar; oksidasyon tepkimelerini kolayca katalizleyen oksidoredüktazlar, bir bileşikteki amino, karboksil yada fosfor gruplarını başka bir bileşiğe transfer eden transferazlar, ester, eter ve glikozid gibi veya C-X, P-N gibi bağlara su katılmasını katalizleyen hidrolazlar, substratlarından grup uzaklaştırıp çift bağların oluşumunu katalizleyen liyazlar, geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüşümünde katalizleyen izomerazlar, ATP (Adenozin trifosfat) ve GTP (guanin trifosfat) gibi bileşiklerden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan yüksek enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonunu katalizleyen ligazlar ve moleküllerin hücre zarları üzerinde hareketini ve ayrılmasını sağlayan translokazlardır (McDonald ve Tipton, 2014; Tao vd., 2020).

Yapısal çalışmalar sayesinde araştırmacılar, enzim katalizinin, aktif bölge olarak

bilinen enzim yapısı içinde gömülü bir cepte gerçekleştiğini ortaya koymuştur. X-ışını kristalografisinden elde edilen deneysel kanıtlarla, bu işlemin nasıl gerçekleştiğini açıklamak için bir model önerilmiştir. Enzim ve substrat ilişkisini açıklayan en bilindik model indüklenmiş uyum modelidir (Koshland 1958). Başlangıçta enzim ve substrat etkileşimi zayıf olduğundan öncelikle enzim ve substratlar aktif bölgede yapılarında büyük konformasyonel değişikliklere neden olabilecek bir kompleks oluştururlar. Böylece bağlanma güçlenmiş olur. Bağlanma olduktan sonra alternatif reaksiyon mekanizmalarıyla enzimler, reaksiyonun geçiş halinin serbest enerjisi düşürürler. Bir veya daha fazla reaksiyon ara maddesi üretilir, bu daha sonra ürüne dönüşür. Substrat enzime yaklaştığında, moleküler tanıma gerçekleşir ve kompleks enzim substratı aktif maddenin substratının çeşitli amino asitlerle etkileşimlerinden kaynaklanır. Karmaşık formasyonu yönlendiren iki tür etkileşim vardır: Bunlar elektronların paylaşımını içeren kovalent etkileşimler ve elektrostatik, dipol, hidrojen bağı, hidrofobik ve van der Waals kuvvetlerini içeren kovalent olmayan etkileşimlerdir. Kovalent olmayan etkileşimler ayrıca geçiş durumunu stabilize ederek ve zemin durumunu kararsızlaştırarak enzim katalizine katkıda bulunurlar. Bireysel olarak zayıf olmalarına rağmen, toplu olarak geçiş durumu oluştuğunda maksimum düzeyde güçlü bir etkileşim kurarlar (Fersht 1999 ; Silverman, 2002).

Bir enzimin aktif bölgesi, yaklaşık on ile on iki amino asit içerir. Katalitik amino asitler olarak bilinen yaklaşık üç veya dördü, biyokimyasal reaksiyonun katalizinde doğrudan yer alır ve katalitik siteyi oluştururlar (Gutteridge ve Thornton, 2005). Rollerini mekanizmada yaptıkları spesifik kimyasal fonksiyona göre tanımlanır. Enzimlerin bir çok biyoteknolojik uygulama alanları vardır. Örneğin; tatlandırıcı ajanlar ve antibiyotiklerin modifikasyonunda deterjan üretiminde ve çeşitli temizlik ürünlerinde kullanılırlar. Ayrıca adli ve çevresel uygulamalar gibi klinik alanlarda kilit rol oynarlar (Robinson, 2015).

1.1.1.2. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin aktivitelere etki eden bazı etken maddeler bulunmaktadır. Enzim etkinliğini tamamen durduran veya azaltan etken maddelere inhibitör denilmektedir. Meydana gelen bu olaya ise inhibisyon denilmektedir. (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Dönüşümsüz inhibisyonlarda; enzimin aktif bölgesine inhibitör kovalent bağlanır ve enzim yapısını bozarak aktivitesini düşürebilir yada aktiviteyi bitirebilir. Toksik sinir

gazlarının kompleks oluşumu ile asetilkolinesteraz (AChE) enzimini inhibe etmeleri bu tip inhibisyona örnek olarak gösterilebilir.

Dönüşümlü inhibisyonlar ; inhibitör etkenliği bakımından üç kısımda incelenir.

Kompetitif (Yarışmalı) inhibisyon: Enzim aktif bölgesine bağlanmak için substrat ile inhibitör yarışır. İnhibitör enzimin aktif bölgesine yerleşirse enzimin aktivitesini azaltır veya tamamiyle durdurabilirler.

Nonkompetitif (Yarışmasız) inhibisyon: İnhibitör aktif olan enzime yada enzim substrat kompleksine bağlanır ancak aktif bölgeden uzak şekilde bağlanırlar bundan dolayı enzimin yapısı bozulabilir aktivite düşer.

Unkompetitif (Yarı yarışmalı) inhibisyon: İnhibitör enzim aktif bölgesine değil sadece enzim substrat kompleksine ilgi duyar ve enzimin aktivitesini düşürür (Gürdol ve Ademoğlu, 2006; Telefoncu ve Kılınç 2012).

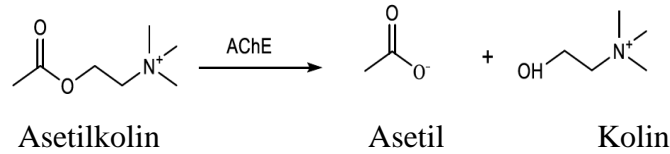
1.1.2. Kolinesteraz Enzimleri

İnsan vücudunda kolinesterazların iki formu vardır. Bunlar asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) ve butirilkolinesterazdır (BChE; EC 3.1.1.8) (Shidore vd., 2016). Farklı kromozomlarda kodlanan bu enzimlerin aminoasit dizilimleri % 65 oranında birbirlerine benzerlik gösterse de erişkin normal bir insanın beyinde BChE' a göre AChE, daha yaygın olarak bulunmaktadır. Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin % 20'sinden BChE' nin geriye kalan büyük bir kısmı olan % 80'inden ise AChE sorumlu olduğu düşünülmektedir. (Greik vd., 2001).

1.1.2.1. Asetilkolinesteraz Enzimi

İki tip önemli kolin esterazdan AChE, ağırlıklı olarak kolin esterlerini hidrolize eden ve beyin, sinir ve kırmızı kan hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarla karakterize edilen spesifik bir esterazdır. BChE olarak adlandırılan diğer tip ise, diğer esterlerin yanı sıra kolin esterlerini de hidrolize eden ve kan serumu, pankreas, karaciğer ve merkezi sinir sisteminde bulunan spesifik olmayan bir kolin esterazdır ("psödo" kolin esteraz olarak da adlandırılır). Asetilkolinesterazın klasik etkisi, beyin ve otonom sinir sisteminin kolinerjik sinapslarında asetilkolinin hidrolizini katalize etmektir. Butirilkolinesteraz bu fonksiyonlardan bazılarını paylaşırsa da, beyindeki rolü belirsizliğini korumaktadır (Das 2012).

Asetilkolin esteraz enzimi beyinde nörotransmisyon olayı gerçekleşirken sinapsis bölgesinde hücre bölünmelerini kontrol altına alır, nörotransmitterleri hidroliz eder. Asetilkolinesteraz, sinir ucu önünde biriken kimyasalları süpürerek ortamdan uzaklaştırır. Bu sayede, elektron taşıyıcıların önü devamlı olarak açılmak suretiyle sinirsel iletim kesintiye uğramadan dengeli bir şekilde gerçekleşir (Göçer vd. 2013; Akıncıoğlu vd. 2014).



Şekil 1.1. Asetilkolinesterazın hidroliz reaksiyonu

AChE, bir saniyede 250.000 asetilkolin molekülünü hidrolize edebilen, 537 amino asit uzunluğunda bir peptid monomerdur. AChE'nin moleküler yapısı 14 alfa sarmal ile çevrili 12 beta levhadan oluşmaktadır. Asetilkolin esteraz enzimi üç bölgeden oluşmaktadır bu bölgeler anyonik bölge katyonik bölge ve aktif bölgedir. Amin grubu bulunan katyonik bölgede Ser200, His440 ve Glu327 amino asitlerin aktifliği mevcuttur. Anyonik bölgede ise temel olarak Trp84 amino asidi bulunmakta aktif bölge ise hidrolizin gerçekleştiği bölge olarak tanımlanmakta olup asetilkolin bağlanmasını gerçekleştirmektedir (Tripathi, 2008).

Asetilkolinesteraz enziminin aktive inhibitörleri, Ellman ve arkadaşları tarafından spektrofotometrik yöntem ile modifiye edilmiştir. Asetilkolin esteraz enzim inhibitörleri genellikle, silah sanayisinde (sinir gazı), pestisitlerde, tıbbi tedavi amaçlı olarak kullanılırlar (Colovic vd., 2013).

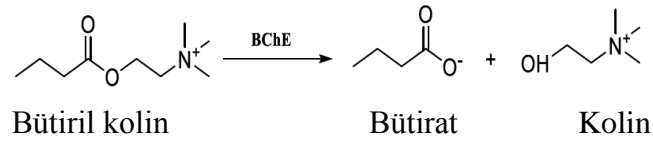
1.1.2.2. Bütirilkolinesteraz Enzimi

Bütirilkolinesteraz (BChE) ise yaklaşık olarak 342 000 Da ağırlığında tetramerik bir glikoproteindir (Barta vd. 2001). BChE çoğunlukla karaciğer, plazma ve kas dokularında mevcut olan bir enzimdir. AChE'nin bilinen klasik rolü kolinerjik sinapslardaki asetilkolini hidrolize etmektir. BChE ise, sinaptik aralıkta bulunmaz. Bilimsel araştırmalar henüz bu enzimin farmakolojik rolünü kesin olarak ortaya koyamamışlar da, BChE'nin dejeneratif değişiklikler ile beyindeki asetilkolin hidrolizi sırasında dengeleyici bir role sahip

olabileceği bildirilmiştir. BChE; AChE eksikliğinde ve yokluğunda kolinerjik iletimde koregülatör olarak görev yapmaktadır. (Guillou, 2000; Mack ve Robitzki, 2000; Suarez vd., 2006; Chitransi vd., 2013).

BChE esas olarak glial hücreleri ile ilişkilidir ve sağlıklı beyin hücrelerinde çok daha düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Ancak, Alzheimer hastalığı süresince, AChE aktivitesi giderek azalırken BChE aktivitesi artar ve BChE daha sonra asetilkolin (ACh) metabolizması için telafi edici bir mekanizma oluşturur. Sonuç olarak, ACh düzenlemesi giderek BChE'ye bağımlı hale gelebilir. Böylece ikili inhibitörler, AChE seçici ajanlardan daha uzun süreli etkinlik sağlayabilir (Rodríguez-Franco vd., 2005)

BChE; serum, kalp, pankreas, karaciğer ve beyinde expresse olmuştur. Boşluğun tabanında bulunan aktif bölgede, katalitik etkinlik için subsratların karbonil gruplarına veya psödosubstrat inhibitörlerine nükleofilik olarak saldırır (Chiou vd. 2009).



Şekil 1.2. Bütirilkoliesterazın hidroliz reaksiyonu

Bütirilkolinesteraz, asetilkolinesteraza benzer şekilde yapısında esteraz, aril açilamidaz ve peptidaz (proteaz) enzimatik aktiviteleri barındırmaktadır. Organofosfat ve karbamat yapılı inhibitor bileşiklerinin asetilkolinesteraza ulaşmadan dolaşımdan temizlenmesinde, asetilkolinesteraz yokluğunda kolinerjik sinir iletiminin kontrolünde kokain, aspirin, amitriplin gibi bazı ilaçların inaktivasyonu ve bambuterol, heroin gibi bazı ilaçların aktivasyonunda bütirilkolinesterazın esteraz aktivitesi önem kazanmaktadır. Seratonerjik ve kolinerjik sinir iletim sistemleri arasında iletişim sağlama işlevinde ise enzimin aril açilamidaz aktivitesinin, ayrıca Alzheimer hastalığının gelişmesi ve ilerlemesinde de enzimin peptidaz ve proteaz aktivitesinin önemi bulunmaktadır. Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri insan kromozomlarının farklı genlerinin ürünü olmalarına rağmen moleküler formları ve aktif merkez yapıları benzer iki enzimdir ve bazı homologları %65 aynı aminoasit dizisine sahiptir (Greig vd., 2001; Silman ve Sussman, 2005; Özcan, 2014).

Son çalışmaların, BChE ve AChE enzimlerinin plazma (serum), kırmızı kan hücreleri ve lökosit aktivitelerinin, Alzheimer hastalığı, diabetes mellitus, hipertansiyon, insülin direnci ve hiperlipidemi hastalarında yükseldiğini ortaya çıkarmıştır. BChE aktivitesinin yaşla ters orantılı olduğu ve albümin, kolesterol ve trigliseridlerin serum konsantrasyonları ve fazla kilo, obezite ve vücut yağ dağılımı ölçümleri ile pozitif bir şekilde ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Alzheimer hastalığı, diabetes mellitus, hipertansiyon, insülin direnci ve hiperlipidemi, butirilkolinesteraz enziminin aktivitesi artarken, hastalığın son aşamalarında veya bu hastalıklar ilerlediğinde ve tedaviye kolayca yatkın olunmadığında butirilkolinesteraz aktivitesi düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumlar hastalık süreçlerinde bu enzimlerin bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Alcantara vd., 2002; Mahmoud, 2006; Lampon vd., 2012)

Asetilkolin, anti-enflamatuar bir molekül olduğundan, AChE ve BChE enzimlerinin konsantrasyonları arttığında, asetilkolin seviyelerinin düşmesine yol açacaktır. Bu durum ise, asetilkolinin uyguladığı anti-enflamatuar (iltihap önleyici) etkilerin yokluğuna veya azalmasına yol açar (Das, 2012).

1.1.3. Kolinesteraz Enzimi ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi

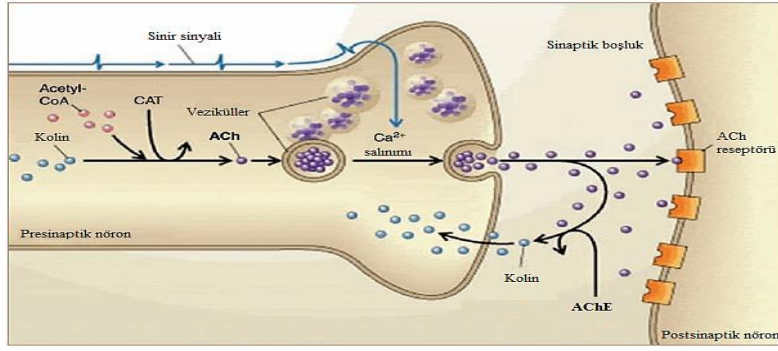
Alzheimer hastalığı, insanlarda ruh halini, iletişim sorunlarını ortaya koyan insanlarda karakteristik özelliklerini etkileyen kompleks bir nöron hastalığıdır. Bazı korteks ve korikal bölgelerde, sinaptik olayların sinir uyarımı gerçekleşmesi esnasında bazı maddelerin kaybı ile gerçekleşir. Bu eksikliğin asetilkolinesteraz inhibitörleri ile giderilebileceği deneylerle belirlenmiş ve çalışmalar başlatılmıştır. Bu tanı Alman Nörolog bilim adamı 1907 yılında Alois Alzheimer tarafından ortaya koyulmuştur. Alzheimer demans hastalığının bir tipidir ancak her demans hastası Alzheimer değildir genellikle 65 yaş üstünde gözükmemektedir. Yani Alzheimer demansa sebep olan bir hastalıktır.

Demans hastalığı beyindeki nöronlarda kimyasal bir kayıp olmadan sadece bunama diye halk dili ile tabir edilir Alzheimer hastalığında ise sinir uyarılarının iletimi esnasında kimyasal kayıplar meydana gelmektedir(Mohsen vd., 2014).

Asetilkolin vücutta karaciğerde ve kan plazmasında bolca bulunmaktadır. Asetilkolin, merkez sinir sisteminde haberci olarak görev yapmaktadır. Beyinde bir uyarı algıladığı andan itibaren asetil ve kolin tranferaz enzimi sayesinde birleşip asetilkolini oluşturur ve beyindeki sinaptik arasındaki boşluğa bırakılır ve vesiküller olarak depolanır.

Daha sonrasında asetilkolin postsinaptik resptörlere bağlanır. İleti diğer sinir ucuna iletilir ve resöptörlerden ayrılır bu esnada bazı kimyasal anyonik katyonik hücre geçişleri sağlanmaktadır ve boşta kalan asetilkolin, asetilkolin esteraz enzimi tarafından yıkılır ve ayrılır. Bu işlev sonunda sürekli bir şekilde elektron geçişlerinin devamlılığı sağlanmış olur. Bu işlem sürekli devam eder (Göçer vd., 2013; Uraz vd., 2017).

Yarı geçirgen bir yapıya sahip olan sinir hücreleri asetilkolinesteraz enziminin kimyasal işlemler uygulanmasında aktif rol oynamaktadır. Sinir hücresi uyarıldığında hücre dışına mV olarak yüksek gelen akım hücre içerisine düşük mV olarak yansıyarak depolarizasyon olayı gerçekleşmiş olur. Depolarizyon diğer sinir uçlarındaki yansıyarak sinir demeti halinde iletim devam eder. Bunun temel nedeni bazı iyonların (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi) demetin üzerindeki birikimlerinden kaynaklanmaktadır. Uyarılan sinir hücresi uyarılma gerçekleşirken asetilkolin sinapsin boşluğuna salgılanır, sinir demeti kısa olduğundan sinapsin boşluğundan kolinesteraz enzimi tarafından asetilkolin parçalanır ve postsinaptik membranına ulaşır. Uyarılma esnasında depolarize olan hücre, kanallarını açarak Ca^{2+} nin hücre içerisine girmesini sağlar. Ca^{2+} sayesinde asetilkolinin veziküllere gitmesi sağlanmış olur ve veziküller kanallarını tamamen açmış olur. Sinir demetleri uyarıldığından dolayı açılmış bu kanallarda Na^+ ve K^+ iyonları sürekli olarak bolca bulunmaktadır. Açılan kanallardan öncelikle Na^+ iyonu giriş yapar depolarize olur, diğer uyarıların devamlılığını sağlamak için K^+ iyonunu tetikleyerek hücre dışına K^+ iyonunu çıkarmış olur ve hücreyi bu sefer repolarize etmiş olur. Uyarının sinir hücresi ucuna geldiğinde Ca^{2+} kanalları açılır ve bu esnada krepş çemberinden gelen asetil koenzim A ve kolin kolintaransferaz enzimi ile birleşerek asetilkolini oluşturur. Ca^{2+} hücre kanallarının açılması ile hücreye girer ve veziküllerde birikmiş olan asetilkolini presinaptik boşluğuna ekzositoz ile çıkarmış olur. Postsinaptik bölgede bulunan asetilkolin, asetilkolinesteraz enzimi tarafından asetat ve kolin olarak parçalar. Kolini hücre içerisinde tekrar kullanımını sağlamak için presinaptik bölgeye yollar ve asetat hücre dışına çıkarılır (Nelson ve Cox, 2005; Yıldız, 2013).



Şekil 1.3. Asetilkolinesteraz enziminin sinir hücreleri aksiyon boyunca kimyasal işlevi (Yıldız 2013)

Alzheimer hastalığı, beyindeki kimyasal olaylar esnasında gerçekleşirken yukarıda belirtilen kimyasal olayların oluşması ile demans hastalığından farklı olduğu görülmektedir. Bu hastalıkta asetilkolin presinaptikte azalmasından dolayı asetilkolinesteraz enziminin aktivitesinde azalması gerekmektedir bunu sağlamak amacıyla bazı inhibitörler kullanılmaktadır. (Nelson ve Cox, 2005). Butirilkolinesteraz (BChE), AChE'nin aktivitesinin bir ortak düzenleyicisi olarak görev yaptığından her iki enzimin inhibitörü olarak işlev gören terapötik maddeler, Alzheimer hastalığına ilave faydalar sağlayabilirler (Meena vd., 2013).

1.1.4. Kolinesteraz İnhibitörleri

Asetilkolinesteraz enziminin aktive inhibitörleri, Ellman ve arkadaşları tarafından spektrofotometrik yöntem ile modifiye edilmiştir. Asetilkolin estereaz enzim inhibitörleri genellikle, silah sanayisinde (sinir gazı), pestisitlerde, tıbbi tedavi amaçlı olarak kullanılırlar (Colovic vd., 2013).

Tıbbi olarak asetilkolin estereaz enzimi, beyindeki nörotransfer açıdan çok önemlidir. Asetilkolin; miktarına göre Alzheimer hastalığında büyük bir etkidir ancak inhibitörler sayesinde bu miktarın azaltılması yolunda çeşitli epoksitler kullanılmış ancak vücutta yan etkileri olması sebebiyle kullanılmaktan vazgeçilmiştir.(Mohsen vd., 2015).

Rivastigmin, Donepezil, Galantamin ve Takrin FDA (Amerikan İlaç Dairesi) nın belirlemiş olduğu ilaçlar olarak kullanılmaktadır ancak günümüzde halen asetilkolinesteraz enzimi inhibitörleri çalışmaları hızla devam etmektedir. (Sharma vd, 2011). Rivastigmin ve galantamin bitkisel kaynaklı; takrin ve donepezil ise sentetik ilaçlardır.

Takrin; asetilkolinesteraz enzimi inhibitörü olarak kullanılan ilk inhibitördür.

Asetilkolinesteraz yanında butirilkolinesteraz ve diğer kolinesterazları da inhibe eder. Hepatotoksitesi ve gastrointestinal yan etkileri kullanımını sınırlamaktadır. Takrinin yüksek dozlarının Alzheimer hastalığında orta derecede etkin olduğunda birleşilmektedir (Yüksel 2000; Qizilbash vd., 2007).

Donopezil için 1980'li yıllarda çalışmalara başlanmış olup şu anda en çok kullanılan inhibitördür. Merkezi sinir sistemindeki asetil kolin esterazlara yüksek oranda özgül olması ilacın önemli bir üstünlüğüdür. Butirilkolinesteraz üzerindeki etkisi daha azdır. Donepezil HCl; beyaz kristal toz şeklinde olan kloroform, su ve glasiyelasetikasitle çözünabilir bir bileşiktir. Yarılanma ömrü yaklaşık 70 saattir. Cinsiyet, ırk ve sigara alışkanlığının bileşiğin plazma konsantrasyonları üzerinde önemli bir etkisi bulunmamaktadır. Alınan dozun % 57'si idrarla atılırken, % 17'si değişmeden atılıp % 15'i ise dışkı ile atıldığı tespit edilmiştir. Donepezil beyine kolayca nüfuz eder ve plazma kolinesteraza göre, daha etkili ve seçici beyin kolinesteraz inhibitörü olarak görev yapar. Bu nedenle güvenilirdir, hepatotoksik etkisi yoktur, ve tolere edilmesi hepatik hasarlı hastalarda iyidir (Sugimotovd., 2002; Reyes,2004). Donepezil, Alzheimer için dizayn edilen piperidin yapısında asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Dönüşümlü ve yarışmasız olarak asetilkolinesterazı inhibe eder. Takrin BChE ve AChE aynı derecede inhibe ederken donepezil AChE'yi daha fazla inhibe eder (Çakıroğlu, 2009; Koç, 2010; Rodrigues, 2014).

Rivastigmin ise kalabar fasulyesinin zehirli tohumlarından üretilmiş olup sentetik bir inhibitördür. Kapsül ve sıvı olarak Parkinson hastalığında ilaç tedavisi olarak kullanılmaktadır. Fenil karbamat yapısında asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Enzime esterik bölgesinden bağlanır ve bölgeden çok yavaş ayrılır. Bu özelliği ile yalancı geri dönüşlü inhibisyona neden olduğu kabul edilir. Rivastigmin kortikal ve hipokampal alanlardaki asetilkolinesterazı beyin diğer bölgelerine göre daha fazla inhibe eder. Ayrıca butirilkolinesterazı da inhibe eder. Bu özelliği ile rivastigmin solunum ve ekstrapiramidal sistem yan etkilerine yol açmadan özgül olarak bellek bozukluklarını düzeltir (Yüksel, 2000; Rodrigues, 2014).

Galantamin ; doğal olarak bulunan tek inhibitördür. Kardelen ve nergiz çiçeğindeki alkaloidlerin yapısında bulunmakla beraber doğal üretimi 1958 yılında üretilmeye başlamıştır. Asetilkolinesteraz enzimi inhibitörlerinden bir de ilaç olarak kullanılan Huperzin A bulunmaktadır. Huperzin ve kurtpençesi bitkisinden alkaloidlerinin saflaştırılması sonucu elde edilmiştir. IC₅₀ ve K_i çalışmaları yapıldıktan sonra inhibitörün çok ciddi sonuçlar verdiği görülmektedir. Huperzin A inhibitörü günümüzde Alzheimer

hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır ve halen üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Raves, 1997; Tang ,1999; Heinrich, 2004; Drtinova, 2014).

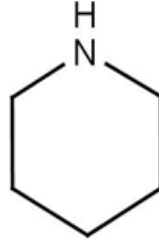
Günümüzde savaş silahı olarak kullanılan organofosfat yada karbamat yapılı sinir gazları, insektisit olarak kullanılan benzer kimyasallar ile zehirlenmelerde, BChE profilaktik amaçla kullanılmaktadır. Enzim, süksinilkolin, aspirin, kokain gibi ester yapıdaki ilaçları, organofosfat pestisitleri ve kimyasal savaş ajanlarını parçalama özelliği nedeniyle hem farmakolojik hem de toksikolojik açıdan önemlidir. Kolinesteraz inhibitörleri, sadece savaşlarda kullanılan kimyasal silah değil, Alzheimer, myastenia gravis veya glokom gibi hastalıklarda da ilaç olarak kullanılan maddelerdir (Massoulie vd., 1993; Bodur ve Çokuğraş, 2006).

Aynı zamanda inhibitörlerin seçiciliği karşılaştırıldığında; donepezil ve galantamin, AChE için göreceli seçiciliğe sahipken, takrin ve rivastigminin hem AChE hem de BChE'yi birlikte inhibe ettiği görülmektedir. AChE ve BChE, ACh'nin sinaptik hidrolizinde eşzamanlı olarak aktif görünmekte, nörotransmitter etkisini sonlandırmakta ve ACh düzeylerini birlikte düzenlemektedir (Mesulam 2003; Lane vd. 2006).

1.1.5. Piperidin Yapısı ve Klinik Önemi

Piperidin yapısında bulunan donepezil asetilkolinesteraz inhibitörüdür ve Alzheimer tedavisinde kullanılan klinik bir ilaçtır. Diğer ilaçlara göre daha seçici bir etkiye sahiptir ve merkezi sinir sistemindeki asetilkolinesterazlara yüksek oranda özgül olması ilacın önemli bir üstünlüğüdür. Butirilkolinesteraz üzerindeki etkisi daha azdır. Bu özelliği ile takrin ve fizostigminden ayrılır. Diğer ilaçlarla karşılaştırıldığında donepezilin yan etkileri daha az görülmektedir ve bilişsel bozukluklarla beraber davranışsal belirtileride düzeltmektedir. Klinik çalışmalarda Alzheimer hastalığındaki ilerlemeyi durdurduğu, bilişsel işlevleri önemli derecede düzelttiği belirtilmiştir (Yüksel, 2000).

Azot atomu içeren heterosiklik bileşiklerin içerisinde piperidin yapıları ayrı bir öneme sahiptir. Piperidinler bazı farmasötiklerin üretiminde ve ayrıca gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Piperidinler sebzeler de dahil olmak üzere çeşitli gıda ürünlerinde doğal olarak bulunmaktadır (Neurath vd., 1977).



Şekil 1.4. Piperidin

Endüstride çözücü, sertleştirici, ara madde, katalizör ve kompleks yapıcı ajan olarak kullanılırlar. İlaç endüstrisinde, lokal anestezikler, analjezikler, antimikrobiyal ilaçlar ve diğer farmasötik ürünlerin yapısında bulunmaktadır. Piperidin halkası bir antidepresan ilaç olan paroksetin gibi, klinikte kullanılan birçok etken maddenin de ana iskeletini oluşturmaktadır. Kimyasal piperidin halkası taşıyan bileşiklerin antioksidan, antikanser, antibakteriyel, antifungal, antiülser ve antihiv gibi farmakolojik aktiviteleri bulunduğu çalışmalardan bilinmektedir. (Thomas vd., 2013; Kaya, 2018).

1.1.6. Önceki Çalışmalar

Piperidin halkası, proton alıcı olarak görev yapan üçüncül bir azot elementine sahiptir. Böylece, azot elementi kuarterner forma dönüşür ve elektrostatik çekim ile AChE'nin anyonik bölgesi ile etkileşime girebilir. Bu etkileşim nedeniyle, piperidin türevleri genellikle AChE'nin yeni inhibitör adayları olarak bilinirler. Son çalışmalarda, piperidin halka sisteminin önemi üzerinde durulmuştur. (Özturan Özer vd., 2013; Levent vd., 2016)

Altıntop ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, piperidin türevlerinin, AChE aktivitesi üzerindeki diğer heterosiklik bileşiklerden daha etkili olduğu gösterilmiştir (Altıntop vd., 2013). Alzheimer hastalığının tedavisi için yeni ilaçlar geliştirmek amacıyla, bir grup N'-2- (4-Benzilpiperidin- / piperazin-1-il) asilhidrazonları sentezlemişlerdir. Asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz enzim inhibisyon deneyleri sonucunda, bileşiklerin hem asetilkolinesteraz hem de butirilkolinesteraz'ı orta düzeyde inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (Özturan Özer vd., 2013).

Yine Levent ve arkadaşları 2016 yılında antikolinesteraz etkilerini gözlemlemek amacıyla bazı yeni piperidin türevleri (4-Piperidin-1-il-asetofenon, 4- [4- (Piperidin-1-il) fenil] -2-aminotiyazol gibi) sentezlemişlerdir. Bileşiklerin enzim üzerinde inhibisyonu

gözlenmiş olup en iyi AChE inhibisyonunun % 73.07 ve % 59.26 inhibisyon oranlarıyla sırasıyla 1 μ M ve 0.1 μ M konsantrasyonlarda 3,4-dikloro-N- (4- (4- (piperidin-1-il) fenil) tiazol-2-il) benamid bileşiği tarafından olduğu bildirilmiştir(Levent vd., 2016).

Çalışmalarda hidrazonlar ve piperidin halkası içeren bileşikler, ilaç tasarımı faydalı substratlar olarak kabul edildiğinden bir çalışmada, etil 4-oksopiperidin-1-karboksilat ve 2,6-difenilpiperidin-4-on'dan türetilen yeni benzoil hidrazonların sentezlenmesi amaçlanmıştır. Sentezlenen bileşikler, antioksidan, antikolinesteraz ve antikanser aktiviteleri açısından incelenmiştir. Sentezlenen 19 bileşikten en yüksek antikolinesteraz aktivitesine sahip olan bileşiğin N'-(2,6-difenilpiperidin-4-il)-4 klorobenzohidrazid olduğu gözlemlenmiştir. Diğer bileşikler AChE enzimi için 50-100mM arasında BChE ise 50,00-155,57 μ M IC₅₀ değerlerine sahipken bu bileşiğin IC₅₀ değerleri sırasıyla 41,19 μ M ve 31,30 μ M olarak bulunmuştur. Ayrıca bileşiğin BChE enzimi için kullanılan standart galantaminden (BChE IC₅₀:46,03 μ M) daha iyi bir inhibitör olduğu da gözlemlenmiştir (Karaman vd., 2016).

Bu şekilde piperidin türevlerinin sentetik olarak sentezlendiği çalışmalar dışında bitkilerden izole edilen doğal bileşiklerden yeni piperidin türevi bileşiklerinin sentezi ve aktivitesinin incelenmesi gibi çalışmalarda mevcuttur. *Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn (*Leguminosae*) isimli baklagiller bitkisi çiçeklerinin etanol ekstraktından izole edilen spektalinden yeni piperidin alkaloidleri sentezlenmiştir (2R, 3R, 6S) -2-Metil-6- (13-oksoetradesil)-piperidin-3-il asetat hidroklorür ve tert-bütil (2R, 3R, 6S)-2-metil-6-(13-oksoetradesil)-piperidin-3-il karbonat hidroklorür bileşiklerinin rat beyni asetilkolinesterazını inhibe ederek, 7,32 ve 15,1 mM'lik IC₅₀ değerleri sergiledikleri ve sırasıyla rat beyni butirilkolinesteraza karşı 21 ve 9,5 kat daha az etkili oldukları görülmüştür. Bu yarı sentetik bileşiklerin, beyin asetilkolinesteraza karşı önemli bir seçicilikle in vivo kolinesteraz inhibitörleri olarak görev yapabileceği belirtilmiştir (Viegas vd., 2005).

Piperidin türevleri ile ilgili belirtilen enzimler üzerinde yapılan çalışmalar dikkate alındığında, yaptığımız literatür taraması sonucu çalışmamızda kullanılacak olan 1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon ve (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiklerinin AChE ve BChE enzimleri ile ilgili yapılan enzim kinetiği çalışmalarına rastlanamamıştır.

İlaç üretiminde önemli olan diğer bir özellikte kullanılacak bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olmalarıdır.

Farmasötik kimya alanında Çırdaklı tarafından bazı N-(4-Sübstitüebenziliden)-5-Fenil-1,3,4-Tiyadiazol-2-Amin Türevleri Üzerinde yapılmış, bileşiklerin S. aureus, P. aeruginosa, E. faecalis, E. coli 'ye karşı etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda piperidin ve piperizin türevi olan (N-(4-(4-benzilpiperazin-1-il)benziliden)-5-fenil-1,3,4-tiyadiazol-2-amin ve N-(4-(4-benzilpiperidin-1-il)benziliden)-5-fenil-1,3,4-tiyadiazol-2-amin) içinde bulunduğu bazı maddelerin diğerlerine göre yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Çırdaklı 2018).

Başka bir çalışmada 50 adet alkaloid yapısındaki piridin ve piperidin türevi indirgenme ürünleri sentezlenmiş antimikrobiyal aktivite çalışmalarında; en iyi aktiviteyi sırasıyla alkil bileşikler, metil sübstitüe, metoksi sübstitüe ve amino sübstitüe bileşiklerin gösterdiği belirlenmiştir. Tamamen indirgenmiş bileşiklerin, piperidin halkası ve aromatik halka fonksiyonel gruplarını içeren bileşiklerin daha yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip oldukları bildirilmiştir (İskender Yılmaz, 2012). Piperidin türevlerinin antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu çalışmalardan görülmektedir.

Piperidin bileşikler ile ilgili bulunan çalışmaların sonuçları yapılan çalışmamız ile karşılaştırılarak tartışma kısmında da ayrıca verilmiştir.

1.1.7. Çalışmanın Amacı

Alzheimer son zamanlarda çok yaygın olan bir demans hastalığıdır ve hastalığının kesin tedavisi yoktur. Günümüzde kullanılan tedavi yöntemleri hastalığın belirtilerini ortadan kaldırmaya yöneliktir. Bu amaca yönelik olarak Takrin ve Rivastigmin gibi kolin esteraz inhibitörleri genel olarak kullanılmaktadır fakat bunların yan etkileride oldukça fazladır. Piperidin yapısında bulunan donepezilde Alzheimer tedavisinde kullanılan klinik bir ilaçtır. Diğer ilaçlara göre daha seçici bir etkiye sahiptir ve merkezi sinir sistemindeki asetil kolin esterazlara yüksek oranda özgül olması ilacın önemli bir üstünlüğüdür. Diğer ilaçlarla karşılaştırıldığında donepezilin yan etkileri daha az görülmektedir ve bilişsel bozukluklarla beraber davranışsal belirtileride düzeltmektedir. Donepezil gibi birçok piperidin türevi farmakolojik olarak aktif bileşiklerin ve önemli ilaçların temel yapısını oluşturmaktadır. Azot atomu içeren heterosiklik bileşiklerin içerisinde piperidin yapıları ayrı bir öneme sahiptir. Birçok biyolojik ve medikal öneme sahip doğal ve doğal olmayan bileşiklerin yapısında piperidin iskeleti bulunur. İlaç endüstrisinde, lokal anestezikler, analjezikler, antimikrobiyal ilaçlar ve diğer farmasötik ürünlerin yapısında bulunurlar.

Yapılan çalışma ile piperidin yapısında olan (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon, (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon maddelerinin ve donepezilin AChE ve BChE enzimleri üzerinde kinetik çalışmaları yapılmış, IC₅₀, ki değerleri ve inhibisyon türleri belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca maddelerin 7 bakteri suşu üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışmadaki hedeflerimiz;

Kinetik çalışmalarla piperidin türevi bileşiklerin ve donepezilin asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi,

Kinetik çalışmalarla piperidin türevi bileşiklerin bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi,

Kinetik çalışmalar sonucu her bir madde için ayrı ayrı Michelis Menten grafikleri çizilerek IC₅₀ (Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) değerlerinin hesaplanması,

Kinetik çalışmalar sonucu her bir madde için Lineweaver burk grafikleri çizilerek, ki değerlerinin hesaplanması ve inhibisyon çeşitlerinin belirlenerek karşılaştırılması,

Piperidin türevi maddelerin farklı suşlar (*S.aureus* ATCC: 29213, *Klebsiella pneumoniae* BL 2003, *E.coli* 35218, *E.coli* 25922, *E. Feacalis* ATCC 29212, *P.aeruginosa* 27853, *P. Putida* BC1617 gibi) kullanılarak antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesidir.

Son konsantrasyonları 30mg/mL olacak şekilde hazırlanan etanol ve DMSO'da çözülmüş maddelerin 7 bakteri suşu üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Hazırlanan Hinton agarlı petrilere yüzey yayma metodu ile 100 µL konsantrasyonda bakteri süspansiyonları inoküle edilmiştir. Pozitif kontrol olarak Ampisilin/Sulbaktam ve basitrasin kullanılmıştır.

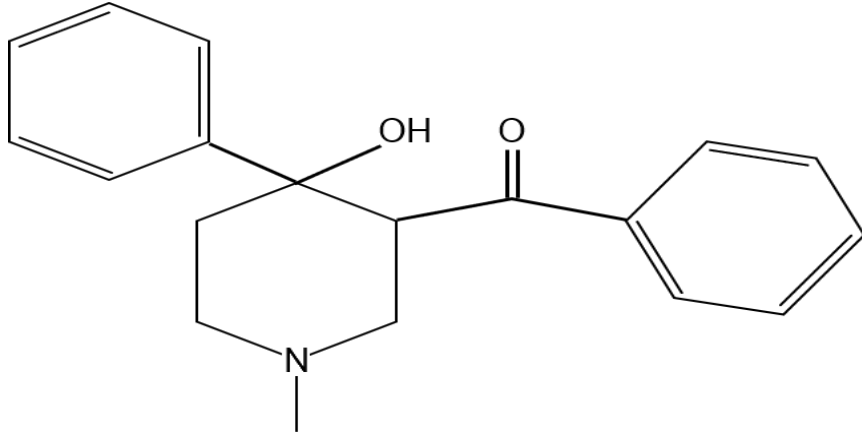
Literatürde çalışmamız için sentezi yapılmış olan (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon ve (1-etil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşikleri için asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerinde inhibisyon etkilerinin incelenmesiyle ilgili kinetik çalışmalara rastlanamamıştır. Aynı şekilde bu bileşikler için disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalara da rastlanamamıştır.

Çalışma sonuçları bütün olarak değerlendirildiğinde; antibakteriyel etkiye sahip olan, ve Alzheimer hastalığı üzerinde etkili olabilecek yeni piperidin türevi inhibitörler literatüre kazandırılmış olacaktır. Maddelerin antibakteriyel etkilerinde belirlenmesiyle elde edilecek sonuçlar farmokolojide hızla artan antibiyotik ve antibakteriyel direncin önlenmesine de yardımcı birer etken olacaktır.

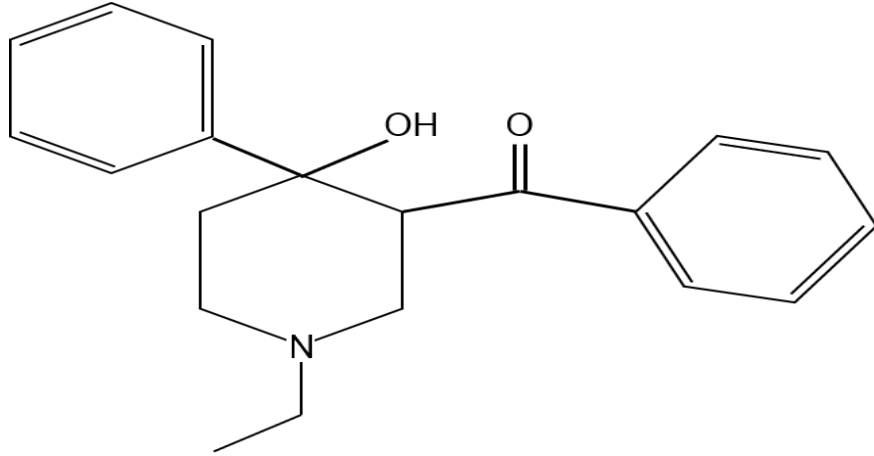
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Numunelerin Temini

Çalışmamızda kullanılan (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon ve (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşikleri Doç Dr. Ahmet Afşin Kaya tarafından sentezlenerek tarafımıza verilmiştir.



Şekil 2.1. (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon



Şekil 2.2. (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon

2.2. Test Bakterilerinin Temini

Çalışmamızda 7 standart mikroorganizma suşu kullanılmıştır. Standart suşlar OXOID ve Atatürk Üniversitesi kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Kullanılan bakteriler Tablo 2.1’de gösterilmektedir. Bakterilerin hassasiyetini belirleyebilmek ve kullanılan yöntemin kontrolü için Amphisilin/sulbactam ve Basitrasın standart antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

Tablo 2.1. Kullanılan bakteriler ve kodları

Bakteri	Bakteri Kodu
<i>S.aureus</i>	ATCC 29213
<i>E.faecalis</i>	29212 2STIK
<i>E.coli</i>	25922
<i>P.aeruginosa</i>	27853
<i>E.coli</i>	35218
<i>P.putida</i>	BC 1617
<i>Klebsiella pnemoniae</i>	BL 2003

2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analiz yapılırken kullanılan kimyasal malzemelerin tümü analitik saflıktadır. Asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, bütirilkolinyodür, asetilkolinyodür, Tris, HCl, Mueller Hinton agar, etanol gibi kimyasallar Sigma-Aldrich’den temin edildi.

2.4. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Gıda mühendisliği bölümünde tez için gerekli olan cihazlar mevcuttur.

Tablo 2.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Cihazın adı	Marka/Model
1) Hassas terazi	Ohaus
2) pH metre	İnoLab WTW

Tablo 2.2. (devamı)

3) Mikrobiyoloji kabini	Biosafety Cabinet
4) UV-VİS Spektrofotometre	WVR
5) Vorteks karıştırıcı	Labnet VX100
6) İnkübatör	Nüve
7) Magnetik Karıştırıcı	WiseStir

2.5. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda verilmiştir.

2.5.1. Asetilkolinesteraz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. 1 M'lık Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması: 30.27 g Tris alındı ve 5mM'lık 0.370 g EDTA 200 mL destile suda çözüldü pH metre kullanılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim 250 mL'ye destile su ile tamamlandı.

2. 10mM'lık Asetilkolin İyodat Çözeltilisinin Hazırlanması: 0.145 gr asetilkolin İyodat alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.

3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) Çözeltilisinin Hazırlanması: 0.01 g DTNB ve 0.5 g sodyum sitrat alındı 50 mL destile suda çözüldü.

2.5.2. Bütirilkolinesteraz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. 1 M'lık Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması: 30.27 g Tris alındı ve 5mM'lık 0.370 g EDTA 200 mL saf suda çözüldü, pH metre ile pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

2. 5mM'lık Bütirilkolin Kolin İyodat Çözeltilisinin Hazırlanması: 0.007 gr bütirilkolin kolin iyodat alınarak 50 mL saf suda çözüldü.

3. 0.35mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) Çözeltilisinin Hazırlanması: 0.0035 g DTNB alındı 25 mL saf suda çözüldü.

2.5.3. Antibakteriyel Aktivite Tayininde Kullanılan Besiyeri ve Bakteri Kùltürlerinin Hazırlanması

0.29 g Mueller-Hinton Agar (MHA) tartılarak 100 mL saf su içerisinde eritilip sterilizasyon amacıyla 121 °C’de 15 dakikalığına otoklava konuldu. Sonrasında steril pedri kaplarına aktarıldı. MHA agar üzerine saf bakteri kùltürlerinin ekimi yapıldı. Bakteri kùltürlerinin çoğalması amacıyla 37 °C’de 24 saat etüvde inkübe edildi.

2.6. Kolinesteraz Enzim Aktivitesi Tayini

2.6.1. Asetilkolinesteraz enzim aktivitesi

(1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon ve (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiklerinin asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla öncelikle saf asetilkolinesteraz enzimi hazır olarak temin edildi. Enzim, aktivitesinin korunacağı uygun tampon çözöcöde çözölerek partisyonlara ayrılarak buzdolabında uygun şartlarda saklandı.

Enzim aktivitesi yönteminin esası asetilkolinin kolinesterazlarla parçalanması sonucu oluşan tiyokolinin 5,5’ ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)le reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturması ve bu ürünün 412 nm’de absorbans göstermesi dayanır. (Ellman vd., 1961). Asetilkolinesteraz enzim aktivitesi ölçümünde DTNB ve asetilkolin iyodür substrat olarak kullanılırlar.

1 mL’lik küvet hacmi için; reaksiyon karışımındaki maddeler ve miktarları sırasıyla aşağıdaki tablodaki gibi uygulandı.

Tablo 2.3. Asetilkolinesteraz enzim aktivite tayin yöntemi için kullanılan küvet içeriğı ve miktarları

Kullanılan Maddeler	Numune Tüpü (µL)	Kontrol tüpü (µL)
Tris/HCl	100	100
Saf su	780	800
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	20	-
Asetilkolinyodür	50	50

2.6.2. Bütirilkolinesteraz Enzim Aktivitesi

(1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon ve (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiklerinin bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla öncelikle saf asetilkolinesteraz enzimi hazır olarak temin edildi. Enzim, aktivitesinin korunacağı uygun tampon çözücüde çözülerek partisyonlara ayrılarak buzdolabında uygun şartlarda saklandı.

Kolinesterazların katalizi ile asetilkolinin tiyokolin ve asetata parçalanma reaksiyonu sonucu açığa çıkan ürünün 412 nm’ de absorpsiyon göstermesiyle enzim aktivitesi ölçülmüş olur (Ellman vd., 1961).

Bütirilkolin Esteraz enzim aktivitesi ölçümünde DTNB ve bütirilkolin iyodür substrat olarak kullanıldı. 1 mL’lik küvet hacmi için; reaksiyon karışımındaki maddeler ve miktarları sırasıyla aşağıdaki tablodaki gibi uygulandı.

Tablo 2.4. Bütirilkolinesteraz enzim aktivitesi tayin yöntemi için kullanılacak küvet içeriği ve miktarları

Kullanılan Maddeler	Numune Tüpü (µL)	Kontrol tüpü (µL)
Sodyum fosfat(NaH_2PO_4)	100	100
Saf su	780	800
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	20	-
Bütirilkolinyodür	50	50

2.7. Kolinesteraz Enzimleri Üzerinde Yapılan Kinetik Çalışmalar

2.7.1. IC_{50} Değerlerinin Bulunması ile İlgili Çalışmalar

Her iki enzim içinde ayrı ayrı Tablo 2.3. ve 2.4.’deki gibi reaksiyon karışımları ayarlandıktan sonra 1 dakikada bir absorbans değeri okunarak ve 5 dakika sonunda 25°C’de 412 nm’de son absorbans değeri okunadı. Başlangıç ve son okunan değerler arasındaki fark kaydedildi. Bu işlemler her enzim ve her madde için 5 farklı inhibitör

konsantrasyonu tekrarlandı. İnhibisyon etkisi gösteren her molekül için aktivite (%)-[I] grafiği çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı (Ozturk Sarikaya 2015).

2.7.2. Ki Değerlerinin Bulunması ve İnhibisyon Türünün Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar

Piperidin türevi bileşiklerin ki değerlerini belirlemek amacıyla en az 5 değişik substrat ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Her inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafiği çizilerek, grafikten ki değerleri hesaplandı. Her madde için ayrı ayrı inhibisyon türleri belirlendi. Sonuçlar literatürlerle karşılaştırılarak yorumlandı (Ozturk Sarikaya 2015).

2.8. Antibakteriyel Aktivite Tayin Yöntemi

2.8.1. Disk Difüzyon Yöntemi

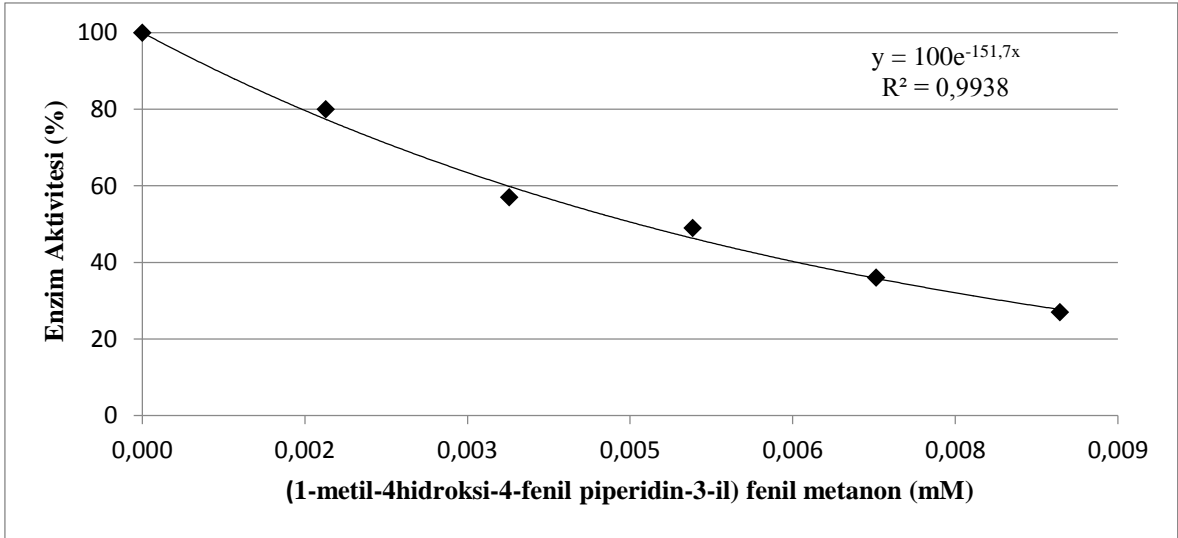
Piperidin türevi maddelerin antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı (Ayaz, 2008). Maddelerin son konsantrasyonları 30 mg/mL olacak şekilde etanol ve DMSO (dimetil sülfoksit)'da çözülerek hazırlandı. Hazırlanan Hinton agarlı petrilere yüzey yayma metodu ile 100 µL konsantrasyonda *S.aureus* ATCC: 29213, *K. pnemoniae* BL 2003, *E. coli* 35218, *E.coli* 25922, *E. feacalis* ATCC 29212, *P.aeruginosa* 27853, *P. Putida* BC1617 gibi bakteri süspansüyonları inoküle edildi. Ekim işlemi tamamlanan petrilere 15 dakika kadar bekletildi. Pozitif kontrol için hazırlanan antibiyotikli diskler ve maddelerin uygulanacağı boş diskler numaralandırıldı. Pozitif kontrol olarak Ampisilin/Sulbaktam ve basitrasin kullanıldı. Çözeltilerin uygulandığı disklerle nüfuzu için 10-15 dakika bekletilerek, petrilere düz bir şekilde 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı (Özkan, 2009). İnkübasyon sonrasında diskler etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları milimetrik cetvel ile ölçüldü (Ebrahimabadi vd., 2010).

3. BULGULAR

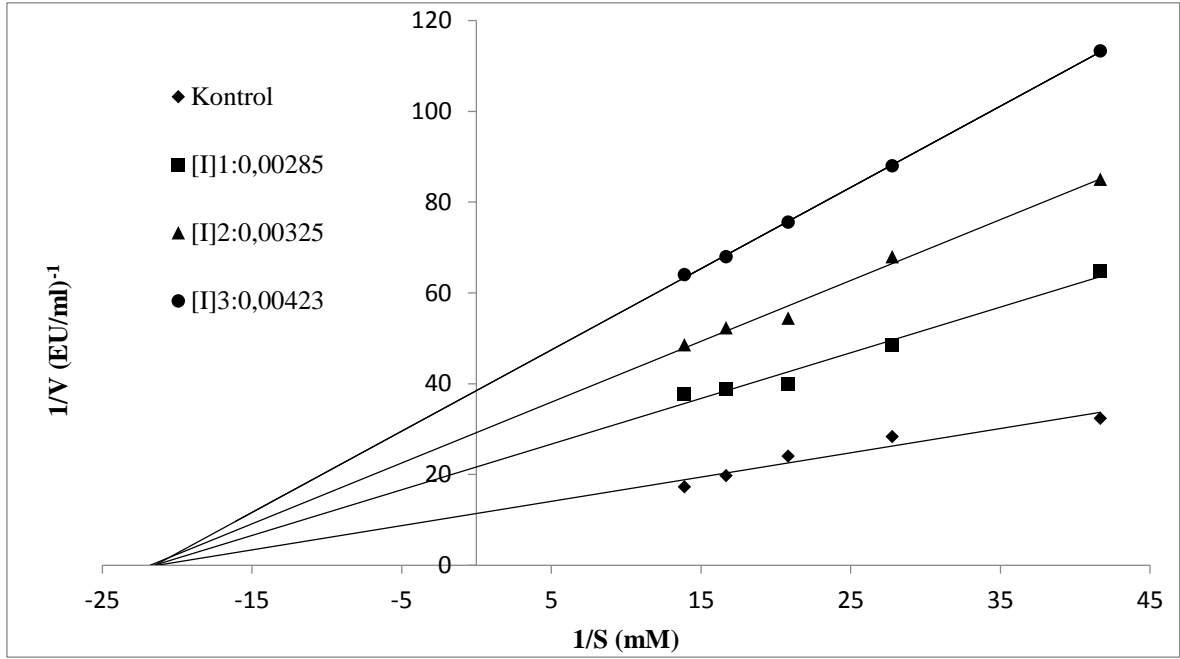
3.1. Kolinesteraz Enzimleri Üzerinde Yapılan Kinetik Çalışma Sonuçları

3.1.1. Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Piperidin Türevi Maddeler ile İlgili Sonuçlar

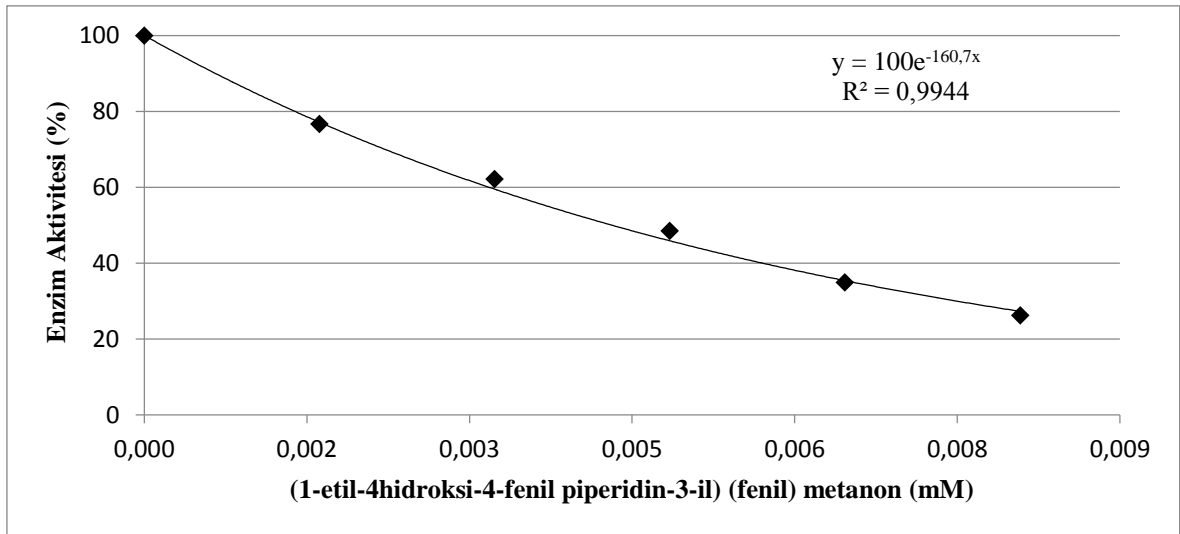
Asetilkolinesteraz enzimi için; doyun substrat konsantrasyonlarında piperidin türevi bileşiklerin inhibisyon etkileri incelendi. Ellman ve arkadaşları (1961) tarafından geliştirilen yöntemle ölçümler yapıldı. İnhibisyon görülen her molekül için Aktivite (%)-[I] ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden IC_{50} ve k_i değerleri hesaplandı.



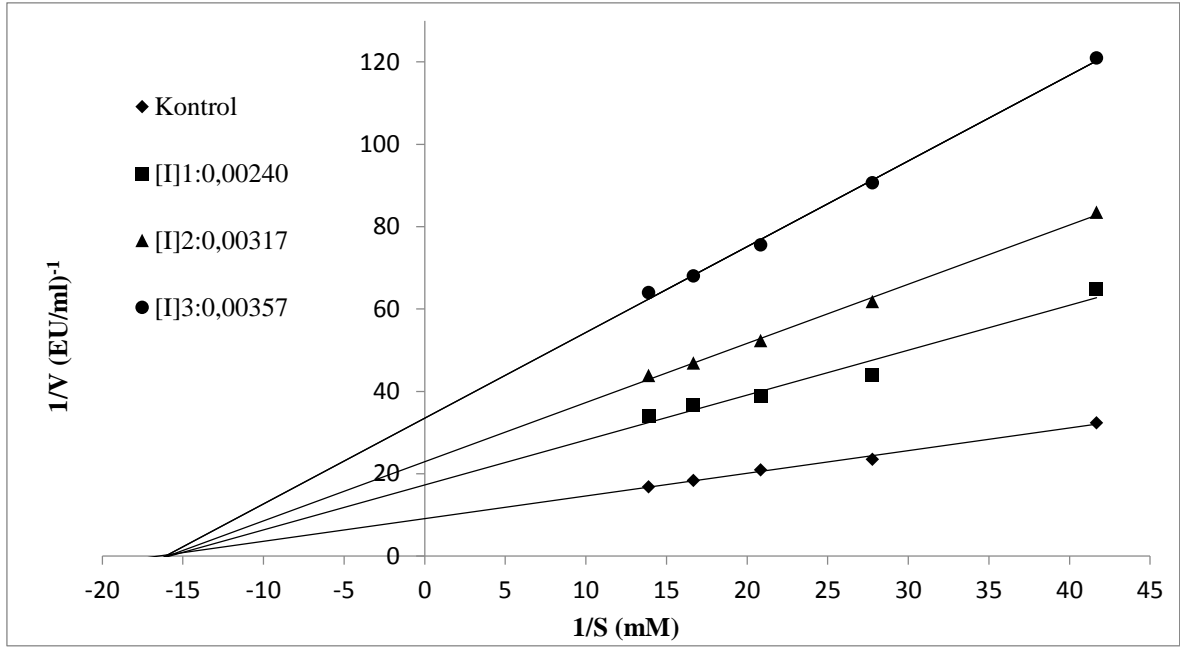
Şekil 3.1. (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı inhibitor konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[Konsantrasyon] grafiği



Şekil 3.2. (1-metil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.3. (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı inhibitor konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[Konsantrasyon] grafiği



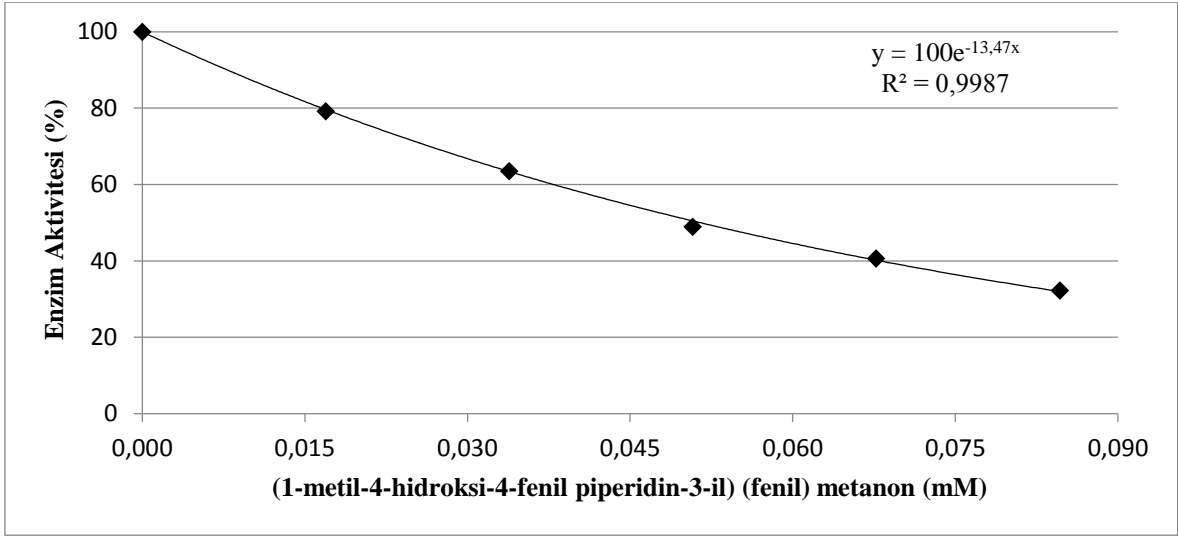
Şekil 3.4. (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 3.1. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin IC_{50} değerleri, k_i değerleri ve inhibisyon türleri

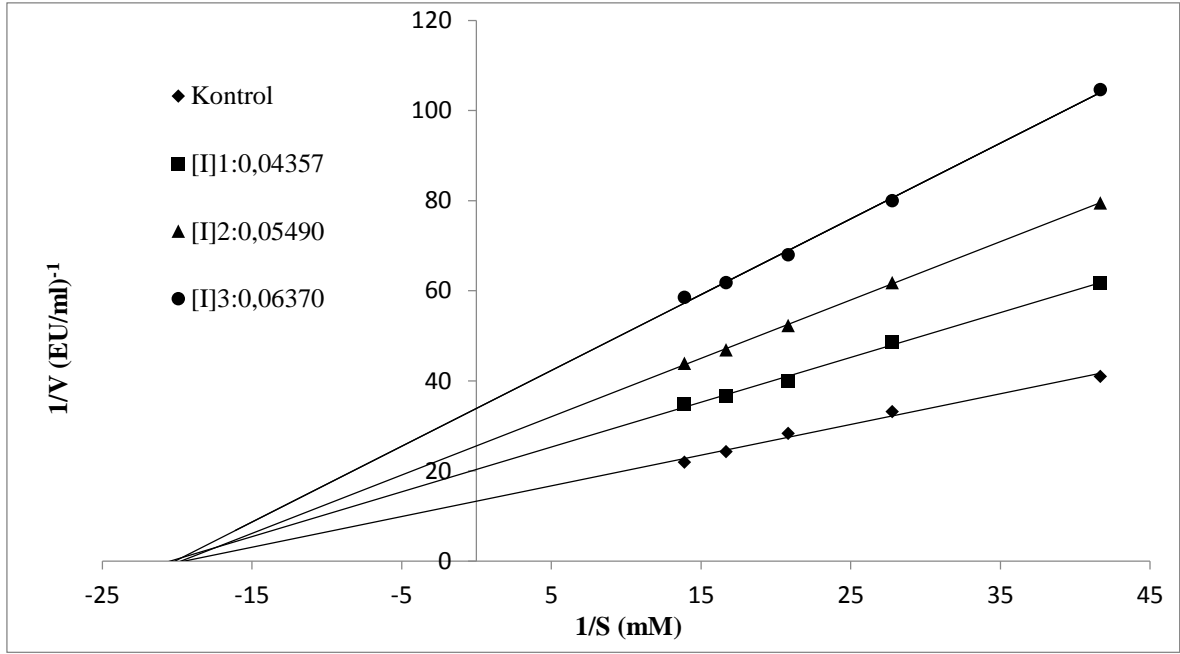
İnhibitör	IC_{50} (μ M)	k_i ortalama $\pm\sigma$	İnhibisyon türü
(1-metil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil) metanon	4.584	0.00344 \pm 0.00071	Yarışmasız
(1-etil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil) metanon	4.312	0.003047 \pm 0.00060	Yarışmasız

3.1.2. Bütirilkolinesteraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Piperidin Türevi Maddeler ile İlgili Sonuçlar

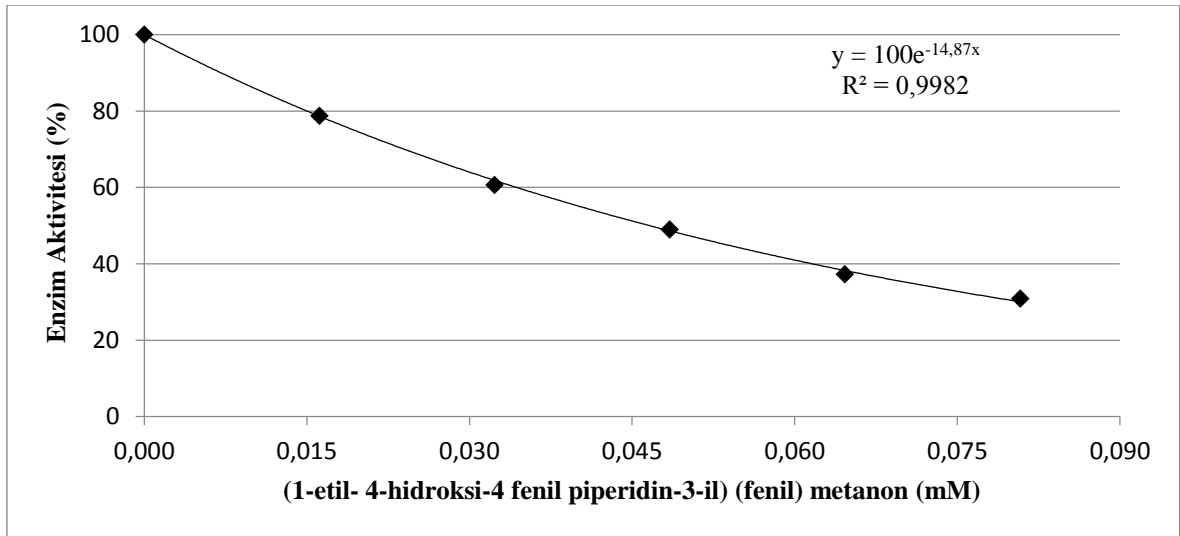
Bütirilkolinesteraz enzimi için; doygun substrat konsantrasyonlarında piperidin türevi bileşiklerin inhibisyon etkileri incelendi. Ellman ve arkadaşları (1961) tarafından geliştirilen yöntemle ölçümler yapıldı. İnhibisyon görülen her molekül için Aktivite (%)-[I] ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden IC₅₀ ve k_i değerleri hesaplandı.



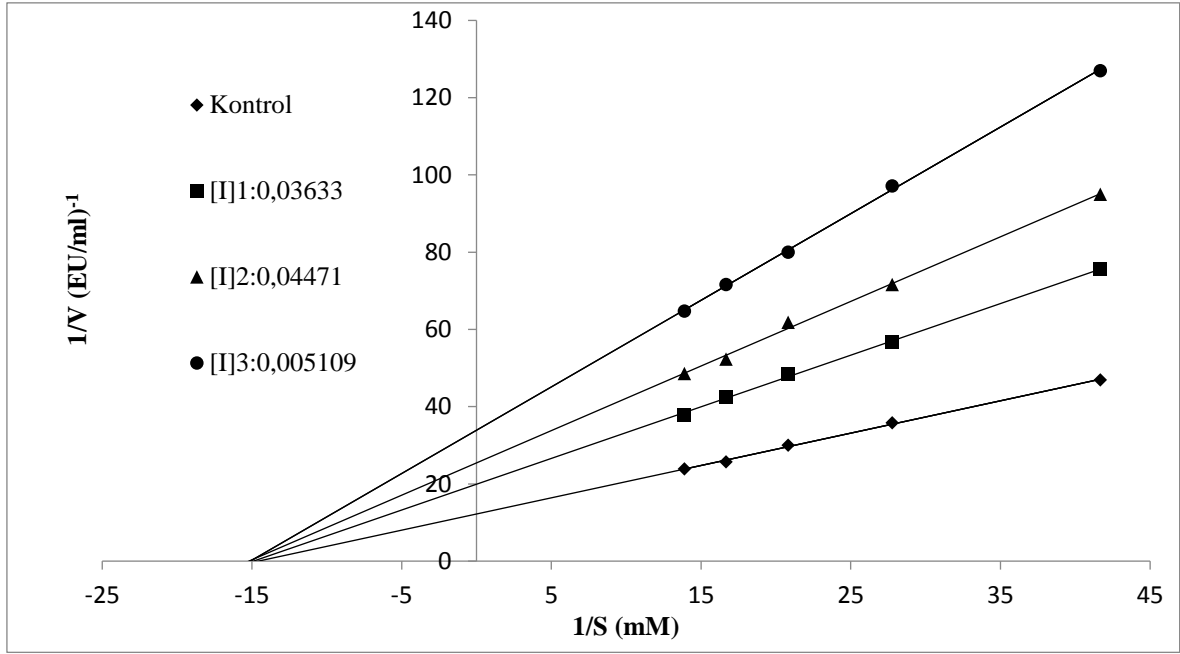
Şekil 3.5. (1-metil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin BChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı inhibitor konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[Konsantrasyon] grafiği



Şekil 3.6. (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin BChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.7. (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin BChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[Konsantrasyon] grafiği



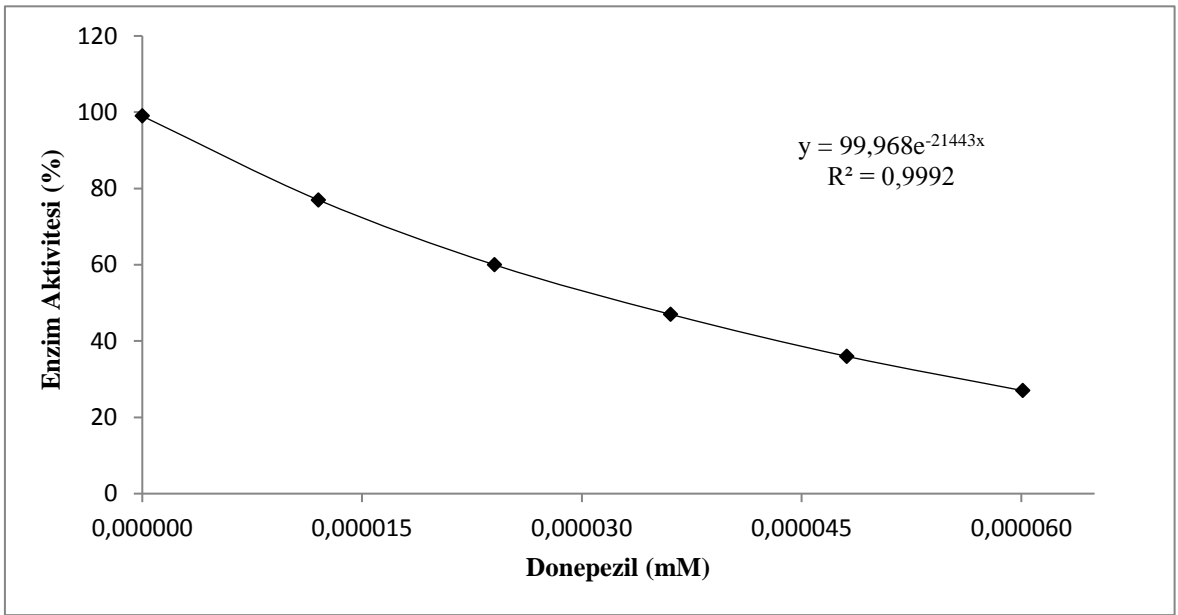
Şekil 3.8. (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiğinin BChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 3.2. Bütürlkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin IC_{50} değerleri, k_i değerleri ve inhibisyon türleri

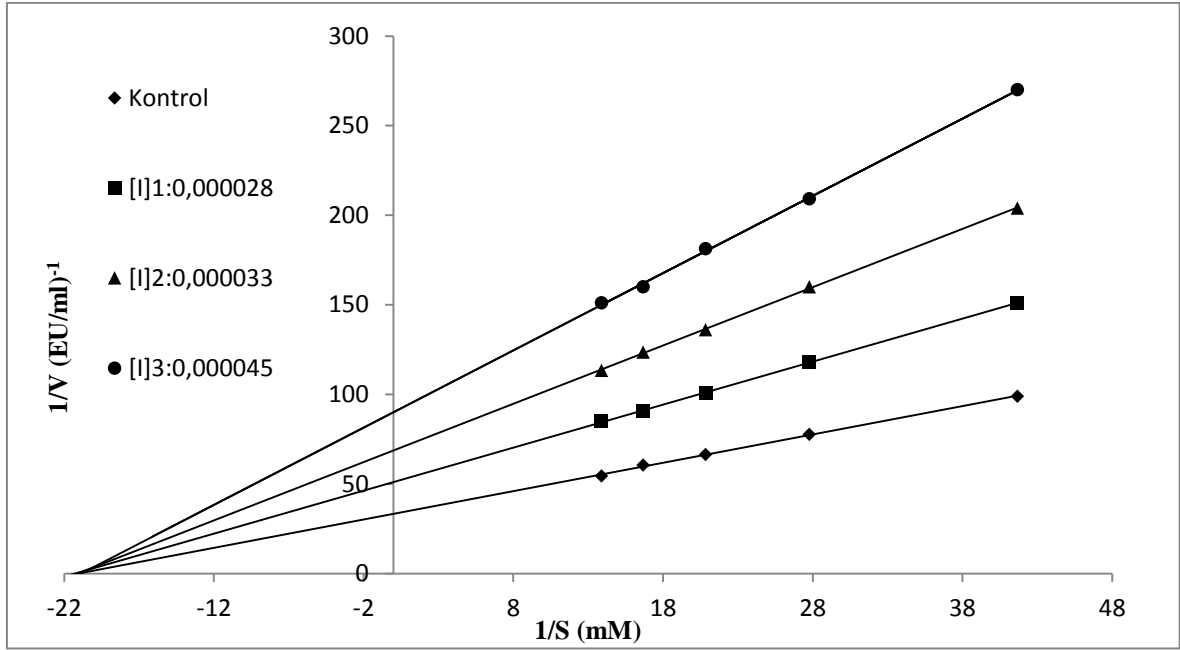
İnhibitör	IC_{50} (μ M)	k_i ortalama $\pm\sigma$	İnhibisyon türü
(1-metil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon	51.448	0.05406 \pm 0.01009	Yarışmasız
(1-etil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il) (fenil)metanon	47.968	0.04404 \pm 0.05109	Yarışmasız

3.1.3. Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Donepezil ile İlgili Sonuçlar

Asetilkolinesteraz enzimi için; doygun substrat konsantrasyonlarında donepezil standart maddesinin inhibisyon etkisi incelendi. Ellman ve arkadaşları (1961) tarafından geliştirilen yöntemle ölçümler yapıldı. İnhibisyon görülen standart madde için Aktivite (%)-[I] ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Çizilen grafiklerden IC₅₀ ve k_i değerleri hesaplandı.



Şekil 3.9. Donepezilin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı inhibitor konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[Konsantrasyon] grafiği



Şekil 3.10. Donepezilin AChE enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 3.3. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren donepezilin IC_{50} değeri, k_i değeri ve inhibisyon türü

İnhibitör	IC_{50} (μ M)	k_i ortalama $\pm\sigma$	İnhibisyon türü
Donepezil	0.032	0.00004 \pm 0.00000	Yarışmasız

3.2. Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

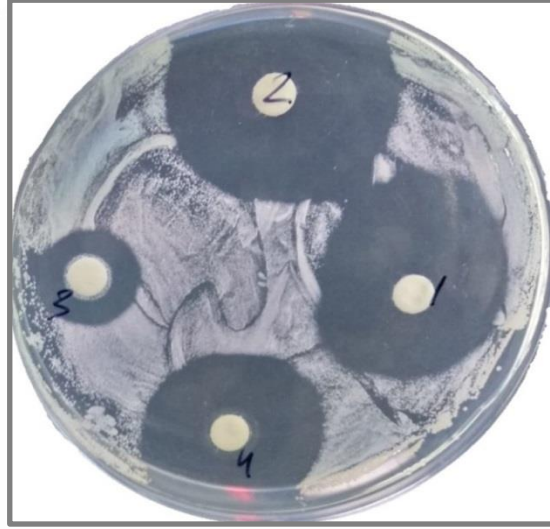
Son konsantrosyanları 30mg/mL olacak şekilde hazırlanan etanol ve DMSO'da çözülmüş maddelerin 7 bakteri suşu üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Pozitif kontrol olarak Ampisilin/Sulbaktam ve Basitrasin kullanıldı. Disklere maddeler ve antibiyotiklerden 100 μ L inoküle edildi.

Tablo 3.4. Etanolde ve DMSO’da çözünen (1-metil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin (30 mg/mL) ve pozitif kontrollerin (Ampisilin/Sulbaktam, Basitrasin) 7 bakteri suşuna karşı oluşturdıkları inhibisyon zon çapları

BAKTERİLER	İNHİBİSYON ZON ÇAPLARI (mm)			
	Madde (Etanol)	Madde (DMSO)	Ampisilin/sulbaktam	Basitrasin
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	32	30	23	25
<i>E. coli</i> 35218	29	24	9	(-)
<i>E. coli</i> 25922	26	19	17	18
<i>K.pneumoniae</i> BL 2003	21	13	9	(-)
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	20	17	21	22
<i>P.aeruginosa</i> 27853	18	9	18,5	21
<i>P. putida</i> BC1617	23	20	11	9

Tablo 3.5. Etanolde ve DMSO da çözünen (1-etil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin (30 mg/mL) ve pozitif kontrollerin (Ampisilin/Sulbaktam, Basitrasin) 7 bakteri suşuna karşı oluşturdıkları inhibisyon zon çapları

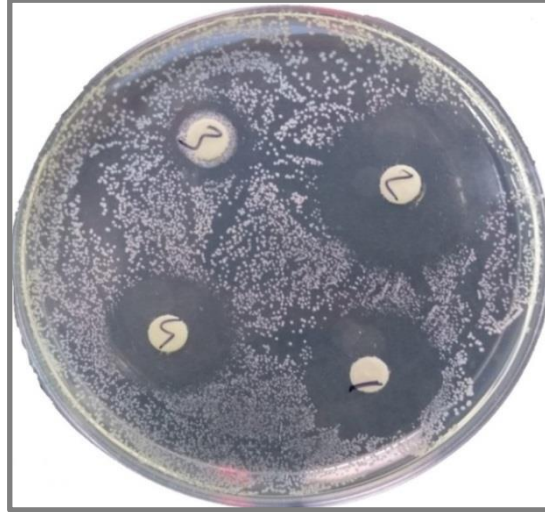
BAKTERİLER	İNHİBİSYON ZON ÇAPLARI (mm)			
	Madde (Etanol)	Madde (DMSO)	Ampisilin/sulbaktam	Basitrasin
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	32	17	23	25
<i>E. coli</i> 35218	25	16	9	(-)
<i>E. coli</i> 25922	21	10	17	18
<i>K.pneumoniae</i> BL 2003	19	-	9	(-)
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	21	-	21	22
<i>P.aeruginosa</i> 27853	14	-	18,5	21
<i>P. putida</i> BC1617	21	12	11	9



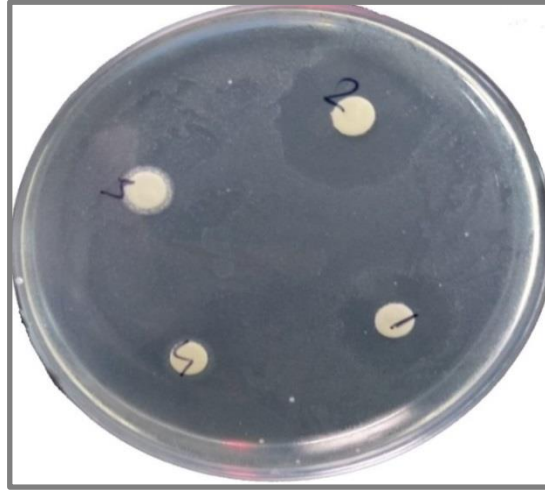
Şekil 3.11. Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği etanol (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) *S. aureus* ATCC 29213 üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları



Şekil 3.12. Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) *E. coli* 35218 üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları



Şekil 3.13. Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği etanol (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) *E. coli* 25922 suşu üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları



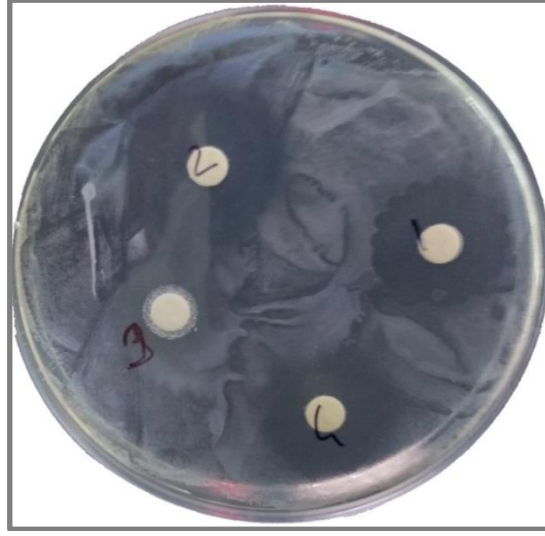
Şekil 3.14. Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği etanol (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) *Klebsiella pneumoniae* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları



Şekil 3.15. Disklere emdirilen maddelerin (A bileşigi etanol (1), B bileşigi etanol (2), A bileşigi DMSO (3) B bileşigi DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) *E. faecalis* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları



Şekil 3.16. Disklere emdirilen maddelerin (A bileşigi etanol (1), B bileşigi etanol (2), A bileşigi DMSO (3) B bileşigi DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) *P. aeruginosa* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları



Şekil 3.17. Disklere emdirilen maddelerin (A bileşiği etanol (1), B bileşiği etanol (2), A bileşiği DMSO (3) B bileşiği DMSO'da (4) çözülerek hazırlandı) *P. putida* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları

Yukarıdaki bileşikler A ve B olarak adlandırılmıştır **A:** (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon **B:** (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon

4. TARTIŞMA

Donepezil gibi birçok piperidin türevi farmakolojik olarak aktif bileşiklerin ve önemli ilaçların temel yapısını oluşturmaktadır. Azot atomu içeren heterosiklik bileşiklerin içerisinde piperidin yapıları ayrı bir öneme sahiptir. Birçok biyolojik ve medikal öneme sahip doğal ve doğal olmayan bileşiklerin yapısında piperidin iskeleti bulunur. Piperidinler bazı farmasötiklerin üretiminde ayrıca gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Çalışmamızda, sentezi yapılmış olan iki piperidin türevi etanol içerisinde çözülerek kullanılmıştır (1mg/mL). Her bir maddenin kolinesteraz enzim aktivitesi belirlenerek IC_{50} ve k_i değerleri bulunmuştur. Ayrıca bileşiklerin 7 farklı suş üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Maddelerin son konsantrasyonları 30 mg/mL olacak şekilde etanol ve DMSO'da çözülerek hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak Ampisilin/Sulbaktam ve basitrasin kullanılmıştır. Petrilere numune ve pozitif kontrollerden 100 μ L inoküle edilmiştir.

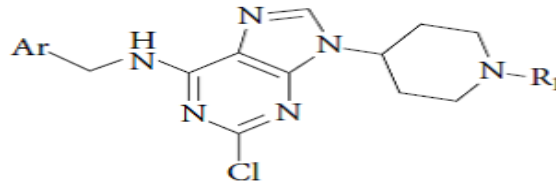
(1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon, (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiklerinin ve donepezil AChE ve BChE enzimleri için IC_{50} ve k_i değerleri Tablo 3.1., Tablo 3.2. ve Tablo 3.3. de verilmiştir. (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiği için IC_{50} değerleri (IC_{50} AChE: 4.584 μ M; IC_{50} BChE: 51.448 μ M) ve k_i değerleri (k_i AChE: 0.00344 \pm 0.00071; k_i BChE: 0.05406 \pm 0.01009) olarak hesaplanmıştır. (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiği için IC_{50} değerleri (IC_{50} AChE: 4.312 μ M; IC_{50} BChE: 47.968 μ M) ve k_i değerleri (k_i AChE: 0.003047 \pm 0.00060; k_i BChE: 0.04404 \pm 0.05109) olarak; donepezilin ise IC_{50} değeri (AChE: 0.032 μ M) ve k_i değeri (AChE: 0.00004 \pm 0.00000) olarak hesaplanmıştır. Bileşiklerin inhibisyon türleri yarışmasız olarak belirlenmiştir.

Piperidin türevleri ile ilgili olarak farklı bileşiklerin sentezlendiği bir çalışmada, bu bileşiklerin AChE ve BChE enzimleri üzerindeki etkileride incelenmiştir. N-benzilpiperidin türevlerinin (IC_{50} : 20-42 μ M) AChE'yi N-benzilpirolidin olanlardan daha iyi inhibe ettiği belirlenmiştir.

Ancak bu türlerin BChE üzerinde etkili olmadığı gözlemlenmiştir. 1-benzil-4 - [(ksantin-8-il) -metoksimetil] - piperidin türevleri ise çok daha iyi AChE inhibisyonu sergilemiştir (IC_{50} : 0.75 -1.0 μ M). Bu türevler ayrıca BChE'yi de inhibe ettiğinden (IC_{50} = 0.4–2.5 μ M), Alzheimer hastalığı için yeni tedavilerin araştırılmasında ilginç ikili

inhibitörler olarak düşünülmüştürler (Rodríguez-Franco vd., 2005).

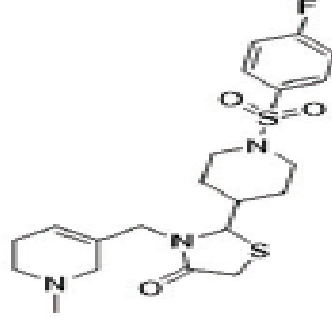
Kang ve arkadaşlarının 2013 de yapmış oldukları bir çalışmada yeni bir 9-(1-(sübsitüe-benzil)piperidin-4-il)-2-kloro-9H-purin-6-amin türevleri serisi tasarlanarak sentezlenmiş (Şekil 4.1.) ve bunların AChE inhibe edici aktiviteleri incelenmiştir.



Şekil 4.1. Sentezlenen 9-(1-(sübsitüe-benzil)piperidin-4-il)-2-kloro-9H-purin-6-amin türevleri için genel kimyasal yapı (Kang vd. 2013)

Bu sonuçlara göre 26 bileşikten genel yapıda aril grubu olarak 3,4-dimetoksifenil bağlı 13 bileşikten 100µM konsantrasyonda R grubuna benzil (%14.57) ve 3-klorobenzil (%11,03) grupları bağlı olan bileşiklerin diğerlerine göre daha yüksek inhibisyon yüzdelere sahip olduğu görülmüştür. Aril grubu olarak benzo[d][1,3] dioksol-5-il bağlı 13 bileşikten ise R grubuna 3-siyanobenzil (%15.42) ve 4-metoksibenzil (%11.21) bağlı bileşiklerin diğerlerine göre daha iyi inhibisyon etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada standart olarak kullanılan donepezil ise aynı konsantrasyonda %80.07 inhibisyon etkisi göstermiştir. Çalışmada bu dört bileşiğin, 100 µM konsantrasyonda % 10'dan fazla inhibitör yüzdesi ile AChE'ye karşı orta düzeyde aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Kang vd. 2013).

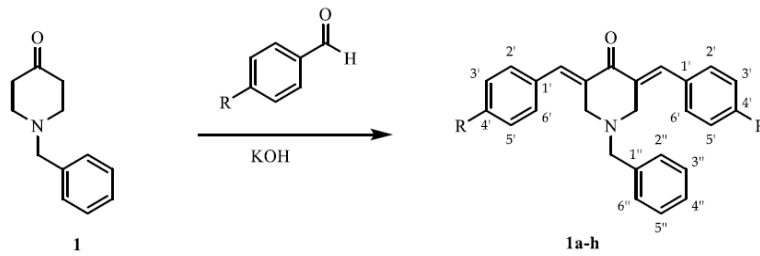
Bir başka çalışmada sentezlenen 18 piperidin türevinin (Şekil 4.2.) asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Asetilkolinesteraz enzimi için IC₅₀ değerlerinin (6.62-41.28 µM) bütirilkolinesteraz enzimi için ise (13.78-53.36 µM) arasında değiştiği gözlemlenmiştir. 2-(1-((4-florofenil) sülfonil)piperidin-4-il) -3 - ((1-metil-1,2,5,6-tetrahidropiridin-3-il) metil) tiazolidin-4-on bileşiğinin her iki enzim üzerinde en etkin inhibitör olduğu görülmüştür (IC₅₀AChE:6.62±0.41; IC₅₀BChE: 13.78±0.48). Standart olarak kullanılan neostigminin IC₅₀ değerleri ise sırasıyla AChE için 2.05 ±0.07 BChE için ise 3.64 ±0.19 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2. 2-(1-((4-florofenil) sülfonil)piperidin-4-il)-3 - ((1-metil-1,2,5,6-tetrahidropiridin-3-il) metil) tiazolidin-4-on bileşiği kimyasal yapısı (Kumar vd. 2015)

Bu bileşik diğer bileşiklerle ve standartla kıyaslandığında benzen sülfonil grubunun para pozisyonunda bulunan flor atomunun, kolinesteraz aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir. Aksine benzil bağlı bileşikler, benzen sülfonil ve benzoil türevleri ile karşılaştırıldığında hem AChE hem de BChE inhibisyonuna karşı zayıf aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu durumun, piperidin ve aril substitüsyonu arasında karbonil veya sülfonil grubunun varlığının AChE / BChE inhibisyonunda önemli bir rol oynadığını gösterdiğide ayrıca belirtilmiştir. Çalışmada bileşiğe bağlı olan aril sülfonil / benzoil grubuna sahip bileşikler arasında, farklı bileşikler, fenil halkasına bağlı atomlara / gruplara bağlı olarak farklı aktivite aralığı sergilemişlerdir (Kumar vd. 2015).

Bazı piperidinonların sentezi ve kolinesteraz enzimlerini belirlemek amacıyla yapılan 8 bileşiğin sentezlendiği (Şekil 4.3.) başka bir çalışmada ise galantamin ve rivastigmin standart olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Piperidinonların sentez reaksiyonu (Parlar, 2019)

Çalışmada metil, metoksi, nitro, flor, klor, metil, nitrit ve brom gibi farklı gruplar, her iki benziliden halkasının para pozisyonlarına takılarak sentezlenmiştir. Tüm bileşiklerin AChE sonuçlarına göre 12.55-23.75 μ M, BChE sonuçlarına göre 17.28-59.96 μ M aralığında inhibe edici aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. R grubu olarak nitro grubu taşıyan bileşiğin standart ilaç rivastigminine ($IC_{50} = 10.87 \mu$ M) kıyasla 12.55 μ M'lik bir IC_{50} değeriyle en yüksek aktivite gösterdiği ve ayrıca AChE için BChE'ye göre en yüksek seçiciliği sergilediği görülmüştür. R grubuna klor bağlı bileşik ise , ikili bir inhibisyonla en iyi anti-BChE aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir ($IC_{50 \text{ BChE}} = 17.28 \mu$ M, $IC_{50 \text{ AChE}} = 18.04 \mu$ M). Verilere dayanarak, benzil kısımları üzerinde para pozisyonlara farklı grupların bağlanmasıyla hem AChE hem de BChE enzim inhibisyonunda daha iyi sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Ancak çalışmada inhibitör potansiyelleri ile grupların elektron çekme veya itme kuvvetleri arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır (Parlar 2019).

Levent 2016 ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada donepezil molekülünün , asetilkolin estera inhibitörü olarak görev yaptığı ve bu nedenle, antikolinesteraz aktivitesini değerlendirmek için piperidin bileşiklerinin sentezinin, tıbbi kimyada çok popüler bir alan olduğunu belirtmiş ve bu nedenle, olası asetilkolinesteraz etkilerini gözlemlemek için bazı yeni piperidin türevleri sentezlemişlerdir. 4-(piperidin 1-il) grubunun ortak olarak bulunduğu farklı 5 bileşiğin inhibisyon oranlarının 1 ve 0.1 μ M konsantrasyonlarında sırasıyla % 26.14-73,07 ve % 9.42- 59.26 aralıklarında olduğu belirlenmiştir. Dizide 4-dikloro-N-(4-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benzamide bileşiğinin, 1 μ M ve 0.1 μ M konsantrasyonlarında % 73.07 ve % 59.26 inhibisyon oranları ile AChE'ye karşı en aktif türev olarak bulunmuştur.

Piperidin ve piperazin bileşiklerinin sentezlendiği bir çalışmada 3-((4-benzilpiperidin-1-il)(fenil)metil)-4-hidroksi-2H-kromen-2-on bileşiği için 32mM konsantrasyonda AChE inhibisyonu %29.0 BChE inhibisyonu %12.2 iken; 3-((4-benzil piperidin-1-il)metil)-4-hidroksi-2H kromen-2-on bileşiği için sırasıyla % 33.7 ve %9.0; 4-hidroksi-3-(piperidin-1-ilmetil)-2H-kromen-2-on bileşiği için sırasıyla %6.7 ve %17.7 olarak bulunmuştur. Çalışmada piperidin kısmına benzil grubunun eklenmesi ile AChE inhibitör aktivitesinde önemli bir artış olduğu gözlenmiştir Ancak BChE için tüm bileşikler daha zayıf inhibitör etkisi gösterirken piperidinler içinde en yüksek 4-hidroksi-3-

(piperidin-1-ilmetil)-2H-kromen-2-on bileşiğinin inhibisyonu en yüksektir (Kiani vd.2019).

Başka bir çalışmada ise bir dizi yeni sentezlenen N-alkil-N- (piperidin-1-il) benzensülfonamid ve N-aril / alkil ikameli-2 [(fenilsülfonil) (piperidin-1-il) amino] asetamid bileşiklerinin AChE ve BChE enzimleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bileşikler için AChE ve BChE enzimleri üzerinde IC_{50} değer aralıkları sırasıyla 19.11-399.11 μ M; 4.21-137.24 μ M olarak bulunmuştur. Bileşiklerden N-alil-N-(piperidin-1-il) benzensülfonamid (IC_{50} BChE: 4.4 ± 0.03 μ mol/L) ve N-benzil-N-(piperidin-1-il) benzensülfonamid (IC_{50} BChE: 4.21 ± 0.11 μ mol/L) bileşiklerinin bütirilkolinesteraz enzimine karşı çok yüksek bir IC_{50} değerine sahip oldukları görülmüştür. AChE enzimi üzerinde ise asetamid bağlı bileşikler içerisinde N- (2,6-dimetilfenil)-2-[(fenilsülfonil) (piperidin-1-il) amino] asetamid (19.11 ± 0.32) ve benzensülfonamid bağlı bileşiklerden ise N-alil-N- (piperidin-1 il) benzensülfonamid bileşiğinin (23.21 ± 0.17 μ mol/L en yüksek IC_{50} değerine sahip oldukları görülmüştür. Bu yükseklikler muhtemelen allil ve benzil gruplarının N-ikamesinden kaynaklanmaktadır (Khalid ve Rehman 2012).

Yukarıda belirtilen piperidin türevleri ile ilgili çalışmalarda bulunan sonuçlar ile çalışmamızda bulunan değerlerin benzer aralıklarda olduğu görülmektedir. Kiani ve arkadaşlarının 2019'da yaptıkları çalışmada piperidin kısmına benzil grubunun eklenmesi ile AChE inhibitör aktivitesinde önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Ancak BChE için tüm bileşikler daha zayıf inhibitör etkisi göstermiştir. Yine yukarıda belirtildiği üzere Khalid ve Rehman 2012 de yaptıkları çalışmada ve benzeri çalışmalarda benzil gruplarının inhibitor aktivitesi arttırıcı yönde etki gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmamızdaki bileşiklerinde piperidin halkasında para pozisyonunda bulunan OH ve bu halkaya bağlı olan 2 ayrı fenil gruplarının özellikle AChE üzerinde inhibitör aktivite etkisini arttırdığı düşünülmektedir.

Çalışmalardan donepezilin çok iyi bir asetilkolinesteraz enzim inhibitörü olduğu bilinmektedir. Donepezilin standart olarak kullanıldığı çalışmalar incelendiğinde IC_{50} değerleri 0.058 ± 0.002 μ M, 0.029 ± 0.002 , 6.31 ± 0.09 μ M gibi değerler bulunduğu görülmüştür (Mohsen, 2012; Li vd.,2013; Islam vd., 2019) . Piperidin türevleri ile ilgili yapılan bir çalışmada ise standart olarak kullanılan donepezilin bileşiklerle aynı konsantrasyonda %80,07 inhibisyon etkisi gösterdiği gözlenmiş, çalışmada kullanılan dört bileşiğin, 100 μ M konsantrasyonda % 10'dan fazla inhibitör yüzdesi ile AChE'ye karşı orta

düzye de aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Kang vd. 2013). Kiani ve arkadaşlarının 2019’da yaptığı bir çalışmada ise asetilkolinesteraz enzimini donepezilin %100 inhibe ederken kullanılan bileşiklerin %6.7-%33 arasında inhibe ettikleri gözlenmiştir. Bu çalışmalarda anlaşılacağı gibi piperidin türevleri ile yapılan çalışmalarda standart donepezilin etkisi çok daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda IC₅₀ değeri 0.032 mM olarak belirlenen donepezilin yapılan çalışmalarla benzer değere sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalara ve çalışmamıza bakıldığında hem AChE’ı hem BChE’ı seçicilik göstermeden inhibe eden bileşiklerin varlığı, çalışmamızda kullanılan bileşiklerin inhibisyon düzeylerinin diğer çalışmalarla kıyaslandığında iyi bir değere sahip oluşu ve piperidin türevi maddelerin farmakolojide birçok ilaç için kullanıldığı gibi nedenlerden dolayı çalışma sonuçları oldukça önemlidir.

Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde bileşiklerin AChE enzimi üzerindeki etkisinin çok daha iyi olduğu gözlemlenmiş ve bileşiklerin iyi bir AChE inhibitörü olduğu görülmüştür. Bununla birlikte bileşiklerin BChE enziminide inhibe etmelerinde ikili enzim inhibitörleri olarak görev yaptıklarından Alzheimer hastalığı açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Antibakteriyel aktiviteye sahip etken maddeler geçmişten bugüne hem alternatif tıpta hemde ilaç endüstrisinde hastalıkların iyileşmesi amaçlı kullanılmaktadır. Doğal veya sentetik bileşiklerin ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelere sahip olmaları; alternatif tıpta, eczacılıkta, kozmetikte, besinlerin korunması gibi birçok alanda önemi büyüktür. Bu nedenle geçmişten bugüne birçok madde sentezlenmiş ve antibakteriyel etkileri araştırılmış ve halen araştırılmaya devam edilmektedir.

Dang ve arkadaşlarının 2007 yılında yeni piperidin türevlerinin sentezlendiği bir çalışmada bileşiklerin çoğunun, bazı bakteri türlerine karşı (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi) yüksek *in vitro* antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 4-metilamino-3-metiloksim piperidin türevinin, gram-pozitif ve gram-negatif organizmalara karşı en güçlü antibakteriyel aktiviteyi sahip olduğu gözlemlenmiştir. Gram-pozitif bakteriler için, 4- amino-3-alkiloksim piperidin serisi (Q₁) ve 3- amino-4-alkiloksim piperidin serisi (Q₂) aktiviteleri arasında önemli bir fark olmadığı; ancak Gram-negatif bakteriler için Q₁ serisinin, Q₂ serisinden daha iyi aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

Bunun sonucu olarak amin kısmının alkil grubunun boyutunun, antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde önemli olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte bağlı metil grubunun optimal görüldüğü ancak metilamine başka bir metil grubunun eklenmesi veya metilin bir siklopropil grubu ile değiştirilmesi ile antibakteriyel aktivitenin azalmasına neden olduğu düşünülmüştür.

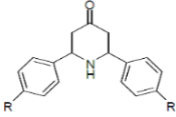
Sentezlenen 2,6-diarlypiperidin-asetil türevlerinin antibakteriyel aktivitelerinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmada ise MIC testi uygulanmış, Linezolid ve Trovafloksasin ilaçları pozitif kontrol olarak kullanılırken, DMSO negatif olarak kullanılmıştır. Test bileşikleri en fazla 128 µg / mL'lik konsantrasyona kadar hazırlanmıştır. Bileşiklerin birkaçının *Staphylococcus aureus*'a, *Enterococcus faecalis*'e ve *Enterococcus faecium*'a karşı en düşük MIC₉₀ değeri gösterdikleri ve en iyi şekilde inhibe ettikleri gözlemlenmiştir (16 µg / mL). (Aridoss vd.2008)

Başka bir çalışmada; altı yeni piperidin türevi için, sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri agar disk difüzyonu kullanılarak değerlendirildi. Etil 1- (4-metil-3- (triflorometil) fenil) -4- (4-metil-3- (triflorometil) fenilamino)-2,6-di (piridin-3-il) -1,2,5, 6-tetrahidro piridin-3-karboksilat bileşiği en az antibakteriyel aktivite gösterdi. Metil 2,6-bis (4-siyanofenil) -1-p-tolil-4- (p-tolilamino) -1,2,5,6-tetrahidropiridin-3-karboksilat bileşiğinin, *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aurenginosa*, *Kl pneumoniae* ve *M. luteus* 'a karşı büyük inhibisyon etkileri ortaya çıkaran en güçlü inhibe edici aktivite (≥ 6 mm inhibisyon zon çapı) ve *B. subtilis*'a karşı 0.75 mg / ml ve *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aurenginosa*, *Kl pneumoniae* ve *M. luteus*'a karşı 1.5 mg/ ml'lik en iyi minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) sonuçlarını sergiledi. Piperidin halkası üzerinde hem elektron veren hem de elektron çeken grupların antibakteriyel aktiviteyi arttırdığı belirtilmiştir (Naicker vd.2015).

Ravindernath ve Reddy (2013), fenil halkasında hidroksi, metil ve nitro ikameleri içeren piperidin türevlerinin, test edilen bakteri türlerine karşı yüksek antibakteriyel potansiyele neden olan önemli bir inhibisyonu ortaya çıkardığını belirtmişlerdir. Bu durumunda çalışmada en yüksek antibakteriyel aktiviteyi sergilemesinin nedeni olarak söylenilebileceği bildirilmiştir (Ravindernath ve Reddy 2015). 1-(4-[(5-ikameli-1,3,4-oksadiazol-2-il)tiyo]metil}benzensülfonil)-4-metilpiperidin türevleri sentezlenerek antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin çoğu, hemen hemen tüm türlere karşı (*S. typhi* (-), *E. coli* (-), *P. aeruginosa* (-), *B. subtilis* (+) ve *S. aureus* (+))

değerli sonuçlar göstermiştir. Bileşikler içerisinde özellikle fenil bağlı 1- (4 - {[5-Fenil-1,3,4-oksadiazol-2-il) tiyo] metil} benzensülfonil) -4-metilpiperidin bileşiğinin *P. aeruginosa* (-) dışındaki tüm suşlara karşı etkili inhibitör olduğu gözlenmiştir. Yine 1- [4 - {[5- (2,4-Diklorofenil) -1,3,4-oksadiazol-2-il) tiyo} metil) benzensülfonil] -4-metilpiperidinbileşiği (6h), siprofloksasine göre 10.27 ± 0.68 , 10.37 ± 0.17 ve 10.76 ± 0.10 $\mu\text{mol} / \text{L}$ MIC değerleri ile *S. typhi* (-), *B. subtilis* (+) ve *S. aureus* (+) 'a karşı mükemmel inhibisyon potansiyeli sergilemişlerdir. Bileşiğin bakterilere karşı sırasıyla $7,83 \pm 0,78$, $7,22 \pm 0,67$ ve $7,00 \pm 1,54$ $\mu\text{mol} / \mu\text{g}$ MIC değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu molekülün daha iyi aktiviteye sahip olması durumunu, biyoaktif oksadiazol halkasına bağlı diklorofenil halkasının varlığına bağlanılabileceği bildirilmiştir (Rehman vd. 2017).

Pandey ve Chawla 2012 yaptığı çalışmasında 2,6-disüstitüe piperidin-4-on türevleri (4a-j) (Şekil 4.4) sentezlenerek, sentezlenen bileşiklerin antibakteriyel aktivitesi, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (Gram-pozitif) ve *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negatif) olmak üzere dört farklı bakteri suşuna karşı agar difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

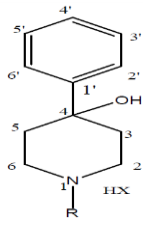
			
Bileşik kod numarası	R grubu	Bileşik kod numarası	R grubu
4a	4-Cl	4f	N(CH ₃) ₂
4b	4-OCH ₃	4g	3-NO ₂
4c	4-F	4h	2-NO ₂
4d	3-OC ₂ H ₅ , 4-OH	4i	3-Cl
4e	3-OCH ₃ , 4-OH	4j	2-Ar

Şekil 4.4. 2,6-disüstitüe piperidin-4-on bileşiği genel yapısı ve bileşik kod numaraları ve R grupları (Pandey ve Chawla 2012)

Çalışmada test bileşiklerinin hem gram pozitif hem de gram negatif organizmalara karşı aktif olduğu bulunmuştur. Bu bileşikler arasında (10-100µg/ml) tüm bakteriler için zon çapları (mm) en fazla bulunan 4a, 4b, 4d, 4e, 4f ve 4g (Şekil 4.4.) bileşiklerinin güçlü anti bakteriyel maddeler olduğu gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda piperidin türevlerinin gram pozitif ve gram negatif dahil olmak üzere bir dizi bakteri suşuna karşı güçlü antibakteriyel yanıt oluşturdıkları ve güçlü antibiyotikler olduğu kanıtlanmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada 6 farklı 4-Hidroksi-4-fenil piperidin türevi sentezlenerek antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus saprophyticus* gram pozitif bakterilerine karşı düşük zon çapları (4-5 mm) elde edilmiş 1- (1 ''- Etil fitalamid)-4-fenil-4-hidroksi piperidinyum hidrobromür bileşiği için (VI) ise daha yüksek zon çapları (14-16mm) elde edilmiş ve iyi antibakteriyel etki gösterdiği görülmüştür (Rafig vd., 2013).

		
Bileşik kod numarası	R grubu	X
II	OC ₉ H ₁₁	Br
III	O ₂ C ₅ H ₅ N ₂	Cl
IV	OC ₁₂ H ₁₇	Br
V	OC ₈ H ₇	Cl
VI	O ₂ C ₁₀ H ₈ N	Br

Şekil 4.5. 4-Hidroksi-4-fenil piperidin türevi bileşikleri R ve X grupları (Rafig vd., 2013)

(1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon ve (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiklerinin disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivitelerini belirlemek amaçlı yaptığımız çalışmada etanolde çözünen (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin bakteri suşları üzerindeki etkisi zon çapları büyüklüklerine göre; *S. aureus*_{ATCC 29213} (32) > *E. coli*₃₅₂₁₈ (29) > *E. coli*₂₅₉₂₂ (26) > *P. putida*_{BC1617} (23) > *K. pneumoniae*_{BL2003} (21) > *E. faecalis*_{ATCC29212} (20) > *P. aeruginosa*₂₇₈₅₃ (18) şeklinde iken, DMSO'da çözünen (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiğinin bakteri suşları üzerindeki etkisi ise zon büyüklüklerine göre; *S. aureus*_{ATCC29213} (30) > *E. coli*₃₅₂₁₈ (24) > *P. putida*_{BC1617} (20) > *E. coli*₂₅₉₂₂ (19) > *E. faecalis*_{ATCC29212} (17) > *K. pneumoniae*_{BL2003} (13) > *P. aeruginosa*₂₇₈₅₃ (9) şeklinde olduğu gözlemlenmiştir. Hem etanolde hemde DMSO'da çözünmesiyle elde edilen maddenin antibiyotiklerden daha yüksek zon çapı oluşturduğu, sadece DMSO'da çözünen maddenin *E. faecalis*_{ATCC29212} ve *P. aeruginosa*₂₇₈₅₃ suşlarında antibiyotikli diklere yakın değerler gösterdiği görülmüştür (Tablo 3.1.)

Etanolde çözünen (1-etil-4-hidroksi-4-fenilpiperidin-3-il)(fenil)metanon bileşiğinin ise bakteri suşları üzerindeki etkisi zon çapları büyüklüklerine göre; *S. aureus*_{ATCC 29213} (32) > *E. coli*₃₅₂₁₈ (25) > *E. coli*₂₅₉₂₂ (21) = *P. putida*_{BC1617} (20) = *E. faecalis*_{ATCC29212} (20) > *K. pneumoniae*_{BL2003} (19) > *P. aeruginosa*₂₇₈₅₃ (14) şeklinde iken, DMSO'da çözünen (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiğinin bakteri suşları üzerindeki etkisi ise zon büyüklüklerine göre; *S. aureus*_{ATCC29213} (17) > *E. coli*₃₅₂₁₈ (16) > *E. coli*₂₅₉₂₂ (12) şeklinde olduğu diğer suşlar üzerinde etkili olmadığı gözlemlenmiştir. Hem etanolde hemde DMSO'da çözünmesiyle elde edilen maddenin etkili olduğu suşlar üzerinde antibiyotiklerden daha yüksek zon çapı oluşturduğu, sadece DMSO'da çözünen maddenin *S. aureus*_{ATCC29213} ve *E. coli*₂₅₉₂₂ suşlarında ve etanolde çözünen maddenin ise *P. putida*_{BC1617} suşları üzerinde antibiyotikli diklere göre daha düşük zon çapları oluşturduğu görülmüştür (Tablo 3.2.).

Çalışmada ayrıca piperidin halkasına metil bağlı bileşiğe ait zon çapları ve etkili olduğu suş sayısının etil bağlı olandan daha fazla olduğuda gözlemlenmiştir. Bu durum için yukarıda anlatılan Dang ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışma sonucunda amin kısmının alkil grubunun boyutunun, antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde önemli olabileceği ve bağlı metil grubunun optimal görüldüğü ancak metilamine başka bir metil grubunun eklenmesi ile antibakteriyel aktivitenin azalmasına neden olduğu görüşü dikkate

alınabilir niteliktedir.

Yine yukarıda verilen diğer çalışmalar göz önüne alındığında bileşiklerin çoğunun, özellikle bazı bakteri türlerine karşı (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi) yüksek *in vitro* antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Dang vd. 2007; Aridoss vd.2008; Ravindernath ve Reddy 2015). Benzer olarak çalışmamız kapsamındada aynı türlerde yüksek antibakteriyel etki gözlemlenmiştir.

Ayrıca yukarıda verilen çalışmalarda fenil halkasında hidroksi, metil ve nitro ikameleri içeren piperidin türevlerinin varlığının test edilen bakteri türlerine karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi sergilemesinin nedeni olarak söylenilebileceği ve piperidin halkası üzerinde hem elektron veren hem de elektron çeken grupların antibakteriyel aktiviteyi arttırdığı bildirilmiştir. (Ravindernath ve Reddy 2013; Naicker vd.2015). Piperidin türevi indirgenme ürünleri sentezlenmiş başka bir antimikrobiyal aktivite çalışmasında ise; en iyi aktiviteyi sırasıyla alkil bileşikleri, metil sübstitüe, metoksi sübstitüe ve amino sübstitüe bileşiklerin gösterdiği belirlenmiştir. Tamamen indirgenmiş bileşiklerin, piperidin halkası ve aromatik halka fonksiyonel gruplarını içeren bileşiklerin daha yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip oldukları bildirilmiştir (İskender Yılmaz, 2012). Çalışmamız kapsamında kullanılan maddelerin; piperidin halkasının para pozisyonuna bağlı olan hidroksil, para ve orto pozisyonuna bağlı olan fenil halkalarının ayrıca piperidin halkasının N atomuna bağlı olan alkil gruplarının bu görüşleri destekleyici olarak görev yaptıkları düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma kapsamında (1-metil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon ve (1-etil-4-hidroksi-4-fenil piperidin-3-il) (fenil) metanon bileşiklerinin hem AChE ve BChE enzimlerini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Alzheimer hastalığı süreci enzimler açısından düşünüldüğünde, AChE aktivitesi giderek azalırken BChE aktivitesi arttığından ve sonrasında BChE enzimi ACh metabolizması için telafi edici bir mekanizma oluşturduğundan dolayı ACh düzenlemesi giderek BChE'ye bağımlı hale gelebilmektedir. Bu nedenle çalışmada kullanılan piperidin türevi iki maddeninde özellikle AChE enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin çok daha yüksek olduğu ancak beraberinde BChE enziminide inhibe ettikleri durum göz önüne alındığında bu tip ikili inhibitörlerin, AChE seçici inhibitörlerden daha uzun süreli etkinlik sağlayabileceği ve Alzheimer hastalığı açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda bu maddelerin güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olmaları dolayısıyla elde edilen sonuçların farmokolojide hızla artan antimikrobiyal direncin önlenmesinde de yardımcı birer etken olabileceği ve ilaç etken maddelerinin belirlenmesinde yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Akincioglu, A., Topal, M., Gulcin, I. ve Goksu, S., 2014. Novel sulphamides and sulphonamides incorporating the tetralin scaffold as carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors, Archiv der Pharmazie, 347, 68-76.
- Alcantara, V.M., Chautard-Freire-Maia, E.A., Scartezini, M., Cerci, M.S., Braun-Prado, K. ve Picheth, G., 2002. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease, Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 62, 399-404.
- Altıntop, M.D., Gurkan Alp, A.S., Özkay, Y. ve Kaplancıklı, Z.A., 2013. Synthesis and Biological Evaluation of a Series of Dithiocarbamates as New Cholinesterase Inhibitors, Archiv der Pharmazie, 346, 571–576.
- Aridoss, G., Amirthaganesan, S., Kumar, N.A., Kim, J.T., Lim, K.T., Senthamarai Kannan, K. ve Jeong, Y.T., 2008. A facile synthesis, antibacterial, and antitubercular studies of some piperidin-4-one and tetrahydropyridine derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18, 6542–6548.
- Ayaz, A., 2008. Sideritis Hololeuca Boiss.&Heldr. Apud Bentham ve Sideritis Libanotica Labill. Subsp. Violascens Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya, 70s.
- Barta, C., Sasvari-Szekely, M., Devai, A., Kovacs, E., Staub, M. ve Enyedi, P., 2001. Analysis of mutations in the plasma cholinesterase gene of patients with a history of prolonged neuromuscular block during anesthesia, Molecular Genetics and Metabolism, 74, 484-488.
- Bodur, E. ve Çokuğraş A.N., 2006. Benzoyilkolin, İndol-3 Asetik Asit ve İnsan Serum Bütirilkolinesterazı Etkileşimleri, Türk Biyokimya Dergisi, 31, 182-186.
- Chiou, S.Y., Huang, C.F., Hwang M.T. ve Lin G., 2009. Comparison Of Active Sites Of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase Based on Inhibition By Geometric Isomers of Benzene- Di- N- Substituted Carbamates, Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 23,303–308.
- Chitranshi, N., Gupta, S., Tripathi, P.K. ve Seth P.K., 2013. New molecular scaffolds for the design of Alzheimer's acetylcholinesterase inhibitors identified using ligand- and receptor-based virtual screening, Medicinal Chemistry Research, 22, 52328–2345.
- Colovic, M.B., Krstic, D.Z., Lazarevic, P., Tamara, D., Bondzic, A.M. ve Vasic, V.M. 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology, Engeland, Current Neuropharmacology, 11, 315–335.

- Çakıroğlu, G., 2009. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri Olarak Bazı Piridin Türevleri Üzerinde Sentez Ve Biyoaktivite Çalışmaları., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, İzmir, 227 s.
- Çırdaklı, D., 2018. Bazı N-(4-Süstitübenziliden)-5-Fenil-1,3,4-Tiyadiazol-2-Amin Türevleri Üzerinde Çalışmalar , Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 102s.
- Dang, Z., Yang, Y., Jia R. ve Zhangb, S., 2007. Synthesis and antibacterial activity of novel fluoroquinolones containing substituted piperidines. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 17, 4523–4526.
- Das, U.N., 2012. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation, Annals of hepatology, 11, 409-411.
- Drtinova, L., Dobes, P. ve Pohanka, M. 2014. Low molecular weight precursor applicable for Alzheimer disease drugs synthesis AChE and BChE inhibition, BACE inhibition, antioxidant properties and in silico modulation), Czech Republic, Journal of Applied Biomedicine, 12, 285-299.
- Ebrahimabadi, A.H., Bidgoli Z., Mazoochi A., Kashi F.J. ve Batooli H., 2010. Essential Oil Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of The Leaves And Flowers of Chaerophyllum Macropodium Boiss, Food Control, 21, 1173-1178.
- Ellman, G.L., Courtney K.D., Andres V. ve Featherston R.M., 1961. A New And Rapidcolorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, Biochemical Pharmacology, 7, 88-95.
- Fershet, A., 1999. Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, W.H. Freeman, San Francisco.
- Gutteridge, A. ve Thornton, J.M., 2005. Understanding nature's catalytic toolkit, Cambridge UK, Trends in Biochemical Sciences, 30, 622-629.
- Gürdöl, F. ve Ademoğlu, E., 2006, Enzimler, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 161.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu S. ve Gülçin İ., 2013. Synthesis, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine related compounds, Atina, Archive Der Pharmazie, 346, 783-792.
- Greig, N.H., Utsuki, T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H.W., Perry, T., Lee, B., Ingram, D.K. ve Lahiri, D.K., 2001. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase, Current Medical Research and Opinion, 17: 159-165.
- Guillou, C., Mary, A., Renko, D.Z., Gras E. ve Thal, C., 2000. Potent Acetylcholinesterase Inhibitors: Design, Synthesis and Structure-activity Relationships of Alkylene Linked Bisgalanthamine and Galanthamine-

- Galanthaminium Salts, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 10, 637-639.
- Heinrich, M., 2004. Snowdrops: the heralds of spring and a modern drug for Alzheimer's disease, London, The Pharmaceutical Journal, 273, 905-906.
- Islam, R., Adip, M., Ahsan, M., Rahman, M. ve Mazid A., 2019. Cholinesterase and Glycation Inhibition Assay of Several Metabolites Obtained from Plant and Fungi, Journal of Pharmaceutical Sciences, 18, 31-38.
- İskender Yılmaz, N., 2012. Süstitüe Azakalkonlardan Katalitik Hidrojenasyonla Piperidin Türevi Bileşiklerin Eldesi ve Biyolojik Aktiviteleri, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon, 382 s.
- Kang, D., Song Y., Zhan, P., Zhang, Q. ve Liu, K., 2013. Design, Synthesis, and Acetylcholinesterase Inhibition Assay of Novel 9-(1-(Substituted-benzyl)piperidin-4-yl)- 2-chloro-9H-purin-6-amine Derivatives, Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry, 107302, 9.
- Karaman N., Sıcak Y., Taşkın Tok, T., Öztürk M., Karaküçük İyidoğan A., Dikmen M., Koçyiğit Kaymakcioğlu B. ve Oruç E.E., 2016. New piperidine-hydrazone derivatives: Synthesis, biological evaluations and molecular docking studies as AChE and BChE inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry, 124, 270-283.
- Kaya C., 2018. Bazı Piperidin Türevi Bileşiklerin Sentezi ve Olası Antidepresan Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 120 s.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ., 2012. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Bizim Büro Basımevi Yayın-Dağıtım, Ankara, 645 s.
- Khalid, H. ve Rehman, A., 2012. Synthesis of bioactive sulfonamides bearing piperidine nucleus with talented activity against cholinesterase. Department of Chemistry, Government College University, Lahore-54000, Pakistan 19pphe 16th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry
- Kiani, A., Jalili-baleh, L., Abdolahi, Z., Nadri, H., Foroumadi, A., Ebrahimi, S.E.S. ve Khoobi, M., 2019. Cholinesterase Inhibition Activity and Docking Simulation Study of Coumarin Mannich Base Derivatives. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran, 30, 5 – 12.
- Koç, N., 2010. Asetilkolinesteraz İnhibitörü Donepezil Hcl'nin Genotoksitesiti, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 41 s.
- Koshlend, D.E., 1958. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis, New York, Proceedings of the National Academy of Sciences, 44, 98-104.

- Lampón, N., Hermida-Cadahia, E.F., Riveiro, A. ve Tutor, J.C., 2012. Association between butyrylcholinesterase activity and lowLampón N, Hermida-Cadahia EF, Riveiro A, Tutor JC. Association between butyrylcholinesterase activity and lowgrade systemic inflammation, Annals of Hepatology, 11, 356-63.
- Lane, R.M., Potkin, S.G. ve Enz, A., 2006. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. International Journal of Neuropsychopharmacology, 9, 101–124.
- Levent, S., Sağlık, B.N., Acar Çevik, U. ve Özkay, Y., 2016. Synthesis of Novel Piperidine Compounds As Anticholinesterase Agents, International Journal of Pharmaceutical Science Invention, 5, 40-42.
- Li, F., Wang, Z., Wu, J., Wang, J., Xie, S., Lan, J., Xu, W., Kong, L. ve Wang, X., 2016. Synthesis and pharmacological evaluation of donepezil-based agents as new cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential application against Alzheimer's disease, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2016; 31, 41–53.
- Mack, A. ve Robitzki, A., 2000. The Key Role of Butyrylcholinesterase During Neurogenesis and Neural Disorders: An Antisense- 5 Butyrylcholinesterase-DNA Study, Progress in Neurobiology, 60, 607-628.
- Mahmoud, F.F., Haines, D.D., Abdul, H.T., Omu, A.E., Abu-Donia, M.B., 2006. Butyrylcholinesterase activity in gestational diabetes: correlation with lymphocyte subpopulations in peripheral blood, American Journal of Reproductive Immunology, 56, 185-92.
- Massoulie, J., Sussman, J., Bon, S. ve Silman, I., 1993. Structure and Functions of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase, Progress in Brain Research, 98, 139–146.
- McDonald, A.G. ve Tipton, K.F., 2014. Fifty five years of enzyme classification: advances and difficulties, Ireland, Federation of European Biochemical Societies, 281, 583-592.
- Meena, P., Nemaysh, V., Khatri, M., Manral, A., Luthra, P.M. ve Tiwari, M., 2015. Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of novel piperidine and piperazine derivatives as multi-targeted agents to treat Alzheimer's disease, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 23, 1135–1148.
- Mesulam, M.M., 2003. Butyrylcholinesterase in the normal and Alzheimer brain. In : Giacobini E (Ed.), Butyrylcholinesterase : Its Function and Inhibitors. London: Martin Dunitz.
- Mohsen, U.A., 2012. Studies on Imidazopyridine Derivatives as Acetylcholinesterase Inhibitors, Clinical and Experimental Health Science, 2, 119-123.

- Mohsen,U.A., Koçyiğit, B., Oruç, E.E., Asım Kaplancıklı, E.Z. ve Rollas, S., 2015. Studies on Hydrazide–Hydrazones Derivatives As Acetylcholinesterase Inhibitors, Turkey, Clinical and Experimental Health Science, 1, 10-14.
- Naicker, L., Venugopala, K. N., Shode, F. ve Odhav, B., 2015. Antimicrobial and antioxidant activities of piperidine derivatives. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 9, 783-792.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M. 2005. Lehninger Biyokimyanın Etkileri. Palme Yayıncılık. 444- 445.
- Neurath, G.B., Dünger, M., Pein, F.G., Ambrosius, D. ve Schreiber, O., 1977. Primary and secondary amines in the human environment, Food and Chemical Toxicology, 15, 275–282.
- Özcan. B., 2014. İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 149s.
- Ozturk Sarikaya, S.B., 2015. Acethylcholinesterase Inhibitory Potential and Antioxidant Properties of Pyrogallol, Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 30, 761–766.
- Özkan, G., 2009. Comparison of Antioxidant Phenolics of Ethanolic Extracts and Aqueous Infusions from Sideritis Species, Asian Journal of Chemistry, 21, 1024-1028.
- Özturan Özer, E., Unsal Tan, O., Ozadali, K., Küçükkılınç, T., Balkan, A. ve Uçar, G., 2013. Synthesis, Molecular Modeling and Evaluation of Novel N'-2-(4-Benzylpiperidin-/Piperazin-1-Yl) Acylhydrazone Derivatives as Dual İnhibitors for Cholinesterases and Aβ Aggregation, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 23, 440-3.
- Pandey P. ve Chawla P. 2012. Syntheses, Characterization and Biological Activity Of Novel 2,6-Di Substituted Piperidine-4-One Derivatives. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 2, 305-309.
- Parlar, S., 2019. Synthesis and cholinesterase inhibitory activity studies of some piperidinone derivatives, Organic Communications, 12, 202-209.
- Rafiq K., Saify Z.S., Vaid F., Khan S., Akhtar F. ve Kausar R, 2013. Synthesis with Antibacterial and Antifungal Screening of 4-Hydroxy-4- Phenyl Piperidine Derivatives, British Biomedical Bulletin 1, 064-067.
- Ravindernath A. ve Reddy M.S., 2013. Synthesis and evaluation of antiinflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of densely functionalized novel benzo [d] imidazolyl tetrahydropyridine carboxylates, Arabian Journal of Chemistry, 1-8.

- Raves, M.L., Harel, M., Pang, Y.P., Silman, I., Kozikowski A.P. ve Sussman, J.L., 1997. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (–) huperzine A, New York USA, Nature Structural & Molecular Biology, 4, 57–63.
- Rehman, A., Ahtzaz, S., Abbasi, M.A., Siddiqui, S.Z., Rasool, S. ve Ahmad, I., 2017. Synthesis, Spectral Analysis And Antibacterial Evaluation Of 5-Substituted-1,3,4-Oxadiazol-2-Yl-(4-Methylpiperidin-1 Ylsulfonyl) Benzyl Sulfides. Journal of the Chilean Chemical Society, 62, 3370-3375.
- Reyes, F. J., Vargas, R., Kumar, D., Cullen, I. E., Perdoma, C. ve Pratt, R.D., 2004. Stead-State Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Tolerability of Donapezil Hydrochloride in Hepatically Impaired Patients with, British Journal of Clinical Pharmacology, 58, 9-17.
- Robinson, K., 2015. Enzymes : Principles and Biotechnological Applications, Great Britain, Essays in Biochemistry, 59, 1-41.
- Rodrigues Simões, M.C., 2014. Donepezil: an important prototype to the design of new drug candidates for Alzheimer's disease, Brazil, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 14, 2-19.
- Rodriguez-Franco, M.I., Fernandez-Bachiller, M.I., Perez, C., Castro, A., Martinez, A. 2005. Design and synthesis of N-benzylpiperidine–purine derivatives as new dual inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase, Bioorganic & Medicinal Chemistry 13, 6795–6802.
- Sharma, J., Ramanathan, K. ve Sethumadhavan, R. 2011. Identification of Potential Inhibitors Against Acetylcholinesterase Associated With Alzheimer's Diseases: A Molecular Docking Approach, India, Journal of Computational Methods in Molecular Design, 1, 44-51.
- Shidore M., Machhi, J., Shingala, K., Murumkar, P., Sharma, M.K., Agrawal, N., Tripathi, A., Parikh, Z., Pillai, P. ve Yadav, M.R., 2016. Benzylpiperidine-linked Diarylthiazoles as Potential Anti-alzheimer's Agents: Synthesis and Biological Evaluation, Journal of Medicinal Chemistry, 59, 5823–5846.
- Silverman, R.B, 2002. The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions. Academic Press, San Diego, 800p.
- Sugimoto, H., Ogura, H., Arai, Y., Limura, Y. ve Yamanishi, Y., 2002. Research and Development of Donapezil Hydrochloride, A new type of Acetylcholinesterase Inhibitor: New Drug and Recent Technique Review, The Japanese Journal of Pharmacology, 89, 7-20.
- Suarez, D., Diaz, N., Fontecilla-Camps, J. ve Field, M.J., 2006. A Computational Study of the Deacylation Mechanism of Human Butyrylcholinesterase, Biochemistry, 45, 7529-7543.

- Sumner, J.B., 1926. The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease, Ithaca, Journal of Biological Chemistry, 69, 435-441.
- Silman, I. ve Sussman J.L., 2005. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology, Current Opinion in Pharmacology, 5, 293-302.
- Tang, X.C. ve Han, Y.F., 1999. Huperzine A: a Novel Acetylcholinesterase İnhibitör, Chinese, CNS Drug Reviews, 5, 281-300.
- Tao, Z., Dong, B., Teng, Z. ve Zhao, Y., 2020. The classification of enzymes by deep learning. Institute of Electrical and Electronics Engineers Access, 8, 89802-89811.
- Telefoncu, A. ve Kılınç, A., 2012. Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler, Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler , Lisans Üstü Yaz Okulu, Muğla, 1-36.
- Thomas, I., Plas, A., Vogrig, A., Kandepedu, N., Chalard, P. ve Troin, Y., 2013. An Access to 2,6-Disubstituted Piperidines: Control of the Diastereoselectivity, Scope and Limitations. Applications to the Stereoselective Synthesis of (-)-Solenopsine A and Alkaloid (+)-241D, The Journal of Organic Chemistry, 78, 2511–2526.
- Tipton, K. ve Boyce, S., 2000. History of the Enzyme Nomenclature System, Bioinformatics, 16, 34–40.
- Tripathi, A., 2008. Acetylcholinesterase: A Versatile Enzyme of Nervous System, India, Annals of Neuroscience, 15, 106-111.
- Uraz, M., Karakuş, S., Mohsen, UA., Kaplancıklı, Z.A. ve Rollas, S., 2017. The Synthesis and Evaluation of Anti-acetylcholinesterase Activity of Some 4(3H)-Quinazolinone Derivatives Bearing Substituted 1,3,4- Thiadiazole, Turkey, Marmara Pharmaceutical Journal, 21, 96-101.
- Qizilbash, N., Birks, J., Lopez Arrieta, J., Lewington, S. ve Szeto, S., 2007. “Withdrawn: Tacrine for Alzheimer's disease, England, Cochrane database of systematic reviews, 280, 177-82.
- Viegas, C., Bolzani, V.S., Pimentel, L.S.B., Castro, N.G., Cabral, R.F., Costa, R.S., Floyd, C., Rocha, M.S., Young, M.C.M., Eliezer J.B. ve Fraga, C.A.M., 2005. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 13, 4184–4190.
- Yıldız M., 2013. Timol Ve Karvakrolün *Drosophila Melanogaster* Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması , Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum, 68 s.
- Yüksel, N., 2000. Alzheimer Hastalığının İlaçla Tedavisi, Klinik Psikiyatri, 3, 137-14.

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve Ortaokul eğitimini Mersin’de Güneykent ve Anafartalar İlköğretim Okullarında, Lise eğitimini ise Cemile Hamdi Ogun Lisesinde tamamladı. 2009’da Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı ve 2013’de lisans eğitimini tamamladı. 2013 yılında Gümüşhane Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde Kimya Teknikeri olarak göreve başladı. 2018’de Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2019 yılında görev yaptığı Gümüşhane Üniveristesinden ayrılarak Tarsus Üniversitesi Teknik Bilimler Fakültesinde Kimya Teknikeri olarak göreve başladı ve halen bu görevine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.