

**BÜT-2-ENDOİK ASİT BİS-(BENZİL-FENİL-AMİT) TÜREVİ
BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, ASETİLKOLİNESTERAZ VE
BUTİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİNE KARŞI
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Edip TOSUN

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Kadir Özden YERDELEN

Yükseklisans Tezi-2014

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BÜT-2-ENDOİK ASİT BİS-(BENZİL-FENİL-AMİT) TÜREVİ
BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, ASETİLKOLİNESTERAZ VE
BUTİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİNE KARŞI
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Edip TOSUN

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Kadir Özden YERDELEN

ERZURUM

2014

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**BÜT-2-ENDOİK ASİT BİS-(BENZİL-FENİL-AMİT) TÜREVİ
BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, ASETİLKOLİNESTERAZ VE
BUTİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİNE KARŞI
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

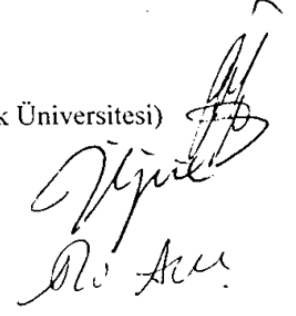
Edip TOSUN

Tez Savunma Tarihi : 11.09.2014

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kadir Özden YERDELEN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. H. İnci GÜL (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Ali AŞÇI (Atatürk Üniversitesi)



Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

**Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2014**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLOLAR DİZİNİ	XV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Alzheimer Hastalığı ve Tanısı	2
2.2. Alzheimer Hastalığının Nedenleri	3
2.3. Alzheimer Hastalığının Evreleri	4
2.4. Asetilkolin ve Kolinesterazlar	5
2.4.1. Asetilkolin Metabolizması.....	5
2.4.2. Vücudumuzda Bulunan Kolinesterazlar	7
2.4.3. Asetilkolinesteraz Enzimin Yapısı.....	9
2.4.4. Alzheimer Hastalığında Kolinesterazların Rolü	11
2.5. Alzheimer Hastalığında Nöropatolojik Özellikler	12
2.5.1. Amiloid Plaklar.....	13
2.5.2. Nörofibriler Yumaklar	14
2.6. Alzheimer Hastalığı'nda Metallerin Önemi	16

2.7. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Farmakolojik Yaklaşım.....	17
2.7.1. Kolinesteraz İnhibitörleri.....	19
2.7.2. Metabolik ve Vasküler Etkili İlaçlar.....	27
2.7.3. Büyüme Faktörleri.....	28
2.7.4. Amiloid Oluşumunu Engelleyen İlaçlar.....	28
2.7.5. Diğerleri.....	29
2.8. Enzim Kinetiği.....	32
2.9. Kimyasal Reaksiyonlarda Kullanılan Sentez Yöntemleri.....	33
2.9.1. Konvansiyonel (Klasik) Sentez Reaksiyonları.....	33
2.9.2. Mikrodalga Işıma Destekli Sentez Reaksiyonları.....	34
3. MATERYAL VE METOT.....	38
3.1. Sentez Çalışmaları.....	38
3.1.1. Sentez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar.....	38
3.1.2. Sentez Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler.....	38
3.1.3. m-Süstitüe Benzanilin Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (1a-s).....	39
3.1.4. Büt-2-endoik asit bis-(4-süstitüe benzil-3-süstitüe fenil-amit) Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (2a-s).....	39
3.2. Biyoaktivite Çalışmaları.....	100
3.2.1. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar.....	100
3.2.2. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler.....	100
4. BULGULAR.....	106
4.1. Deneysel ve Spektral Bulgular.....	106

5. TARTIŞMA	113
5.1. Sentez Çalışmaları	113
5.2. Kolinesteraz İnhibisyon Aktivitesi	113
5.3. Enzim Kinetiği Çalışmaları	115
5.4. Moleküler Modelleme Çalışması.....	116
5.5. Metal Şelasyon Etkisi	117
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	118
KAYNAKLAR	119
EKLER	127
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	127
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	128

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmamın her aşamasında benden zamanını esirgemeyen, pratik tecrübeleriyle bana yol gösteren, değerli bilgi ve katkılarıyla bana her zaman destek olan çok değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Kadir Özden YERDELEN' e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez kapsamında $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumlarını alan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Organik Kimya Bölümünün değerli kadrosuna, LC-MS spektrumlarını alan Araştırma Görevlisi Onur ŞENOL' a (Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya), bu çalışmayı **2013/56 BAP** proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, çalışmalarım sırasında benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Farmasötik Kimya Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine, laboratuvar arkadaşlarıma ve bu yoğun çalışma dönemim boyunca her zaman beni destekleyen, yanımda olan değerli iş arkadaşlarım ve aileme teşekkür ederim.

Ecz. Edip TOSUN

ÖZET

Büt-2-endioik asit bis-(benzil-fenil-amit) Türevi Bileşiklerinin Sentezi, Asetilkolinesteraz ve Butilkolinesteraz Enzimlerine Karşı Aktivitelerinin Araştırılması

Amaç: Bu tez çalışmasında amaç, *meta*-süstitüe benzanilin türevi başlangıç bileşiklerinden (**1a-s**) hareketle, büt-2-endioik asit bis-(4-süstitüe benzil-3-süstitüe fenil-amit) bileşiklerini (**2a-s**) sentezlemek ve bunların ChE enzimleri üzerindeki aktivitelerini, moleküler modelleme ve metal şelasyon çalışmalarıyla destekleyerek araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Büt-2-endiamit türevi bileşikler (**2a-s**), başlangıç bileşiklerinin (**1a-s**) trietilamin varlığında fumaril klorür ile 0 °C' de 12 saat karıştırılmasıyla sentezlendi. Bileşiklerin kolinesteraz enzimlerine karşı inhibisyon aktiviteleri kolorimetrik Elman yöntemi kullanılarak ölçüldü. Aktivite sonuçlarına göre en güçlü inhibitör bileşikler için enzim kinetiği, metal şelasyon ve moleküler modelleme çalışmaları yapıldı.

Bulgular: Hedef bileşiklerin kimyasal yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve kütle spektroskopik yöntemleriyle aydınlatıldı. Büt-2-endiamit türevleri genellikle orta-yüksek düzeyde antikolinesteraz aktivite gösterdi ki bunlardan **2o** ve **2p** bileşikleri, sırasıyla AChE ve BuChE enzimlerine karşı düşük mikromolar konsantrasyonlarda etkili en güçlü inhibitör bileşikler olarak bulundu. Bileşiklerin inhibisyon mekanizması tipleri enzim kinetiği çalışmalarıyla belirlendi. **2o** bileşiğinin Cu⁺² ve Fe⁺² gibi metal iyonlarıyla şelat yapma yeteneğine sahip olduğu görüldü. Ayrıca moleküler simülasyon çalışmaları, modellenen bileşikler olan **2o** ve **2p** bileşiklerinin AChE ve BuChE enzimlerinin aktif bölgeleriyle birçok etkileşimler meydana getirdiğini gösterdi.

Sonuç: Bu çalışmada, 18 adet yeni büt-2-endiamit türevi bileşik sentezlendi ve bunların kimyasal yapıları doğrulandı. Bu yeni bileşiklerin antikolinesteraz aktiviteleri AChE ve BuChE enzimlerine karşı değerlendirildi. Aktivite sonuçlarına göre genellikle sentezlenen bileşiklerin çoğunun ChE enzimlerinin her ikisine karşı etkili inhibitör bileşikler olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: AChE, BuChE, Moleküler Modelleme, Şelasyon

ABSTRACT

Synthesis of But-2-endioic acid bis-(benzyl-phenyl-amide) Derivatives, Investigation of Their Activities Against Acetylcholinesterase and Butylcholinesterase Enzymes

Aim: The aim of this thesis is to synthesize but-2-endioic acid bis-(4-substituted benzyl-3-substituted phenyl-amide) compounds (**2a-s**) from the starting meta-substituted benzaniline compounds (**1a-s**) and to investigate their activities on ChE enzymes by supporting with molecular modeling and metal chelation studies.

Material and Method: But-2-endiamide compounds (**2a-s**) were synthesized performed by stirring of the starting compounds (**1a-s**) with fumaryl chloride in the presence of triethylamine at 0 °C for 12 hours. The inhibition activities of the compounds against cholinesterase enzymes were measured by using colorimetric Ellman assay. According to the activity results, the enzyme kinetic, metal chelation and molecular modeling studies were carried out for the most potent inhibitor compounds.

Results: Chemical structures of the target compounds were illuminated by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and Mass spectroscopic methods. But-2-endiamide derivatives generally showed moderate to high anticholinesterase activity in which compounds **2o** and **2p** were found as the most potent inhibitors acting in low micromolar concentrations towards AChE and BuChE, respectively. The types of the inhibition mechanism of the compounds were determined with enzyme kinetic studies. It was shown that the compound (**2o**) was able to chelate with metal ions such as Cu⁺² and Fe⁺². Also the simulation studies showed that modeled compounds **2o** and **2p** created many interactions with the active sites of AChE and BuChE.

Conclusion: In this study, 18 new but-2-endiamide derivatives were synthesized and their chemical structures were confirmed. Anticholinesterase activities of these new compounds were evaluated against AChE and BuChE. According to the activity results, generally most of the synthesized compounds were found as effective inhibitors against both ChE enzymes.

Key Words: AChE, BuChE, Chelation, Molecular Modeling

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	: Asetilkolinesteraz
AH	: Alzheimer Hastalığı
AP	: Amiloid Plak
Ar	: Aril
ATCI	: Asetiltiyokolin İyodür
Å	: Angstrom
AβPP	: Amiloid Beta Prekürsör Protein
BuChE	: Bütilkolinesteraz
BTCl	: Bütiltiyokolin İyodür
CDCl₃	: Dötorokloroform
CH₂Cl₂	: Diklorometan
ChAT	: Kolinasetiltransferaz
CuSO₄	: Bakır Sülfat
d	: Dublet
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DTNB	: Ditiyo-bis-nitrobenzoik asit
ESI	: Elektron Sprey İyonizasyon
FeSO₄	: Demir Sülfat
Hz	: Hertz
IC₅₀	: % 50 İnhibisyon Konsantrasyonu
İ.T.K.	: İnce Tabaka Kromatografisi
J	: Jiromanyetik Sabiti
K₂CO₃	: Potasyum Karbonat
m	: Multiplet

M. A.	: Molekül Ağırlığı
MHz	: Mega Hertz
ml	: Mililitre
mmol	: Milimol
Na₂SO₄	: Sodyum Sülfat
NFY	: Nörofibril Yumak
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
nm	: Nanometre
NSAİ	: Non Stereoidal Antienflamatuvar İlaçlar
P	: Partisyon Katsayısı
ppm	: Milyonda Bir Birim
PTC	: Faz Transfer Katalizörü
q	: Kuartet
s	: Singlet
SiO₂	: Silika Jel
SSS	: Santral Sinir Sistemi
t	: Triplet
TBAB	: Tetra Bütil Amonyum Bromür
TEA	: Trietilamin
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
W	: Watt
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrad

^{13}C -NMR : ^{13}C Nükleer Manyetik Rezonans

^1H -NMR : ^1H Nükleer Manyetik Rezonans

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Asetilkolin Biyosentezi	5
Şekil 2.2. Asetilkolinesterazın Sinaptik Aralıktaki Mekanizması	6
Şekil 2.3. Butilkolinesterazın 3 Boyutlu Yapısı	7
Şekil 2.4. Asetilkolinesteraz Enzimi Üç Boyutlu Yapısı.....	9
Şekil 2.5. Amloid Plaklar	14
Şekil 2.6. Nörofibril Yumaklar	15
Şekil 2.7. Alzheimer Evreleri	16
Şekil 2.8. Alzheimer Tedavisinde Kullanılan İlaç Grupları	18
Şekil 2.9. Takrin: [1,2,3,4-Tetrahidroakridin-9-amin]	20
Şekil 2.10. Galantamin: (4aS,6R,8aS)-5,6,9,10,11,12-Hekzahidro-3-metoksi-11-metil-4aH- [1]benzofuro[3a,3,2-ef] [2] benzazepin- 6-ol	20
Şekil 2.11. Metrifonat: Dimetil (2,2,2-trikloro-1-hidroksietil) fosfonat.....	21
Şekil 2.12. Donepezil: 2-[(1-Benzil-4-piperidil)metil]- 5,6-dimetoksi-2,3-dihidroind en-1-on	21
Şekil 2.13. Rivastigmin: 3-[1-(Dimetilamino)etil]fenil N-etil-N-metilkarbamat.....	22
Şekil 2.14. Fizostigmin: 1,2,3,3a,8,8a-hekzahidro-1,3a,8-trimetilpirolo[2,3-b]indol-5-ol	23
Şekil 2.15. Fenserin: Fenil-karbamik asit-1,3a,8-trimetil-1,2,3,3a,8,8a-hekzahidropirol o [2,3-b]-indol-5-il] ester	23
Şekil 2.16. Eptastigmin: Heptil-karbamik asit 1,3a,8-trimetil-1,2,3,3a,8,8a-hekzahidro- pirolo[2,3-b]indol-5-il ester	24
Şekil 2.17. Ganstigmin: 2-Etilfenil-karbamik asit-2,4a,9-trimetil-2,3,4,4a,9,9a hekza hidro-1-oksa-2,9-diaza-fluoren-6-il-ester	24
Şekil 2.18. Memantin: 3,5-Dimetiladamantan-1-amin	25

Şekil 2.19. Neostigmin:3-[(Dimetilamino)karbonil]oksi)-N,N,N-trimetilbenzenamin yum	26
Şekil 2.20. Ambenonyum klorit: 2,2'-[(1,2-dioksoetan-1,2-diil)diimino]bis[N-(2-kloro benzil)-N,N-dietiletanaminyum].....	26
Şekil 2.21. Pentoksifilin: 3,7-Dimetil-1-(5-okzo-hekzil)-3,7-dihidro-1H pürin-2,6-dion	27
Şekil 2.22. Selejgilin: N-metil-N-(1-fenilpropan-2-il)prop-1-in-3-amin	30
Şekil 2.23. İndometazin: (1-(4-Klorobenzoil)-5-metoksi-2-metil-1H-indol-3-il)-asetik asit	30
Şekil 2.24. Östrojen: 13-Metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahidro-6H-siklopenta[a] fenantren-3,17-diol.....	31
Şekil 2.25. Simvastatin: (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2-[(2R,4R)-4-hidroksi-6-oksotetrahidro- 2H-piran-2-il]etil}-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-hekzahidronaftalen-1-il 2,2-di metilbütanoat.....	32
Şekil 2.26. Bir Enzim Reaksiyonu İçin İlerleme Eğrisi	33
Şekil 3.1. Benzanilin (1a-s) ve Fumaramit (2a-s) Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi.....	40
Şekil 3.2. 2a Bileşiğinin UV Spektrumu	42
Şekil 3.3. 2a Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu	42
Şekil 3.4. 2a Bileşiğinin ¹³ C-NMR Spektrumu	43
Şekil 3.5. 2a Bileşiğinin Kütle Spektrumu	43
Şekil 3.6. 2b Bileşiğinin UV Spektrumu	45
Şekil 3.7. 2b Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu	45
Şekil 3.8. 2b Bileşiğinin ¹³ C-NMR Spektrumu	46
Şekil 3.9. 2b Bileşiğinin Kütle Spektrumu	46
Şekil 3.10. 2c Bileşiğinin UV Spektrumu	48
Şekil 3.11. 2c Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu	48

Şekil 3.12. 2c Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	49
Şekil 3.13. 2c Bileşiğinin Kütle Spektrumu	49
Şekil 3.14. 2d Bileşiğinin UV Spektrumu	51
Şekil 3.15. 2d Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	52
Şekil 3.16. 2d Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	52
Şekil 3.17. 2d Bileşiğinin Kütle Spektrumu	53
Şekil 3.18. 2e Bileşiğinin UV Spektrumu	55
Şekil 3.19. 2e Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	55
Şekil 3.20. 2e Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	56
Şekil 3.21. 2e Bileşiğinin Kütle Spektrumu	56
Şekil 3.22. 2f Bileşiğinin UV Spektrumu	58
Şekil 3.23. 2f Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	58
Şekil 3.24. 2f Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	59
Şekil 3.25. 2f Bileşiğinin Kütle Spektrumu	59
Şekil 3.26. 2g Bileşiğinin UV Spektrumu	61
Şekil 3.27. 2g Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	61
Şekil 3.28. 2g Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	62
Şekil 3.29. 2g Bileşiğinin Kütle Spektrumu	62
Şekil 3.30. 2h Bileşiğinin UV Spektrumu	64
Şekil 3.31. 2h Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	65
Şekil 3.32. 2h Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	65
Şekil 3.33. 2h Bileşiğinin Kütle Spektrumu	66
Şekil 3.34. 2i Bileşiğinin UV Spektrumu	68

Şekil 3.35. 2i Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	68
Şekil 3.36. 2i Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	69
Şekil 3.37. 2i Bileşiğinin Kütle Spektrumu	69
Şekil 3.38. 2j Bileşiğinin UV Spektrumu	71
Şekil 3.39. 2j Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	72
Şekil 3.40. 2j Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	72
Şekil 3.41. 2J Bileşiğinin Kütle Spektrumu	73
Şekil 3.42. 2k Bileşiğinin UV Spektrumu	75
Şekil 3.43. 2k Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	75
Şekil 3.44. 2k Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	76
Şekil 3.45. 2k Bileşiğinin Kütle Spektrumu	76
Şekil 3.46. 2l Bileşiğinin UV Spektrumu	78
Şekil 3.47. 2l Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	79
Şekil 3.48. 2l Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	79
Şekil 3.49. 2l Bileşiğinin Kütle Spektrumu	80
Şekil 3.50. 2m Bileşiğinin UV Spektrumu	82
Şekil 3.51. 2m Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	82
Şekil 3.52. 2m Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	83
Şekil 3.53. 2m Bileşiğinin Kütle Spektrumu	83
Şekil 3.54. 2n Bileşiğinin UV Spektrumu	85
Şekil 3.55. 2n Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu	85
Şekil 3.56. 2n Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu	86
Şekil 3.57. 2n Bileşiğinin Kütle Spektrumu	86

Şekil 3.58. 2o Bileşiğinin UV Spektrumu	88
Şekil 3.59. 2o Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu	88
Şekil 3.60. 2o Bileşiğinin ¹³ C-NMR Spektrumu	89
Şekil 3.61. 2o Bileşiğinin Kütle Spektrumu	89
Şekil 3.62. 2p Bileşiğinin UV Spektrumu	91
Şekil 3.63. 2p Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu	91
Şekil 3.64. 2p Bileşiğinin ¹³ C-NMR Spektrumu	92
Şekil 3.65. 2p Bileşiğinin Kütle Spektrumu	92
Şekil 3.66. 2r Bileşiğinin UV Spektrumu	94
Şekil 3.67. 2r Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu	95
Şekil 3.68. 2r Bileşiğinin ¹³ C-NMR Spektrumu	95
Şekil 3.69. 2r Bileşiğinin Kütle Spektrumu	96
Şekil 3.70. 2s Bileşiğinin UV Spektrumu	98
Şekil 3.71. 2s Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu	98
Şekil 3.72. 2s Bileşiğinin ¹³ C-NMR Spektrumu	99
Şekil 3.73. 2s Bileşiğinin Kütle Spektrumu	99
Şekil 3.74. Ellman Yönteminin Reaksiyon Mekanizması	101
Şekil 3.75. 2o (a) ve 2p (b) İnhibisyonun Lineweaver-Burk Grafiği	103
Şekil 3.76. 2o Bileşiğinin (100 µM) ve 100 µM Cu ⁺² ve Fe ⁺² ile Oluşturduğu Komplekslerin UV Spektrumu	104
Şekil 3.77. (a) 2o-1ACJ ve (b) 2p-1P0I Komplekslerinin Moleküler Simülasyonu	105

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Kolinesteraz İnhibitörlerinin AChE ve BuChE İnhibisyonuna Etkileri	12
Tablo 3.1. 2a-s Bileşiklerinin IC ₅₀ (µM) Değerleri ve Enzim Selektiviteleri	102
Tablo 4.1. 1a-s Bileşiklerinin Genel Sentezine İlişkin Veriler	107
Tablo 4.2. Sentezlenen 2a-s Bileşiklerinin Sentezine İlişkin Deneysel Veriler.....	108
Tablo 4.3. Sentezlenen 2a-s Bileşiklerinin ¹ H-NMR Verileri.....	109
Tablo 4.4. Sentezlenen 2a-s Bileşiklerinin ¹³ C-NMR Verileri	110
Tablo 4.5. Sentezlenen 2a-s Bileşiklerinin MS Verileri	111
Tablo 4.6. Sentezlenen 2a-s Bileşiklerinin λ max ve log ε Verileri.....	112

1. GİRİŞ

İlk defa 1907 yılında Alois ALZHEIMER adında bir Alman doktor tarafından tanımlanan Alzheimer hastalığı; hafıza, konuşma, yön bulma, insanları tanıma, problem çözme gibi çeşitli zihinsel işlevlerin zamanla zayıfladığı, günlük işleri yerine getirme yeteneklerinin azaldığı ve davranış bozukluklarının görülebildiği ilerleyici bir beyin hastalığıdır.¹

Kronik bir hastalık olması nedeniyle uzun bir tedavi süresi olan Alzheimer hastalığı, kalp hastalıkları ve kanserden sonra tedavi maliyeti en yüksek hastalıklardan birisidir. Özellikle gelişmiş ülkelerde, yaşam standartlarının yükselmesi ve sağlık hizmetlerinin gelişmesine bağlı olarak yaşlı nüfusun artmasından dolayı Alzheimer hastalığı çağımızın önemli hastalıkları arasına girmiştir.¹

Alzheimer hastalığına neden olan patogenez ve patofizyolojik olaylar tam olarak aydınlatılmadığından bugün için Alzheimer hastalığının tam önleyici bir tedavisi bulunmamaktadır. Alzheimer hastalığında temel sorun nöron kaybı ve kolinerjik sistemdeki azalmadır. Nöron kaybı geri dönüştürülemezle beraber kolinerjik etkinin artırılması hastanın yaşam kalitesinde ve hastalığın seyrinde düzelmeye sağlamaktadır.¹

Yukarıda sayılan sebeplerden ötürü Alzheimer hastalığının tam kesin tedavisine ve kolinerjik etkilerin artırılmasına yönelik çalışmalar son zamanlarda hız kazanmaktadır. Alzheimer hastalığının tedavisinde amaç nöron kaybını önlemek ve kolinerjik aktiviteyi artırmaya yönelik istenmeyen yan etkileri azaltılmış veya olmayan bileşikler geliştirmektir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmaların ana gayesi bu alandaki ihtiyaçları kısmen de olsa karşılamaya yöneliktir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı ve Tanısı

Alzheimer hastalığı (AH), kolinerjik eksiklik ile zihinsel işlev bozukluğunun başlangıcı, seyri ve derinliği arasında net ilişkinin kurulabildiği nörodejeneratif bir hastalıktır.² Bugün dünyada 20 milyona yakın insanın Alzheimer hastalığına yakalandığı tahmin edilmektedir. Alzheimer hastalığının görülme sıklığı, yaş ile orantılı olarak artmaktadır. 65-70 yaşlar arası % 1.5 iken, 85 yaş sonrasında % 6' ya kadar artmaktadır.³ Devlet İstatistik Enstitüsü' nün rakamlarına göre; Türkiye' de yaklaşık 250.000 Alzheimer vakası bulunmaktadır. Demans vakalarının % 80' ini teşkil eden Alzheimer hastalığı, ilerleyici ve hastanın günlük yaşam aktivitelerini engelleyen apati, ajitasyon, psikoz, anksiyete ve depresif semptomlarla karakterize olmaktadır.

Klinik olarak Alzheimer hastalığı tanısı aşağıdaki kriterlerin karşılanması halinde konulabilir:

- 1- Hastada klinik olarak demans tanısının konulmuş olması,
- 2- İlerleyici hafıza kaybının ve en az iki farklı bilişsel alanda fonksiyon bozukluğunun olması,
- 3- Hastalığın başlangıcının 40 yaş ve üzerinde olması,
- 4- Demansa neden olabilecek herhangi bir sistemik hastalığın ya da nörolojik hastalığın bulunmaması.

Bellek kaybı ya da amnezi hastalığın değişmez bulgusudur ve hastalık çoğunlukla ilk olarak yakın bellek bozukluğu ile başlar. Hastalığın ilerlemesi ile birlikte lisan bozuklukları ortaya çıkar. Ayrıca hastalığın seyri sırasında depresyon, psikotik semptomlar, ajitasyon ve agresyon gibi davranış bozuklukları meydana gelebilir.⁴

Alzheimer hastalığına beyinde nörofibriler dejenerasyon sonucu meydana gelen nörofibril yumak (NFY) ve amiloid plak (AP) olarak adlandırılan oluşumların neden olduğu ileri sürülen başka bir sebep olarak gösterilmiştir.

2.2. Alzheimer Hastalığının Nedenleri

Alzheimer hastalığının kesin nedeni bilinmemektedir. Alzheimer hastalığının bilinen en eski sebeplerinden birinin beyindeki kolinerjik kayıp olduğu gösterilmiştir. Kolinerjik kavşak ve sinaplardan salınan asetilkolin miktarının Alzheimer hastalarında azaldığının saptanması ile asetilkolini hidroliz yoluyla parçalayan bir enzim olan asetilkolinesterazın inhibe edilerek asetilkolin miktarının artırılması şeklinde bir yaklaşım ortaya çıkmıştır.⁵ Temel bileşeni hiperfosforilize olmuş tau proteinleri olan NFY' lar hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olurlar. Amiloid, dejenere nöron ve reaktif glia hücrelerinden teşekkül eden heterojen yapılar olan amiloid plaklar, erken yaştaki Down sendromlu hastalarda veya normal yaşlanmada da görülebilmektedir. Ancak Alzheimer hastalığında sayıları aşırı derecede artmaktadır.⁶

Alzheimer hastalığını karakterize eden distrofik nöritler ve plaklar içinde bulunan apolipoprotein E (E₄ alleli), hastalığın oluşum mekanizmalarından biri olarak gösterilmektedir.⁶ Başlıca karaciğer tarafından sentezlenen bir plazma proteini olan apolipoprotein E, diğer proteinlerden farklı olarak merkezi sinir sisteminde astrositler, Schwann hücreleri ve oligodendrositler tarafından da sentezlenir ve beyinde lipaz aktivitesini bozarak yaşlanmaya maruz kalan beyin bölgelerinde kolesterol ve lipid seviyesini değiştirebilir.

Yukarıda sayılan sebeplere ilaveten son zamanlarda Alzheimer hastalığının bir başka sebebinde beyinde biriken metal iyonları olduğu düşünülmektedir. Alzheimer hastalığında metallerin rolünü açıklayan metal hipotezi; metal iyonları ve A β peptidi,

metal iyonu anormal homeostazi arasındaki etkileşimlerin AH nöropatogenezi ile bağlantılı olduğunu belirtmektedir.⁷⁻⁹ Bu hipoteze dayanarak, metal-A β peptidi türlerinin nörotoksitesini azaltmak ve beyindeki metal iyonu homeostazisinin yeniden dengelenmesi amacıyla metal şelasyon tedavisi yoluyla metal-A β etkileşimlerinin bozulması önerilmiştir.¹⁰

2.3. Alzheimer Hastalığının Evreleri

AH' nin seyirinde yakınma ve bulguların şiddetine göre klinik tablo erken, orta ve ileri olmak üzere üç evreye ayrılabilir.

Erken evrede yakın bellek bozukluğu ve yeni bir bilginin öğrenilmesinde güçlük önemli bir özelliktir. Eşyaların yerlerini karıştırmak, konuşmaların tekrarlanması, isim unutkanlıkları, konuşurken kelime bulma güçlükleri, cep telefonu gibi kullanımı kısmen de olsa, karmaşık olan cihazların kullanımının öğrenilememesi gibi güçlükler bu evrede görülen genel özelliklerdir.²²

Orta evrede, başlangıç belirtilerinin ağırlaşması ve günlük yaşam aktivitelerindeki bağımsızlığın, çoğu işlevde kaybı söz konusudur. Yeni bir bilgi öğrenme tamamen durmuştur. Var olan bilgi de geriye dönük bir kronolojik seyirle kaybolma göstermektedir. Dilsel işlevlerdeki bozulmalar, tutarlı bir sohbeti sürdürmeyi olanaksız kılacak düzeye ulaşmıştır.²²

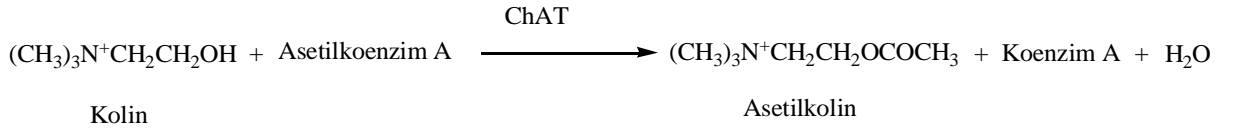
İleri evrede; hastanın en temel günlük yaşam aktivitelerini dahi sürdürmeleri bir başkasının yardımını gerektirmektedir. Beslenme, yıkanma, giyinme gibi temel fonksiyonlarda tamamen bağımlı hale gelmiştir. Zihinsel işlevler en alt düzeye iner. Yatak yarası enfeksiyonları, akciğer embolisi veya enfeksiyonu, üriner enfeksiyon, beslenme bozukluklarının yarattığı komplikasyonlar başlıca ölüm nedenlerini oluşturur.²²

2.4. Asetilkolin ve Kolinesterazlar

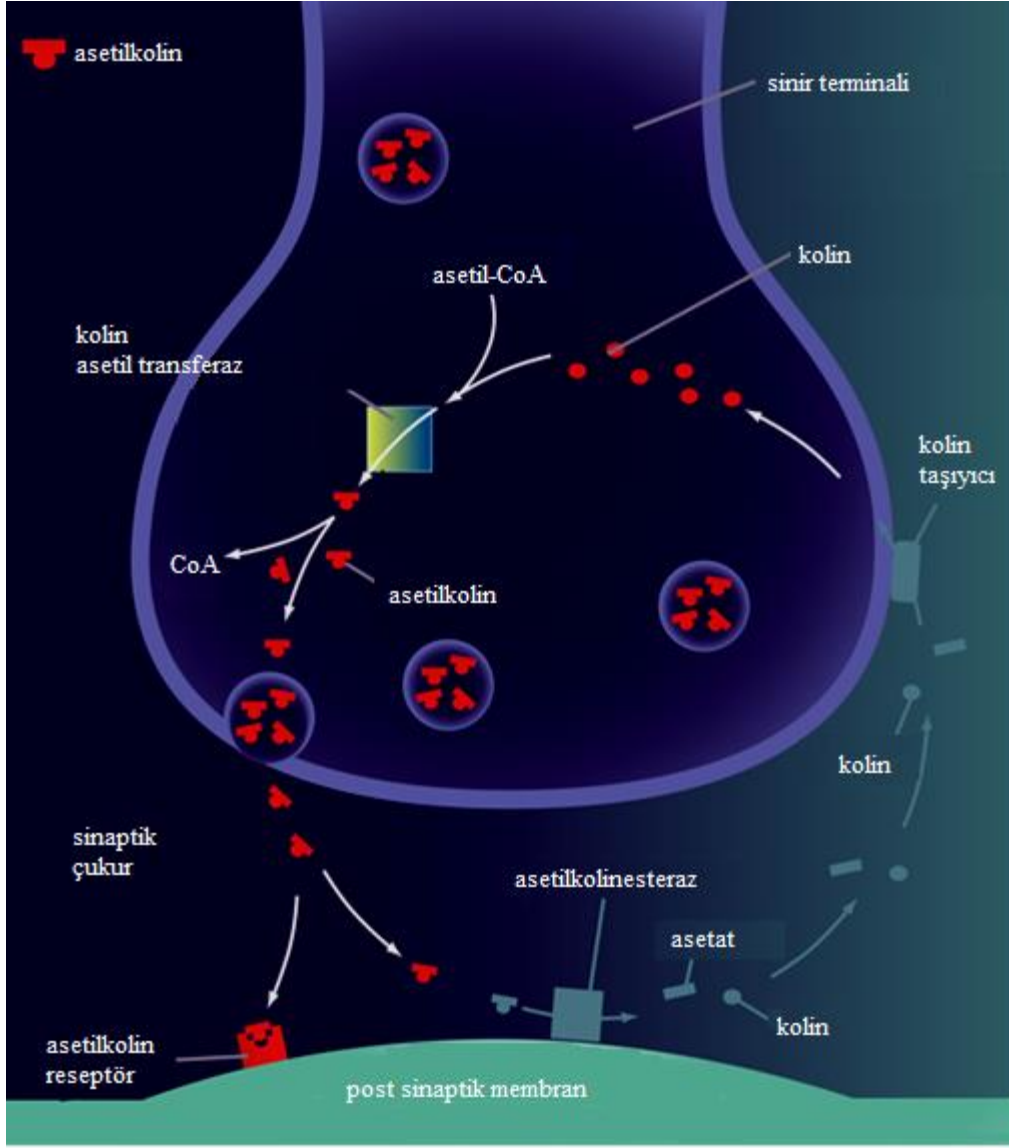
Alzheimer hastalığında kolinerjik kayıp sözkonusu olduğu için, hastalığın tedavisi hakkında fikir üretebilmek için asetilkolin ve kolinesterazların yapısının bilinmesi önem oluşturmaktadır.

2.4.1. Asetilkolin Metabolizması

Asetilkolin, kolinerjik nöronların gövdesinde kolin ile asetilkoenzim A' dan gelen asetil' in kolinasetiltransferaz (ChAT) tarafından birleştirilmesi yoluyla oluşmaktadır. Oluşan asetilkolin, aksonal transport yoluyla sinir uçlarına taşınır ve sinaptik aralığa salınır (**Şekil 2.1**).



Şekil 2.1. Asetilkolin Biyosentezi



Şekil 2.2. Asetilkolinesterazın Sinaptik Aralıktaki Mekanizması

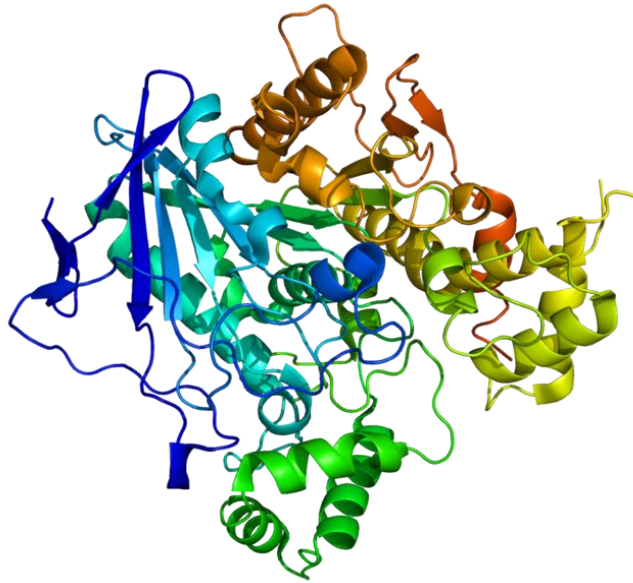
ChAT-pozitif nöronlara kolinerjik nöron, kolinesteraz-pozitif nörona ise kolinoseptif (kolinerjik lif alan) nöron denilmektedir. Normal kolinerjik ileti, sinaptik aralıktaki asetilkolinin, kolinesteraz enzimleri tarafından hızlı katalitik hidrolizi yolu ile sonlandırılmasına bağlıdır.¹¹ Bu hidroliz sonucu sinaptik aralıkta oluşan kolin tekrar presinaptik nörona alınır ve asetilkolin sentezinde kullanılır. Asetilkolin molekülündeki kolin' in, besinler ve hücre membranındaki fosfolipidler dışındaki en önemli kaynağı, bu geri alınan kolin' dir. Kolinesterazların ortamda bulunmaması, hem asetilkolin

sentezi için gereken hücre içi kolinin azalmasına hem de sinaptik aralıktaki asetilkolin etkisinin uzamasına yol açmaktadır.

Kolinesteraz inhibisyonu, asetilkolin yetmezliği ile ilerleyen Alzheimer hastalığı, myastenia gravis gibi hastalıklarda sinaptik aralıktaki asetilkolini arttırmak üzere tedavi amaçlı kullanıldığı gibi öldürücü asetilkolinerjik uyarım yaratmak üzere kimyasal gaz üretiminde de kullanılmaktadır.¹¹

2.4.2. Vücudumuzda Bulunan Kolinesterazlar

İnsan beyni başlıca iki tip kolinesteraz enzimi içerir; 7. kromozom tarafından kodlanan asetilkolinesteraz (AChE) ve diğeri 3. kromozom tarafından kodlanan butilkolinesteraz (BuChE).¹²



Şekil 2.3. Butilkolinesterazın 3 Boyutlu Yapısı

Farklı kromozomlarda kodlanmış olan her iki enzimin aminoasit dizilimleri % 65 oranında birbirlerine benzemesine rağmen normal erişkin bir insanın beyinde AChE, BuChE' a göre daha yaygın bulunmaktadır.¹³

AChE' nin kolinerjik iletimdeki rolü oldukça iyi bilinmekle birlikte BuChE' nin rolü yeterince anlaşılmış değildir.¹⁴ Normal beyinde sinaptik asetilkolin hidrolizinin

esas olarak AChE tarafından yapıldığı, BuChE' nin buna çok az katkısının olduğu kabul edilmektedir.¹⁵

Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin % 80' inden AChE, geriye kalan % 20' inden BuChE' nin sorumlu olduğu düşünülmektedir.¹⁶ Sinir sistemi gelişiminin erken dönemlerinde BuChE düzeyleri yüksektir, ilerleyen evrelerde bu düzey düşmektedir.¹² Kolinerjik nöronlarda AChE, hücre gövdesinde, aksonlarda ve dentrit uzantıların proksimalinde yer alır. BuChE ise hücre gövdesinde ve dendritlerde bulunur. Enzim çalışmalarında AChE' nin korteksin bütün bölümlerinde bulunduğunu, BuChE' nin ise yalnızca beyaz maddeye yakın olan 6. tabakada yer aldığını göstermektedir.¹⁷

Biyokimyasal çalışmalar, kolinerjik ya da kolinoseptif nöron içermeyen ve asetikolin reseptörü bulunmayan beyin alanlarında da AChE aktivitesi olduğunu göstermektedir. Nöronal gelişimin farklı evrelerinde AChE aktivitesinde geçici artışlar olmakta ve bu artışın miktarının, hem aksonal büyüme hem de kortikal nöronların sinaptogenez evresinde daha belirgin olduğu gözle çarpmaktadır.¹⁸

Fareler üzerinde AChE ve BuChE enzimlerinin işlevlerini daha iyi anlamak amacıyla yapılan in vivo çalışmalar neticesinde BuChE' nin önemine dair mevcut bilgilere önemli katkılar sağlayan şu sonuçlar elde edilmiştir;^{19, 20}

-AChE, kolinerjik nöron gruplarının gelişimi ve kolinerjik iletimin sürdürülebilmesi için mutlaka gerekli değildir,

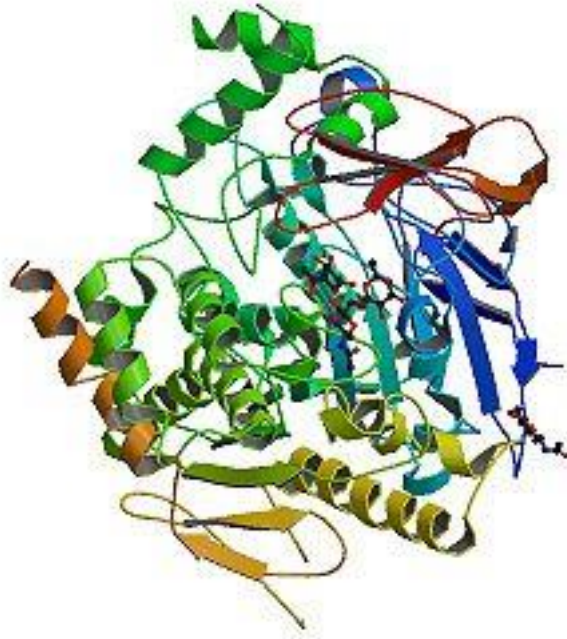
-AChE' nin yokluğu, sinaptik aralıkta sürekli asetilkolinerjik uyarıya yol açıp organizma için ölümcül sonuçlar yaratmamaktadır, yani asetilkolin hidrolizi sürdürülebilmektedir,

-AChE yokluğunda nöronal gelişim durmamaktadır.

Bu etkiler, büyük olasılıkla, ortamda BuChE' nin bulunması ile gerçekleşmektedir. Öte yandan AChE aktivitesinin olmaması dentritik çıkıntılarının oluşumunda, hücre büyüklüğü ve sayısı ile reseptör dansitesinde bazı anormalliklere yol açmaktadır.¹⁹ Dolayısıyla tek başına ne AChE ne de BuChE, asetilkolin metabolizmasının ve kolinerjik iletimin sağlıklı işlemesi için yeterli değildir.^{20,21} Oldukça duyarlı tekniklerin kullanıldığı yukarıda belirtilen çalışmaların sonuçlarına göre varılan nokta, hem AChE' nin hem de BuChE' nin nöronal gelişim ve kolinerjik iletimde birlikte aktif rol oynadıkları şeklindedir.²²

2.4.3. Asetilkolinesteraz Enzimin Yapısı

Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi insan kromozomunda tek bir gen tarafından kodlandırılmaktadır. Kodlu bölgede farklı şekilde bağlantı yapması ile AChE' nin farklı moleküler formları oluşmaktadır. Bağlantı olasılıkları, benzer özellikte fakat farklı selüler ve ekstraselüler dağılım göstermektedir. Vertebralarda AChE' nin ana dağılımı beyin nöron ve aksonlarında ve de eritrositlerdedir.



Şekil 2.4. Asetilkolinesteraz Enzimi Üç Boyutlu Yapısı

Enzimin alternatif bağımlı üç izoformu aydınlatılmıştır. AChE' nin tetrametrik çözümlü formu sinaptik boşlukta lokalizedir. Glikofosfotidilinositol-bağlı AChE-E izoformu bir dimerdir. Diğer alternatif izoformu ise monomerik AChE-R' dir. Bu formun nöroprotektif etki sağladığı düşünülmektedir.²³ Asetilkolinesteraz enzim inhibitörlerinin Alzheimer hastalarına uygulanması, AChE-R izoformunun salınmasına yol açar. Bu durum kognitif fonksiyonların artmasını sağlamaktadır.

Asetilkolinesteraz' ın periferik ve aktif bölge olmak üzere iki bağlanma bölgesi vardır.²⁴

A. Periferik Bölge

Periferik anyonik bölge olarak adlandırılan periferik bölge aktif çukurun ağız kısmında bulunmaktadır. Temel olarak Trp279, Tyr70 aromatik aminoasit artığı taşımaktadır.¹³

B. Aktif Bölge

Dar, uzun -20 Å uzunlukta, hidrofobik bir çukurdan oluşmaktadır. Enzimin orta kısmına yakın bölgede yer alan en dar kısmın çapının 4.4 Å olduğu saptanmıştır. Aktif yörede 5 majör bağlanma bölgesi bulunmaktadır.²⁴

1. Oksanyonik çukur: Gly118, Gly119, Ala201 aminoasit artığı taşımaktadır.

2. Esteratik bölge: Çukurun dip kısmında katalitik üçlü olarak adlandırılan Ser200-His440-Glu327 aminoasit artığı bulunmaktadır.

3. Anyonik substrat bağlanma bölgesi: Az sayıda (-) yükler, çok sayıda aromatik aminoasit artığı bulunmaktadır.

4. Selektif aromatik bağlanma bölgesi: Aril substratların bağlanma yeridir. Esteratik ve anyonik yöreye yakın bölgede bulunmaktadır.

5. Açıl bağlanma bölgesi: Asetilkolinin asetil grubunun bağlandığı bölgedir.

2.4.4. Alzheimer Hastalığında Kolinesterazların Rolü

Kolinerjik eksikliğin klinik tablo ile olan yakın ilişkisi nedeniyle asetilkolinin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlamak, günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan stratejidir. Bu amaca yönelik olarak en fazla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır.^{25,26} AH' nin ileri dönemlerinde beyin AChE aktivitesi % 55-67 oranında azalırken BuChE aktivitesi artmaktadır.²⁷

Normal kontrollerle karşılaştırıldığında AH' de entorinal kortekste BuChE gliolar, AChE' ye oranla daha fazladır.²⁸ Işık ve elektron mikroskopik incelemeler, hastalığın patolojik işaretleyicileri olan amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklarda AChE yanı sıra BuChE aktivitesinin de aşırı derecede arttığını göstermiştir.^{17, 29, 30}

Guillozet ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptığı çalışmada, AH' li beyinlerde nöritik plakların BuChE aktivitesi gösterdiği buna karşılık, aynı yaşlardaki normal kontrol beyinlerindeki amiloid plakların BuChE aktivitesi göstermedikleri bulunmuştur. Bu bulgularla, klinik olarak saptanabilir demans bulgularının ortaya çıkmasından yıllar önce oluşmaya başladığı düşünülen amiloid plakların nöritik plaklara dönüşmesinde BuChE' nin etkileri olduğu ileri sürülmektedir.

Bu sonuçlar, AH' nin tedavisinde, AChE' nin yanısıra BuChE' nin de inhibe edilmesinin hem beyin asetilkolin miktarını arttırmak hem de diffüz plakların nöritik plaklara dönüşümünü engellemek açısından avantajlı olacağını düşündürmektedir.³¹ Nitekim doku kültürlerinde seçici BuChE inhibitörlerinin, beyin amiloid yükü ile yakından ilişkili olan amiloid prekürsor proteininin hücre-içi ve hücre-dışı düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Başka çalışmalarda da aynı ajanların uygulanmasının yaşlı farelerde yeni bilgi öğrenmeyi kolaylaştırdığı ve asetilkolin düzeyini arttırdığı saptanmıştır.^{16, 32}

AH' de patolojik sürecin başlamasını engelleyen, klinik belirti ve bulguları geriye döndüren tedavi halen yoktur. Dolayısıyla, hastalığın seyrinde ılımlı etkileri olduğu genel kabul görmüş olan kolinesteraz inhibitörleri günümüzde AH' nin semptomatik tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardır. Söz konusu ilaçların AChE ve BuChE inhibisyonuna etkileri **Tablo 2.1'** de gösterilmiştir.¹⁶

Tablo 2.1. Kolinesteraz İnhibitörlerinin AChE ve BuChE İnhibisyonuna Etkileri

İlaç	AChE inhibisyonu	BuChE inhibisyonu
Takrin	+	+
Donepezil	+	-
Rivastigmin	+	+
Galantamin	+	-

Bu ilaçlarla yapılan klinik çalışmalar birbirlerinden farklı sonuçlar vermektedir. Her iki enzimi de inhibe eden ilaçların kullanılmasının hem zihinsel işlevler hem de günlük yaşam aktiviteleri açısından daha yararlı olduğunu ileri süren çalışmalar bulunduğu gibi³³ sadece AChE' yi inhibe eden ilaçların kullanımının yeterli geldiğini böylelikle BuChE inhibisyonundan ileri gelen kolinerjik yan etkilerin de oluşmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır.

2.5. Alzheimer Hastalığında Nöropatolojik Özellikler

Alzheimer hastalığına tanısal yaklaşımda, özellikle son yıllarda, araştırmacıların elini güçlendiren çok çeşitli teknolojik araç-gereçler geliştirilmiş olmasına karşın, AH' nin kesin tanısını hasta yaşarken koyabilmek olası değildir. Kesin tanı biyopsi/otopsi materyalinde karakteristik lezyonların gösterilmesi ile konulur.

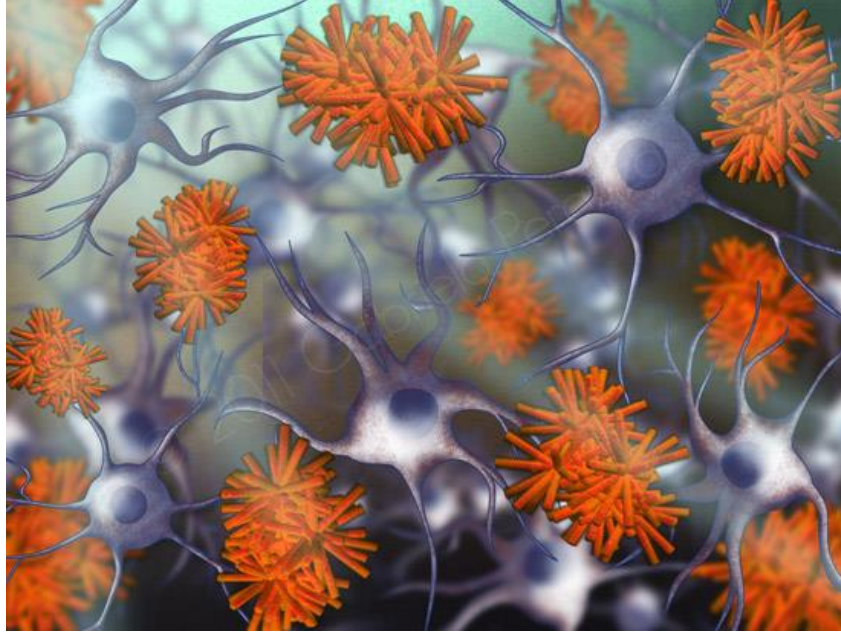
Nöron sayısında azalma, sinaptik kayıp, nörotik dentritik uzantılarda küçülme, granülovaküoler dejenerasyon, gliozis, amiloid plaklar ve nörofibriller yumaklar, giruslarda atrofi, sulkuslarda genişleşme yaygın olarak karşılaşılan bulgulardır.³⁴

2.5.1. Amiloid Plaklar

AP' lerin temel yapısını A β peptidi oluşturur. A β peptidi, bir ucu hücre içinde diğeri hücre dışında olmak üzere hücre zarını enlemesine geçen A β prokürsor proteinin (A β PP), çözünür olmayan parçalarıdır. A β PP' nin işlevi yeterince bilinmemektedir. A β PP metabolizması α , β , γ sekretaz olmak üzere üç enzim tarafından gerçekleştirilir. α -sekretazlar A β peptidini orta noktalarından keserler ve böylece hücre dışında, çözünebilir olan APP parçası ortaya çıkarırlar. β ve γ sekretazlar tarafından ortaya çıkan ürünler ise çözünürlüğü olmayan, amiloid plakların oluşumunda rol oynayan hücre dışı parçalardır (Şekil 2.5).

Amiloid plakların, içerdikleri A β peptidinin yapısı ve toksisite potansiyeline göre bazı türleri vardır: diffüz, kompakt ve nöritik plak. Diffüz plaklar, toksik etkisi çok sınırlı olan ya da olmayan plaklardır. Pre-amiloid plaklar olarak kabul edilirler ve demansı olmayan yaşlı bireyler de sıklıkla bulunurlar. Diffüz plaklar çeşitli nedenlerle (enflamasyon, serbest radikallerin etkisi, oksidatif stres) kompakt plaklara dönüşebilirler. Kompakt plaklar toksik etkilidir ve nöron dejenerasyonuna yol açarlar. Nöritik plaklar, dejenere olmuş A β peptid içeren dentrit ve akson parçalarından oluşan ve çoğu nörofibriller yumak da içeren oluşumlardır. Hem kompakt hem de nöritik plaklar AH' li hastalarda yaygın olarak bulunur

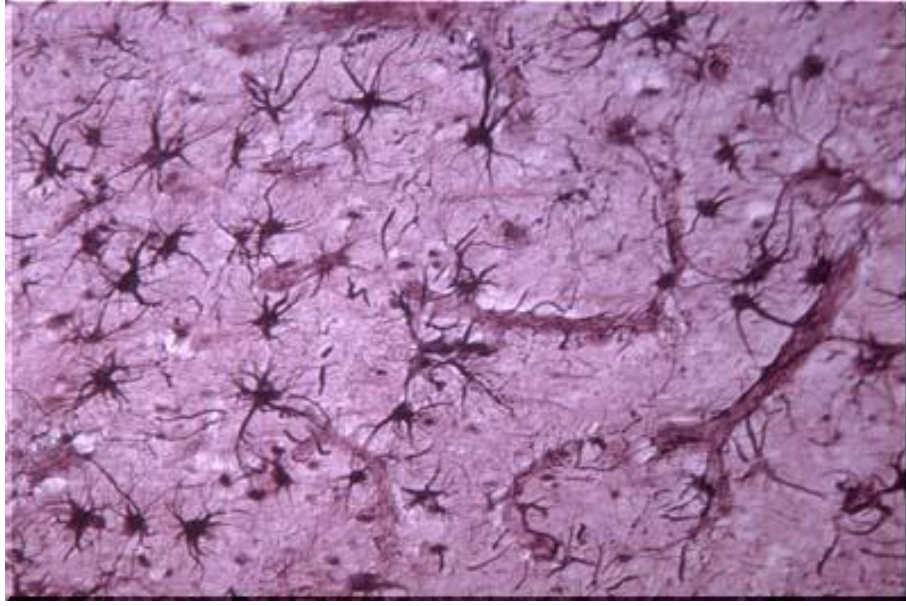
Toksik olup olmama potansiyeline bakılmaksızın, plaklar, serebral korteksin limbik yapılarından ziyade neokortikal bölgelerinde yerleşme eğilimindedirler. Bir diğer ilgi çekici bulgu da, AH ile ilgili genetik mutasyonların tümünün, amiloid plak oluşum mekanizmaları ile bağlantılı olmasıdır.³⁴



Şekil 2.5. Amloid Plaklar

2.5.2. Nörofibriler Yumaklar

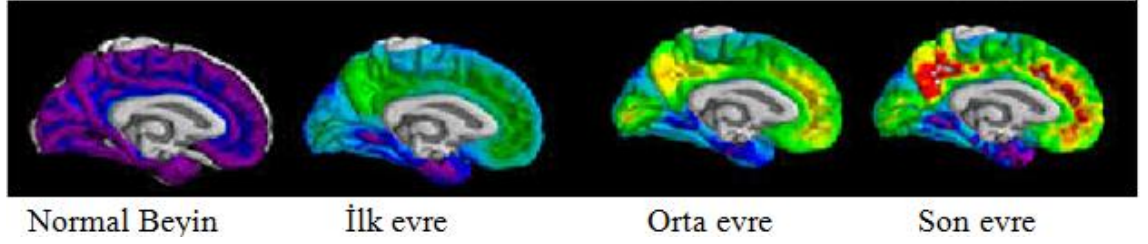
NFY' lerin temel yapısını fosforilize tau proteinleri oluşturmaktadır. Tau, mikrotübüllere bağlıdır ve mikrotübüllerin stabilizasyonunda, hücre iskeletinin bütünlüğünün korunmasında, aksonal transportta önemli rol oynar. AH sürecinde tau, gereğinden fazla fosforilize olur ve mikrotübüllere bağlanma kapasitesi azalır. Bağlanmayan tau proteini, çift sarmallı lifler halinde hücre içine çökerek NFY' ları oluştururlar (**Şekil 2.6**). Akson ve denrit çıkıntılarında bulunan NFY' lar nöropil iplikler olarak adlandırılırlar. Bu lezyonlarda amiloid plaklar da yer aldığına nöritik plak ortaya çıkmış olur. Hücre içi oluşumlar olan NFY' ler hücre içine artık sığmayacak derecede biriktiğinde hücreyi parçalarlar ve hücre dışına yayılırlar. Bunlara hayalet yumak adı verilir.³⁴



Şekil 2.6. Nörofibril Yumaklar

Görünür bir zihinsel işlev bozukluğu olmayan, altmış yaşını geçmiş her bireyde NFY bulunmaktadır. Amiloid plaklarda olduğu gibi NFY'lerin dağılım özelliklerinin kendine özgü tarzı vardır. Bu tarz, aynı zamanda, normal yaşlılıktan AH sürecine geçişi ve hastalığın klinik olarak erken evreden ileri evreye doğru nasıl dönüştüğünü de yansıtmaktadır. Aynı yaşta fakat demansı olan bir bireyde NFY sayısı daima artmıştır. NFY'lerin ilk görüldükleri yer hafızayla bağlantılı bölgeleri etkileyen entorinal-transentorinal korteks bölgesidir. Zamanla beynin diğer korteks bölgelerini ve en sonunda primer motor-duysal alanlar ekseninde yayılırlar. NFY'lerin, limbik-paralimbik-heteromodal neokortikal ekseninde dağılım özelliklerini sistematik olarak inceleyen ve böylece AH'nin patolojik olarak evrelere ayrılmasını yapan Braak ve Braak'tır.³⁵

Seksen beş otopsi olgusunu gümüş boyama yöntemleriyle inceleyen Braak ve Braak, tüm süreci 6 evreye ayırdılar. Evre I ve II'nin erken AH'yi, evre III ve IV'nin orta evre AH'yi, evre V ve VI'nin ileri evre AH'yi temsil ettiğini ileri sürmüşlerdir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Alzheimer Evreleri

2.6. Alzheimer Hastalığı' nda Metallerin Önemi

Beynin birçok hücrenel sürecinde metal iyonlar görev almaktadır. İleri yaşlarda bakır, alüminyum, demir ve çinko gibi metal iyonlarının beyinde daha yoğun miktarda olduğu belirlenmiştir. Birçok çalışma göstermektedir ki Alzheimer hastalığında non fizyolojik alüminyum iyonları kadar bakır, çinko ve demir biyometalleri de önemlidir. Bu çalışmalara göre AH' lığında bu metaller A β peptidinin agregasyonunu sağlayarak ve A β tarafından reaktif oksijen türlerinin üretilmesi ile iki farklı şekilde etki göstermektedir.³⁶

Cu: AH patogenezinde bakırın rolü birçok önemli çalışmalarda incelemelere konu olmuştur.³⁷ Bu çalışmalarda elde edilen en önemli bulgulardan biri beyin ekstraselüler boşluğunda bakır fazlalığının olduğu görülmüştür.³⁸ Lovell ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda 0.2-1.7 μ mol konsantrasyonlarda normal beyin ekstraselüler sıvı ile karşılaştırıldığında amiloid plaklarında daha yüksek miktarda bakır olduğu bulunmuştur.³⁹ Bu ekstraselüler sıvıda bulunan bakır birikimine A β peptidine bağlanmış olan bakır tarafından gerçekleştirilmiş olabilir

Bakır iyonlarının bir yandan amorf agregatları geliştirdiği bir yandan da bakırın fibril formlarını indirgediği iddia edilmektedir.⁴⁰ Bunun yanısıra A β peptidine bağlı Cu, Cu(II) nin Cu(I)' e indirgenmesi yoluyla hidrojen peroksit üretimi ve fenton reaksiyon yoluyla çok toksik radikalın farklı türleriyle sonuçlanabilir. Sonuç olarak farklı nöronal ölümler ve oksidatif strese bağlı olay silsilesi meydana gelir.⁴¹

Fe: Demir redoks aktif bir metaldir ve AH patolojisine katkısı hala net değildir.Yapılan patolojik çalışmalarda, AH plaklarında demir konsantrasyonun normalin neredeyse 3 katı kadar fazla olduğu tespit edilmiştir.³⁹

Ek olarak demirin nörofibril yumaklarla nöronlarda biriktiği bulunmuştur.⁴² Fe⁺³ iyonları hiperfosforilize edilmiş Tau proteini ile bağlanır ve AH' de nörofibril yumakların oluşmasına yol açar. Bu süreç Fe⁺³ nin Fe⁺², ye indirgenmesi ile düzeltilebilir.³⁶

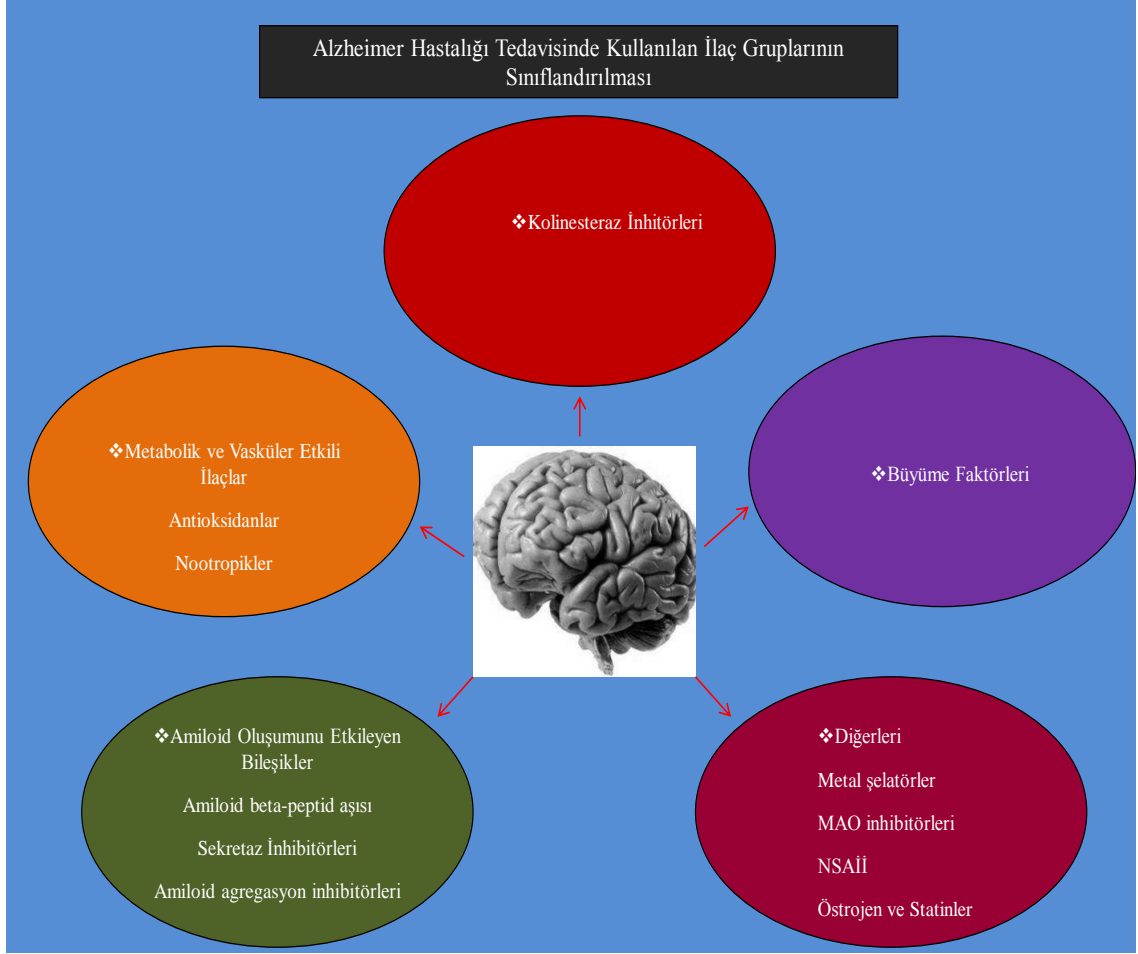
Bununla birlikte, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel ilaç olarak kullanılmak üzere kullanılacak şelatörlerin, belirli özelliklere sahip olması gerekir. Bunlar; düşük bir molekül ağırlığına sahip olmalı, kan-beyin bariyerini rahat geçebilmeli ve özellikle bazı metal iyonları hedeflemelidir. Şelatör bileşik, beyinde proteinlerde fazla miktarda bulunan metal bağlanabilmeli ve çözünürlüğü artırarak fazla miktardai metalin elimine olmasına olanak sağlayabilmelidir. Son olarak, herhangi bir şelatör ile yan etkileri azaltılmış ve düşük toksisiteli bir ilaç ile başarılı bir tedavi sağlanabilir.³⁶

2.7. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Farmakolojik Yaklaşım

Alzheimer hastalığının patogenez ve patofizyolojisi tam olarak aydınlatılmadığından, bugün için yeterli ve tam önleyici bir tedavisi bulunmamaktadır. Alzheimer hastalığının standart ve etkin bir tedavi protokolü yoktur. Temel sorun nöron kaybı ve kolinerjik sistemdeki azalmadır. Kolinerjik etkinliğin artırılması hastanın yaşam kalitesinde ve hastalığın ilerlemesinde düzelmeye sağlarken nöron kaybı geri dönüştürülemez. Alzheimer hastalığında verilen kolinesteraz inhibitörleri mortaliteyi etkilememekte, ancak hastanın yaşam kalitesinde ve hastalık evresinde stabilizasyon sağlamaktadır.⁴³ Hastanın kognitif kapasitesinde bir değişiklik olmaması ya da azalma olması, tedavi başarısızlığı anlamına gelmez. Bu sebeple ilaçlara düzenli olarak devam

edilmelidir. İleri evre demansta tedavi tartışmalıdır. Ancak ortaya çıkan davranış bozukluklarının tedavisine katkı açısından kolinesteraz inhibitörlerine devam edilebilir.⁴³

Alzheimer hastalığında kullanılan ilaç grupları **Şekil 2.8**' de gösterildiği şekilde sınıflandırılabilir:



Şekil 2.8. Alzheimer Tedavisinde Kullanılan İlaç Grupları

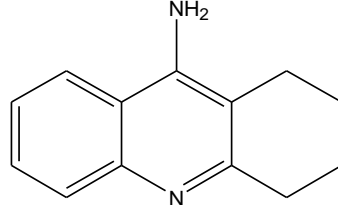
2.7.1. Kolinesteraz İnhibitörleri

Alzheimer hastalığında, özellikle serebral korteks ve beyin sapında kolinerjik sistemle ilgili nörotransmisyon yetmezliği, hastalığın patogenezi ve tedavi hedeflerini belirlemektedir. Bu kolinerjik yetmezlik sonucunda amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar oluşmaktadır. Kolinerjik sistem fonksiyonlarının artırılması önemli düzelmeler sağlamaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolinin intrasınaptik yıkılımını geciktirmekte ve etkisini uzatmaktadır. Ayrıca, muskarinik ve nikotinik etkilerle toksik amiloid prekürsör oluşumunu azaltır, büyüme faktörlerinin sentezini artırır, nöronal dejenerasyonu azaltır.^{44, 45} Kolinesteraz inhibitörlerinin etkinliği, sağlam kolinerjik nöronların varlığına bağlıdır, bu sebeple tedaviye mümkün olduğunca erken başlanmalıdır ve tedavi aralıksız sürdürülmelidir. Bu grup ilaçların en sık yan etkileri gastrointestinal sisteme aittir.

Takrin

Takrin, 1960' larda süksinilkolinin oluşturduğu çizgili kas felcini uzatmak için kullanılmış olan bir ilaçtır. Kan-beyin engelini geçer, eliminasyon yarılanma ömrü plazmada 3 saat olmasına rağmen beyinde bu süre beklenenden uzundur. Asetilkolinesteraz ve butilkolinesterazın geri dönüşümlü, kompetitif inhibitörüdür. Deneysel çalışmalarda serotonin, noradrenalin ve dopamin salıverilmesi ve dönüşümünü de arttırdığı gösterilmiştir. Hafif ve orta şiddette Alzheimer olgularında % 15-30 arası düzelmeye yaptığı, ilerlemiş olgularda yeterli etki göstermediği saptanmıştır.

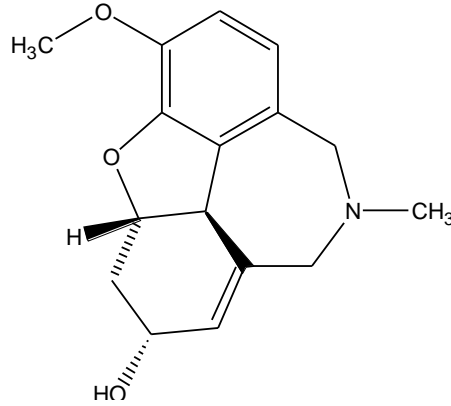
Sitokrom P450 ile aktif metabolite dönüşen takrinin kolinerjik yan etkiler dışında hepatotoksitesisi nedeniyle kullanımı sınırlı kalmış, hastalara ancak tolere edebildikleri sürece verilmiştir.⁴⁶ Takrin, ilaç-ilaç etkileşimleri ve ilaç-besin etkileşimlerinde sebep olduğu önemli yan etkileri nedeniyle kullanımı kısıtlı kalmış olup yerine yeni kolinesteraz inhibitörleri geliştirilmeye başlanmıştır.



Şekil 2.9. Takrin: [1,2,3,4-Tetrahidroakridin-9-amin]

Galantamin

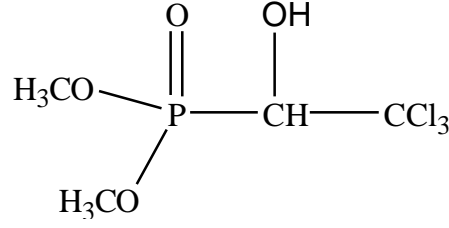
Galantamin, çok yeni olarak tanımlanmış, geri dönüşümlü, kompetitif ve selektif kolinesteraz inhibitörüdür. Bunun yanı sıra nikotinik reseptörleri allosterik olarak modüle ettiği bildirilmiştir.⁴⁷ Bu iki yönlü etki galantaminin, mevcut ilaçlardan yarar görmeyen Alzheimer hastalarında, kullanımını çekici hale getirmiştir.⁴⁸



Şekil 2.10. Galantamin: (4aS,6R,8aS)-5,6,9,10,11,12-Hekzahidro-3-metoksi-11-metil-4aH- [1]benzofuro[3a,3,2-ef] [2] benzazepin- 6-ol

Metrifonat

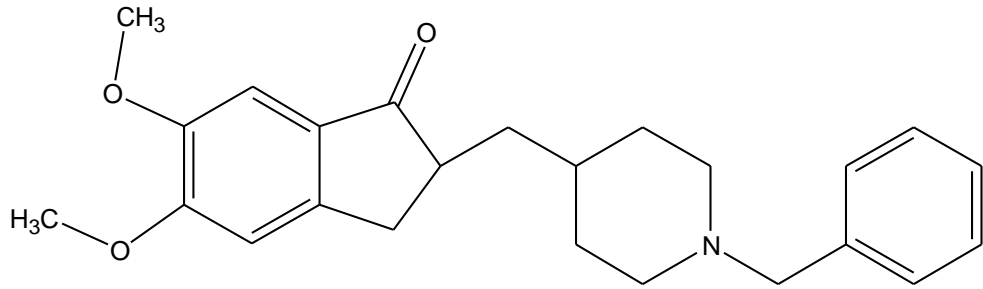
Nonselektif, uzun etkili geri dönüşümsüz kolinesteraz inhibitörlerindedir. Antihelmintik etkilidir. Günde tek doz verilebilir. Kas güçsüzlüğü yapar. Geri dönüşümsüz kolinesteraz inhibitörleri, yan etkileri nedeniyle tedavide kullanılmamaktadır. Bu sebeplerle Alzheimer hastalığı patogenezindeki kolinerjik sistemdeki azalmaya etkili tek ilaç grubu olan kolinesteraz inhibitörlerinden, sadece donepezil ve rivastigmin ülkemizde kullanımdadır.⁴³



Şekil 2.11. Metrifonat: Dimetil (2,2,2-trikloro-1-hidroksietil) fosfonat

Donepezil

Geri dönüşümlü spesifik asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Hepatotoksik yan etkilerinin olmaması, kolinesteraz inhibitörleri arasında en az yan etkili ilaç oluşu ve günde tek doz kullanım olanağı, ilacın en önemli avantajlarıdır.⁴⁹ Akrin bağlı kolinesteraz inhibitörlerinin aksine piperidine bağlıdır ve hepatotoksik yan etkisi yoktur. Kognitif fonksiyonlarda % 50-70 düzelme olduğu gösterilmiştir. Asetilkolinesteraz inhibisyonu olmadığı için yan etkileri belirgin olarak azdır. Hafif ve orta evre Alzheimer hastalığında tercih edilirken, ileri evre demansta da limbik sisteme olan etkileri ile davranış bozuklukları üzerine olumlu etkileri vardır.⁵⁰ Nadir yan etkileri arasında bulantı, kusma, uykusuzluk, yorgunluk hissi vardır.⁴³

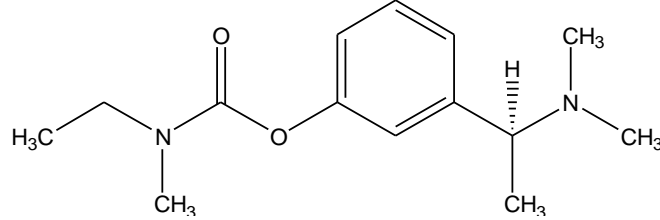


Şekil 2.12. Donepezil: 2-[(1-Benzil-4-piperidil)metil]- 5,6-dimetoksi-2,3-dihidroinden-1-on

Rivastigmin tartarat

Asetilkolinesteraz ve butilkolinesterazı birlikte inhibe eder. Butilkolinesteraz artışı ile amiloid plakların oluşumu ve Alzheimer hastalığı riski artışı arasında korelasyon vardır. İştah, halüsinasyonlar, huzursuzluk, öfori, gece problemleri gibi

davranış bozukluklarına diğer kolinesterazlar gibi etkisi vardır.⁴³ Kognitif kapasiteye etkisi, genel olarak % 30-50 düzelme yönündedir.¹⁴ Kognitif kapasiteye etkisi, genel olarak % 30-50 düzelme yönündedir.³³ Gastrointestinal yan etkiler, doz arttırımı gerekliliği sebebiyle donepezile göre daha fazladır.

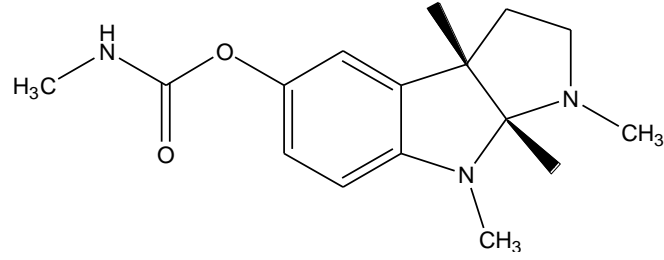


Şekil 2.13. Rivastigmin: 3-[1-(Dimetilamino)etil]fenil N-etil-N-metilkarbammat

Fizostigmin

Alzheimer hastalığında ilk olarak intravenöz veya oral fizostigmin denenmiştir. Fizostigmin, bir alkaloid olup salisilat ve sülfat tuzları kullanılır. Sudaki solüsyonu oldukça dayanıksızdır. Mide-barsak kanalından ve tüm mukozalardan kolaylıkla absorbe edilir. Vücutta hidroliz suretiyle çabuk inaktivasyona uğrar. Lipofilik olması nedeniyle, santral sinir sistemine (SSS) girebilen bir ilaçtır. SSS ve periferik sinir sistemindeki kolinerjik sinapslarda asetilkolinesteraz enzimini geri dönüşümlü olarak bloke ederek kolinerjik transmisyonu arttırır.

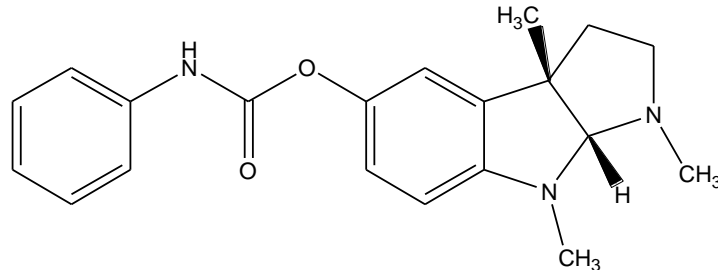
Fizostigmin, asetilkolin prekürsörleri ile birlikte demans tedavisinde kullanıldığında, bellek ve davranışta istatistiksel olarak anlamlı iyileşme sağlamış, ancak bu bulgular tekrarlanamamış ve hastaların klinik iyileşmesinde bir gelişim gözlenememiştir.⁵¹



Şekil 2.14. Fizostigmin: 1,2,3,3a,8,8a-Hekzahidro-1,3a,8-trimetilpirolo[2,3-b]indol-5-ol

Fenserin

Fenserin, fizostigminin fenilkarbamat türevi olup, fizostigmin ve takrine göre toksisitesi daha azdır. Çabuk absorbe olur ve beynin kolinerjik fonksiyonunda uzun süreli uyarı yapar. Asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibe edici etkisini, metabolitleri eserolin ve noreserolinin 4-hidroksifenilkarbamat türevleri ile göstermektedir. Fenserinin bir diğer özelliği de; asetilkolinesteraz inhibisyonu yapmasının yanında, Alzheimer hastalığının oluşma mekanizmalarından biri olarak kabul edilen β -amiloid plak oluşumunda rol oynayan β -amiloid prekürsör proteinini azaltmasıdır.^{33, 52}



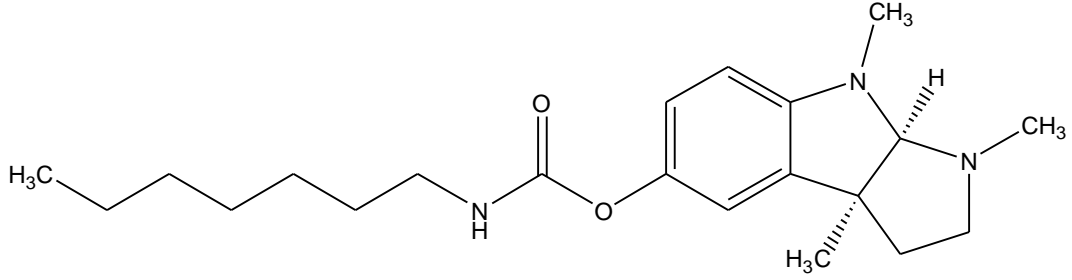
Şekil 2.15. Fenserin: Fenil-karbamik asit-1,3a,8-trimetil-1,2,3,3a,8,8a-hekzahidropirolo[2,3-b]-indol-5-il ester

Eptastigmin

Eptastigmin, uzun etki süreli, oldukça potent yeni bir kolinesteraz inhibitörüdür. Plasebo kontrollü Alzheimer tanısı konulan 349 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada,

tedavi sonrası hastaların bu ilacı iyi tolere ettiği ve kognitif performansda pozitif yönde bir gelişme olduğu gösterilmiştir.⁵³

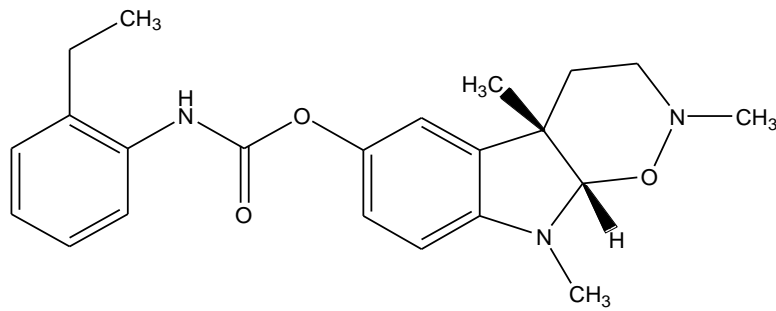
Ancak bu ilacın kolinerjik yan etkileri yanı sıra nötropeni yaptığı ve hematoloji yan etkilerinin olması bu ilacın kullanımını kısıtlamıştır.



Şekil 2.16. Eptastigmin: Heptil-karbamik asit 1,3a,8-trimetil-1,2,3,3a,8,8a-hekzahidro-pirol[2,3-b]indol-5-il ester

Ganstigmin

Ganstigmin AH tedavisi için geliştirilen yeni çıkmış oral olarak aktif seçici AChE inhibitörüdür. Bütilkolinesteraza kıyasla bu bileşik AChE enzimine karşı 115 kat daha güçlüdür. Ayrıca bileşik periferik AChE inhibisyonundan ziyade merkezi AChE inhibisyonu için daha seçicidir.⁵⁴

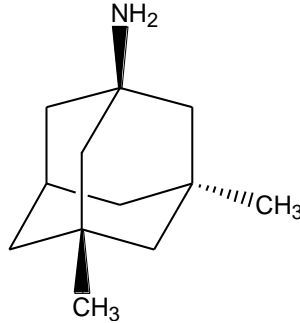


Şekil 2.17. Ganstigmin: 2-Etilfenil-karbamik asit-2,4a,9-trimetil-2,3,4,4a,9,9a-hekzahidro-1-oksa-2,9-diaza-fluoren-6-il-ester

Memantin

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi “Food and Drug Administration” tarafından Alzheimer hastalığı tedavisi için onay verilen son ajan olan memantin, glutamaterjik eksitotoksisiteyi önleyerek özellikle hipokampal nöronlar üzerinde nöroprotektif etkisiyle Alzheimer hastalığında semptomatik düzelmeye sağlayabilir. Beyindeki ana nörotransmitter olan glutamatın tüm beyin nöronların % 70’inde reseptörü bulunur ve memantin bir glutamat reseptörü olan N-metil-D-aspartat antagonistidir. Glutamaterjik iletideki değişiklik bellek ve öğrenme için belirlenmiş en iyi modeldir. Aşırı aktivasyonu nöronal hücre ölümüne neden olur. Buna Alzheimer hastalığında biriken amiloid-β’ nin glutamat alımını azaltarak, salınımını arttırarak ve glutamat reseptör aktivitelerini etkileyerek neden olduğu düşünülmektedir.⁵⁵

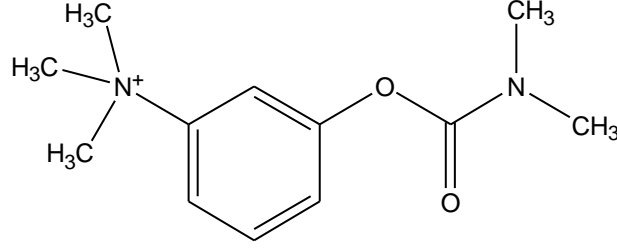
İlk olarak diyabetli hastalarda kullanılan memantin, daha sonraki çalışmalarda ilaç, hayvan modellerinde kognisyon ve öğrenme üzerinde pozitif etkileri olduğu gösterilmesinden sonra, son 15 yıldır, özellikle Alzheimer hastalığı olmak üzere birçok demans türü üzerinde etkinliği çalışılmıştır. Çalışmalarda dikkat çeken husus yüksek etkinliğin yanında oldukça düşük oranlarda görülen yan etkilerdir. Tüm bu çalışmaların sonucu olarak memantin 2002 yılında FDA tarafından orta-ileri evre Alzheimer hastalığı tedavisinde ruhsatlandırılmıştır.⁵⁶



Şekil 2.18. Memantin: 3,5-Dimetiladamantan-1-amin

Neostigmin

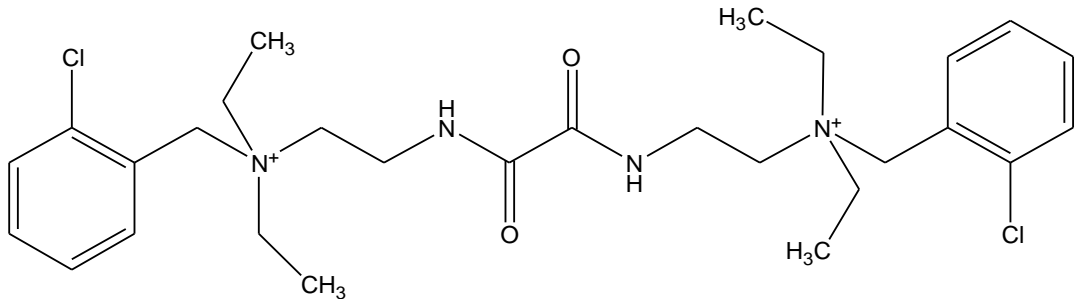
Neostigmin belli bir kas hastalığı olan miyasteniya gravis hastalığında kullanılır. Alzheimer hastalığında asetilkolin hidrolizini durdurarak kolinerjik etkiyi artırması özelliğinden faydalanılarak kullanılabilir. Oral biyoyaralanımı iyidir ve kan beyin engelini kolayca geçer.⁵⁷



Şekil 2.19. Neostigmin:3-[[[(Dimetilamino)karbonil]oksi]-N,N,N-trimetilbenzenaminyum

Ambenonyum klorit

Ambenonyum miyasteniya gravis hastalığında asetilkolinesteraz ile yarışmalı inhibisyona girerek asetilkolini hidrolize eden bir bileşiktir. Asetilkolinesteraz inhibitörü olan ambenonyum klorür yapısında bulunan kuaterner amonyum yapısı yüzünden kan beyin engelini çok zor geçtiğinden Alzheimer hastalığında kullanılamamıştır. Alzheimer hastalığında yeni bileşiklerin değerlendirilmesinde in vitro çalışmalarda AChE ve BuChE' a karşı etkinliğinin ölçülmesinde bir parametre olarak kullanılmıştır.⁵⁸



Şekil 2.20. Ambenonyum klorit: 2,2'-[(1,2-Dioksoetan-1,2-diil)diimino]bis[N-(2-klorobenzil)-N,N-dietiletanaminyum]

2.7.2. Metabolik ve Vasküler Etkili İlaçlar

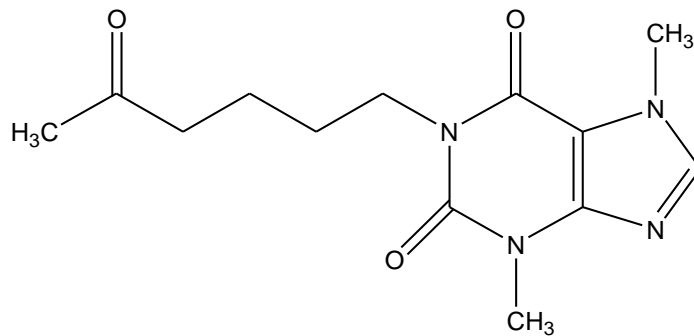
Antioksidan İlaçlar

Amiloid beta-proteini, serbest radikal oluşumuna yol açar. Serbest radikal birikimi ve lipid peroksidasyonu ile nöron hasarı gerçekleşir. Antioksidan ilaçlar amiloid proteinin toksisitesini azaltır. Serbest radikal antagonistleri (propentofilin, pentoksifilin, ginkgobiloba ekstreleri), L-carnitine (mitokondrilerde uzun zincirli yağ asitlerinin birikimini azaltır), vitamin E ve vitamin C bu amaçla kullanılabilir. Vitamin E' nin Alzheimer hastalığı progresyonunu yavaşlattığı bildirilmiştir.⁴⁵ Vitamin E ve C' nin vasküler demansta etkileri daha belirgindir.

Ginkgobiloba ekstrelerinin Alzheimer hastalığında kullanılmaları ile kognitif düzelme olduğu gösterilmiştir. Vasküler demans ve Alzheimer birlikteliğinde etkileri daha belirgindir.⁵⁹

Etki mekanizmaları; kolinerjik ve seratonerjik sisteme etki, antioksidan etkiler, platekelet agregasyonunun inhibisyonu, serebral hücrelerin glikoz kullanımının artması ile olur.⁶⁰ Özellikle kolinesteraz inhibitörleri ile birlikte kullanımı önerilmektedir. Alzheimer hastalığında tek başına kullanımları uygun değildir.⁶¹

Pentoksifilin; antioksidan etkili, vazodilatasyon yapan, hipokampüsteki nöron hasarını azalttığı gösterilmiş bir fosfodiesteraz inhibitörüdür.



Şekil 2.21. Pentoksifilin: 3,7-Dimetil-1-(5-okso-hekzil)-3,7-dihidro-1H pürin-2,6-dion

2.7.3. Büyüme Faktörleri

Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

İntratekal ve nazal sprey formları vardır. Kullanımı zor, pahalı ve etkileri tartışmalıdır. Beyinde kolinerjik sistemi aktive eder. İdebenon ve propentofilin gibi ilaçlar NGF' yi stimüle ederek kognitif kapasitede düzelme sağlayabilir. Ancak çalışmalar kısıtlıdır.⁵

2.7.4. Amiloid Oluşumunu Engelleyen İlaçlar

Antiamiloid Strateji ve Alzheimer Aşısı

Nörotik plaklar amiloid proteinlerinden oluşur. Öncül madde olan amiloid prekürsör proteinlerinden, sekretaz enzimleri aracılığı ile amiloid protein oluşur. Beta ve gama sekretazların amiloid birikimi ve yıkımı ile ilgili aktiviteyi azalttığı bilinmektedir.⁵ Ayrıca, apolipoprotein E₂ analogu maddelerin geliştirilmesi ile oluşacak ilaçlar gelecekte tedavide kullanılabilir. A β 42 proteinine karşı geliştirilen antikolar aracılığı ile oluşturulan Alzheimer aşısının ensefalit yapması sebebi ile aşı çalışmalarına 2001 yılında ara verilmiştir. Ancak giderek daha sık görülen bir sağlık sorunu haline gelen demansın önlenmesine yönelik aşı çalışmalarının sürmesi beklenmektedir.

β , α , γ -Sekretaz İnhibitörleri

Alzheimer hastalığını tedavi etmek veya oluşumunu engellemek için, A β 42' nin neden olduğu amiloid plak oluşumunu inhibe etmek ya da azaltmak en temel yaklaşımdır. Çökmek suretiyle plak oluşumuna neden olan A β peptit sentezinde rol alan sekretaz enzimlerini inhibe etmek üzerine çalışmalar yapılmıştır.⁶² APP' nin A β bölgesinde β sekretaz enzim aktivitesini inhibe eden çeşitli aspartil proteaz katalizörü maddeler yapılmıştır. Bunlar genellikle aspartatları kataliz eden iki hidroksietil grubu içeren statin benzeri bileşiklerdir. Bu grup bileşiklerle hastalığın patogenezinde rol alan

A β sentezi, başlangıç döneminde inhibe edilmiş olur. Ancak bu tür bileşiklerin membrandan geçişi zayıftır.⁶³

Amiloid Agregasyon İnhibitörleri

Mutasyona bağlı oluşan A β ' ların fibrillerde ve oligomerlerde birikmesini veya toplanmasını durdurmak, nörotik plakların oluşmasını engellemektedir. Bazı kritik konsantrasyonlarda A β ' lar solüsyon içerisinde stabil olarak kalmamakta ve çökmektedir.⁶⁴

Kolilamit PP1 368, D-peptid PP1 1019 ve L-peptid iAB5p bileşiklerinin yapıları in vitro deneyler sonucunda fibril oluşumunu engellediği ve böylece A β çökmesini önlediği bulunmuştur. Alzheimer hastalığının tedavisinde katkısı olabileceği düşünülmektedir.⁶⁵

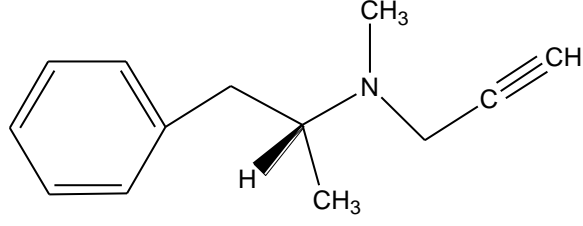
2.7.5. Diğerleri

Metal Şelatörleri

Beyinde biriken metal iyonları A β agregasyonuna sebep olarak Alzheimer hastalığının oluşumuna yol açar. Alzheimer hastalığına beyinde biriken bu metalleri uzaklaştırmak amacıyla metal şelatörler kullanılabilir. Bu amaçla dezferroksamin ve kliokinol isimli metal şelatörler kullanılmıştır. Metal iyonlarının azaltılması veya uzaklaştırılması beyinde A β birikimini azaltarak hastalığın ilerlemesini yavaşlatmıştır.

MAO-B İnhibitörleri

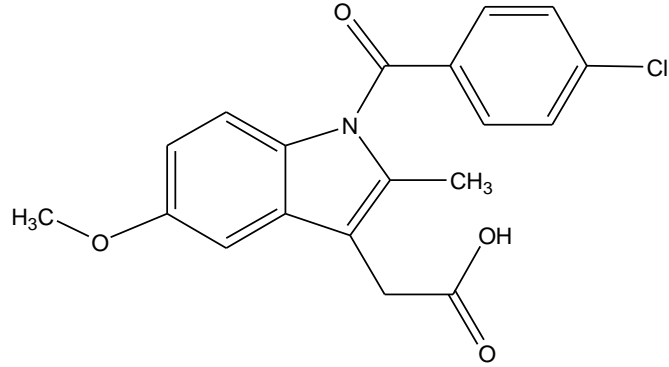
Alzheimer hastalığında beyin MAO-B aktivisinde, özellikle hipokampüste belirgin artış olduğu tespit edilmiştir. Bu enzim ile oksidatif hasarın arttırıldığı düşünülmektedir. Selegilin gibi MAO-B inhibitörleri Alzheimer tedavisinde denenmiştir.



Şekil 2.22. Selegilin: N-Metil-N-(1-fenilpropan-2-il)prop-1-in-3-amin

Antienflamatuvar İlaçlar

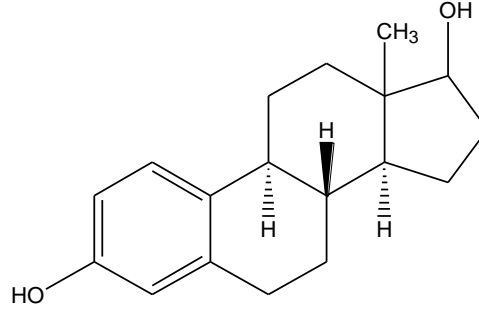
Amiloid proteinine bağlı hasarın enflamasyon aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Nörodejenerasyona yol açan inflamatuvar mekanizmalar kompleman aktivasyonu, mitokondri aktivasyonu, sitokin reaksiyonları şeklindedir. Nörotik plaklar beta-amiloidden ve birçok enflamasyon ürününden oluşmaktadır. Bu inflamatuvar mediatörler, amiloid plağı çözünmez ve kompakt bir hale getirirler. C-reaktif protein ve antikomotripsin gibi akut faz reaktanları Alzheimer hastalarında yüksek bulunmuştur.⁶⁶ Antikomotripsin amiloid proteinin en önemli bileşenidir. Steroid ya da NSAİ kullananlarda Alzheimer hastalığının daha az görüldüğü gösterilmiştir.⁶⁷ İndometazin bu amaçla önceki yıllarda sıklıkla demans tedavisinde kullanılmış ancak belirgin yan etkileri nedeni ile kullanımı azalmıştır.⁶⁸



Şekil 2.23. İndometazin: (1-(4-Klorobenzoil)-5-metoksi-2-metil-1H-indol-3-il)-asetik asit

Östrojen

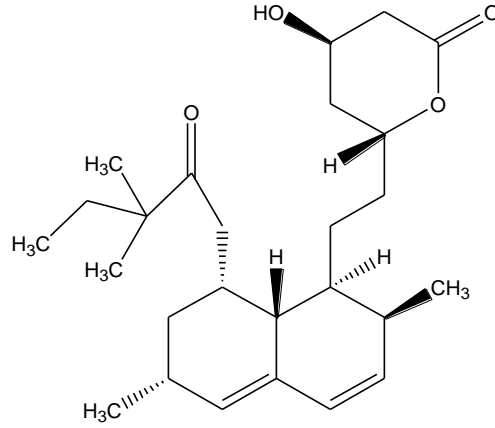
Östrojenin Alzheimer hastalığından koruyucu etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar vardır.⁶⁹ Östrojen sinir büyüme faktörünü artırır, amiloid metabolizmasında rolü ve antioksidan etkileri vardır. Östrojenin beta-amiloid peptid birikimini azaltabileceği in vitro ortamda gösterilmiştir. Halen östrojenin Alzheimer hastalığını önleyici etkilerini inceleyen uzun süreli çalışmalar sürmektedir.



Şekil 2.24. Östrojen: 13-Metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahidro-6H-siklopenta[a]fenantren-3,17-diol

Statinler

Son yıllarda hiperlipidemi için statin kullanan hastalarda, ilaç kullanmayanlara ve normolipidemik kişilere göre demans riskinin daha az olduğunu bildiren yayınlar vardır.⁷⁰ Statinlerle tetiklenen kolesterol düzeyindeki azalma, APP metabolizmasını değiştirdiği ve APβ' nin üretimin azalttığı düşünülmektedir. Statinlerin demanstaki koruyucu ve tedavi edici yönleri konusunda çalışmalar sürmektedir.⁷¹



Şekil 2.25. Simvastatin: 1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2-[(2R,4R)-4-Hidroksi-6-oksotetrahidro-2H-piran-2-il]etil}-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-hekzahidronaftalen-1-il 2,2-dimetilbutanoat

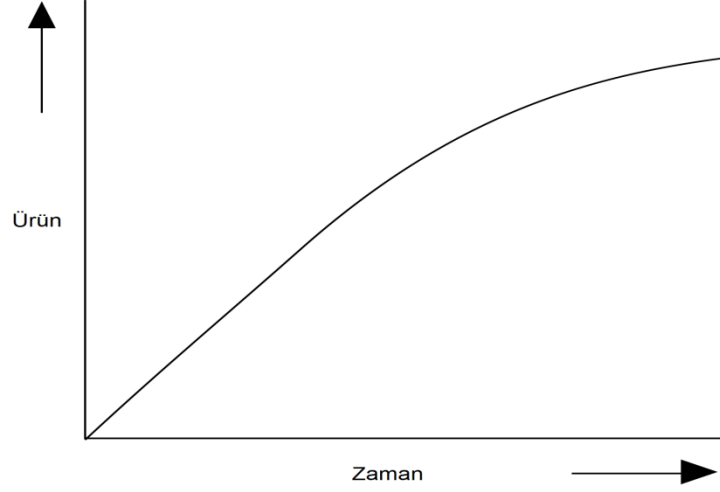
2.8. Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyonların bilimidir. Enzim kinetiğinde reaksiyon hızı ölçülür ve reaksiyon şartlarını değiştirmenin etkisi araştırılır. Bir enzimin kinetiğinin bu şekilde çalışılması enzimin katalitik mekanizmasını, metabolizmadaki rolünü, aktivitesinin nasıl kontrol edildiğini ve bir ilaç veya zehrin enzimi nasıl inhibe edebileceğini ortaya koyabilir.

Enzim ölçümleri; enzim reaksiyonunun hızını ölçen laboratuvar yöntemleridir. Enzimler katalizledikleri reaksiyonlar tarafından tüketilmediği için, enzim ölçümlerinde reaksiyon hızını takip etmek için genelde ya substrat konsantrasyonu ya da ürün konsantrasyonu izlenir. Ölçüm için spektrofotometrik ve radyometrik ölçümler gibi pek çok yöntem vardır.²¹

Bir enzim ölçümü için bir ilerleme eğrisi örneği **Şekil 2.26'** te gösterilmiştir. Enzim, reaksiyonun başlamasında sonra kısa bir süre için doğrusal şekilde ürün meydana getirir. Reaksiyon ilerledikçe ve substrat tüketildikçe, hızı substrat doyum seviyesinde olmadığı sürece gittikçe azalır. İlk ve en yüksek hızı ölçmek için, enzim ölçümleri tipik olarak substratın sadece yüzde birkaçı tüketilene kadar yapılır. Bu ilk hız döneminin uzunluğu ölçüm şartlarına bağlıdır ve milisaniyelerden saatlere kadar

değişebilir. Ancak, sıvıların çok hızlı karışmasını sağlayan araçlar, bir saniyeden kısa sürelerde ilk hızların ölçülebilmesini olanak verir.²¹



Şekil 2.26. Bir Enzim Reaksiyonu İçin İlerleme Eğrisi

Enzim kinetiğinin araştırılması iki temel nedenden dolayı önemlidir. Birincisi, enzimlerin nasıl çalıştığının anlaşılmasını sağlar. İkincisi, enzimlerin organizmalarda nasıl davrandığını öngörmeye yardımcı olur.⁷²

2.9. Kimyasal Reaksiyonlarda Kullanılan Sentez Yöntemleri

2.9.1. Konvansiyonel (Klasik) Sentez Reaksiyonları

Harici bir ısı kaynağı (örneğin; yağ ve su banyoları, manyetik ısıtıcı-karıştırıcılar v.b.) kullanılarak geleneksel olarak gerçekleştirilen organik sentez yöntemleridir. Bu yöntemlerde sisteme enerji transfer etmek nispeten daha yavaş, dolayısıyla uzun süreli, enerji sarfı bakımından maliyetli ve düşük verimli olabilmektedir. Çünkü ısının sisteme etki etmesi kullanılan ısı kaynağı ve çeşitli metaryellerin ısı iletkenliğine bağlıdır. Negatif yönleri olmasına rağmen, günümüz sentez kimyasında reaksiyonların büyük çoğunluğunun konvansiyonel ısıtma yöntemleri kullanılarak yapıldığı gözlenmektedir.

2.9.2. Mikrodalga Işıma Destekli Sentez Reaksiyonları

Organik sentezlerde amaç uygun şartlarda uygun ürünlerle reaksiyonların optimizasyonudur. Birçok reaksiyonda bir veya birden fazla uzun periyotlarda ki ısıtma işlemi optimizasyonu zor ve zaman alıcı hale getirmektedir. Bu yüzden mikrodalga yardımlı ısıtma ile yapılan sentezlerin sonuçları bu yöntemin ilaç kimyası için çok değerli bir teknoloji olduğunu göstermektedir.

Mikrodalğanın organik reaksiyonlar kullanılması 1980' lerin ortalarından sonra olmuştur. İlk sonuçlar 1986' da Richard Gedye ve bir grup bilim adamı tarafından verilmiştir. Yapılan sentezlerin sonucunda mikrodalga enerjisi ile ısıtmada sentez için kullanılan çözücülerin çabuk ve aşırı ısınması patlamalara neden olmuştur. Bu nedenle 1990' lı yıllarda bazı bilimsel gruplar çözücüsüz reaksiyonları denemeye başlamıştır.⁷³

Benzamit'in hidrolizi, mikrodalga destekli organik sentezin yayınlanmış ilk örneğidir. Buna göre benzamit konvansiyonel yöntemle 1 saatte % 90 oranında hidroliz olurken mikrodalga ile ısıtmada 10 dk' da % 99 oranında hidroliz olmuştur.

Mikrodalga ısıtma ile yapılan kimyasal sentezlerde reaksiyon süreleri günler ve saatlerden dakikalara hatta saniyelere kadar azalma göstermiştir.⁷³

a. Mikrodalga Sentez Yönteminin Avantajları

- İşlem hızı klasik metotlardan daha hızlıdır.
- Kimyasal maddeleri direkt olarak ısıtır.
- Karışımlarda seçici ısıtma sağlar.
- Mikrodalga ekipmanları otomatik sistemlerle kolaylıkla adapte edilebilir ve güç seviyesi elektronik olarak görülebilir.
- Klasik ısıtmanın aksine, sıcaklık gradyeni üreten volümetrik bir işlemdir.

- Kayıp faktörü sıcaklık belirli bir kritik sıcaklığa ulaştığı zaman hızla yükselir ve bu durum mikrodalga ile ısıtılan maddenin sıcaklığında ani bir yükselme meydana getirir.
- Isıtma doğrudan ve merkezdendir.
- Enerji elektromanyetik dalgalarla taşındığından ortamda enerji kaybı meydana gelmez, maddede sıcaklık gradienti minimum olur.
- Enerji maddenin içine kadar nüfuz ederek endüstriyel işlemin daha aktif ve hızlı yapılmasını sağlar.
- Sistemler kolaylıkla otomatize edilebilir.
- Uzaktan etki yapar, enerjiyi malzemeye taşıyan doğrudan bir araç bulunmaz.
- Kullanılan ortamda kirlenme olmadığından sistemin daha sağlıklı ve temiz olarak kullanılabilmesini ve sistemlerin kesikli ve sürekli olacak şekilde esnek olarak uygulanabilmesini sağlar.

b. Mikrodalga Reaksiyon Teknikleri

Geleneksel olarak organik sentezler harici bir ısı kaynağı yardımıyla gerçekleştirilir. Bu yöntem sisteme enerji transfer etmek için nisbeten yavaş, az verimli, düşük etkili bir yöntemdir. Zira, ısının nüfuz etme derecesi kullanılan çeşitli materyallerin iletkenliğine bağlıdır. Bu yolla ısıtmada reaksiyon kabının sıcaklığı, reaksiyon içeriğinden daha fazladır. Bu durum etkili iç ısıtmanın mümkün olduğu mikrodalga ısıtma metodundan farklıdır. Mikrodalga ısıtma metodunda mikrodalga enerjisi reaksiyon ortamındaki moleküllerle direkt etkileşir. Mikrodalga yönteminde kullanılan reaksiyon kapları mikrodalga enerjisini geçirir ve bu durum inverted sıcaklık gradyanını etkiler.⁷³

Çözücüsüz Reaksiyonlar

Bu reaksiyonlarda reaktifler ya mikro dalga geçiren bir maddeyle (silika, alümina, kalay) sarılır ya da güçlü adsorbe edici özelliği olan inorganik bir destek kullanılır. Özellikle ilk yıllarda bu teknoloji evde bulunan mikrodalga fırınlarla güvenli bir şekilde uygulanmıştır.⁷³

Çözücüsüz uygulamalara ek olarak faz transfer katalizi (PTC) koşulları da mikrodalga destekli organik sentez tekniklerinde yaygın olarak kullanılır. Faz transfer katalizlerinde reaktantlar ik ayrı fazda bulunur. Bunlar sıvı-sıvı veya sıvı-katı olabilir. Sıvı-sıvı PTC' de fazlar birbiri içinde çözünmediğinden, iyonik reaktifler sulu fazda çözünmüş halde bulunurken, substrattan kalanlar organik fazdadır. Öte yandan katı-sıvı PTC' de iyonik reaktifler organik ortamda süspansiyon halinde katı halde kalabilirler. Sulu veya katı fazdan organik faza anyonların transferi faz transfer kopleks ajanlarının görevidir. Organik sentezlerdeki bu transferler genellikle atmosferik basınçta ve açık kaplarda gerçekleştirilir.⁷³

Çözücülü Reaksiyonlar

Mikrodalga sentezlerde organik çözücülerin kullanımından başka su veya iyonik sıvıların kullanımı son yıllarda daha popüler hale gelmiştir.⁷³

Genellikle 100 °C ve altında gerçekleşen reaksiyonlar için çözücü olarak su kullanılır. Mikrodalga sentezler için sıcaklığın 150-300 °C olduğu subkritik alanlarda su özellikle dikkat çekmektedir. Dielektrik sabiti su için 25 °C' de 78 iken, 300 °C' de 20' dir. İkinci sıcaklıktaki değer suyun, organik çözücülerden asetonun oda sıcaklığındaki özellikleri ile benzerlik gösterir. Bu yüzden yüksek sıcaklıklarda psödo organik çözücüler gibi davranan su, bazı organik substratların çözünmesine izin verir. Ayrıca çevreye de zararlı olmadığından organik çözücülere göre daha avantajlıdır.⁷³

İyonların tamamen oluşumunu sağlayan oda sıcaklığındaki iyonik sıvılar çözücülerin yeni bir sınıfıdır. Bazı durumlarda onlar da reaktif olarak kullanılmaktadır. İyonik sıvılar, organik çözücülerle karşılaştırılmayacak derecede düşük miktarda buhar basıncına sahiptir. Oluşan organik ürünler kolayca temizlenmektedir. İyonik sıvılar geri dönüşüm özelliğine sahiptir ve geniş bir sıcaklık aralığında tutuşmama özelliği olduğundan kullanımı kolaylaştırır. Mikrodalga kimyası açısından önemli olan nokta yüksek polariteleri, katyon ve anyon gibi değişkenlere bağlı olarak belirli uygulamalar için ayarlanabilir olmasıdır.⁷³

İyonik sıvılar mikrodalga aracılı iyonik kondüksiyon mekanizmaları ile yüksek verimli olarak etkileşirler. Önemli bir miktarda basınç birikmesi olmadan hızlı bir şekilde 10 °C' yi aşan miktarlarda sıcaklık artışı sağlarlar. Böylece kapalı kaplarda ısınma sonucu gerçekleşen basınç artışları nedeniyle oluşan güvenlik sorunları minimuma iner. Bu metot diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında organik atık miktarını en aza indirir ve reaksiyon süresi azalır.⁷³

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Sentez Çalışmaları

3.1.1. Sentez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

Bileşiklerin sentezinde kullanılan 3-etilanilin, 3-fenetidin, 3-iyodoanilin, 3-bromoanilin, 3-kloroanilin, 3-floroanilin, m-toluidin, m-anisidin, 3-triflorometilanilin, tetrabutil amonyum bromür (TBAB), potasyum karbonat (K_2CO_3), trietilamin (TEA), benzilklorür, p-metilbenzilklorür kimyasal maddeler Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Sentez Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

Kromatografik Analizler

Sentez çalışmaları sırasında tepkimeyi izlemek ve sentezlenen bileşiklerin saflıklarını kontrol etmek amacıyla ince tabaka kromatografisinden (İ.T.K) yararlanıldı. İ.T.K. için 0.25 mm kalınlıktaki silikajel 60 HF₂₅₄ (Merck Art 5715) hazır kromatografi plakları kullanıldı. Kromatografi işlemi oda sıcaklığında yapıldı ve sürüklenme işlemi kromatografi tankının çözücü buharlarıyla doyurulmasından sonra gerçekleştirildi. Sürüklenme işleminden sonra açık havada kurutulan plaklar üzerindeki lekelerin belirlenmesinde 254 nm dalga boyundaki UV ışığından faydalanıldı. Saflaştırma işlemlerinde kullanılan sütun kromatografisi yönteminde adsorban olarak silikajel 60 (0.063- 0.2 mm) kullanıldı.

Spektral Analizler

Bileşiklerin UV spektrumları, etanol çözeltileri halinde 1 cm' lik kuvarz küvetlerde Thermo Electron Helios (α) (UVA114903, England) spektrofotometresinde kaydedildi. Bileşiklerin ¹H-NMR spektrumları ve ¹³C-NMR spektrumları 400 (100) MHz on a Varian spektrometresinde (Danbury, USA) Dötorokloroform (CDCl₃)' de çözümlenerek alındı. Bileşiklerin kütle spektrumları pozitif (+) elektron sprey iyonizasyon

yöntemiyle (LC-MS) VG Waters Micromass ZQ (USA) spektrometresinde alınmıştır.

Erime Noktası Tayinleri

Bileşiklerin erime dereceleri Electrothermal 9100 (USA) marka erime derecesi tayini cihazı kullanılarak tespit edildi.

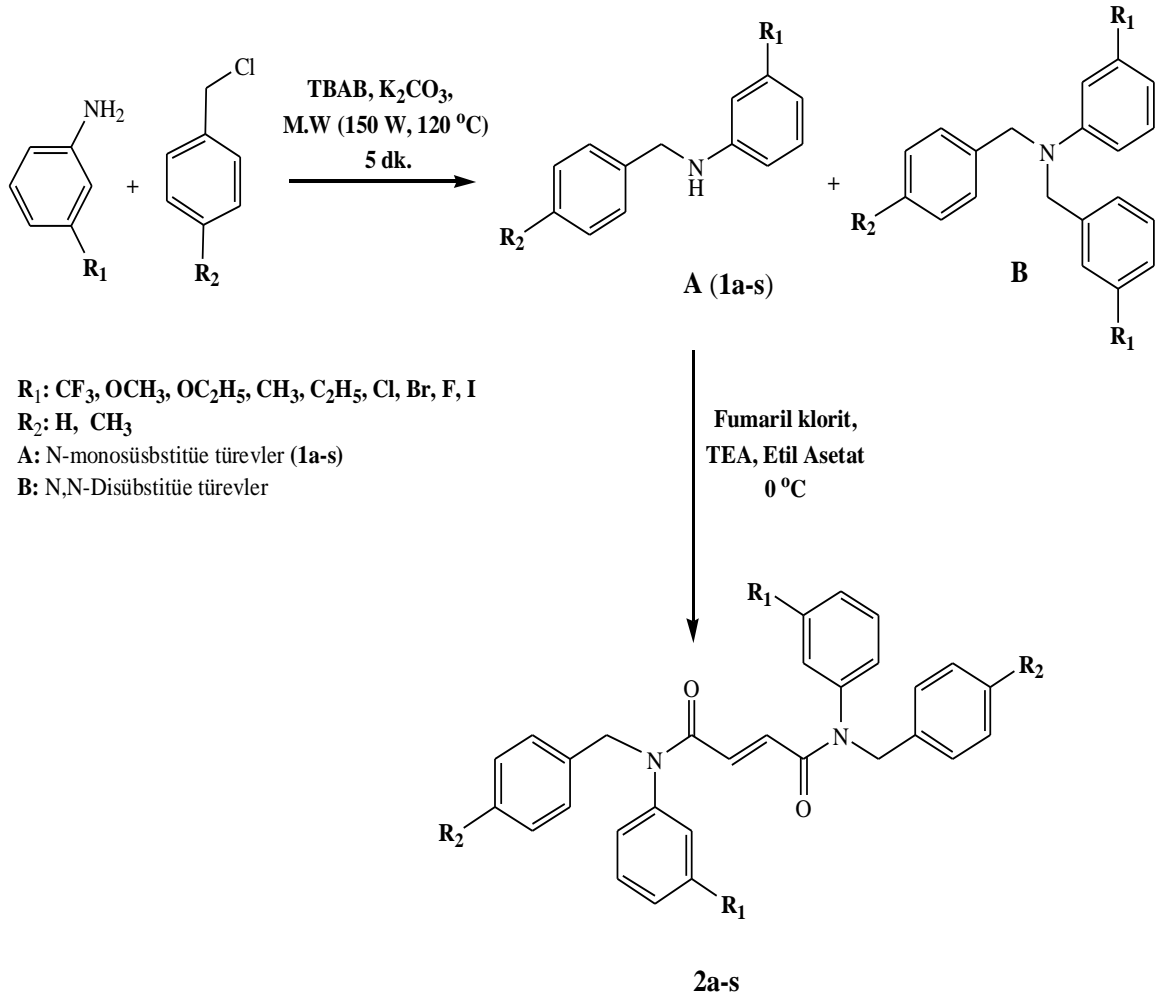
3.1.3. m-Süstitüe Benzanilin Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (1a-s)

Meta-süstitüe anilin (10 mmol), benzil klorür veya p-metilbenzil klorür (5 mmol) üzerine K_2CO_3 (6.25 mmol) ve TBAB (1 mmol) ilave edilerek bir baget yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra 150 W, 120 °C koşullarında 5 dakika boyunca mikrodalga ışımaya tabi tutuldu. Ardından karışım diklorometan (CH_2Cl_2) ile birkaç kez iyice karıştırılmak suretiyle yıkandı. Çözücü evaporatör yardımıyla uzaklaştırıldı. Bileşikler, hareketli faz olarak hekzan/etilasetat (9:1) çözücü karışımının kullanıldığı kolon kromatografisi (SiO_2) yöntemiyle saflaştırıldı. **1a-s** bileşiklerinin sentezi **Şekil 3.1'** de gösterilmiştir.

3.1.4. Büt-2-endioik asit bis-(4-süstitüe benzil-3-süstitüe fenil-amit)

Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi (2a-s)

Meta-süstitüe benzanilin bileşiği (2 ekivalan) ve trietilamin' in (TEA) (1 ekivalan) etilasetat (5 ml) içindeki çözeltisi buz banyosu yardımıyla 0–5 °C' ye kadar soğutuldu. Bu karışıma fumaril klorür' ün (1 ekivalan) etilasetat (5 ml) içerisindeki çözeltisi 30 dakika boyunca damla damla ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında 12 saat boyunca karışmaya bırakıldı. Bu süre sonunda reaksiyon ortamına 10 ml soğuk su ilave edildi ve karışıma (3*10 ml) etilasetat ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz sodyum sülfat (Na_2SO_4) yardımıyla suyundan kurtarıldıktan sonra evaporatör yardımıyla ortamdan uzaklaştırıldı. Ham bileşik etanol kristalizasyonuna tabi tutularak büt-2-endioik asit-bis (benzil-fenil-amit) diğer ifadesi ile fumaramit türevi **2a-s** bileşikleri elde edildi (**Şekil 3.1**).

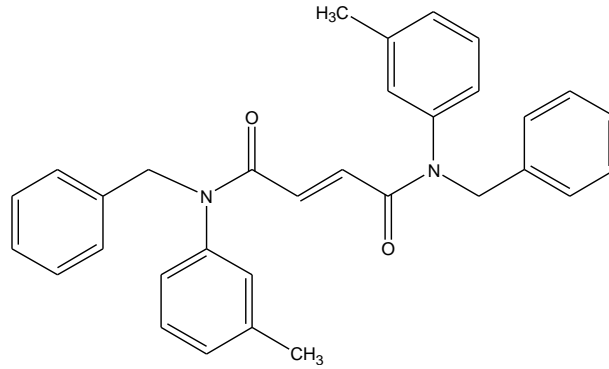


Şekil 3.1. Benzanilin (**1a-s**) ve Fumaramit (**2a-s**) Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi

Büt-2-endioik asit bis-(benzil-m-tolil-amit) (**2a**)

Benzil-m-tolil-amin (0.3 g, 1,52 mmol) üzerine TEA (0.153 g, 1,52 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.116 g, 0.76 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na_2SO_4 kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik

çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 61 verimli 0.220 g beyaz renkli katı **2a** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 180–184 °C' dir.



Büt-2-endioik asit bis-(benzil-m-tolil-amit)

UV Spektrumu (Şekil 3.2)

λ_{maks}^{DMSO} (log ϵ) 298 (1,184)

^1H NMR (CDCl_3) (Şekil 3.3)

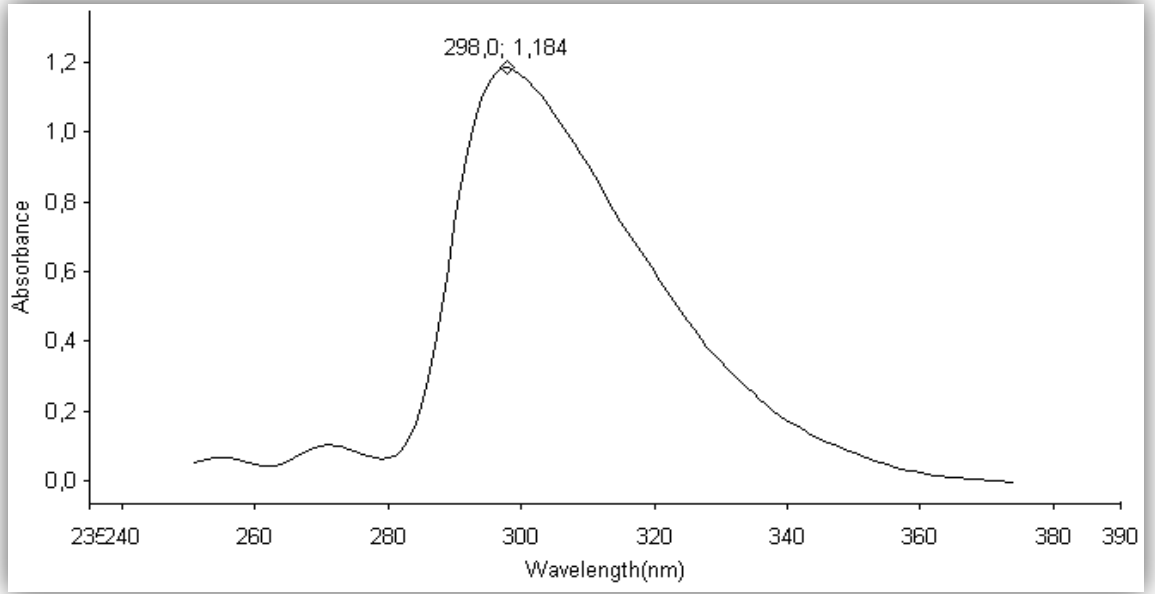
δ (ppm): 2.31 (s, 6H, 2x CH_3), 4.88 (s, 4H, 2x $\text{CH}_2\text{-N}$), 6.75-6.74 (d, 2H, J= 7.60 Hz), 6.81 (s, 2H, fumaril CH=CH), 6.89 (s, 2H), 7.13-7.11 (d, 4H, J= 7.60 Hz), 7.16-7.14 (m, 2H), 7.22-7.18 (m, 6H), 7.26-7.24 (d, 2H, J= 7.6 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) (Şekil 3.4)

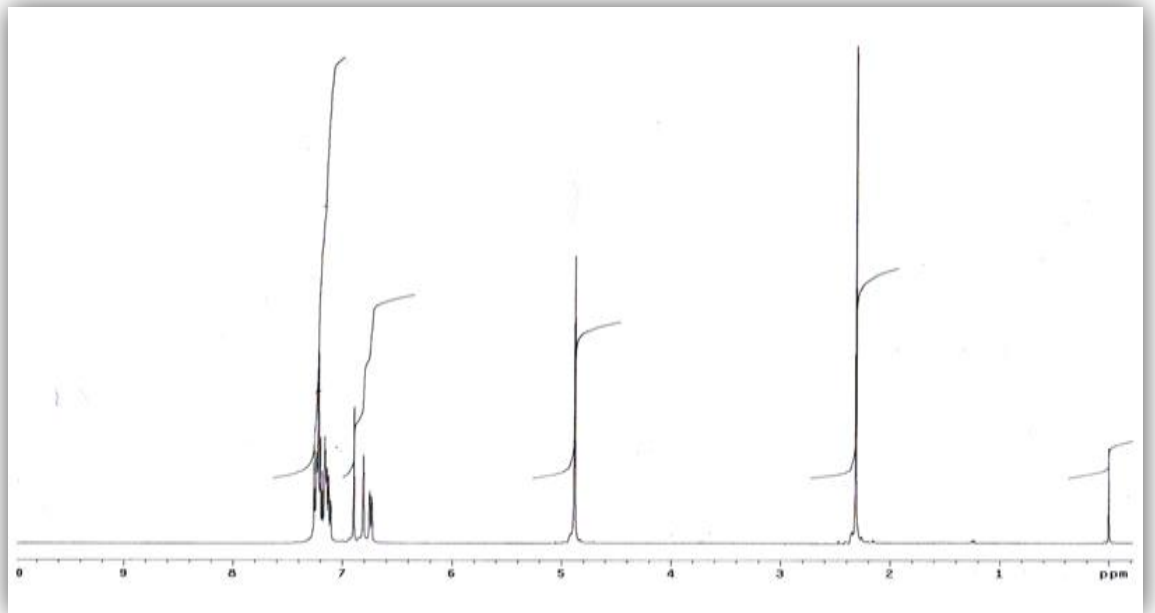
δ (ppm): 21.29 (Ar- CH_3), 53.58 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 125.28, 127.40 (CH=CH), 128.35, 128.49, 128.63, 129.06, 129.041, 132.07, 137.07, 139.75, 141.22, 164.43 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.5)

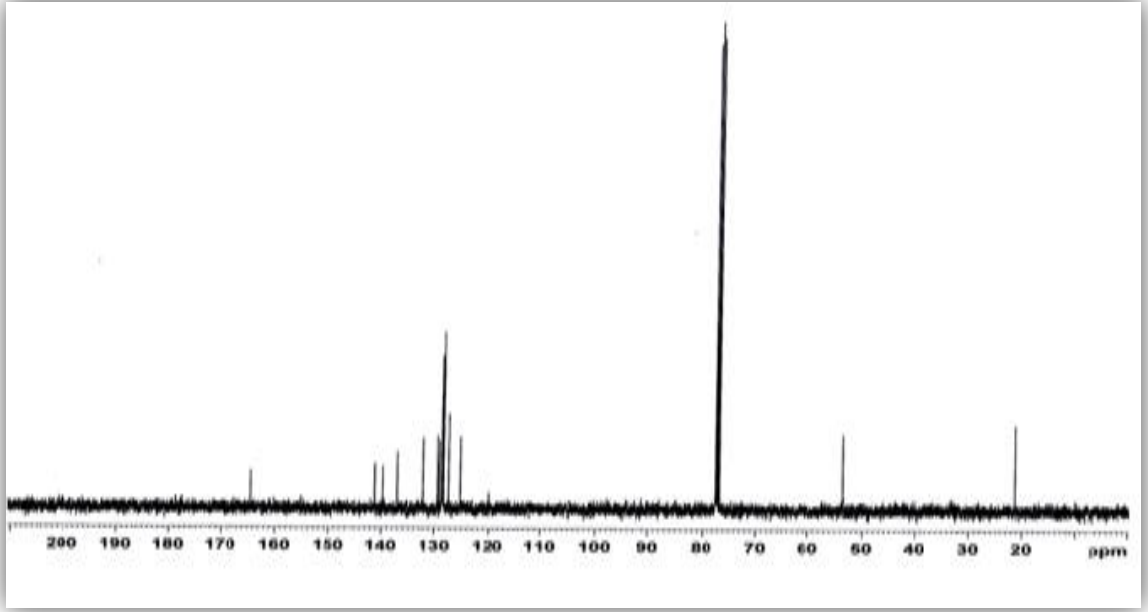
ESI-MS m/z: [M+H] 475.1



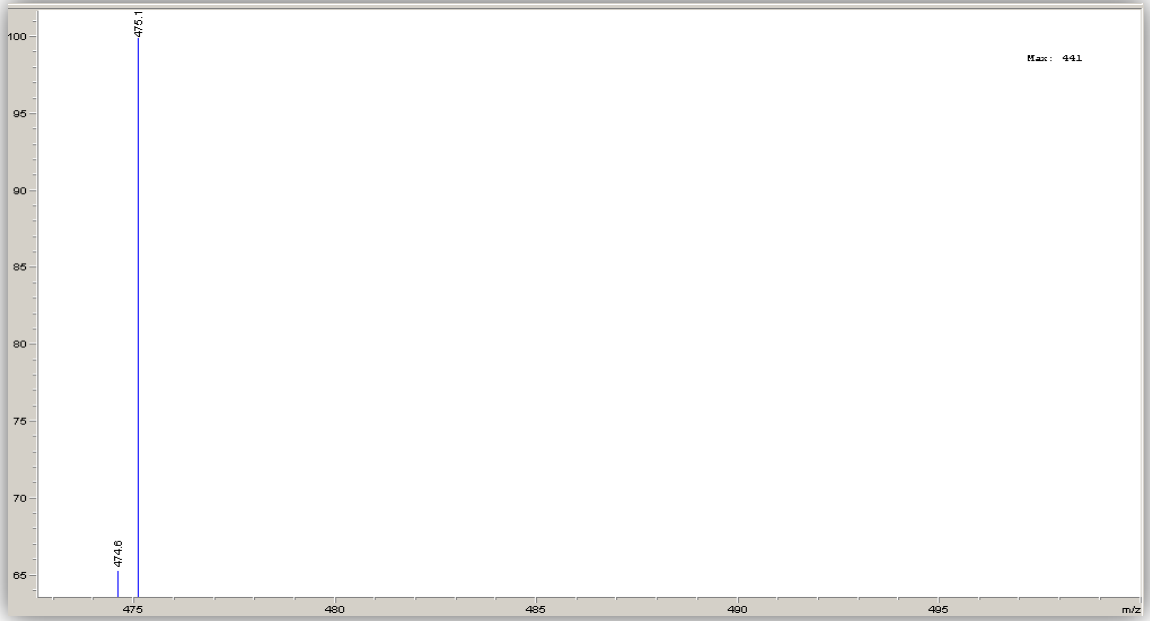
Şekil 3.2. 2a Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.3. 2a Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



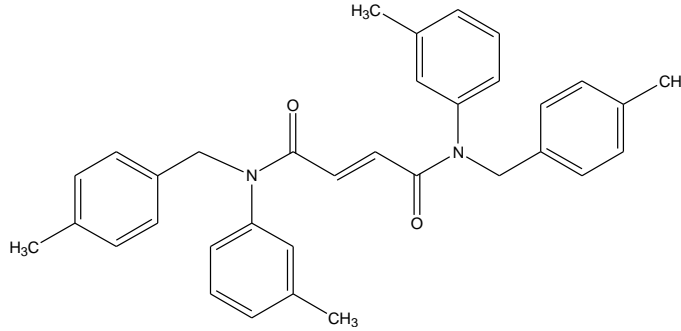
Şekil 3.4. 2a Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.5. 2a Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[(4-metil-benzil)-m-tolil-amit] (2b)

(4-Metil-benzil)-m-tolil-amin (0.3 g, 1,42 mmol) üzerine TEA (0.14 g, 1,42 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.1 g, 0.71 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 55 verimli 0.180 g beyaz renkli katı **2b** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 202–204 °C’dir.



Büt-2-endioik asit bis-[(4-metil-benzil)-m-tolil-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.6)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 297 (1,152)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.7)

δ (ppm): 2.29 (s, 6H), 2.32 (s, 6H), 4.83 (s, 4H, 2x CH₂-N), 6.74-6.72 (d, 2H, J= 7.7 Hz), 6.81 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.88 (s, 2H), 7.00 (bs, 8H, 7.12-7.10 (d, 2H, J= 7.8 Hz), 7.22-7.18 (m, 2H).

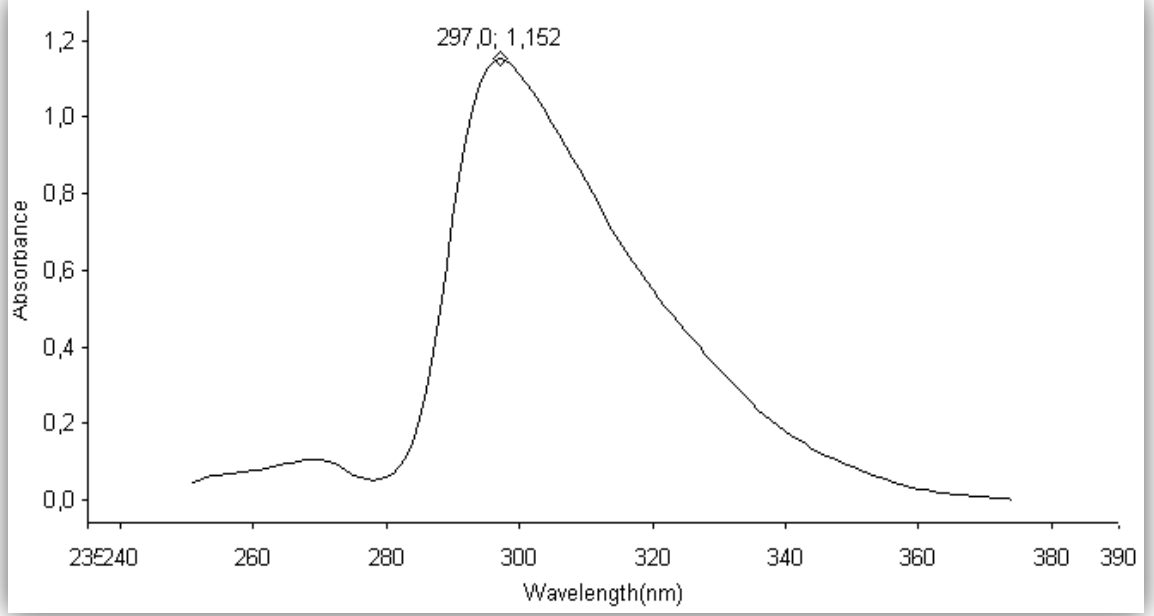
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.8)

δ (ppm): 21.09 (Benzilik-CH₃), 21.29 (Ar-CH₃), 53.33 (CH₂-N), 125.33, 128.50 (CH=CH), 128.61, 129.01, 129.37, 132.07, 134.06, 137.00, 139.69, 141.30, 164.38

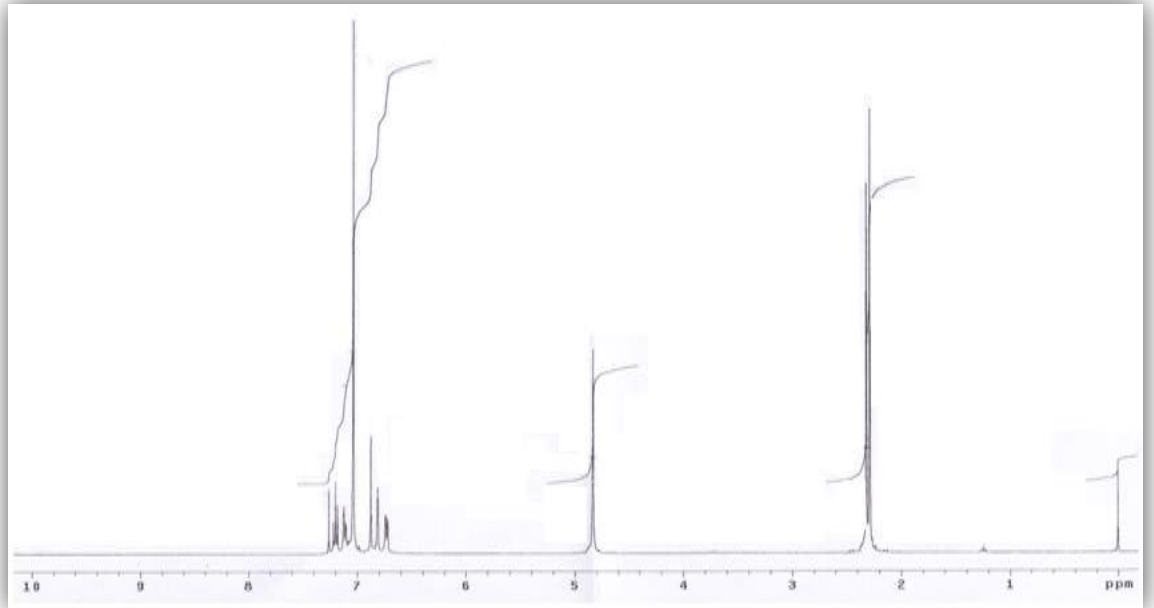
(C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.9)

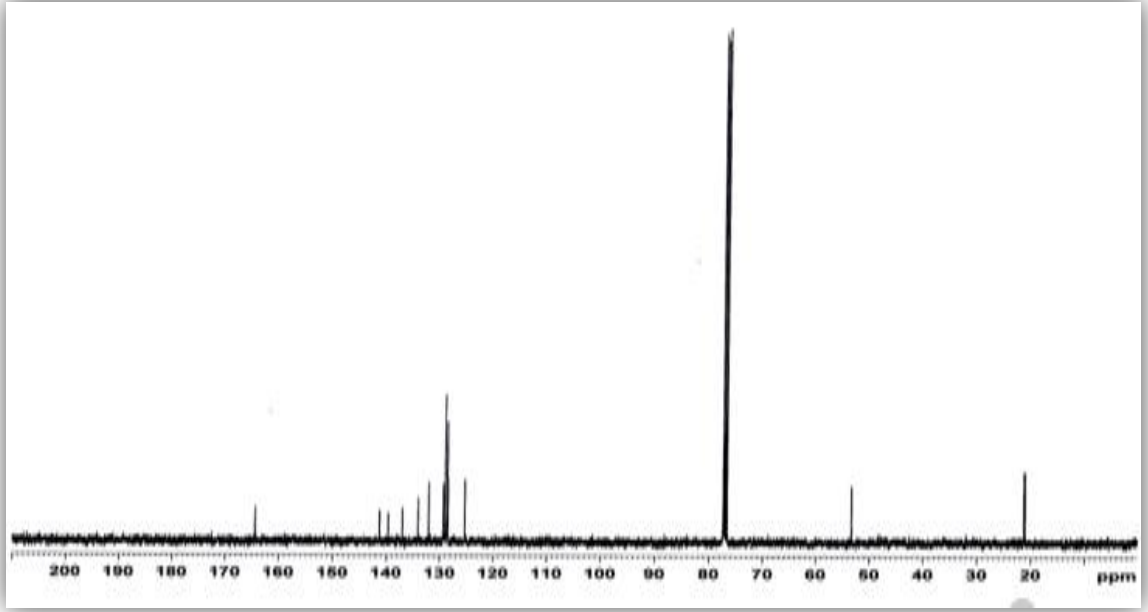
ESI-MS m/z: [M+H] 503.6



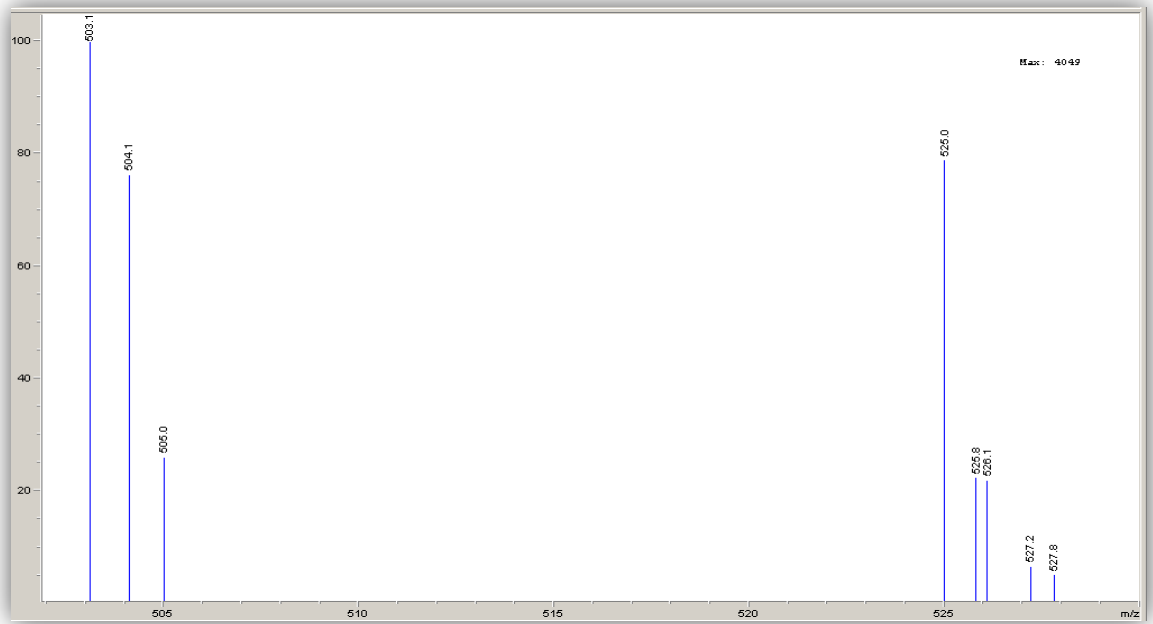
Şekil 3.6. 2b Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.7. 2b Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



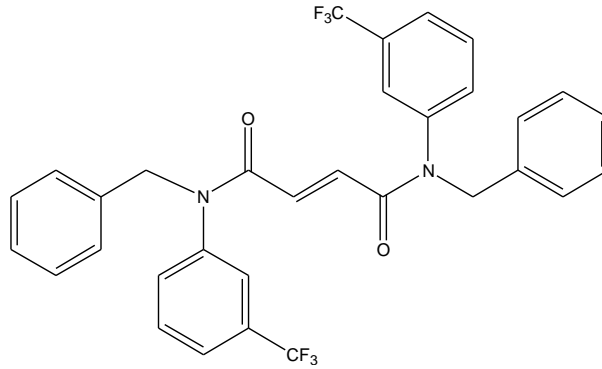
Şekil 3.8. 2b Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.9. 2b Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-triflorometil-fenil)-amit] (2c)

Benzil-(3-triflorometil-fenil)-amin (0.3 g, 1,19 mmol) üzerine TEA (0.12 g, 1,19 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözüldürülmüş fumaril klorür (0.092 g, 0.6 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su- etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 52 verimli 0.180 g beyaz renkli katı **2c** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 161–165 °C' dir.



Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-triflorometil-fenil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.10)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 301 (0,488)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.11)

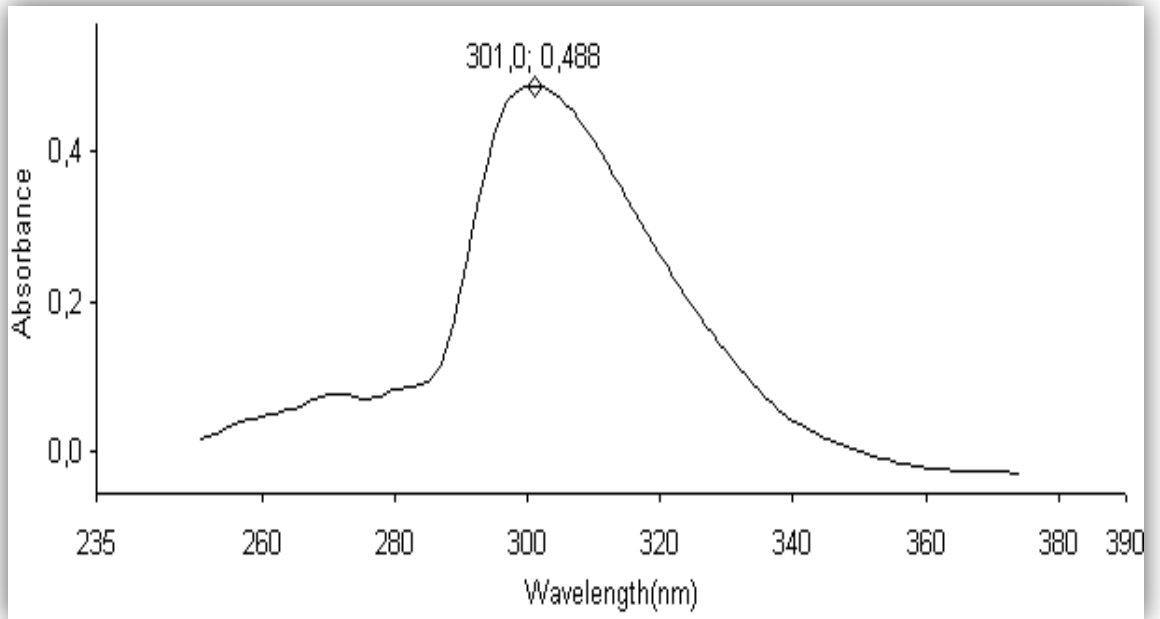
δ (ppm): 4.92 (s, 4H, 2xCH₂-N), 6.83 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.12-7.10 (m, 6H), 7.26-7.24 (m, 2H), 7.29-7.26 (m, 6H), 7.50-7.48 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.60 (s, 2H).

¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.12)

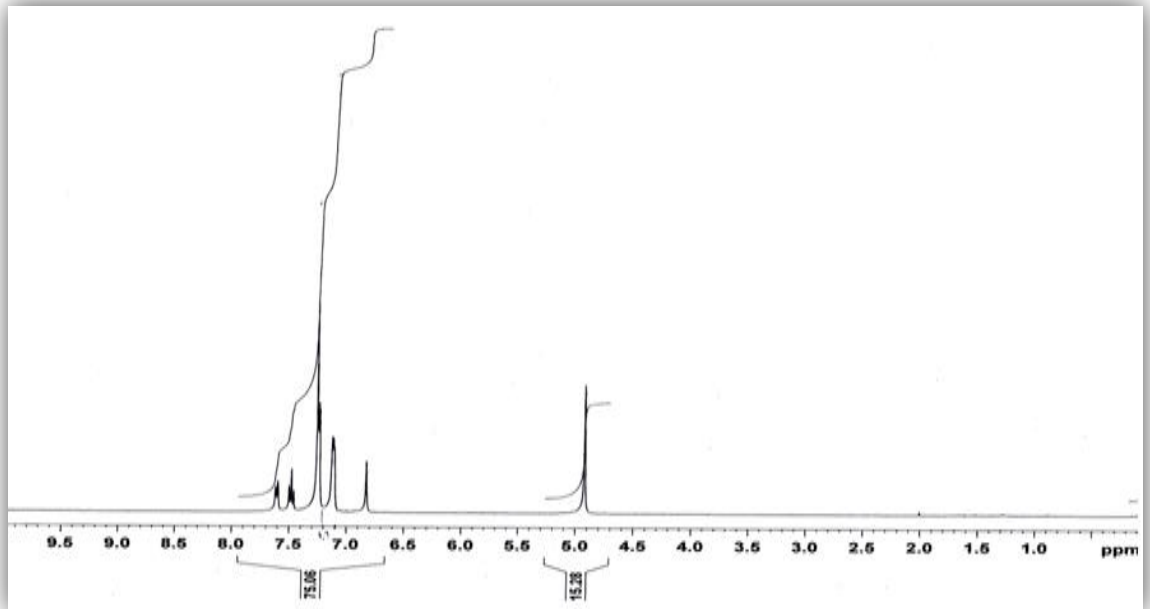
δ (ppm): 53.49 (CH₂-N), 124.87, 125.20 (CH=CH), 127.85, 128.63, 130.41, 131.82, 132.29, 136.20, 141.65, 163.94 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.13)

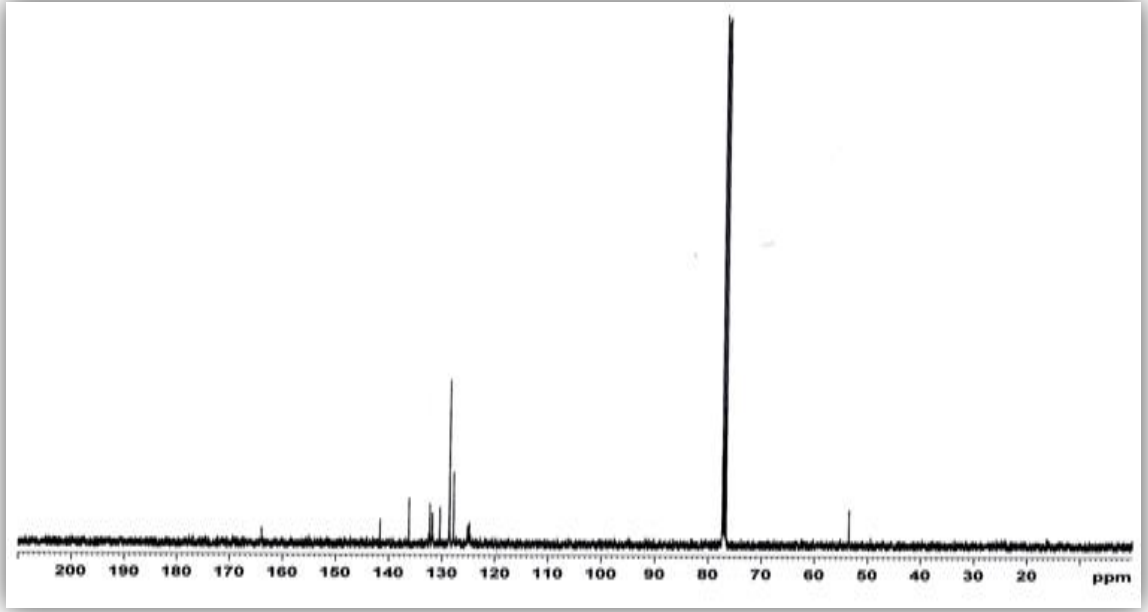
ESI-MS m/z [M+H] 583.4



Şekil 3.10. 2c Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.11. 2c Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



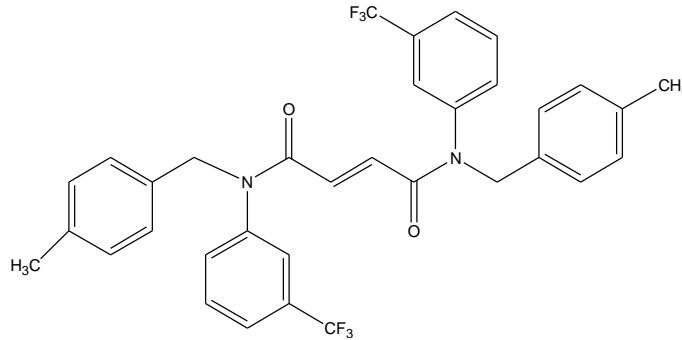
Şekil 3.12. 2c Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.13. 2c Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[(4-metil-benzil)-(3-triflorometil-fenil)-amit] (2d)

(4-Metil-benzil)-(3-triflorometil-fenil)-amin (0.3 g, 1,13 mmol) üzerine TEA (0.114 g, 1,13 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözdürülmüş fumaril klorür (0.087 g, 0.57 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 46 verimli 0.160 g beyaz renkli katı **2d** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 176–180 °C' dir.



Büt-2-endioik asit bis-[(4-metil-benzil)-(3-triflorometil-fenil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.14)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 298 (0,715)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.15)

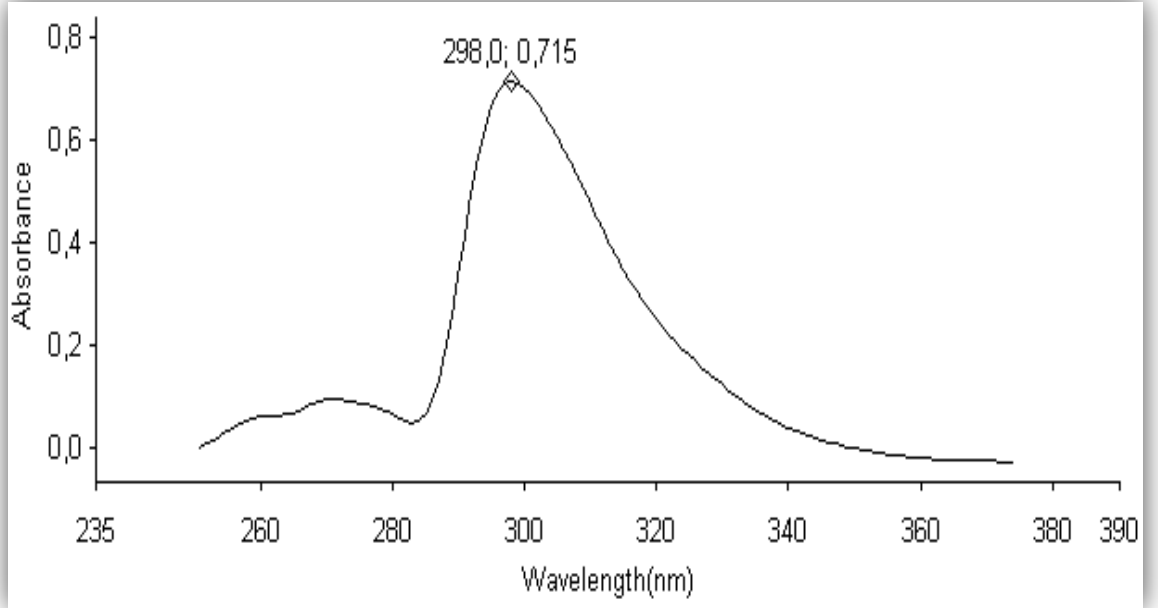
δ (ppm): 2.29 (s, 6H, 2xAr-CH₃), 4.87 (s, 4H, 2x CH₂-N), 6.80 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.00-6.90 (d, 2H, J= 7.9 Hz), 7.05-7.03 (d, 4H, J=8.6 Hz), 7.11-7.09 (d, 4H, J= 7.8 Hz), 7.27-7.26 (m, 2H), 7.49-7.47 (d, 2H, J=7.4 Hz), 7.59 (s, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3) (Şekil 3.16)

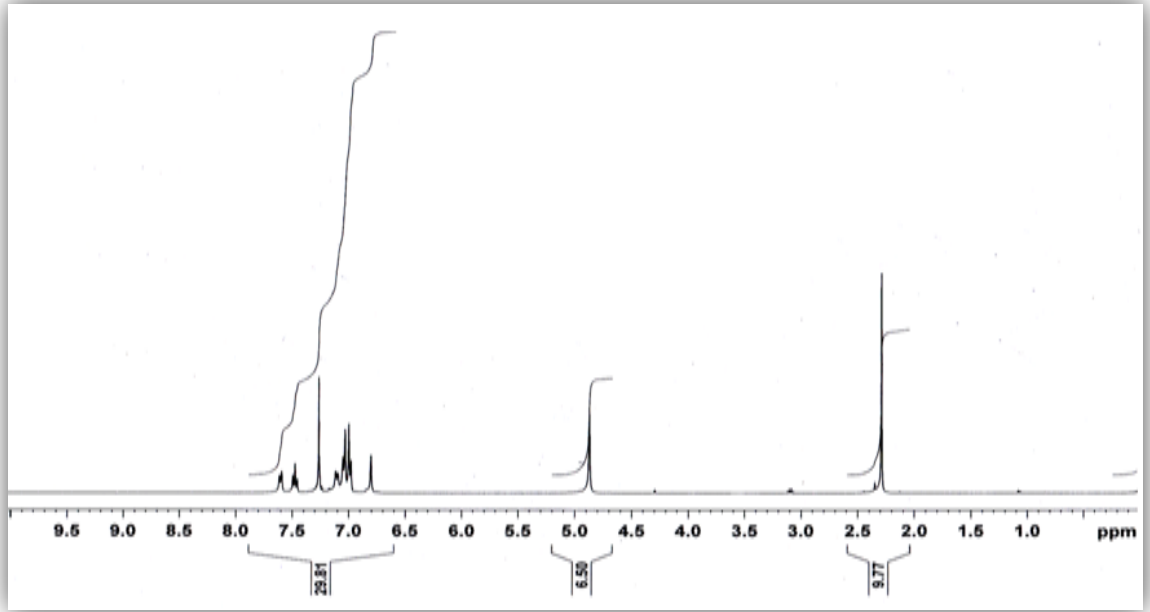
δ (ppm): 21.08 (Ar-CH₃), 53.25 (CH₂-N), 125.11, 128.62 (CH=CH), 129.26, 130.35, 131.88, 132.28, 133.17, 137.57, 141.72, 163.90 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.17)

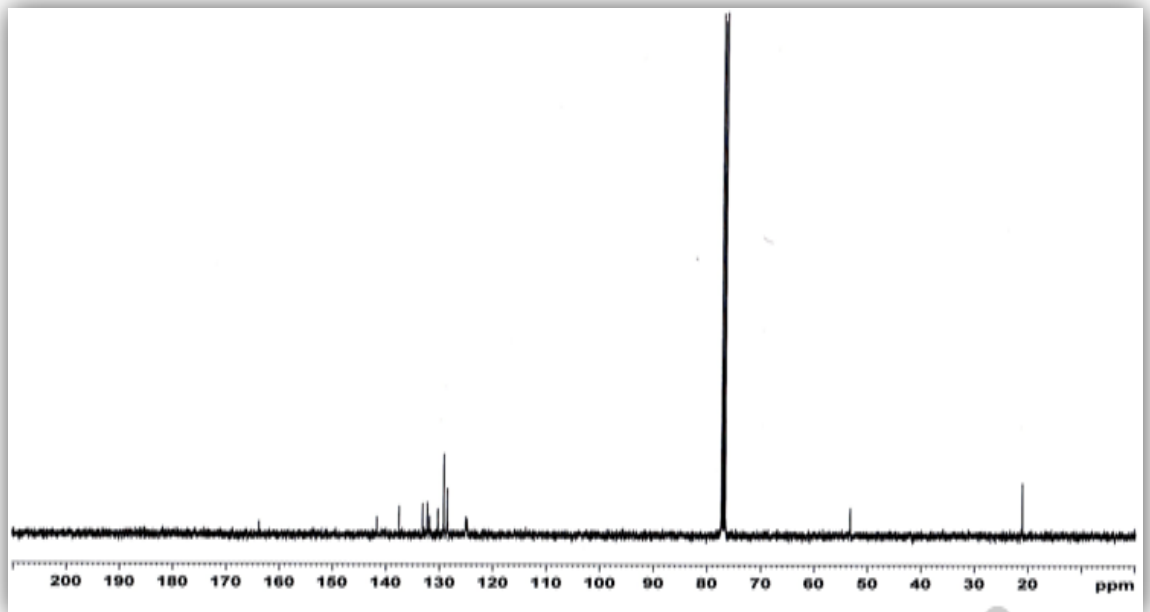
ESI-MS m/z [M+H] 611.2



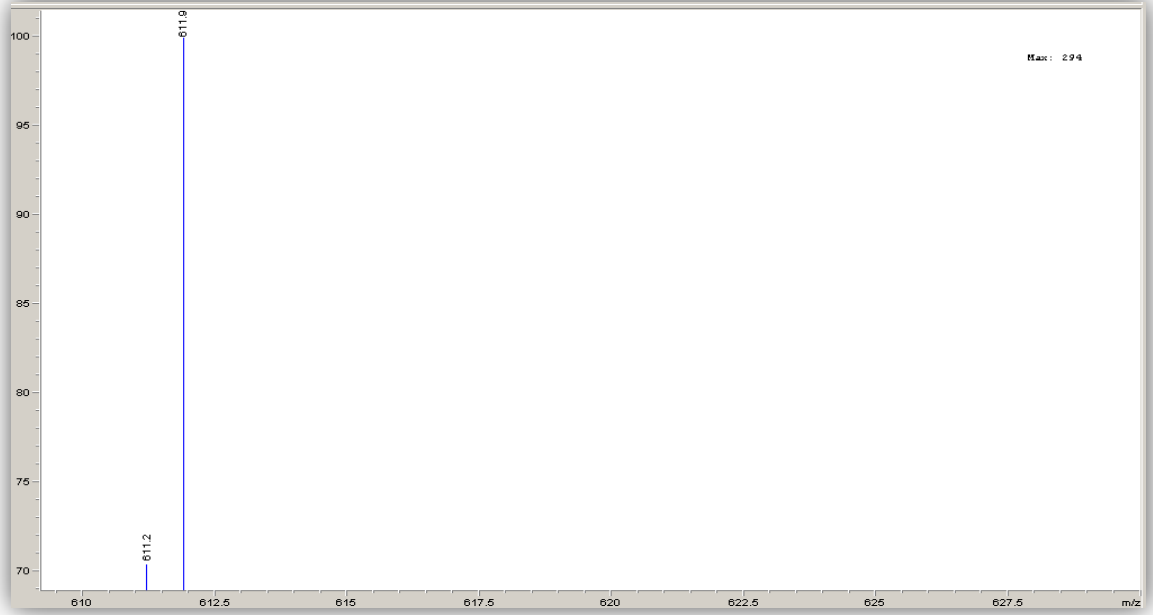
Şekil 3.14. 2d Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.15. 2d Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu



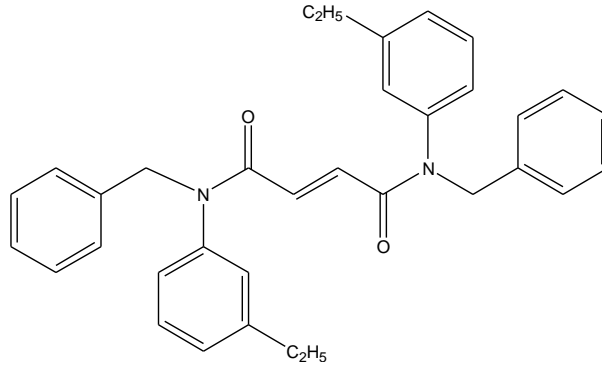
Şekil 3.16. 2d Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.17. 2d Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-etil-fenil)-amit] (2e)

Benzil-(3-etil-fenil)-amin (0.3 g, 1,4 mmol) üzerine TEA (0.14 g, 1,4 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.1 g, 0.7 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su- etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdaki uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 16 verimli 0.052 g beyaz renkli katı **2e** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 138–140 °C' dir.



Büt-2-endoik asit bis-[benzil-(3-etil-fenil)-amit] (2e)

UV Spektrumu (Şekil 3.18)

λ_{maks}^{DMSO} (log ϵ) 303 (1,958)

^1H NMR Spektrumu (CDCl_3) (Şekil 3.19)

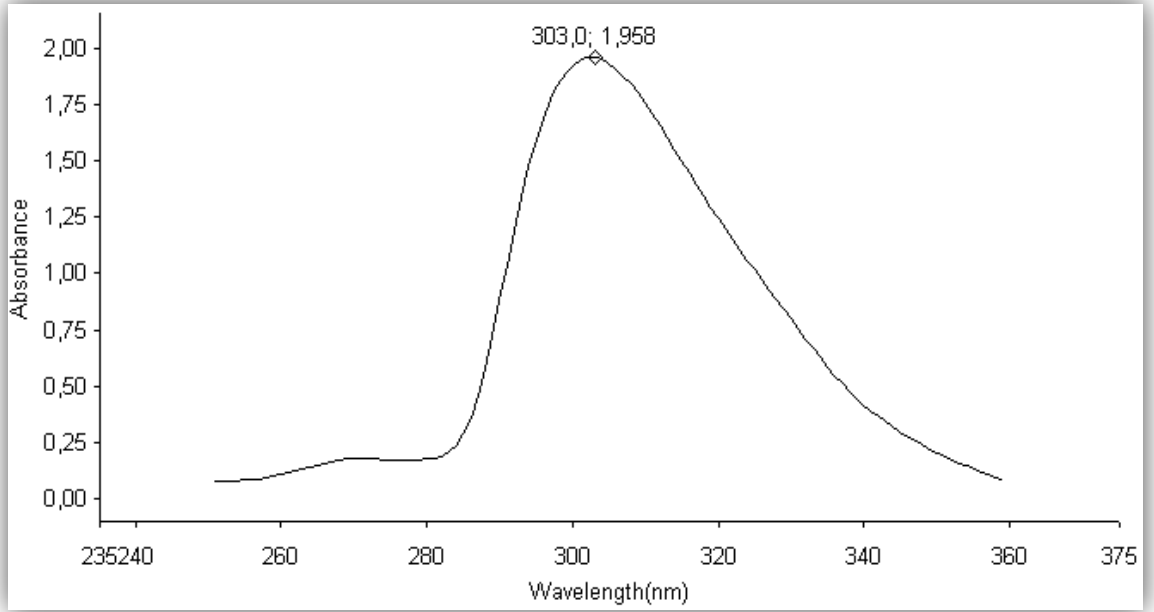
δ (ppm): 1.19-1.15 (t, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.62-2.57 (q, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.88 (s, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N}$), 6.90 (s, 2H, etilen protonları $\text{CH}=\text{CH}$), 6.78-6.77 (d, 2H, $J=7.9$ Hz), 7.15-7.13 (m, 6H), 7.24-7.22 (m, 6H), 7.26 (s, 2H).

^{13}C NMR Spektrumu (CDCl_3) (Şekil 3.20)

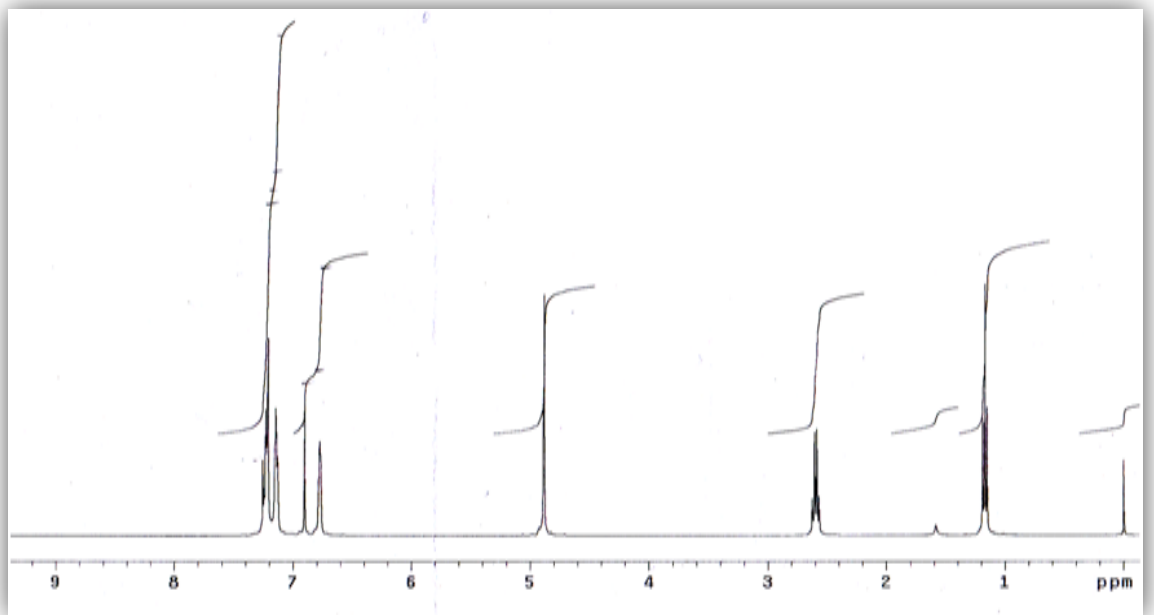
δ (ppm): 15.21 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 28.53 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 53.50 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 125.37, 127.39, 127.79, 128.34, 128.69, 129.49 ($\text{CH}=\text{CH}$), 132.12, 137.12, 141.24, 164.47 ($\text{C}=\text{O}$).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.21)

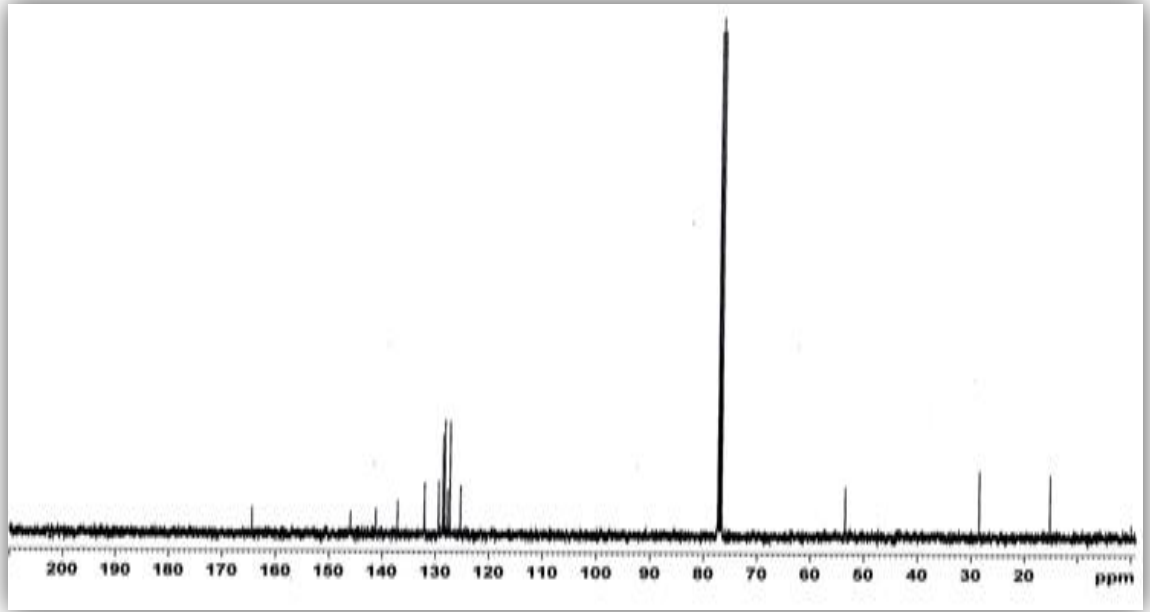
ESI-MS m/z: $[\text{M}+\text{H}]$ 503.8



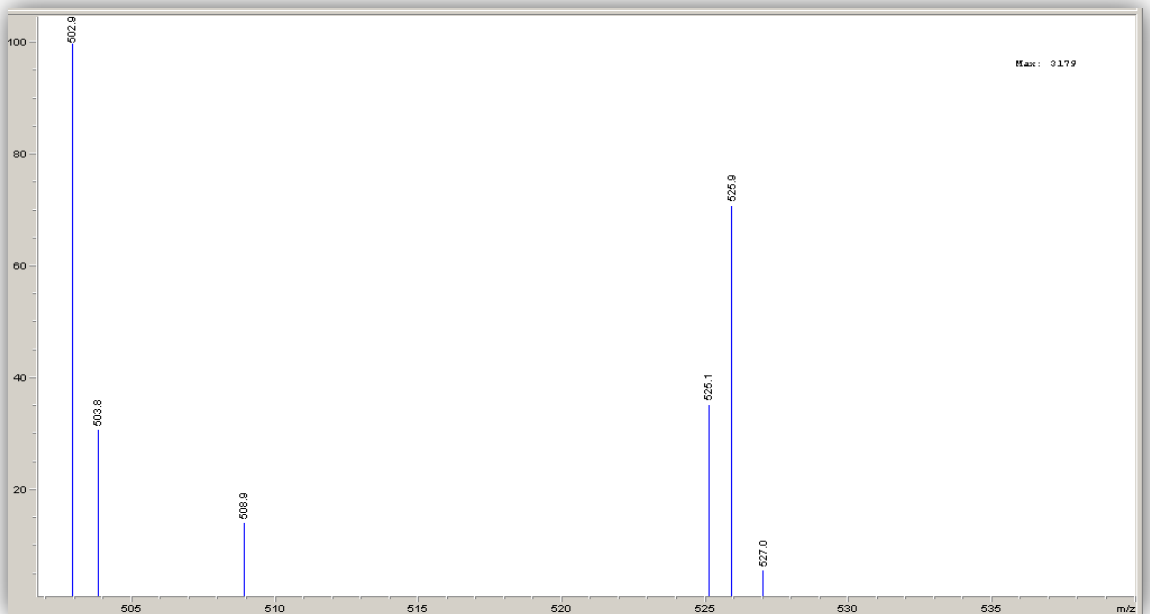
Şekil 3.18. 2e Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.19. 2e Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



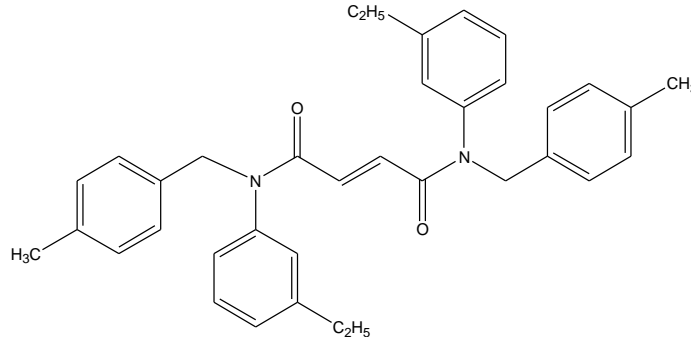
Şekil 3.20. 2e Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.21. 2e Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[(3-etil-fenil)-(4-metil-benzil)-amit] (2f)

(3-Etil-fenil)-(4-metil-benzil)-amin (0.3 g, 0.0013 mmol) üzerine TEA (0.132 g, 1,3 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.1 g, 0.65 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 50 verimli 0.175 g sarı renkli katı **2f** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 171–173 °C' dir.



Büt-2-endioik asit bis-[(3-etil-fenil)-(4-metil-benzil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.22)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 296 (0,831)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.23)

δ (ppm): 1.20-1.16 (t, 6H, 2xCH₂CH₃), 2.28 (s, 6H, 2x Ar-CH₃), 2.63-2.58 (q, 4H, 2xCH₂CH₃), 4.84 (s, 4H, 2xCH₂-N), 6.78-6.76 (bs, 4H), 6.88 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.03 (bs, 8H), 7.15-7.13 (d, 2H, J= 7.69 Hz), 7.26-7.21 (m, 2H)

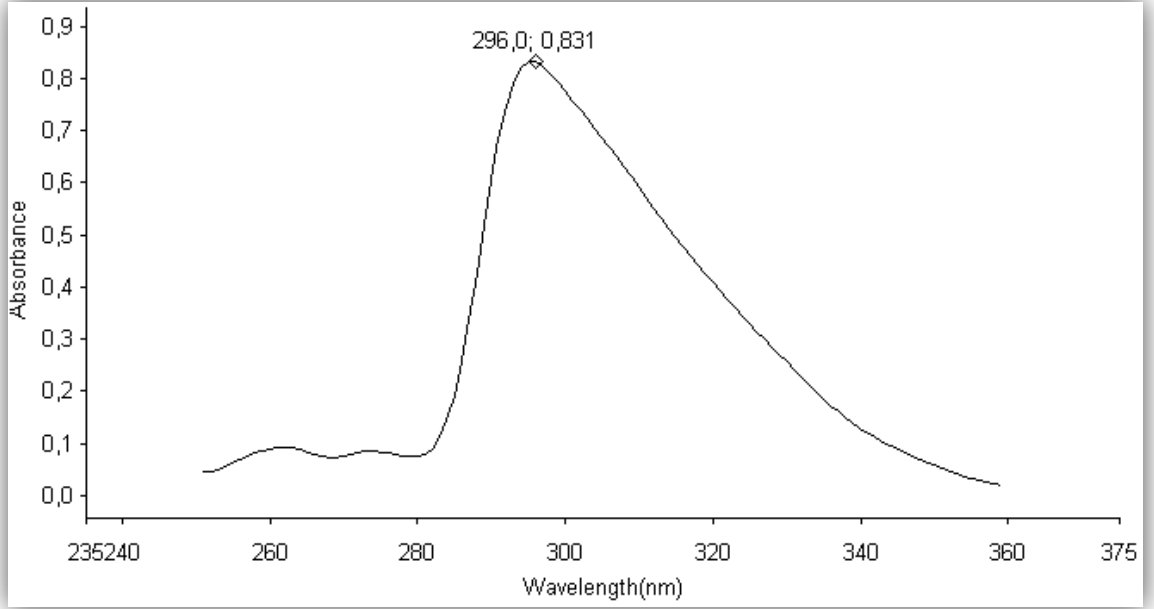
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.24)

δ (ppm): 15.21 (CH₂-CH₃), 21.08 (Ar-CH₃), 28.53 (CH₂-CH₃), 53.26 (CH₂-N), 125.43, 127.41, 127.72, 128.67, 129.00, 129.44 (CH=CH), 132.12, 134.11, 137.00,

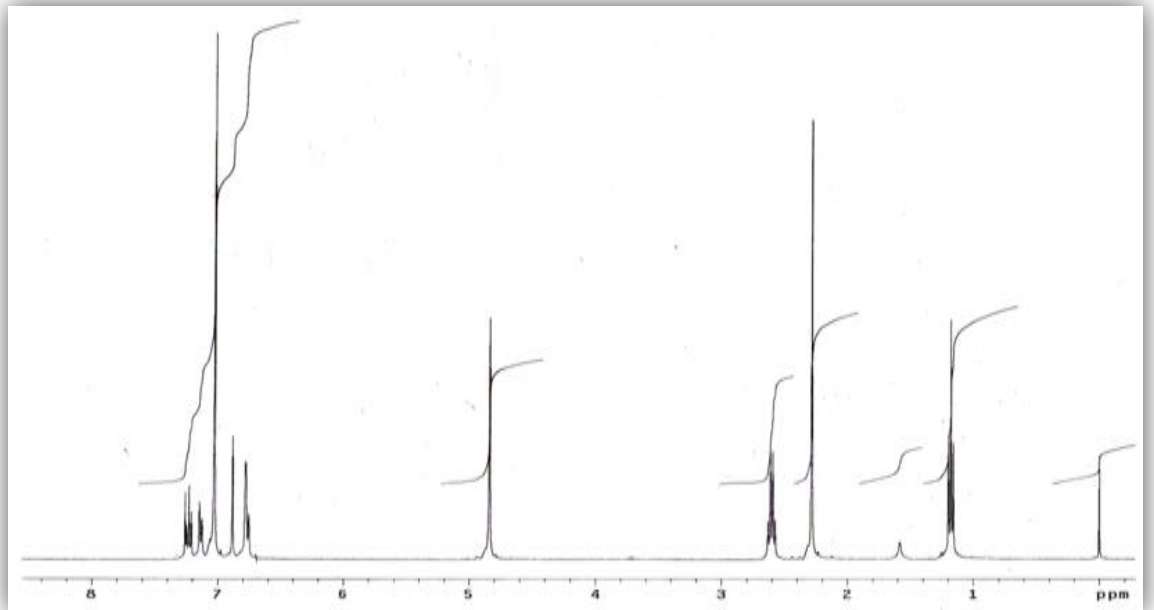
141.32, 145.93, 164.42 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.25)

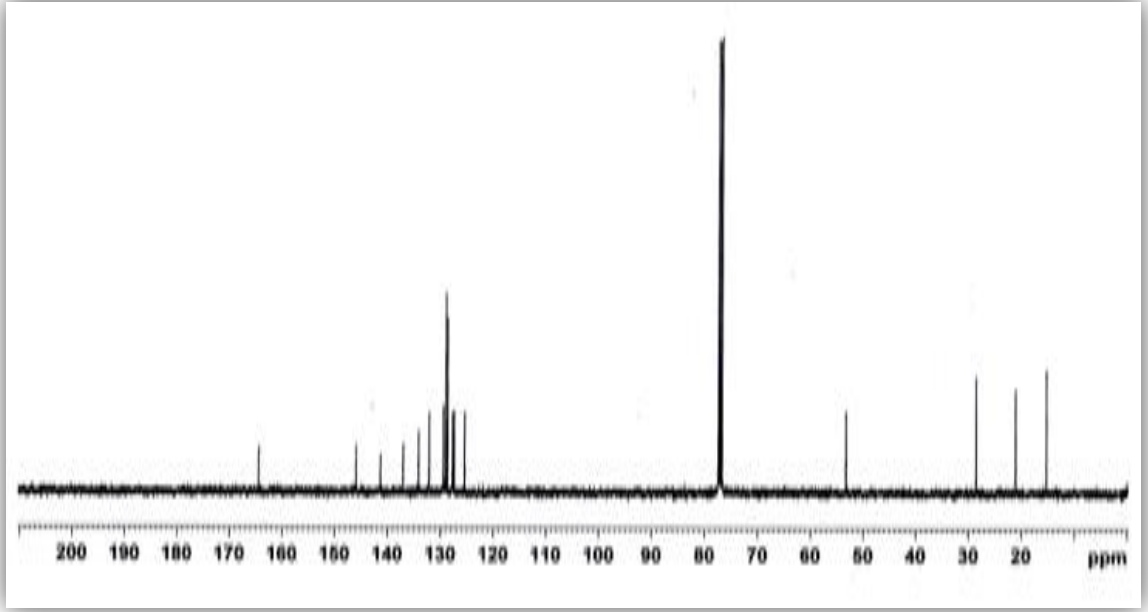
ESI-MS m/z: [M+H] 531.6



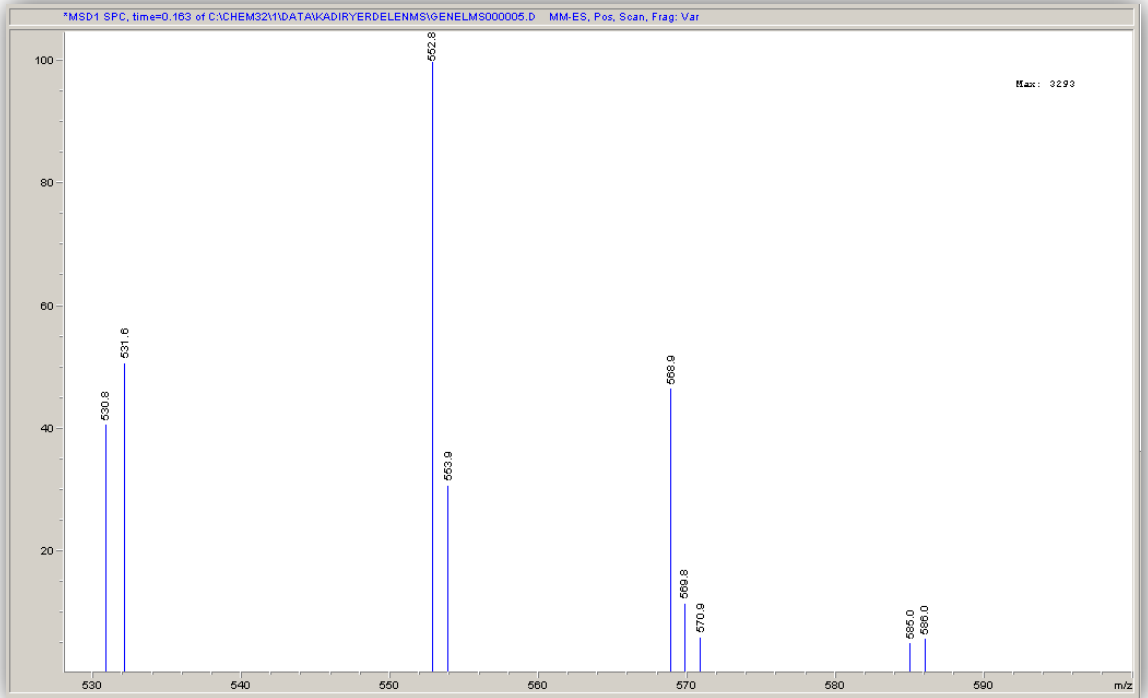
Şekil 3.22. 2f Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.23. 2f Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



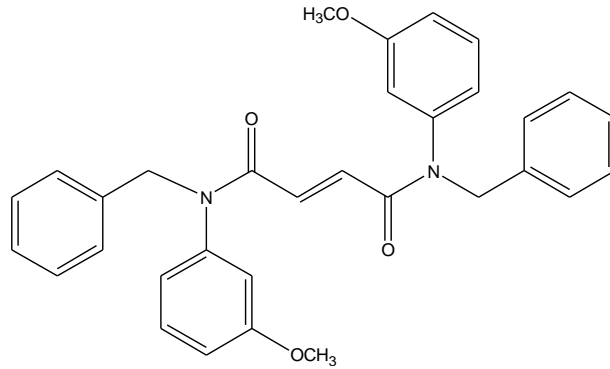
Şekil 3.24. 2f Bileşiminin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.25. 2f Bileşiminin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-metoksi-fenil)-amit] (2g)

Benzil-(3-metoksi-fenil)-amin (0.3 g, 1,4 mmol) üzerine TEA (0.14 g, 1,4 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.1 g, 0.7 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 76 verimli 0.250 g beyaz renkli katı **2g** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 180–182 °C' dir.



Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-metoksi-fenil)-amit

UV Spektrumu (Şekil 3.26)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 297 (1,158)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.27)

δ (ppm): 2.31 (s, 6H, 2xOCH₃), 4.89 (s, 4H, 2xCH₂-N), 6.75-6.73 (d, 2H, J= 7.60 Hz), 6.81 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.90 (s, 2H), 7.13-7.11 (d, 4H, J= 7.3 Hz), 7.16-7.14 (m, 2H), 7.22-7.18 (m, 6H), 7.26-7.24 (d, 2H, J= 7.6 Hz).

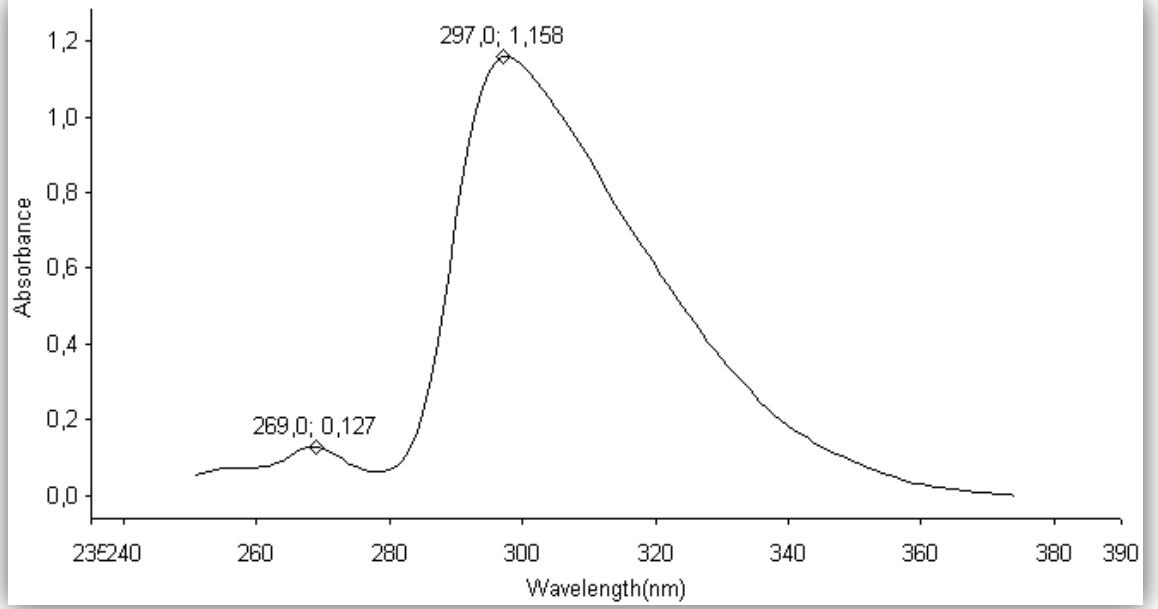
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.28)

δ (ppm): 21.09 (OCH₃), 53.57 (CH₂-N), 125.28, 127.39, 128.49, 128.63 (CH=CH),

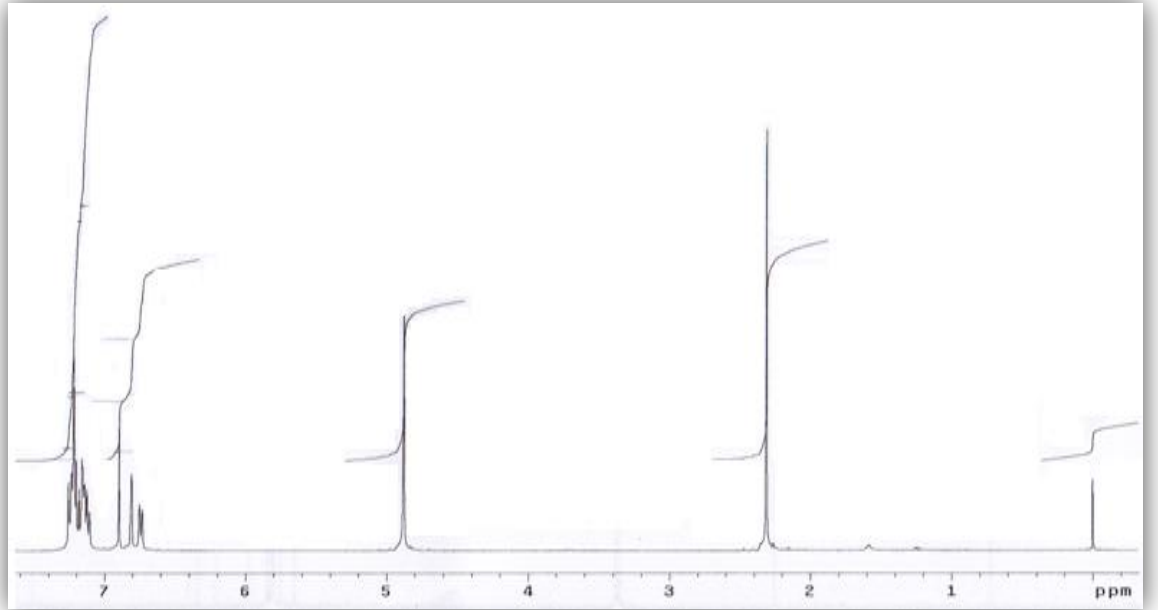
129.05, 129.41, 132.07, 137.07, 139.74, 141.22, 164.43 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.29)

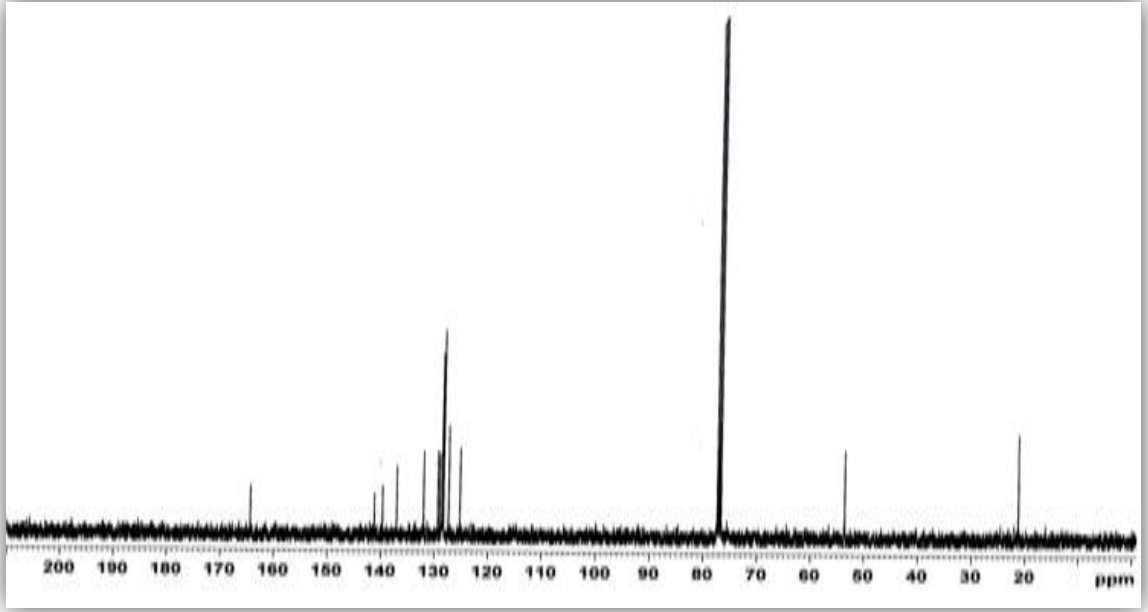
ESI-MS m/z: [M+H] 507.7



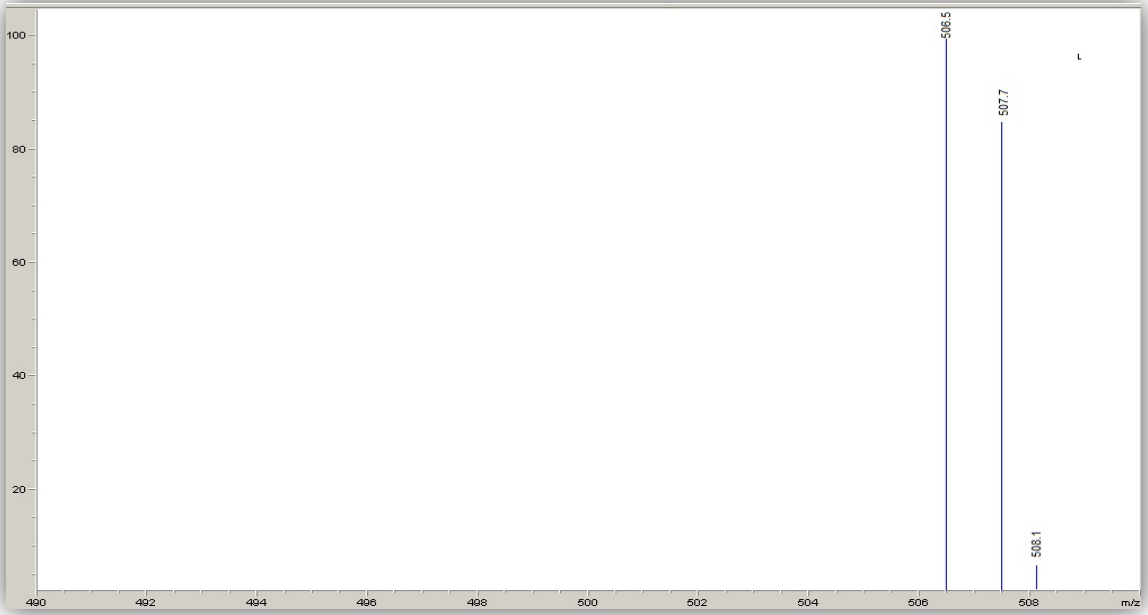
Şekil 3.26. 2g Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.27. 2g Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



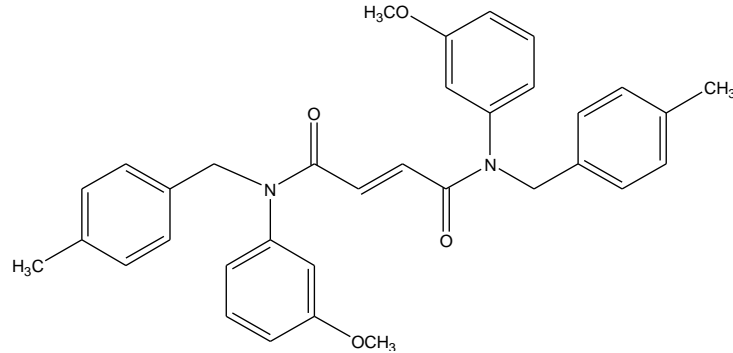
Şekil 3.28. 2g Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.29. 2g Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[(3-metoksi-fenil)-(4-metil-benzil)-amit (2h)

(3-Metoksi-fenil)-(4-metil-benzil)-amin (0.3 g, 1,3 mmol) üzerine TEA (0.132 g, 1,3 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etilasetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.1 g, 0.65 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 37 verimli 0.130 g beyaz renkli katı **2h** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 192–194 °C’dir.



Büt-2-endioik asit bis-[(3-metoksi-fenil)-(4-metil-benzil)-amit

UV Spektrumu (Şekil 3.30)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 296 (0,999)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.31)

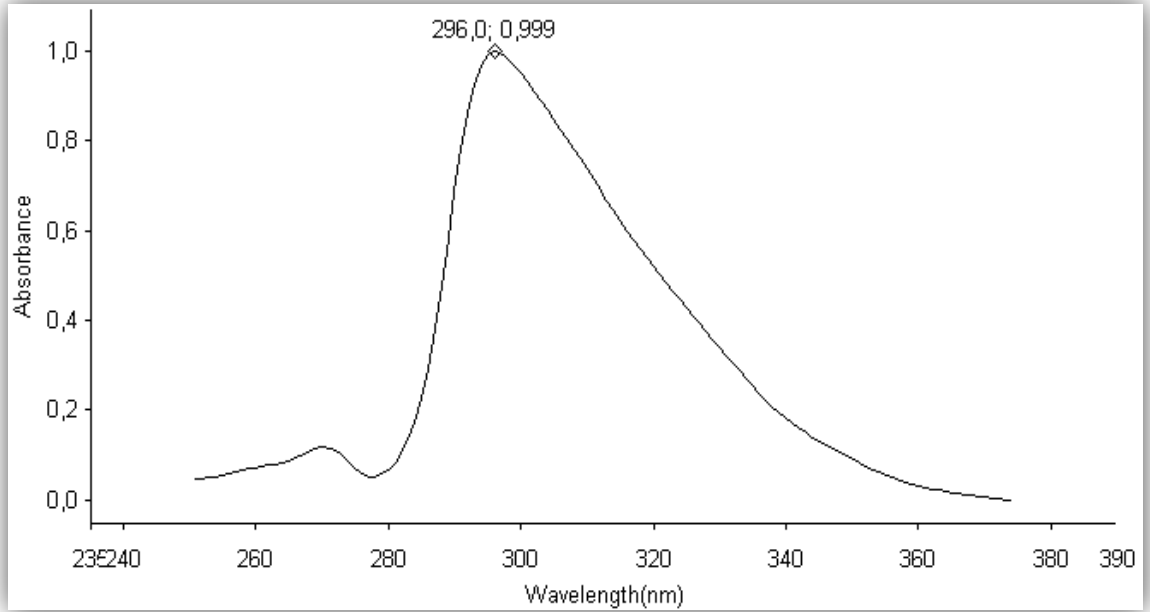
δ (ppm): 2.28 (s, 6H, 2xAr-CH₃), 3.73 (s, 6H, 2xOCH₃), 4.84 (s, 4H, 2xCH₂-N), 6.45 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.56-6.54 (d, 2H, J= 7.6 Hz), 6.90 (s, 2H), 7.04 (bs, 8H), 7.23-7.21 (d, 2H, J= 8.0 Hz), 7.26-7.25 (m, 2H).

¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.32)

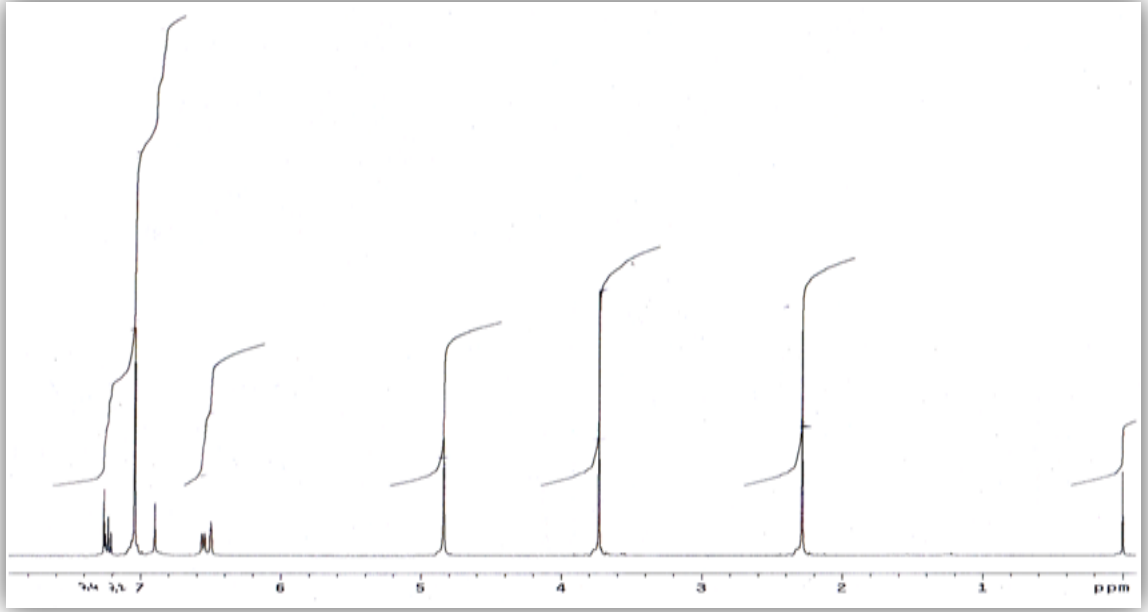
δ (ppm): 21.09 (Ar-CH₃), 53.18 (OCH₃), 55.33 (CH₂-N), 113.70, 113.93, 120.52, 128.66 (CH=CH), 130.30, 132.11, 134.03, 137.08, 142.42, 160.35, 164.32 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.33)

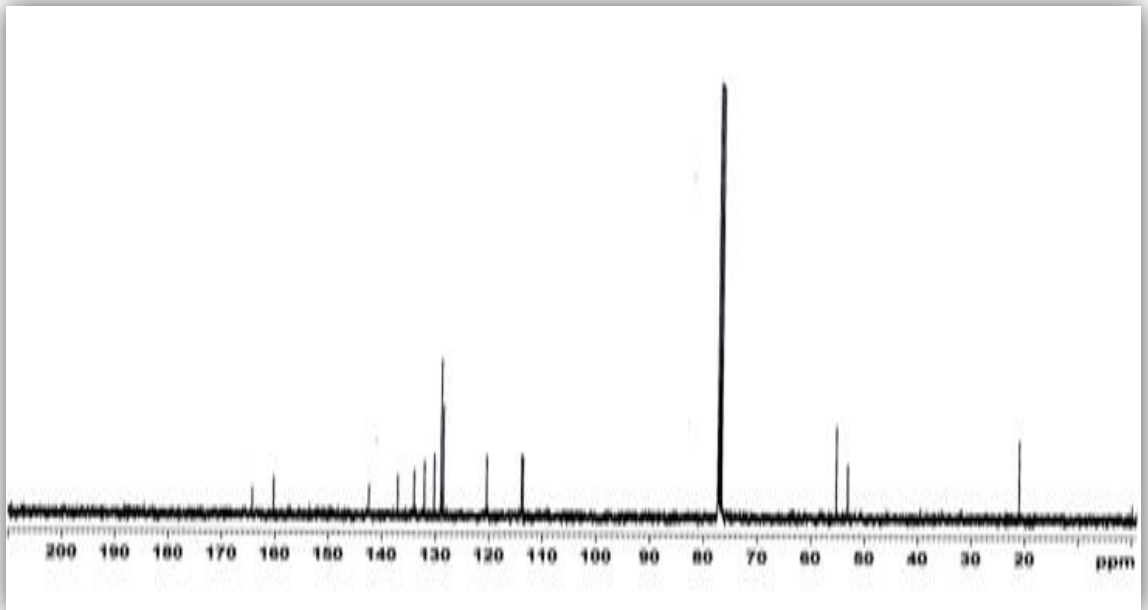
ESI-MS m/z: [M+H] 535.6



Şekil 3.30. 2h Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.31. 2h Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrum



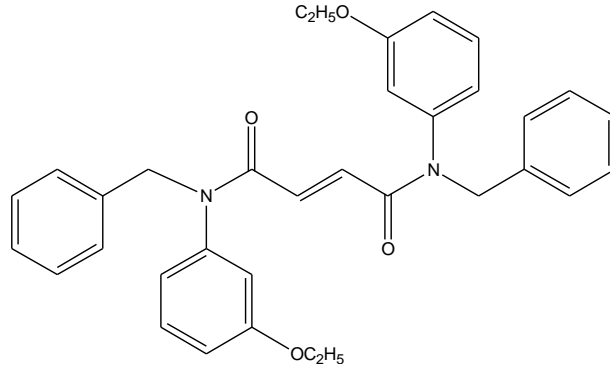
Şekil 3.32. 2h Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.33. 2h Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-etoksi-fenil)-amit] (2i)

Benzil-(3-etoksi-fenil)-amin (0.3 g, 1,32 mmol) üzerine TEA (0.13 g, 1,32 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözüldürülmüş fumaril klorür (0.1 g, 0.66 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 55 verimli 0.190 g kahverenkli amorf **2i** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 184–188 °C’dir.



Büt-2-endoik asit bis-[benzil-(3-etoksi-fenil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.34)

λ_{maks}^{DMSO} (log ϵ) 296 (1,039)

^1H NMR Spektrumu (CDCl_3) (Şekil 3.35)

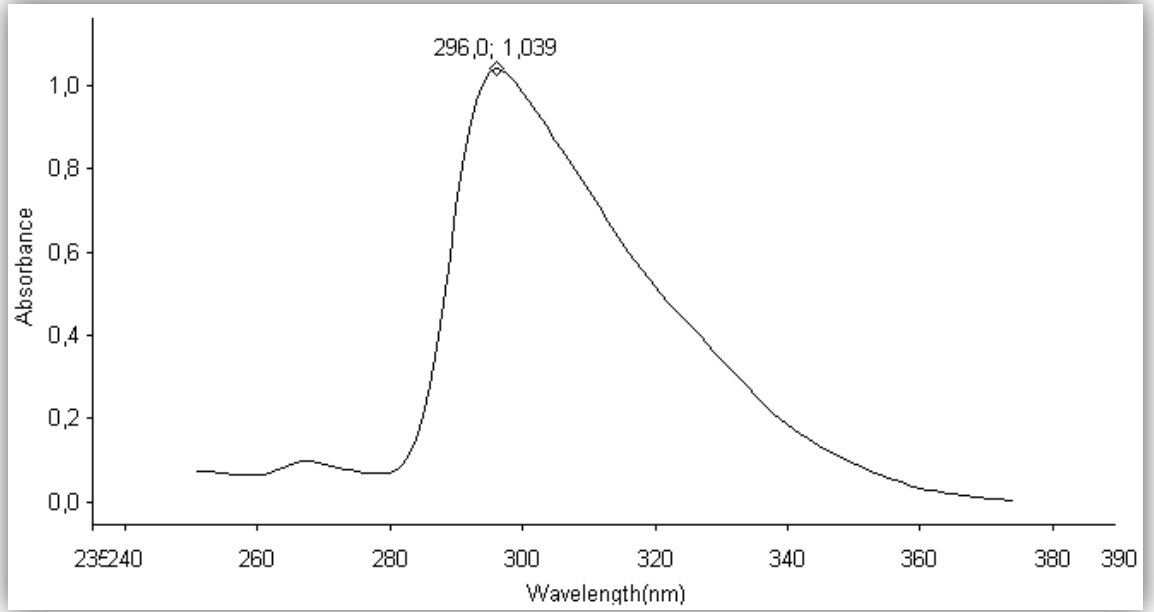
δ (ppm): 1.39- 1.36 (t, 6H, 2x CH_2CH_3), 3.93-3.91 (q, 4H, 2x CH_2CH_3), 4.88 (s, 4H, 2x $\text{CH}_2\text{-N}$), 6.50 (s, 2H, etilen protonları $\text{CH}=\text{CH}$), 6.55-6.53 (d, 2H, $J= 7.60$ Hz), 6.92 (s, 2H), 7.17-7.15 (d, 4H, $J= 7.6$ Hz), 7.19-7.16 (m, 2H), 7.23-7.21 (m, 6H), 7.26-7.24 (d, 2H, $J= 8.4$ Hz).

^{13}C NMR Spektrumu (CDCl_3) (Şekil 3.36)

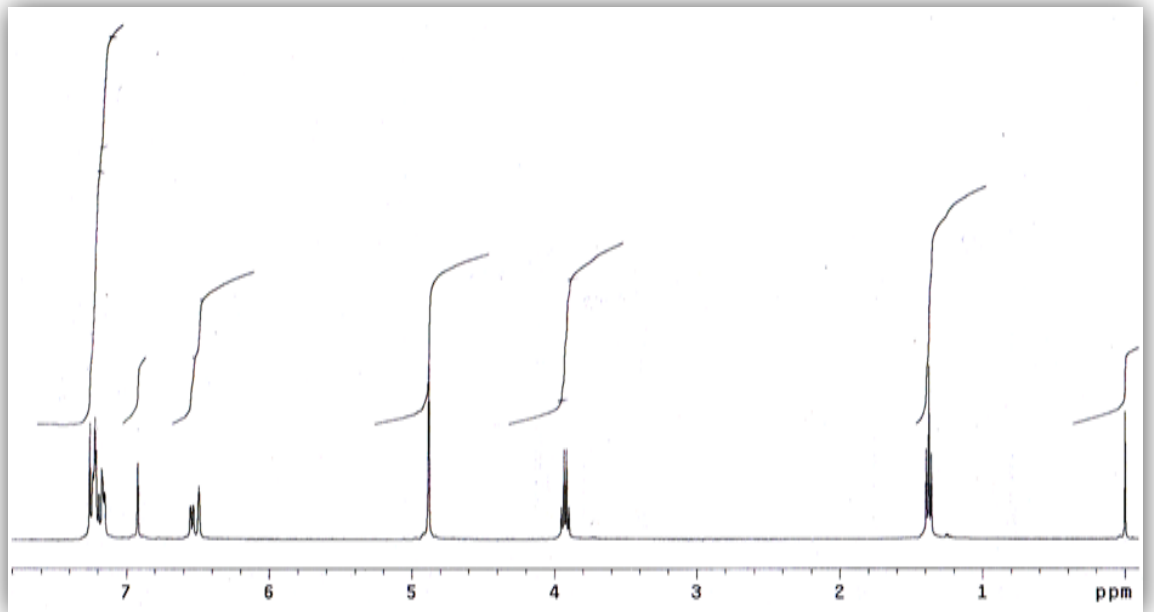
δ (ppm): 14.66 (OCH_2CH_3), 53.45 (OCH_2CH_3), 63.59 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 114.34, 120.29, 127.43, 128.39 ($\text{CH}=\text{CH}$), 128.66, 130.31, 132.11, 137.08, 142.31, 159.77, 164.39 ($\text{C}=\text{O}$).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.37)

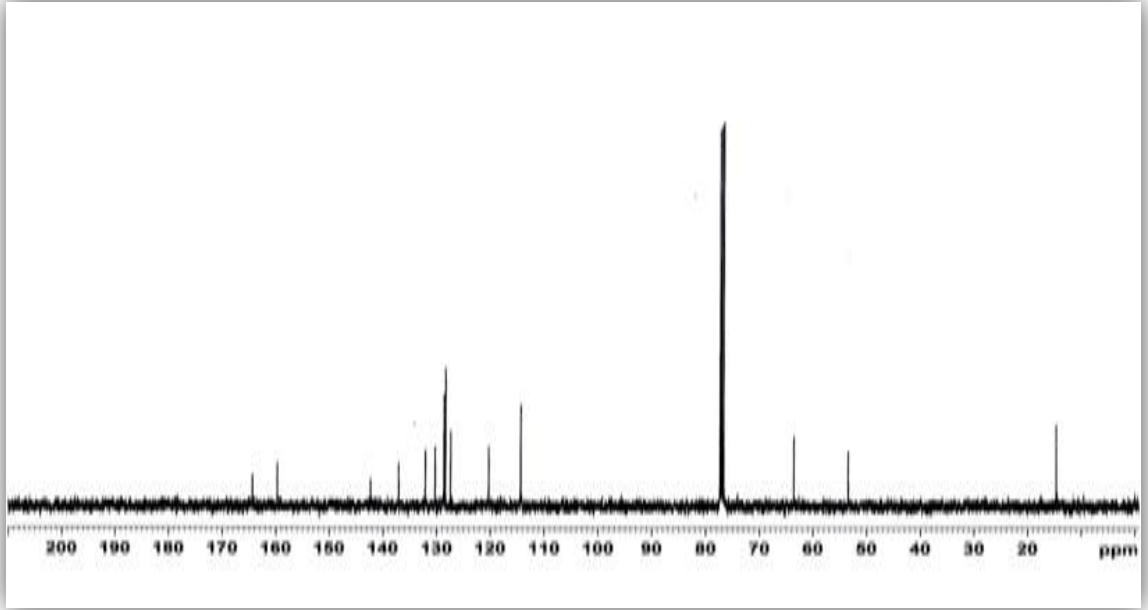
ESI-MS m/z: $[\text{M}+\text{H}]$ 536.8



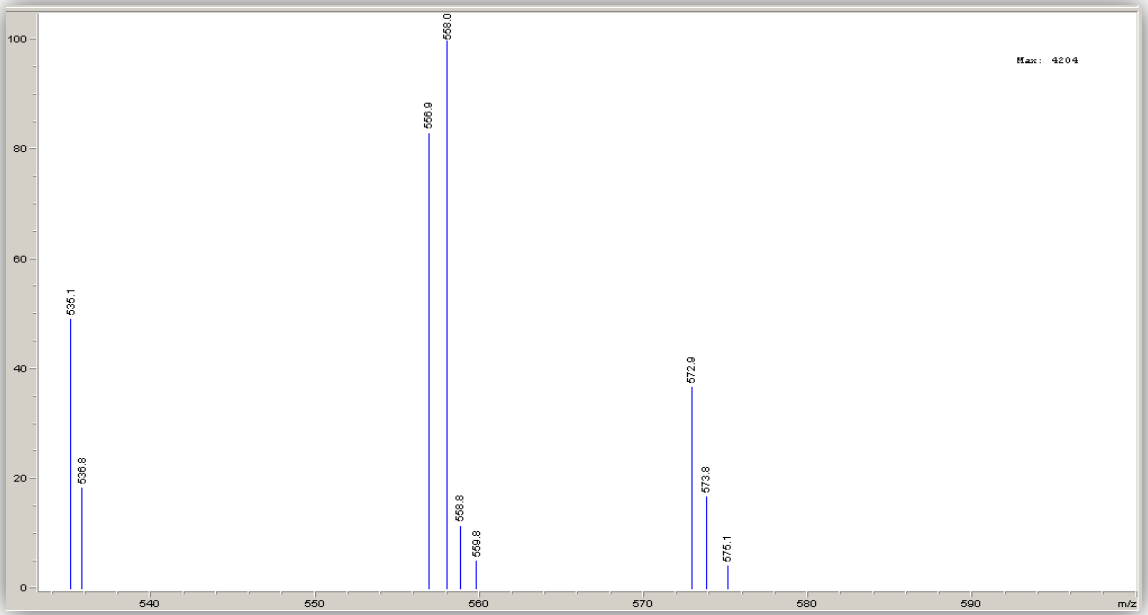
Şekil 3.34. 2i Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.35. 2i Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



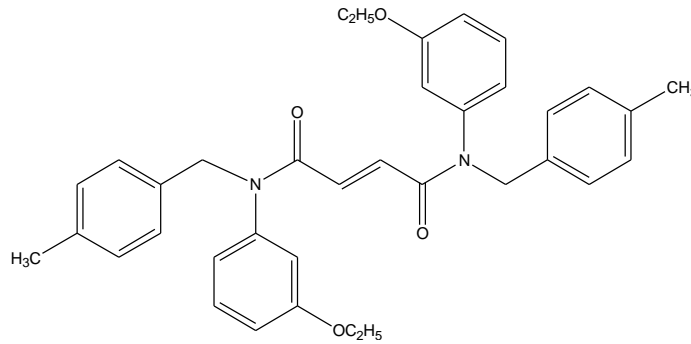
Şekil 3.36. 2i Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.37. 2i Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[(3-etoksi-fenil)-(4-metil-benzil)-amit] (2j)

(3-Etoksi-fenil)-(4-metil-benzil)-amin (0.3 g, 1,24 mmol) üzerine TEA (0.125 g, 1,24 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.095 g, 0.62 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 52 verimli 0.180 g beyaz renkli katı **2j** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 178–182 °C’ dir.



Büt-2-endioik asit bis-[(3-etoksi-fenil)-(4-metil-benzil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.38)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 296 (0,999)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.39)

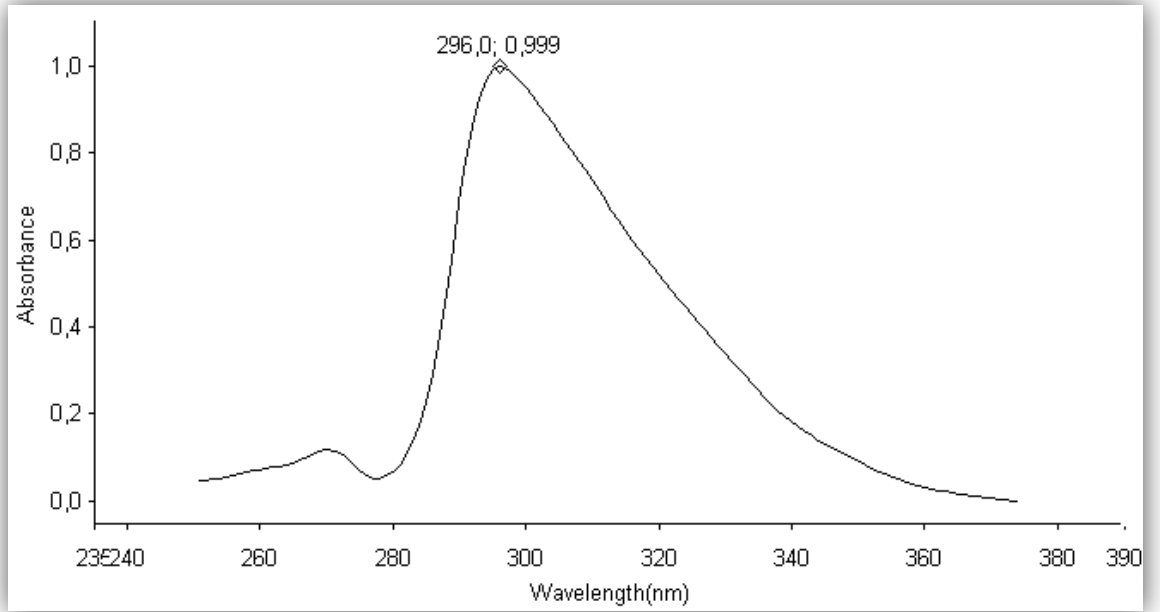
δ (ppm): 1.40-1.37 (t, 6H, 2xAr-OCH₂CH₃), 2.28 (s, 6H, 2xAr-CH₃), 3.96-3.91 (q, 4H, 2xOCH₂CH₃), 4.83 (s, 4H, 2xCH₂-N), 6.50 (s, 2H), 6.54-6.52 (d, 2H, J= 8.05 Hz), 6.84-6.82 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 6.90 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.06-7.04 (bs, 8H), 7.26-7.19 (m, 2H).

¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.40)

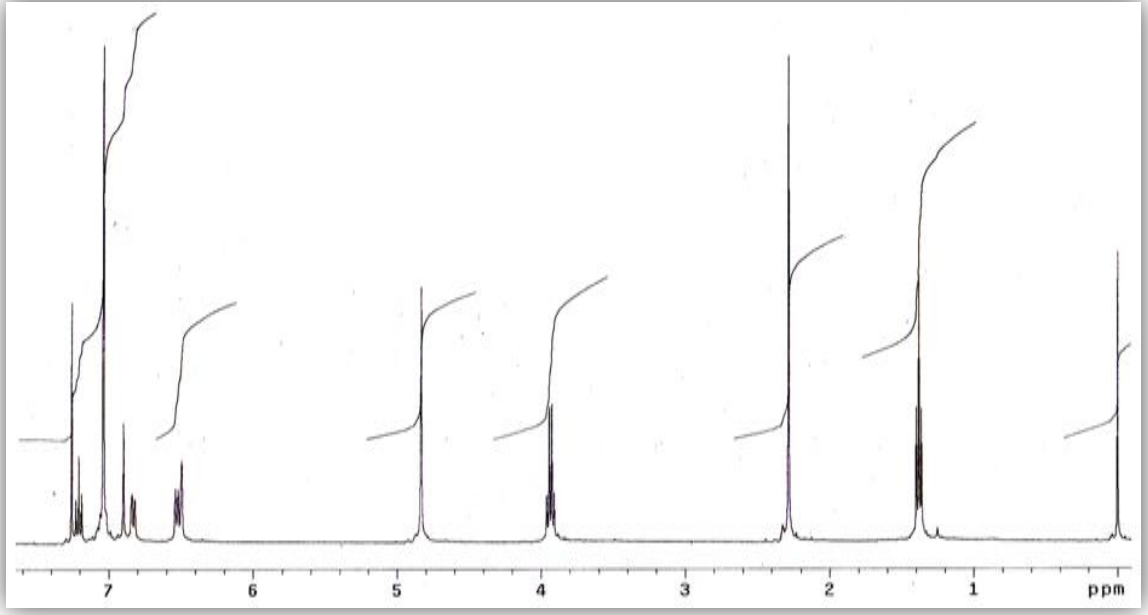
δ (ppm): 14.66 (OCH₂CH₃), 21.08 (Ar-CH₃), 53.19 (OCH₂CH₃), 63.59 (CH₂-N), 114.27, 114.36, 120.35, 128.64 (CH=CH), 129.04, 130.26, 132.11, 134.06, 137.03, 142.39, 159.74, 164.34 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.41)

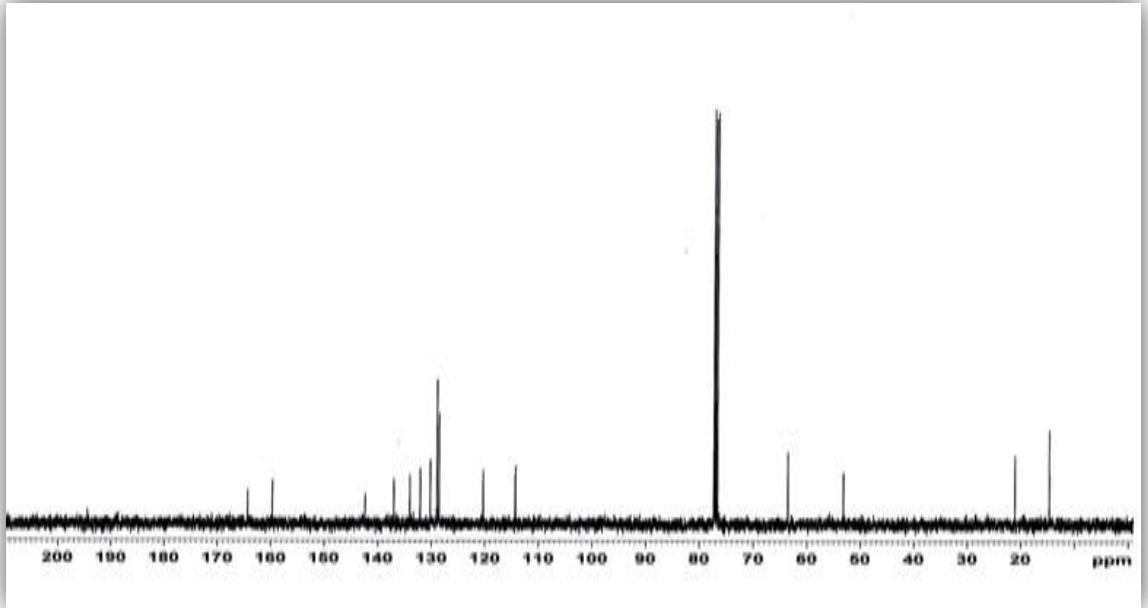
ESI-MS m/z: [M+H] 563.1



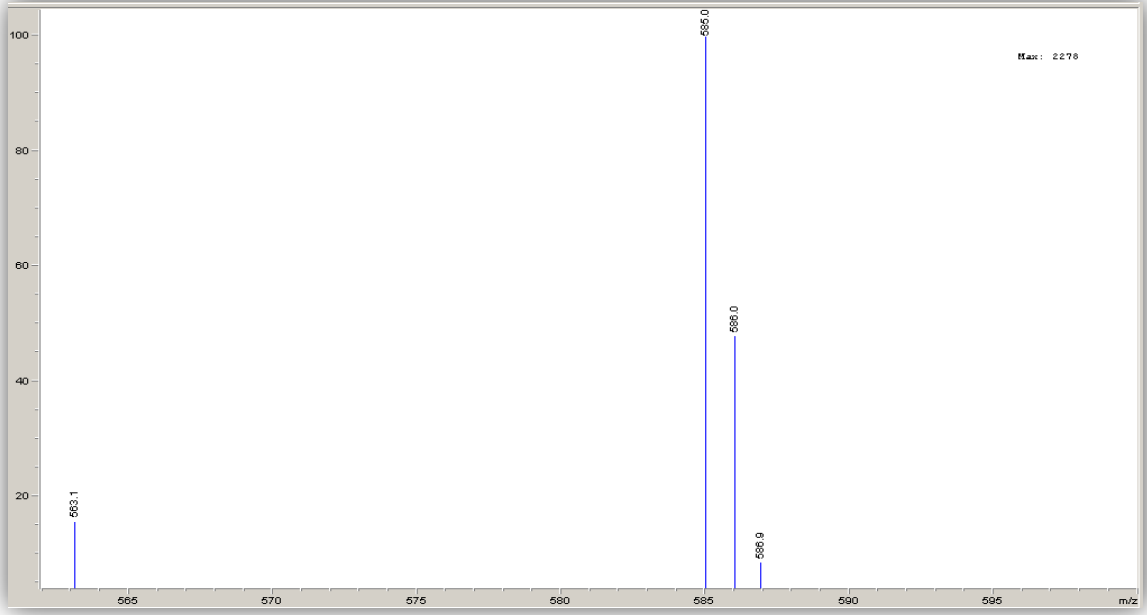
Şekil 3.38. 2j Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.39. 2j Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu



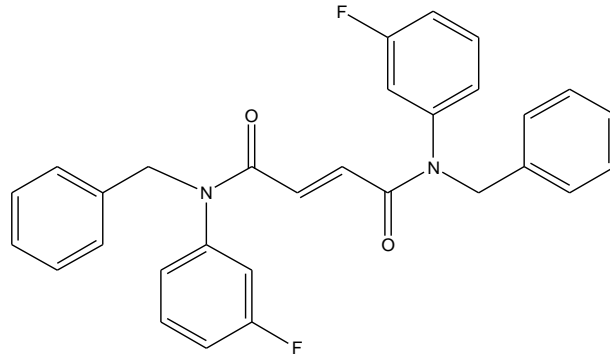
Şekil 3.40. 2j Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.41. 2j Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-floro-fenil)-amit] (2k)

Benzil-(3-floro-fenil)-amin (0.3 g, 1,49 mmol) üzerine TEA (0.15 g, 1,49 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.113 g, 0.74 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdaki uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 73 verimli 0.260 g kahverenkli renkli katı **2k** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 162–165 °C' dir.



Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-floro-fenil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.42)

λ_{maks}^{DMSO} (log ϵ) 301 (0,637)

^1H NMR Spektrumu (CDCl_3) (Şekil 3.43)

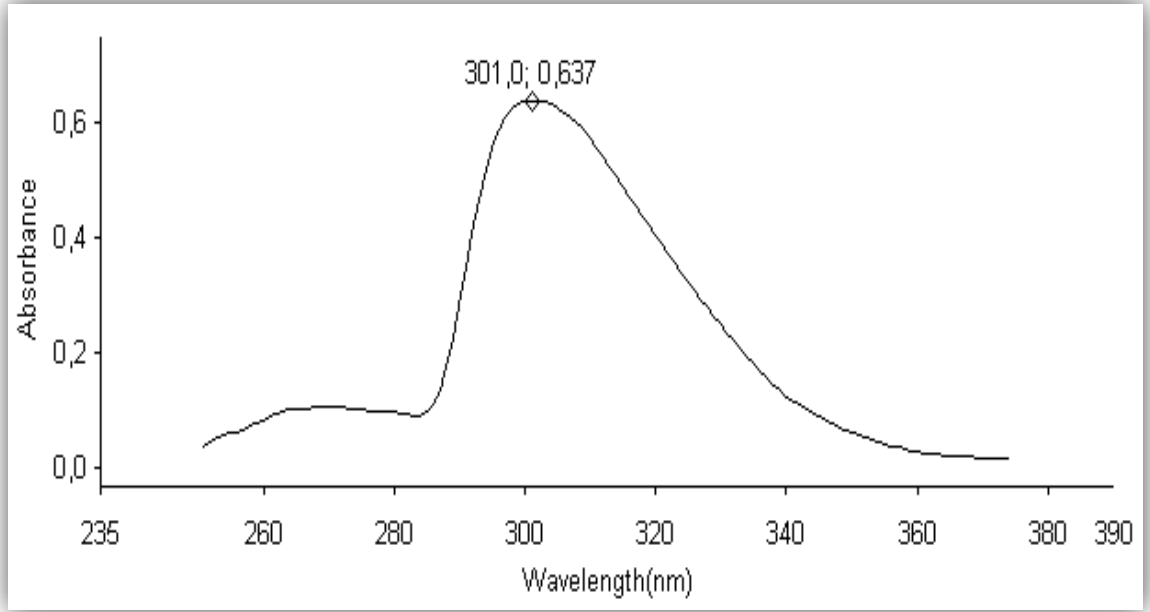
δ (ppm): 4.90 (s, 4H, 2xCH₂-N), 6.73 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.78-6.76 (d, 2H, J= 7.9 Hz), 7.07-7.05 (m, 2H), 7.16-7.30 (d, 4H, J= 7.4 Hz), 7.30- 7.25 (m, 6H), 7.33-7.30 (d, 2H, J= 8.0 Hz).

^{13}C NMR Spektrumu (CDCl_3) (Şekil 3.44)

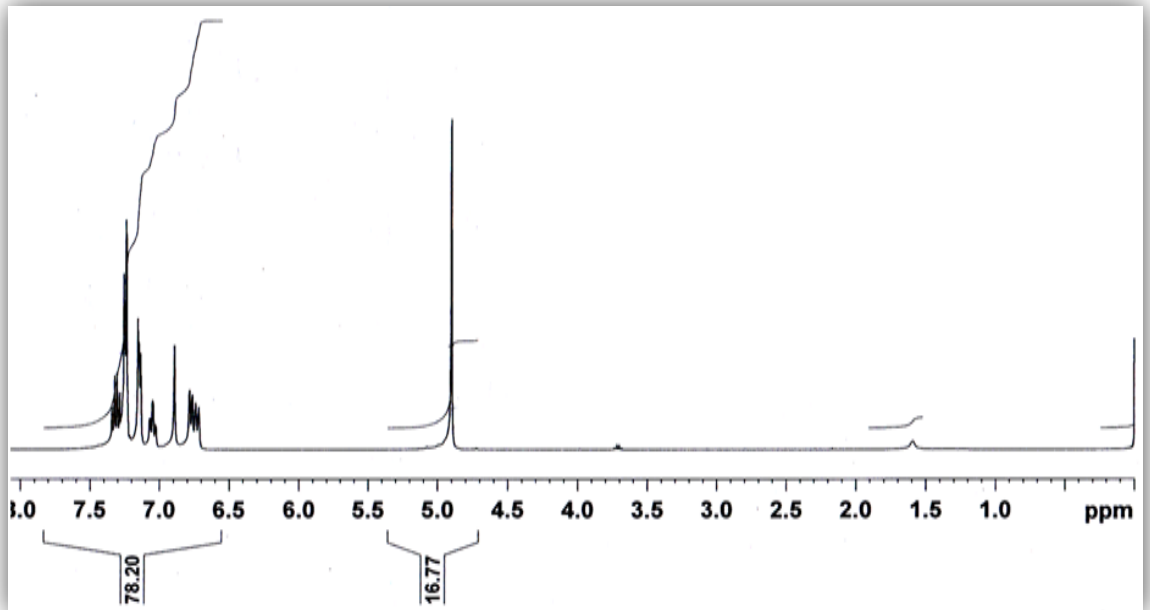
δ (ppm): 53.45 (CH₂-N), 115.56, 115.67, 124.11, 127.70 (CH=CH), 128.56, 130.86, 130.95, 132.18, 136.50, 142.66, 161.67, 164.07 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.45)

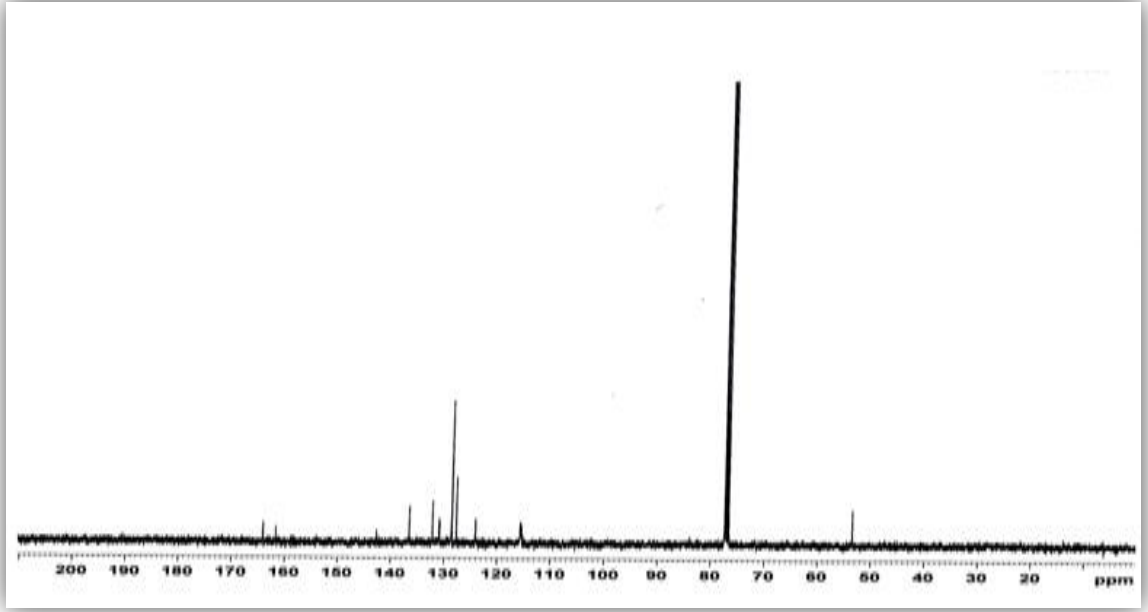
ESI-MS m/z: [M+H] 483.9



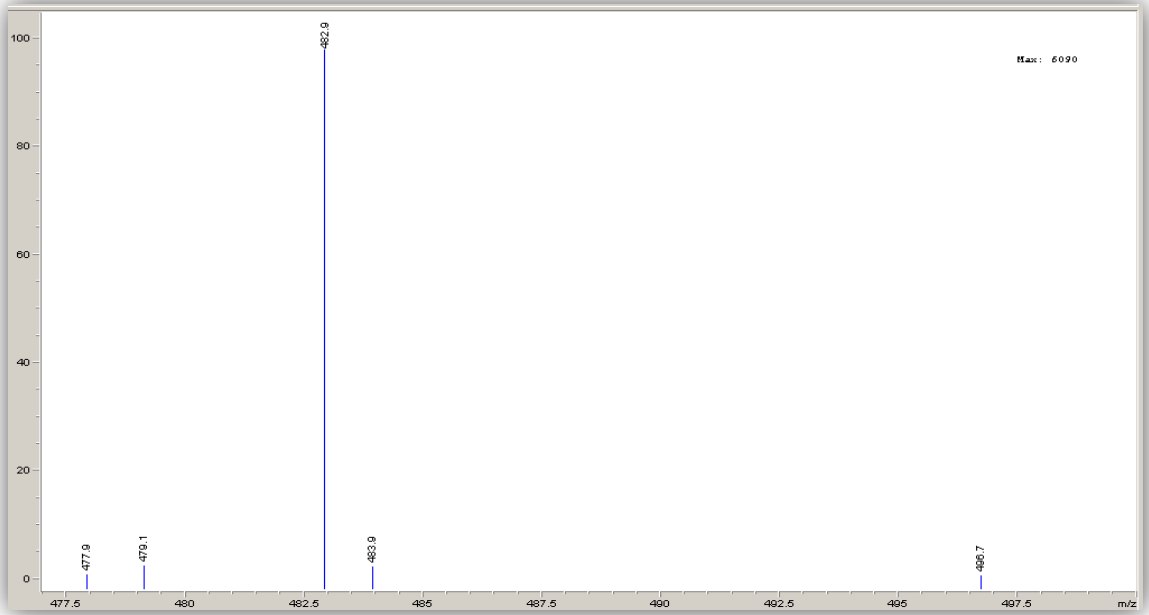
Şekil 3.42. 2k Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.43. 2k Bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



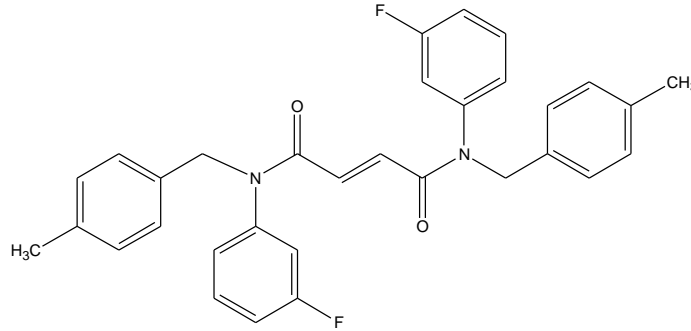
Şekil 3.44. 2k Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.45. 2k Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[(3-floro-fenil)-(4-metil-benzil)-amit] (21)

(3-Floro-fenil)-(4-metil-benzil)-amin (0.3 g, 1,39 mmol) üzerine TEA (0.141 g, 1,39 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etilasetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.107 g, 0.7 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 34 verimli 0.120 g kahverenkli renkli katı **21** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 189–191 °C' dir.



Büt-2-endioik asit bis-[(3-floro-fenil)-(4-metil-benzil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.45)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 301 (0,746)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.46)

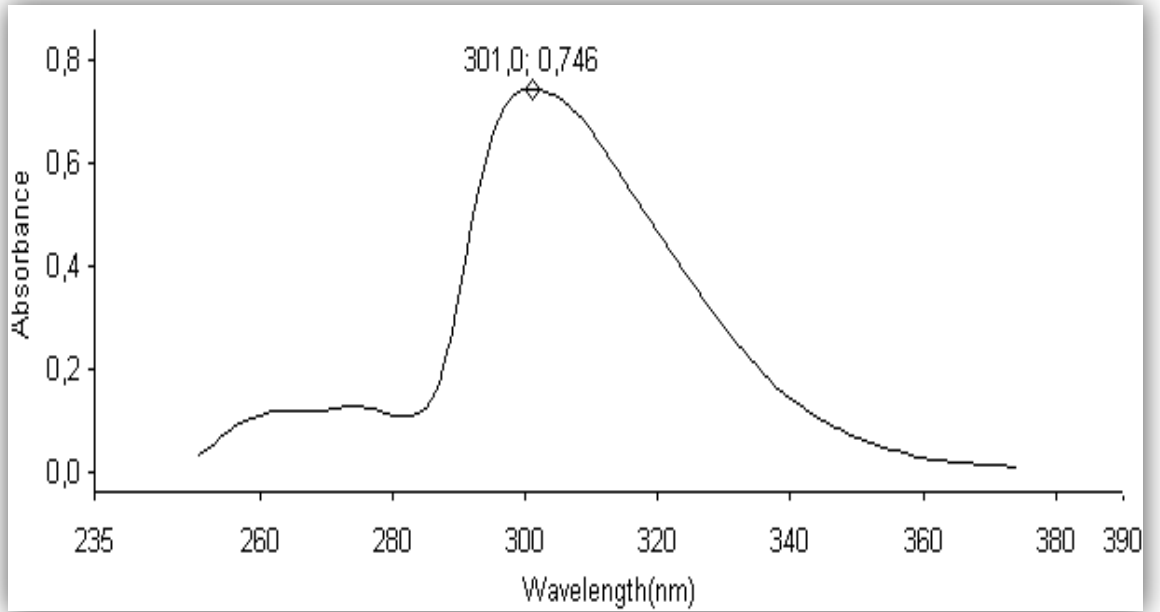
δ (ppm): 2.29 (s, 6H, 2xAr-CH₃), 4.85 (s, 4H, 2xCH₂-N), 6.78-6.70 (m, 4H), 6.87 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.03-7.01 (d, 4H, J=8.3 Hz), 7.06-7.04 (d, 4H, J= 8.3 Hz), 7.30-7.28 (d, 2H, J=8.0 Hz), 7.34-7.32 (m, 2H).

¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.47)

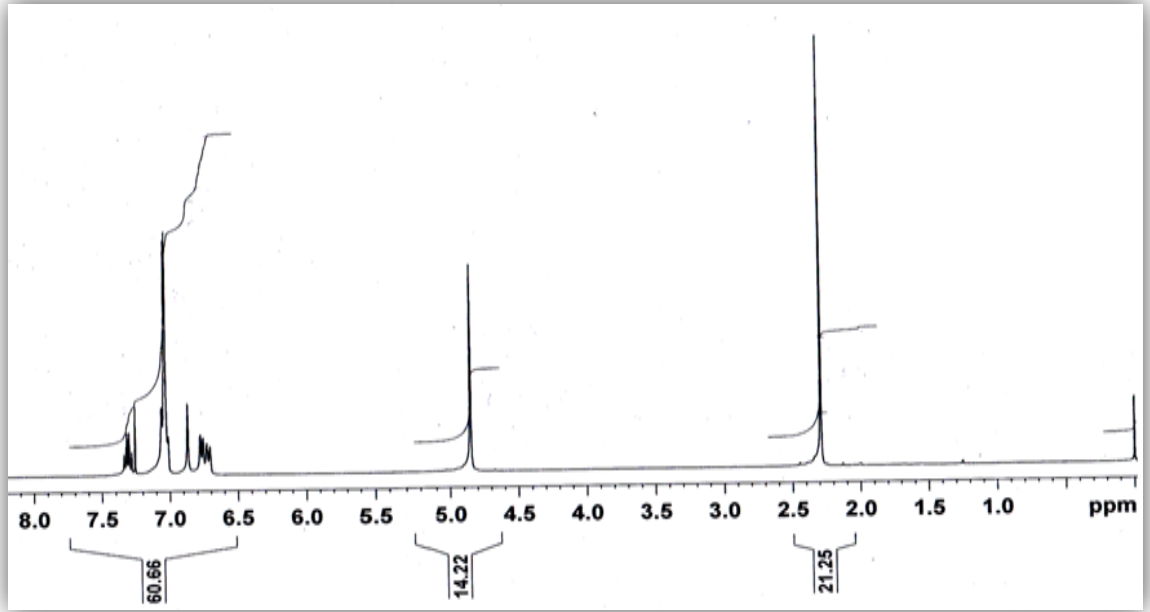
δ (ppm): 21.11 (Ar-CH₃), 53.19 (CH₂-N), 115.38, 115.60, 124.15, 128.57 (CH=CH),
129.21, 130.81, 130.90, 132.18, 137.38, 142.73, 161.65, 164.13 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.49)

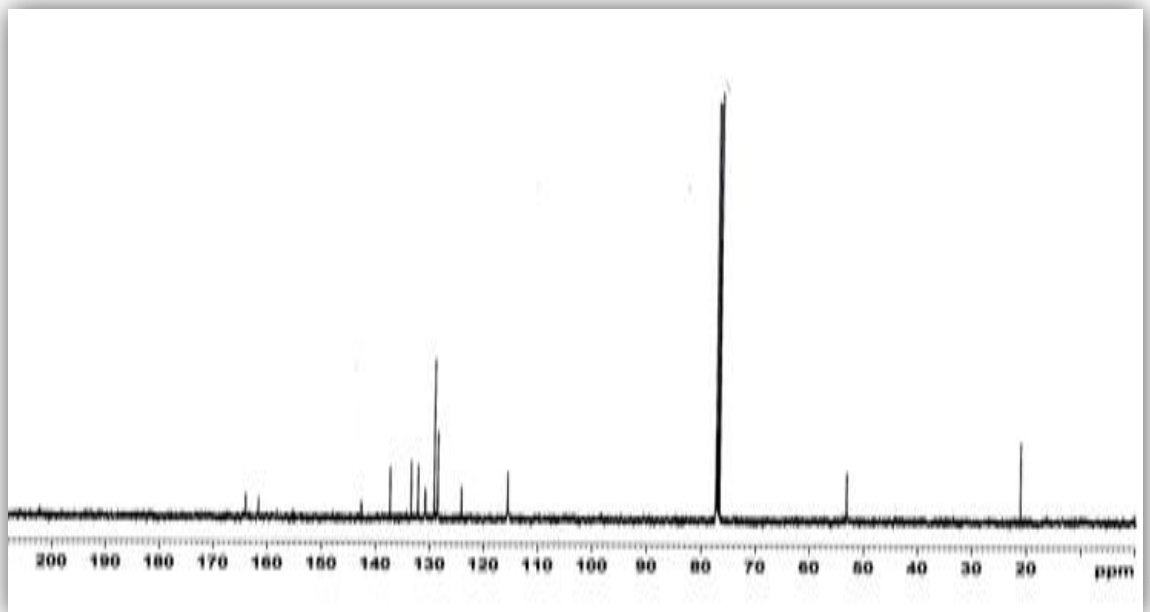
ESI-MS m/z: [M+H] 511.0



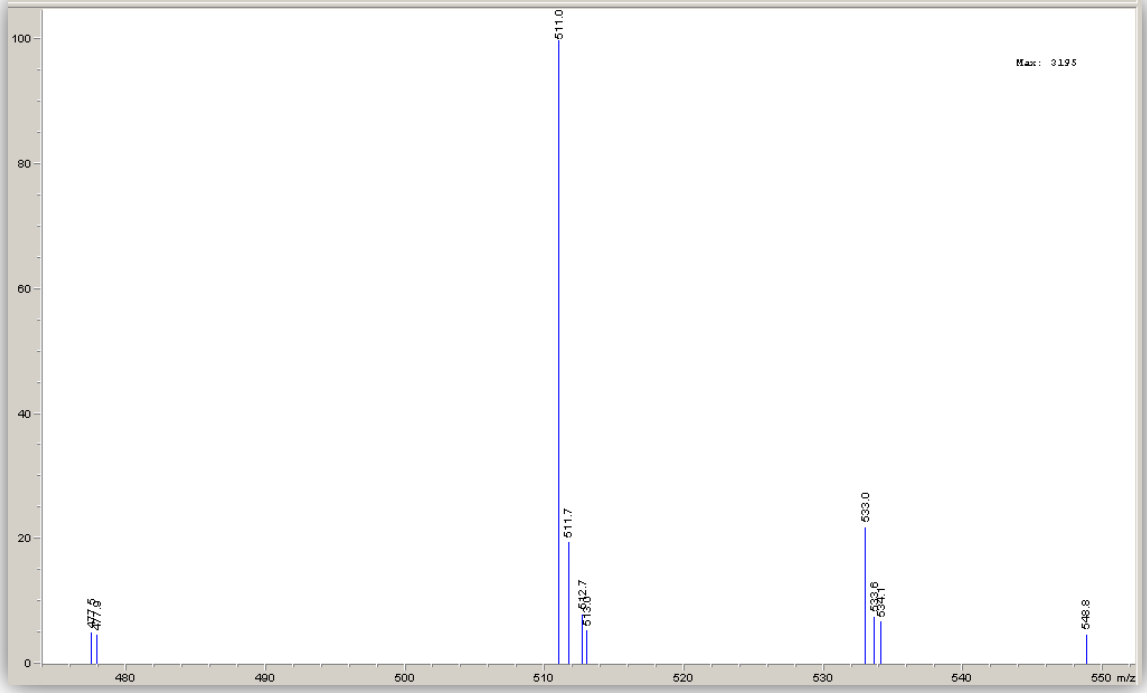
Şekil 3.46. 21 Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.47. 21 Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu



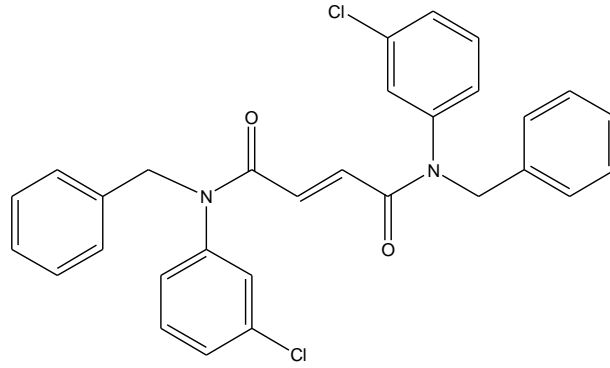
Şekil 3.48. 21 Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.49. 2l Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-kloro-fenil)-amit] (2m)

Benzil-(3-kloro-fenil)-amin (0.3 g, 1,38 mmol) üzerine TEA (0.139 g, 1,38 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.105 g, 0.69 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na_2SO_4 kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 44 verimli 0.155 g kahverenkli renkli katı **2m** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 178–180 °C’ dir.



Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-kloro-fenil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.50)

λ_{maks}^{DMSO} (log ϵ) 296 (1,078)

^1H NMR Spektrumu (CDCl_3) (Şekil 3.51)

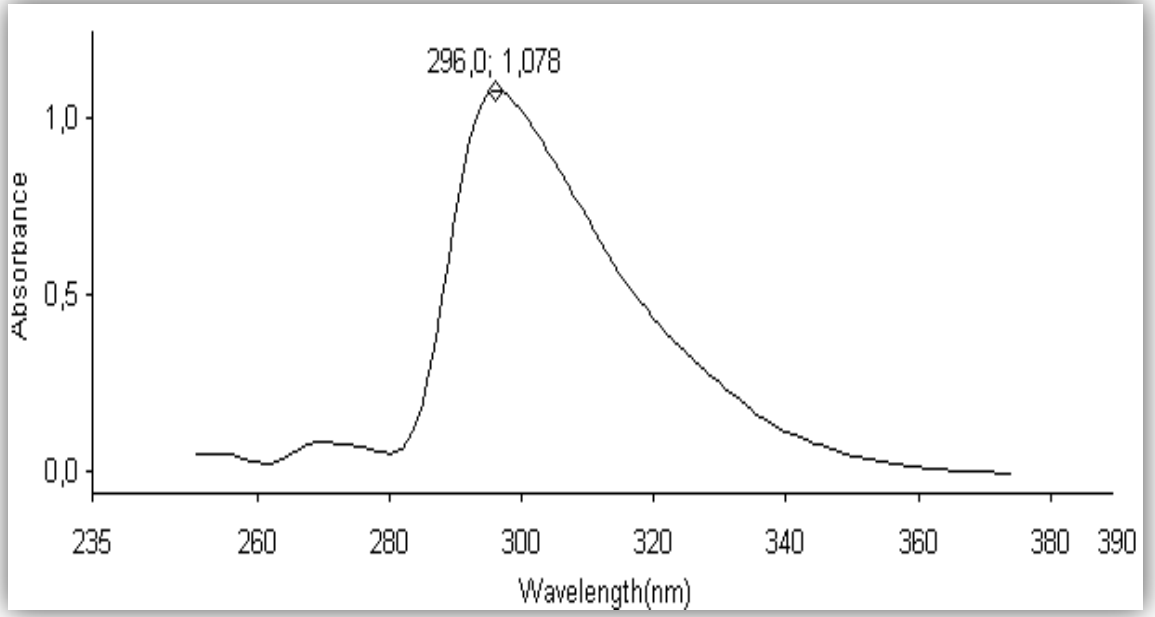
δ (ppm): 4.89 (s, 4H, 2xCH₂-N), 6.84- 6.83 (d, 2H, J= 7.7 Hz), 6.86 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.03 (s, 2H), 7.15-7.13 (d, 4H, J= 8.1 Hz), 7.25-7.24 (m, 2H), 7.29-7.26 (m, 6H), 7.34-7.32 (d, 2H, J= 8.0 Hz).

^{13}C NMR Spektrumu (CDCl_3) (Şekil 3.52)

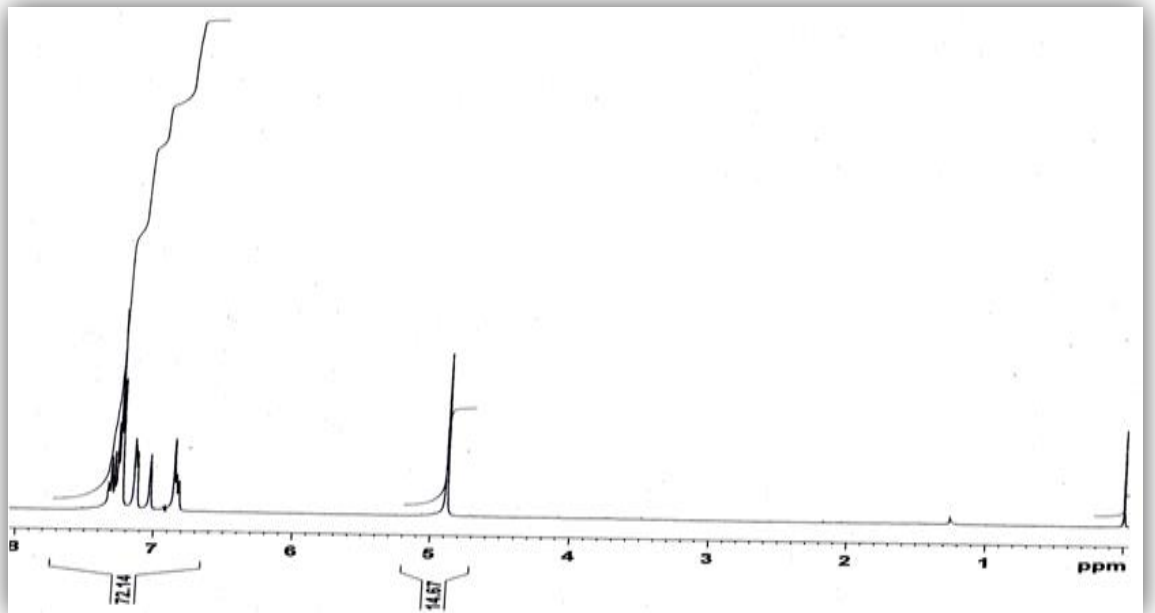
δ (ppm): 53.51 (CH₂-N), 126.68, 127.73, 128.21, 128.56 (CH=CH), 128.62, 128.69, 130.65, 132.20, 135.26, 136.42, 142.32, 164.04 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.53)

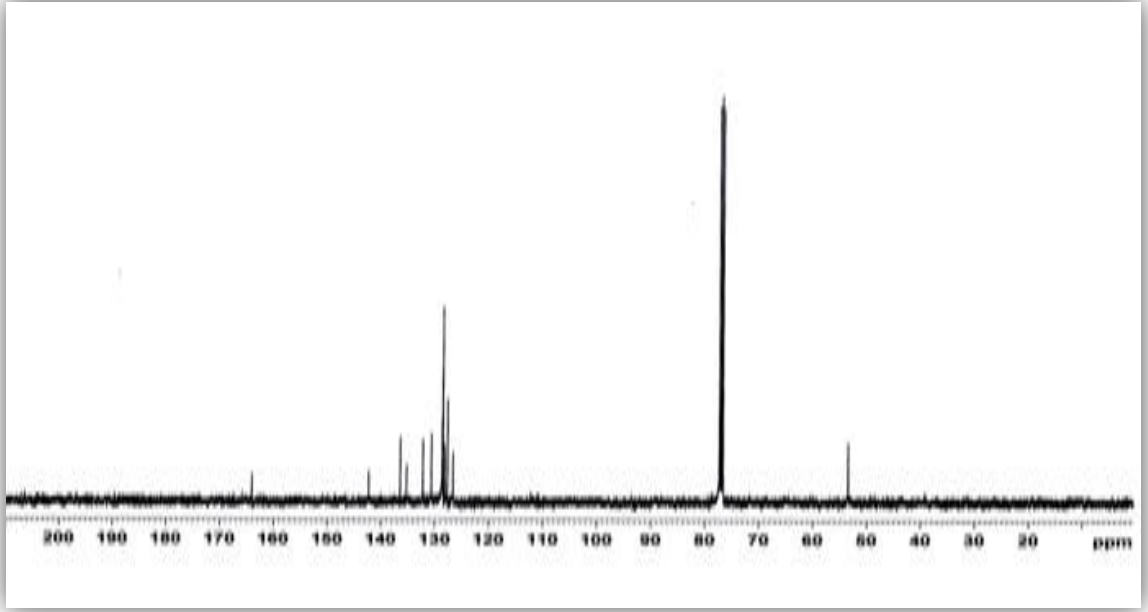
ESI-MS m/z: [M+H] 516.7



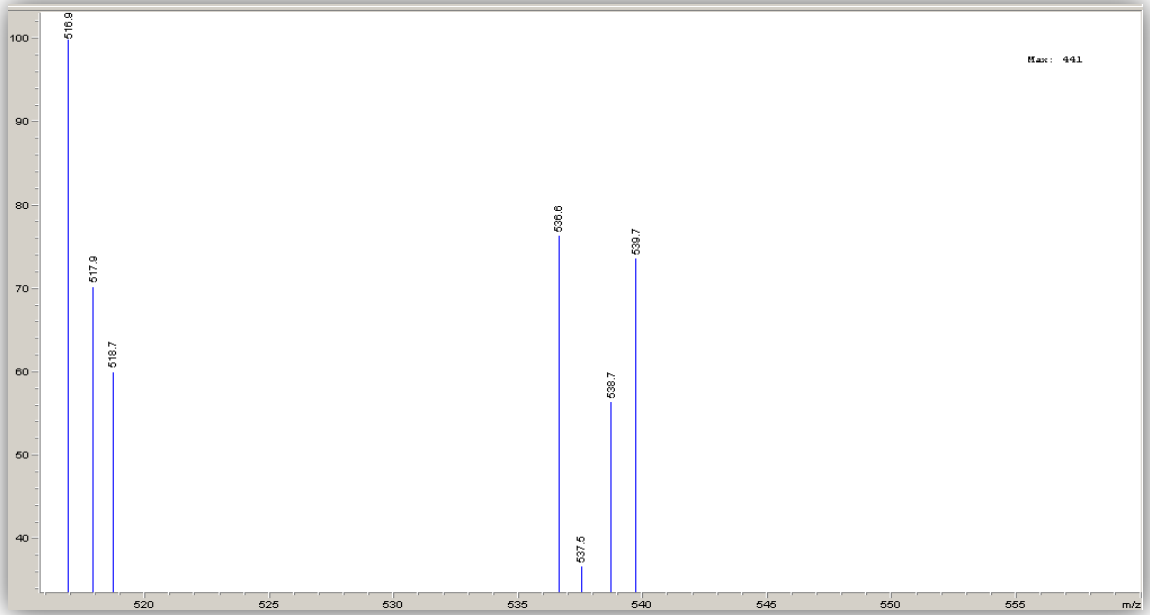
Şekil 3.50. 2m Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.51. 2m Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



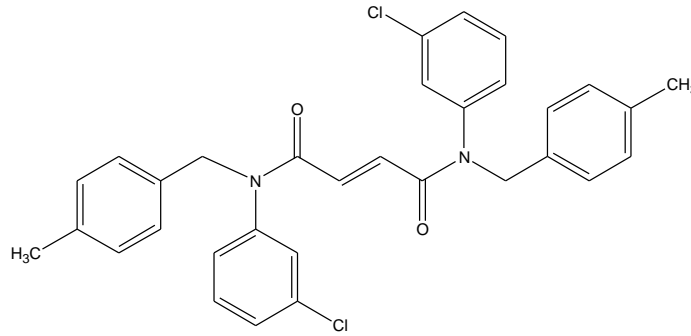
Şekil 3.52. 2m Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.53. 2m Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asid bis-[(3-kloro-fenil)-(4-metil-benzil)-amit] (2n)

(3-Kloro-fenil)-(4-metil-benzil)-amin (0.3 g, 1,29 mmol) üzerine TEA (0.13 g, 1,29 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.099 g, 0.65 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 36 verimli 0.126 g kahverenkli renkli katı **2n** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 197–199 °C' dir.



Büt-2-endioik asid bis-[(3-kloro-fenil)-(4-metil-benzil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.54)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 296 (0,972)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.55)

δ (ppm): 2.29 (s, 6H, 2xAr-CH₃) , 4.84 (s, 4H, 2x CH₂-N), 6.81 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.84 (s, 2H), 7.02 (bs, 8H), 7.06-7.04 (d, 2H, J= 8.2 Hz), 7.28-7.24 (m, 2H), 7.32-7.30 (d, 2H, J= 8.0 Hz).

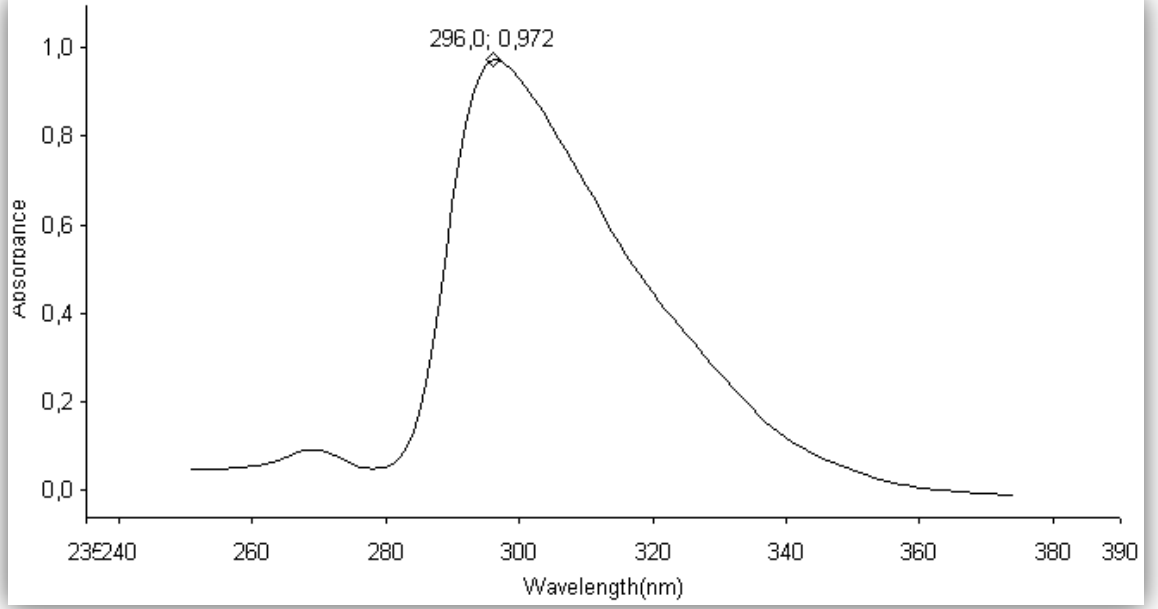
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.56)

δ (ppm): 21.11 (Ar-CH₃), 53.19 (CH₂-N), 115.38, 115.60, 124.15, 128.57 (CH=CH),

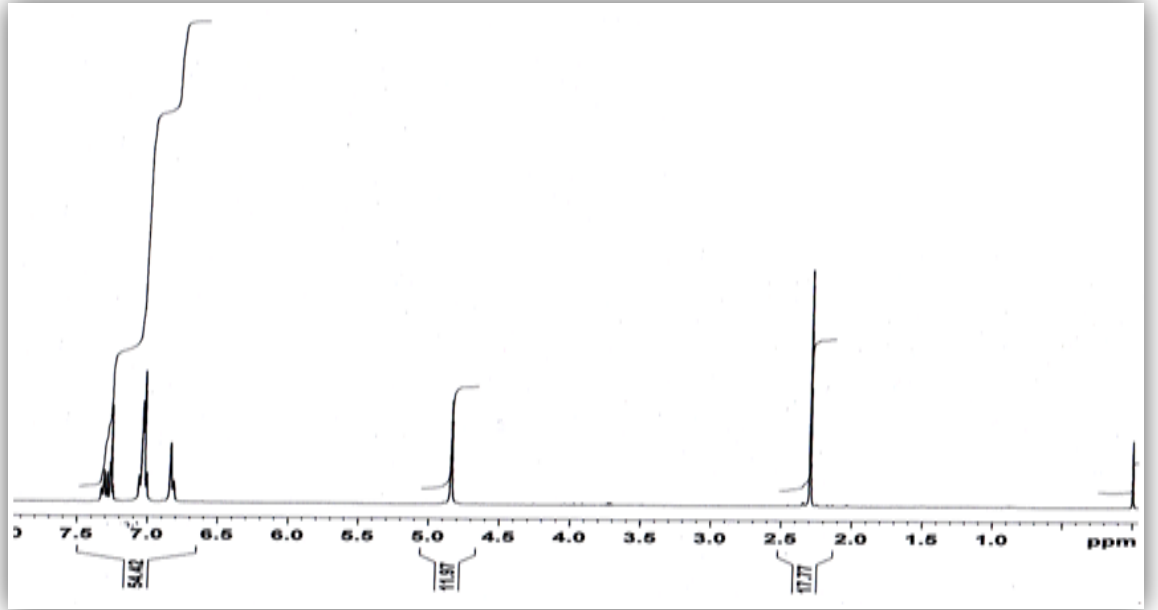
128.69, 129.21, 130.81, 130.90, 132.18, 137.38, 142.73, 164.13 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.57)

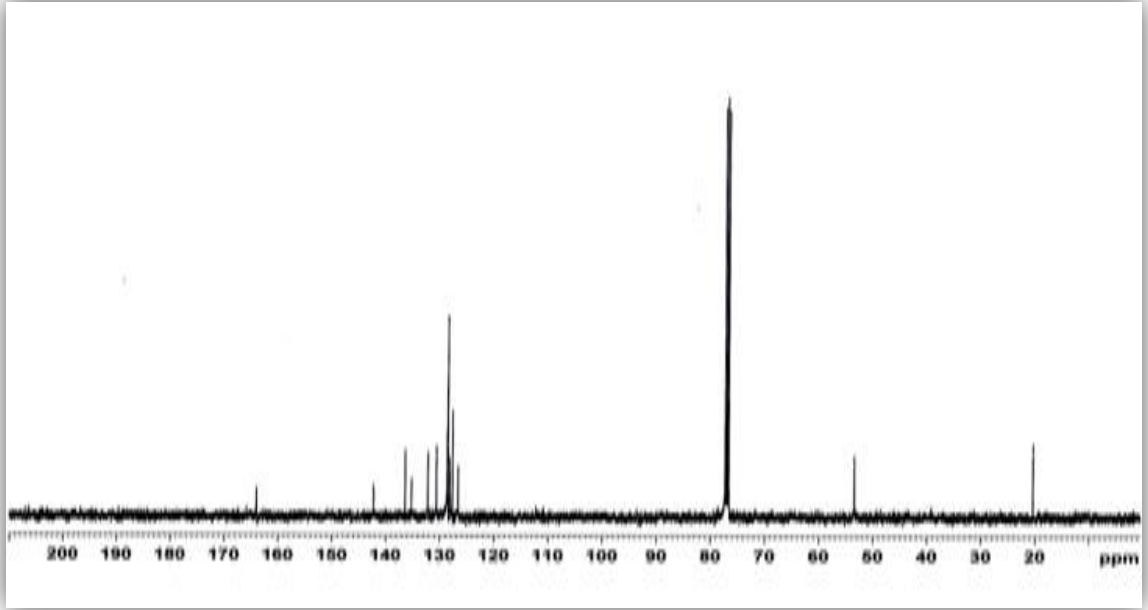
ESI-MS m/z: [M+H] 544.5



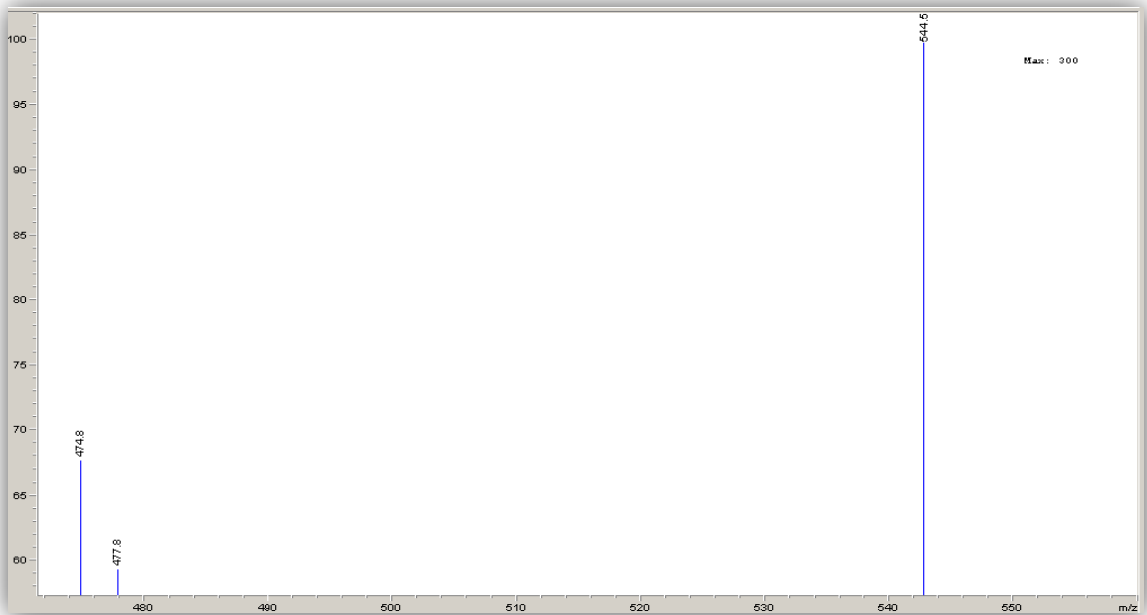
Şekil 3.54. 2n Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.55. 2n Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



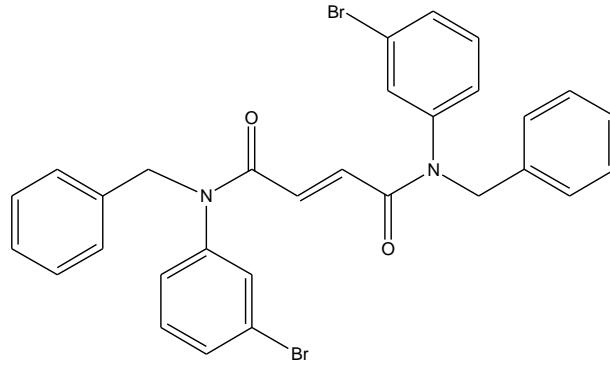
Şekil 3.56. 2n Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.57. 2n Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-bromo-fenil)-amit] (2o)

Benzil-(3-bromo-fenil)-amin (0.3 g, 1,14 mmol) üzerine TEA (0.115 g, 1,14mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.879 g, 0.57 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su- etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 56 verimli 0.194 g kahverenkli renkli katı **2o** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 174–178 °C' dir.



Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-bromo-fenil)-amit

UV Spektrumu (Şekil 3. 58)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 296 (0,724)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.59)

δ (ppm): 4.88 (s, 4H, 2x CH₂-N); 6.85 (s, 2H, etilen protonları CH=CH); 6.88 (bs, 2H); 7.14 (m, 4H); 7.21-7.20 (m, 4H); 7.24 (bs, 6H); 7.48-7.46 (d, 2H, J= 7.8 Hz).

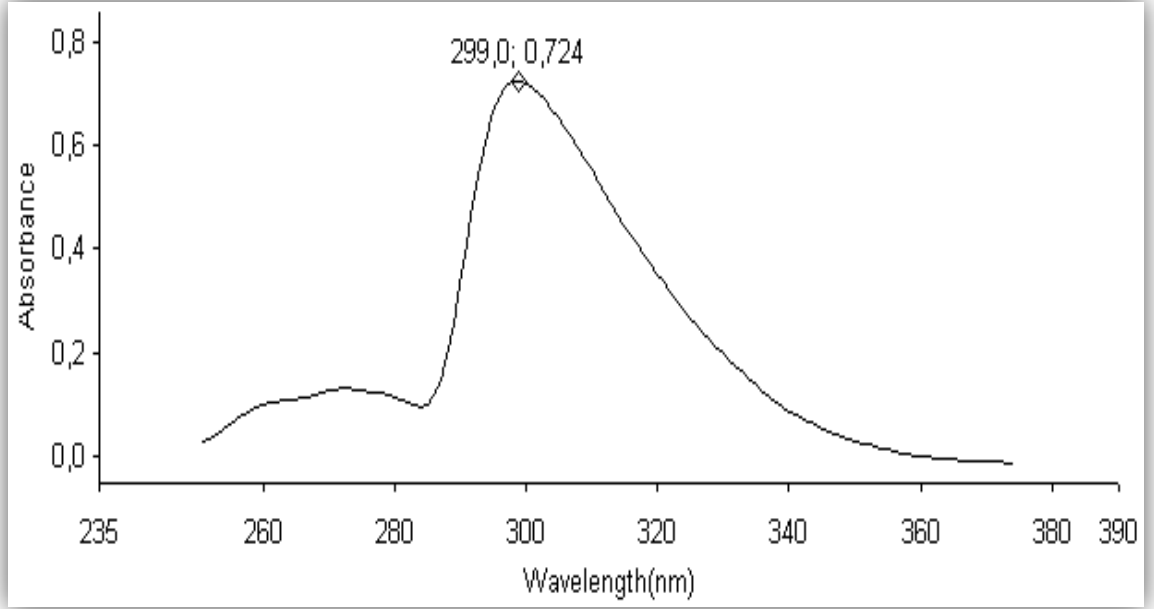
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.60)

δ (ppm): 53.54 (CH₂-N), 123.10, 127.20, 127.74, 128.57, 128.63 (CH=CH), 130.91,

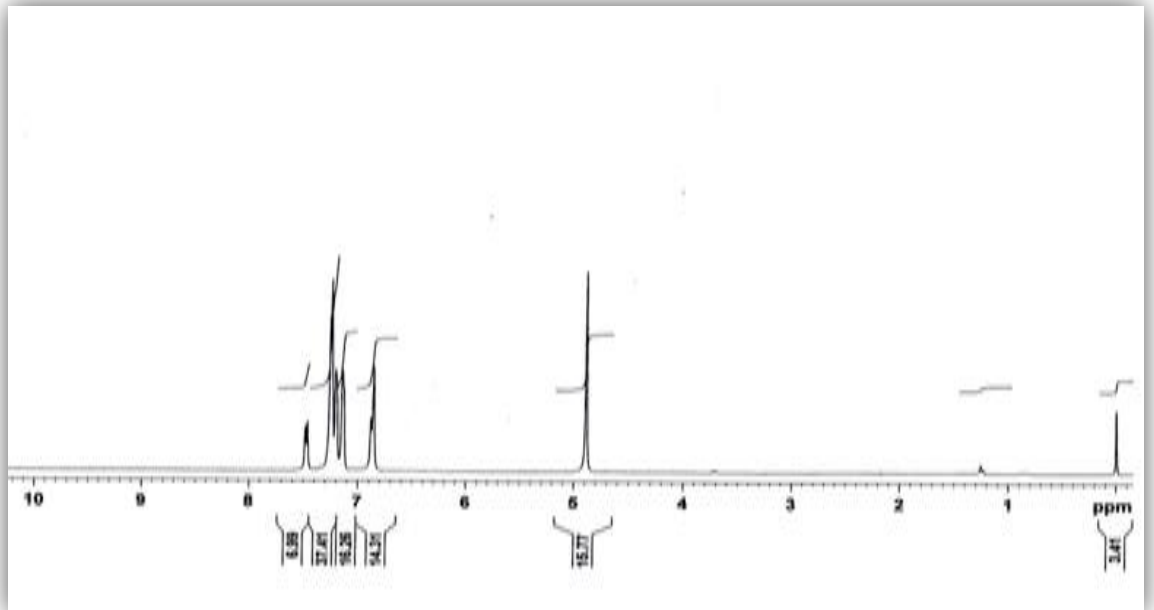
131.06, 131.61, 132.20, 136.40, 142.42, 164.02 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.61)

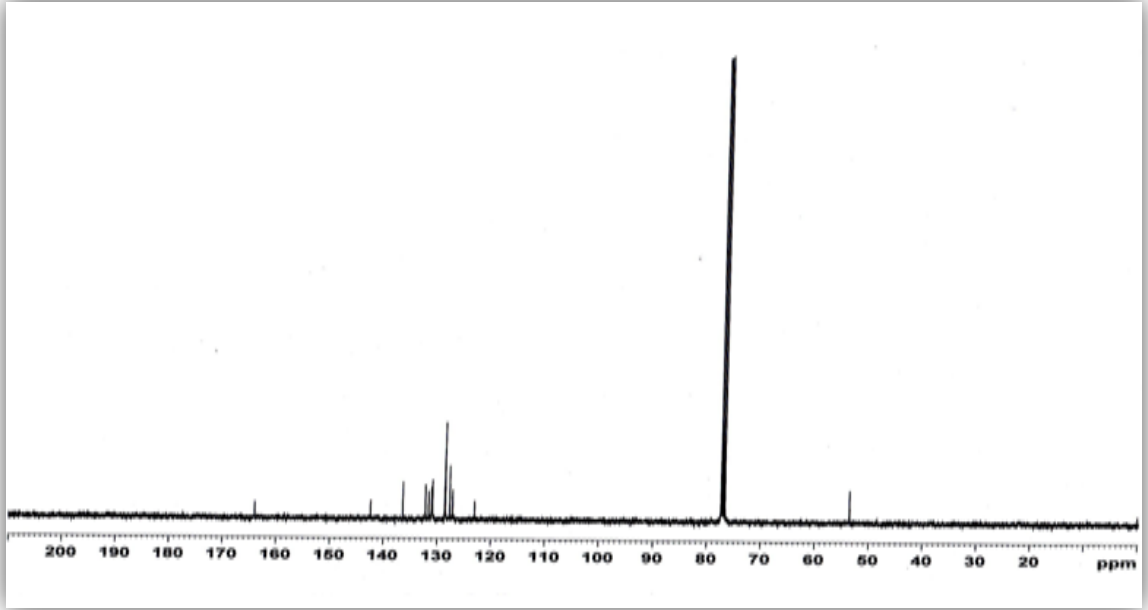
ESI-MS m/z: [M+H] 605.5



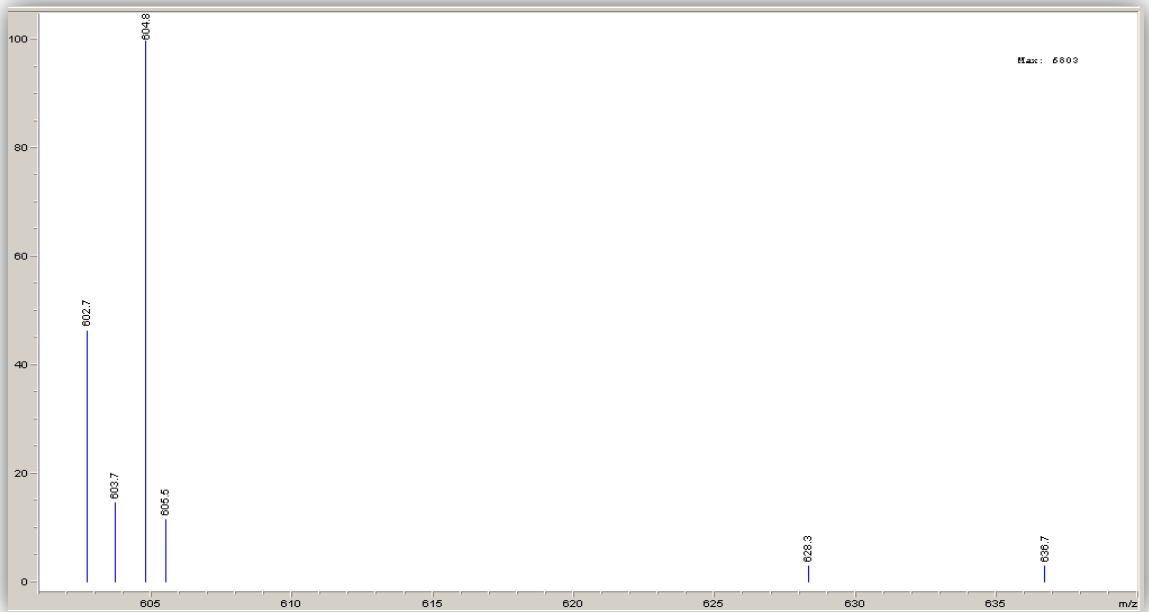
Şekil 3.58. 2o Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.59. 2o Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



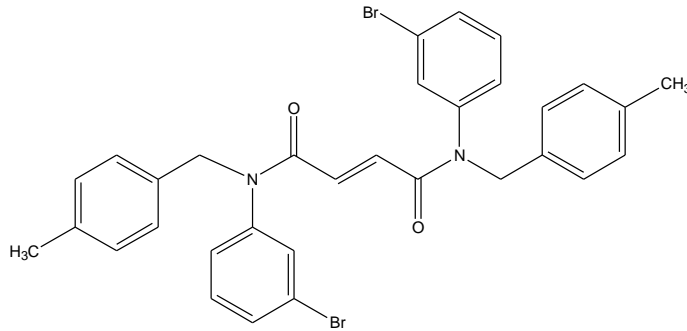
Şekil 3.60. 2o Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.61. 2o Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[(3-bromo-fenil)-(4-metil-benzil)-amit] (2p)

(3-Bromo-fenil)-(4-metil-benzil)-amin (0.3 g, 1.09 mmol) üzerine TEA (0.11 g, 1.09 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etil asetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.083 g, 0.54 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 59 verimli 0.200 g beyaz renkli katı **2p** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 196–198 °C’ dir.



Büt-2-endioik asit bis-[(3-bromo-fenil)-(4-metil-benzil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.62)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 300 (0,991)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.63)

δ (ppm): 2.29 (s, 6H, 2xCH₃), 4.84 (s, 4H, 2x CH₂-N), 6.83 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.87-6.85 (d, 2H, J= 8.0 Hz), 7.03-7.00 (d, 4H, J= 8.0 Hz), 7.06-7.00 (d, 4H, J= 8.0 Hz), 7.18 (s, 2H), 7.22-7.20 (d, 2H, J=8.0 Hz), 7.48-7.46 (m, 2H).

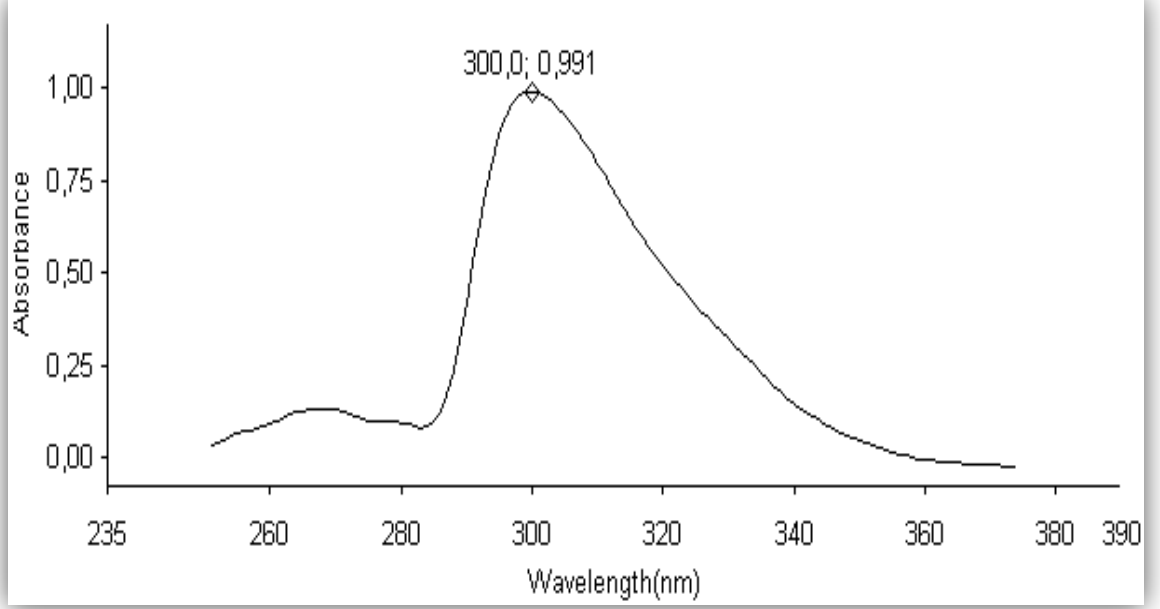
¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.64)

δ (ppm): 21.10 (Ar-CH₃), 53.29 (CH₂-N), 123.05, 127.24, 128.61, 129.21 (CH=CH),

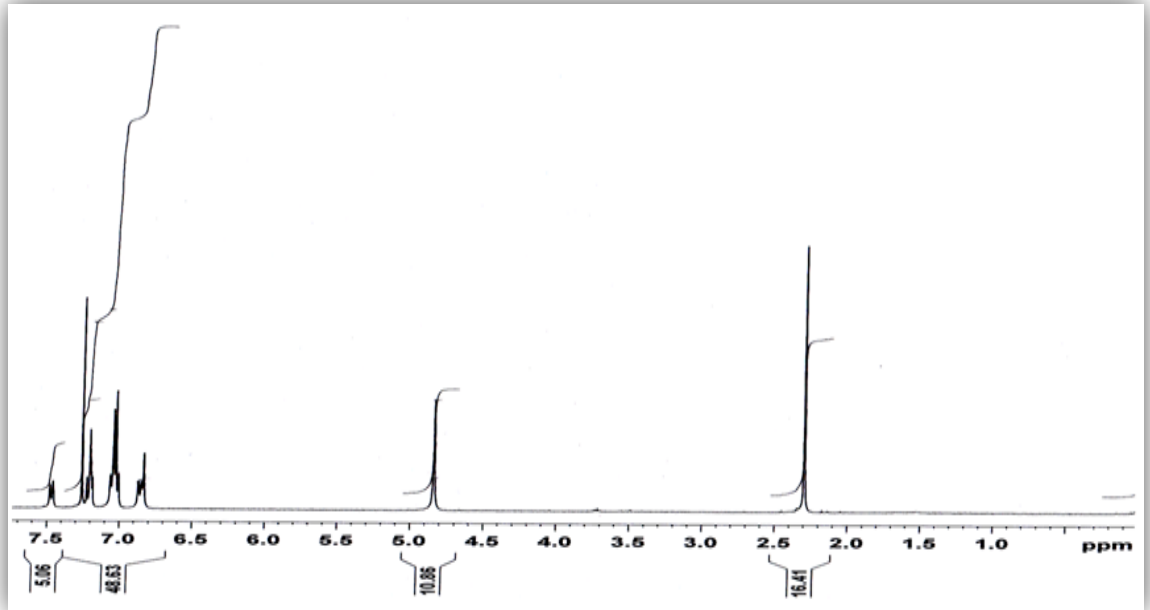
130.85, 131.06, 131.52, 132.21, 133.37, 137.40, 142.51, 163.98 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.65)

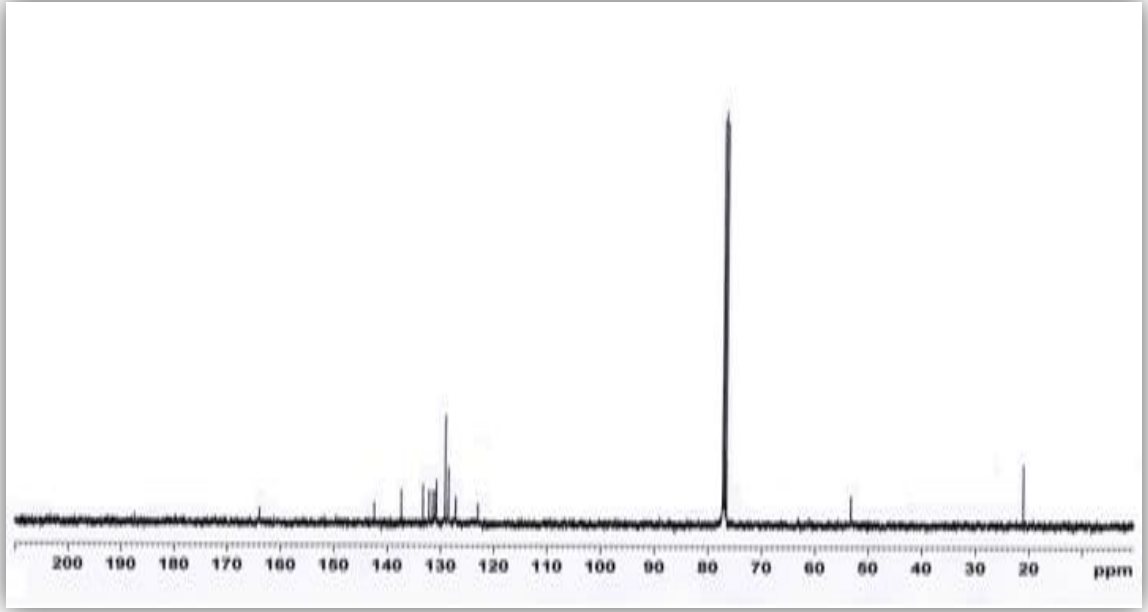
ESI-MS m/z: [M+H] 634.3



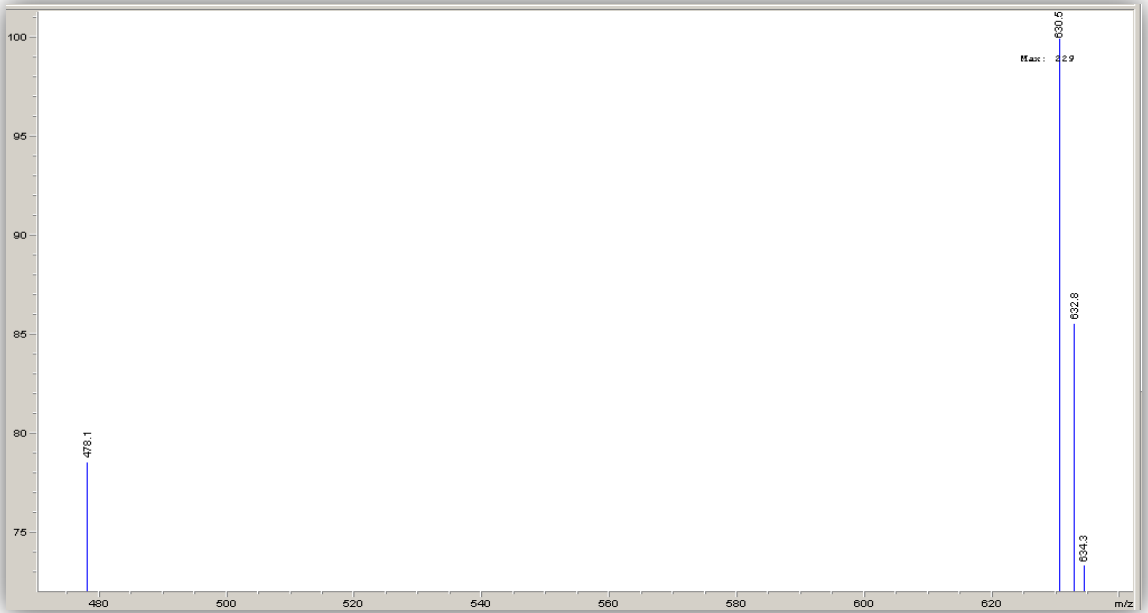
Şekil 3.62. 2p Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.63. 2p Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrum



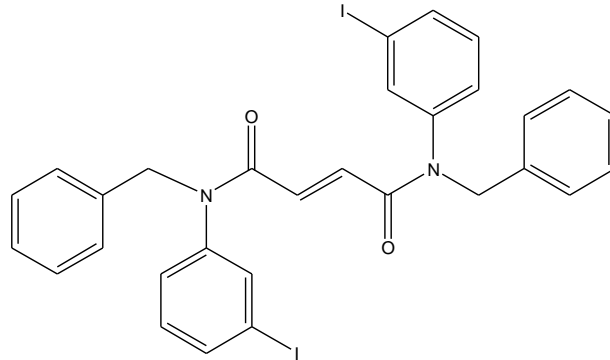
Şekil 3.64. 2p Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.65. 2p Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-iyodo-fenil)-amit] (2r)

Benzil-(3-iyodo-fenil)-amin (0.3 g, 0.97 mmol) üzerine TEA (0.11 g, 0.97 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5°C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etilasetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.075 g, 0.49 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na₂SO₄ kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 50 verimli 0.170 g beyaz renkli katı **2r** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 210–212 °C’dir.



Büt-2-endioik asit bis-[benzil-(3-iyodo-fenil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.66)

$$\lambda_{maks}^{DMSO} (\log \epsilon) 301 (0,550)$$

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.67)

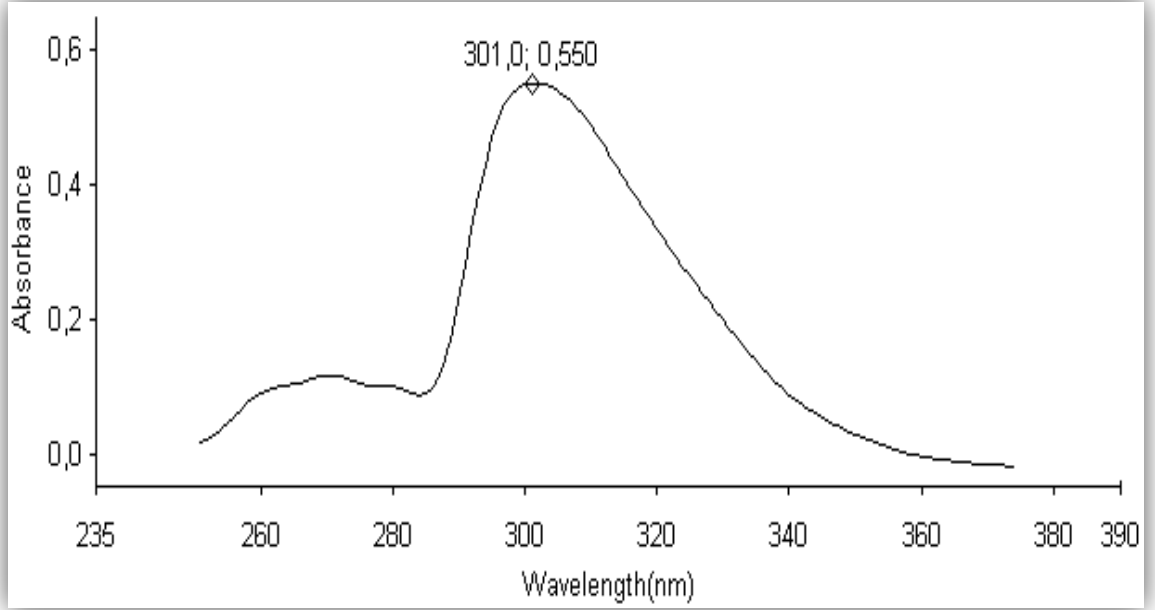
δ (ppm): 4.87 (s, 4H, 2x CH₂-N), 6.84 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.91-6.89 (d, 2H, J= 7.6 Hz), 7.08-7.04 (m, 2H), 7.15-7.13 (d, 4H, J= 7.3 Hz), 7.24 (bs, 6H), 7.49 (s, 2H), 7.68-7.66 (d, 2H, J= 7.8 Hz).

¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃) (Şekil 3.68)

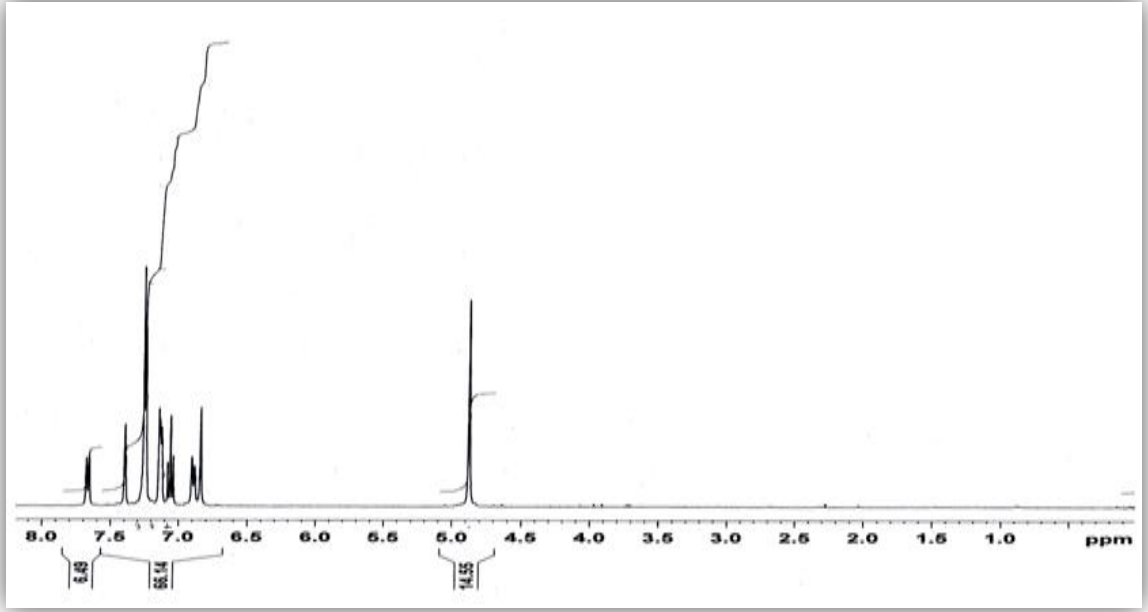
δ (ppm): 53.55 (CH₂-N), 127.72, 127.89, 128.55 (CH=CH), 128.66, 131.03, 132.21, 136.40, 136.84, 137.49, 142.30, 164.01 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.69)

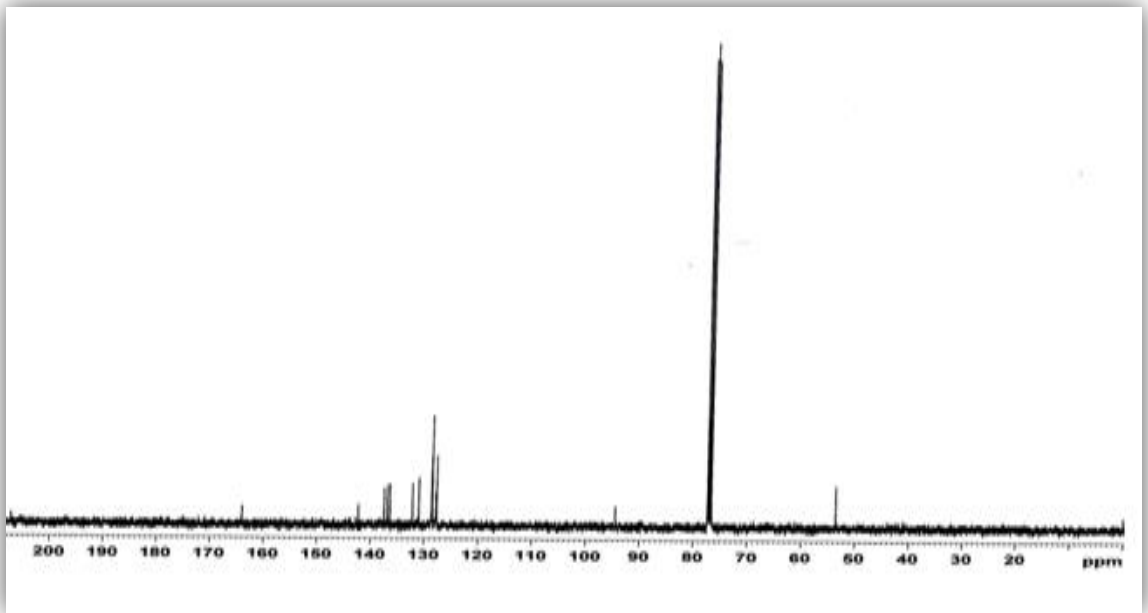
ESI-MS m/z: [M+H] 699.7



Şekil 3.66. 2r Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.67. 2r Bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu



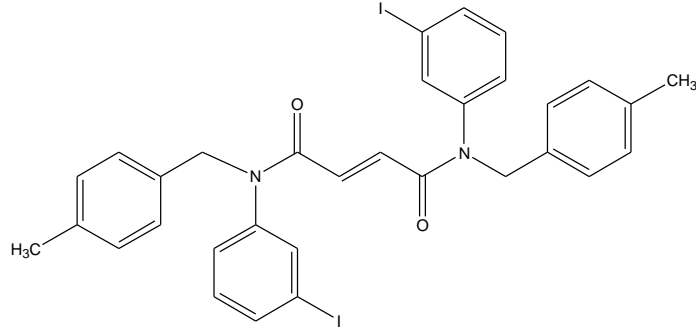
Şekil 3.68. 2r Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.69. 2r Bileşiğinin Kütle Spektrumu

Büt-2-endioik asit bis-[(3-iyodo-fenil)-(4-metil-benzil)-amit] (2s)

(3-İyodo-fenil)-(4-metil-benzil)-amin (0.3 g, 0.928 mmol) üzerine TEA (0.093 g, 0.928 mmol) ve 5 ml etilasetat ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 0–5 °C buz banyosunda soğutuldu ve 5 ml etilasetat içinde çözündürülmüş fumaril klorür (0.071 g, 0.46 mmol) 30 dakika içinde damla damla bu karışıma ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı 12 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon karışımına su-etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Karışım içinde kalan suyu uzaklaştırmak için Na_2SO_4 kullanıldı ve karışım süzgeç kağıdından süzülerek filtre edildi. Evaporatör yardımıyla karışımdaki organik çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol kristalizasyonu yapılarak % 39 verimli 0.130 g beyaz renkli katı **2s** bileşiği elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 142–147 °C’dir.



Büt-2-endioik asit bis-[(3-iyodo-fenil)-(4-metil-benzil)-amit]

UV Spektrumu (Şekil 3.70)

λ_{maks}^{DMSO} (log ϵ) 307 (1,405)

^1H NMR Spektrumu (CDCl_3) (Şekil 3.71)

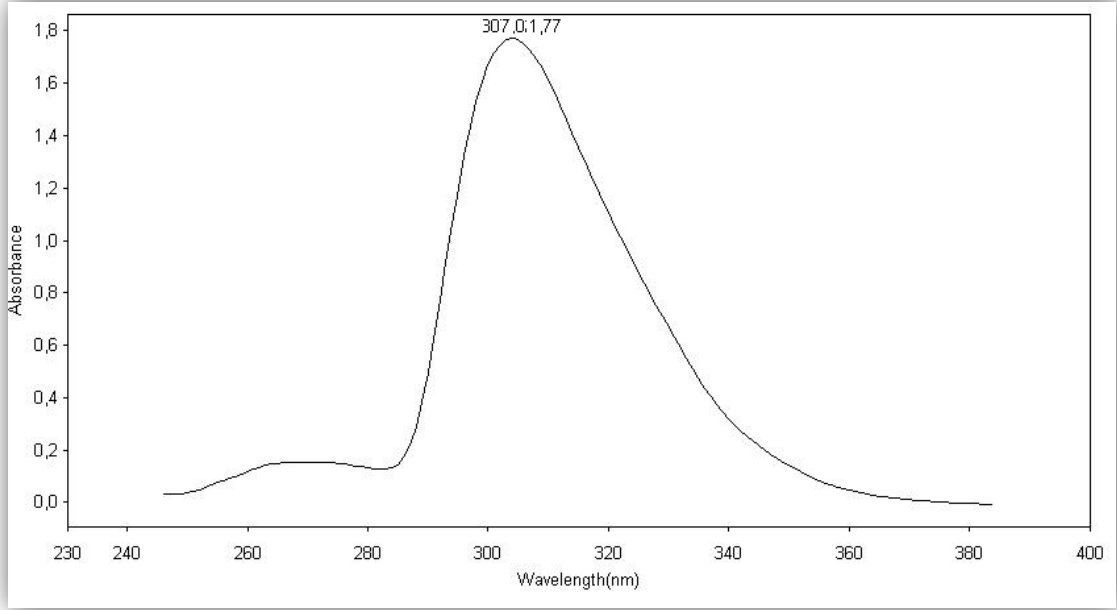
δ (ppm): 2.30 (s, 6H, 2xAr-CH₃), 4.60 (s, 4H, 2xCH₂-N), 6.66 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.97-6.95 (d, 2H, J= 7.9 Hz), 7.05-7.01 (bs, 8H,), 7.08 (s, 2H); 7.13- 7.12 (m, 2H); 7.69-7.67 (d, 2H).

^{13}C NMR Spektrumu (CDCl_3) (Şekil 3.72)

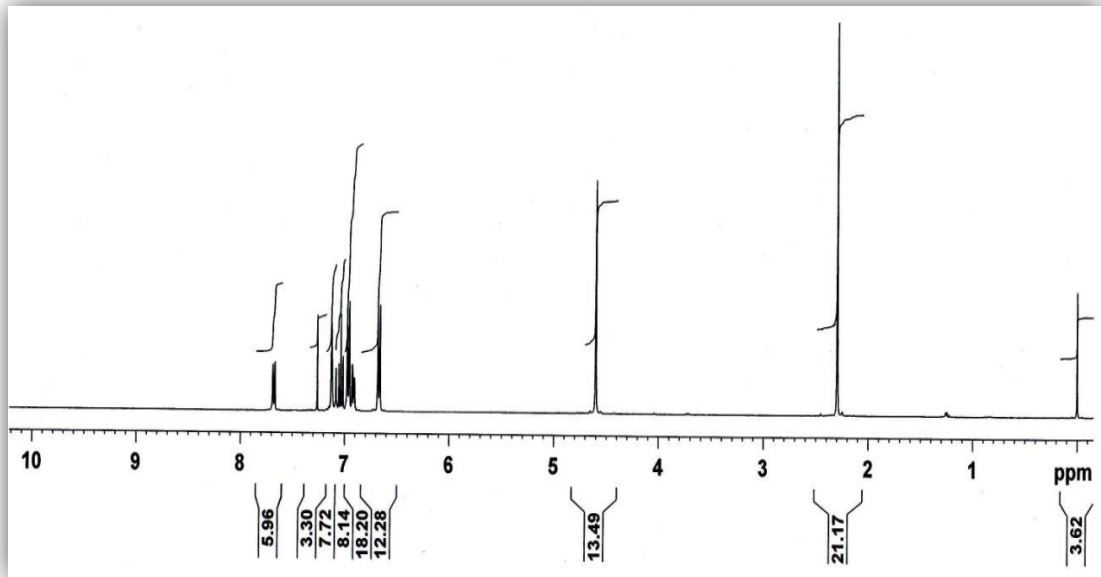
δ (ppm): 21.15 (Ar-CH₃), 51.58 (CH₂-N), 128.21, 128.28, 129.26 (CH=CH), 129.45, 130.41, 132.73, 137.11, 137.37, 137.54, 140.35, 163.85 (C=O).

Kütle Spektrumu (Şekil 3.73)

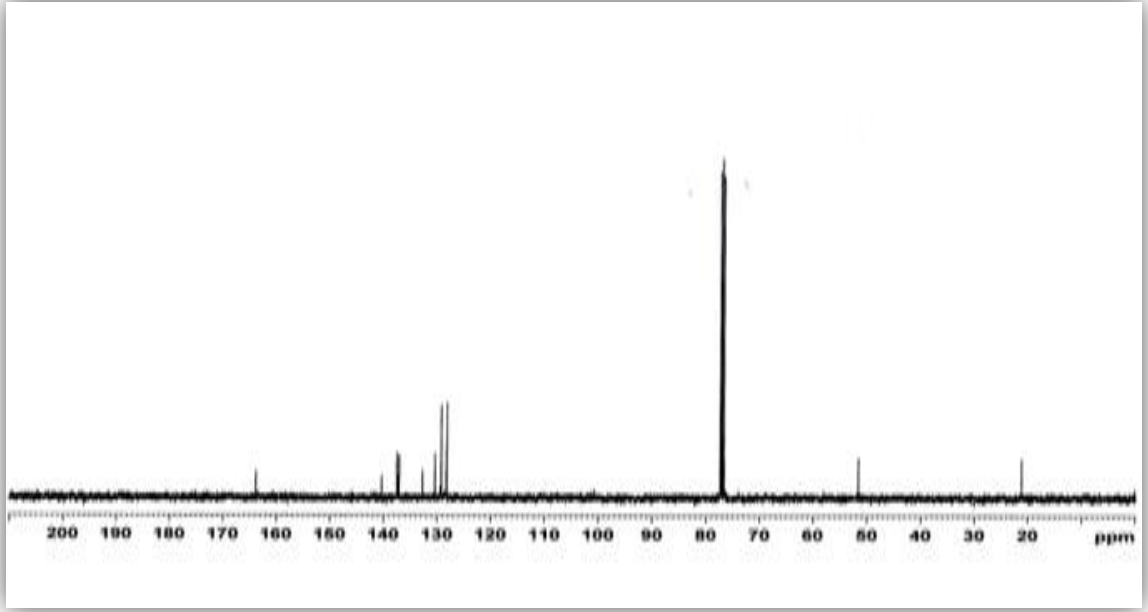
ESI-MS m/z: [M+H] 727.5



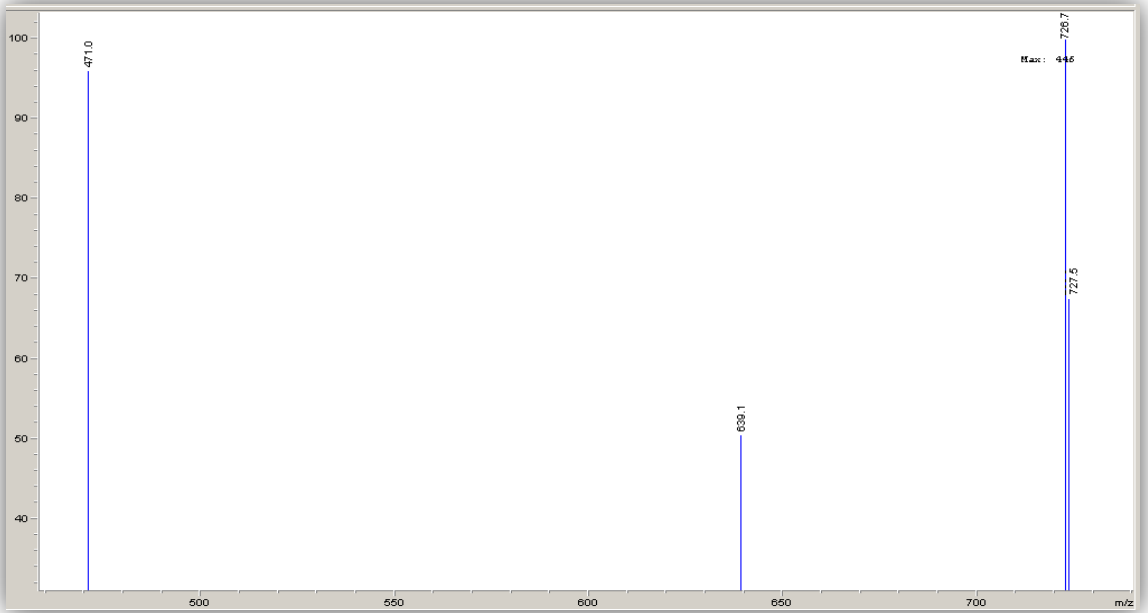
Şekil 3.70. 2s Bileşiğinin UV Spektrumu



Şekil 3.71. 2s Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu



Şekil 3.72. 2s Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu



Şekil 3.73. 2s Bileşiğinin Kütle Spektrumu

3.2. Biyoaktivite Çalışmaları

3.2.1. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

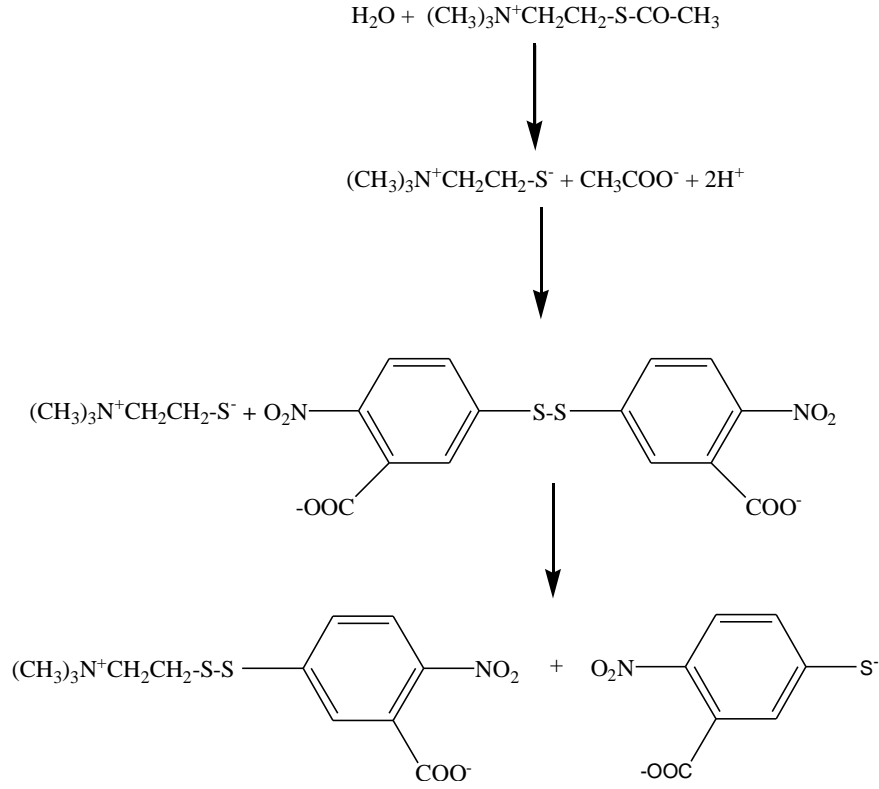
Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan ambenonyum diklorür Tocris firmasından, Asetilkolinesteraz (AChE, E.C. 3.1.1.7, electric eel), bütilkolinesteraz (BuChE, E.C. 3.1.1.8, equine serum), 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) DTNB, asetiltiyokolin iyodür (ATCI) ve Bütiltiyokolin iyodür (BTCl), neostigmin bromür, galantamin hidrobromür kimyasal maddeleri Sigma Aldrich firmasından, metal şelasyon kapasitesi ölçümünde kullanılan CuSO_4 ve FeSO_4 kimyasal maddeler ise Merck firmasından temin edilmiştir.

3.2.2. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

a. Kolinesteraz İnhibisyonunun Kolorimetrik Yöntemle Tayini (Ellman Metodu)

Yöntem, 405 nm absorbans değerindeki değişikliklerin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Bu metod ilk olarak 1961 yılında Ellman ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır.⁷⁴

Ellman yönteminde asetilkolinin oksijen esterinin yerine tiyoesteri olan asetiltiyokolin kullanılır. Asetilkolinesteraz asetiltiyokolini tiyokolin ve asetat haline hidroliz eder. Oluşan tiyokolin ise rejan olarak kullanılan DTNB 405 nm’de absorbans veren nitrobenzoata dönüştürür (**Şekil 3.74**).



Şekil 3.74. Ellman Yönteminin Reaksiyon Mekanizması

b. AChE ve BuChE İnhibisyon Aktivitesi Ölçümü

Test bileşiklerinin AChE ve BuChE inhibisyon aktiviteleri, ticari olarak temin edilebilen neostigmin bromür, galantamin hidrobromür ve ambenonyum diklorür bileşikleri referans alınarak kolometrik Ellman metodu kullanılarak değerlendirildi.⁷⁴ Test bileşikleri dimetilsülfoksit içinde çözüldü ve sonra farklı konsantrasyonlara 50 mM Tris tampon çözeltisi (pH 8.0) ile seyreltildi. Tris tampon çözeltisinden 50 µl, 3 mM DTNB çözeltisinden 125 µl, 0.2 U/ml konsantrasyondaki enzim (AChE veya BuChE) çözeltisinden 25 µl ve 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml gibi 10 farklı konsantrasyonda 25 µl inhibitör bileşiği kuyucuklara eklenerek oluşan karışım 37 °C' de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. 15 dakikalık inkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 25 µl hacimde 15 mM konsantrasyonda substrat (ATCI veya BTCl) çözeltisinden ilave edildi. Reaksiyon karışımlarının absorbanları 412 nm' de mikroplate okuyucu (Bio-Tek ELx800, USA) yardımıyla her 45 sn' de bir ölçüm

alınmak suretiyle okutuldu. Yapılan bu işlem her bir pleyt için üçer kez tekrarlandı. Deney sonuçları ortalama standart sapmaları ile birlikte çalışmada sunuldu. Test bileşiklerinin %50 inhibe edici konsantrasyon değerleri (IC₅₀), ölçümler ve hesaplamalar GraphPad Prism yazılımı kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 3.1. 2a-s bileşiklerinin IC₅₀ (µM) değerleri ve enzim selektiviteleri

Bileşik	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (µM)		Selektif Seçicilik ^c	Log P ^d
			AChE ^a	BuChE ^b		
2a	CH ₃	H	42.19±3.9	60.81±7.5	1.44	7.05
2b	CH ₃	CH ₃	>100	6.59±2.1	0.066	8.02
2c	CF ₃	H	30.01±5.9	0.21±0.7	0.007	7.92
2d	CF ₃	CH ₃	81.89±2.9	22.26±1.5	0.27	8.89
2e	C ₂ H ₅	H	77.45±1.8	>100	1.29	7.88
2f	C ₂ H ₅	CH ₃	2.15±6.5	>100	46.51	8.86
2g	OCH ₃	H	0.2±0.1	2.79±0.3	13.95	5.82
2h	OCH ₃	CH ₃	47.62±0.7	0.32±2.5	0.007	6.80
2i	OC ₂ H ₅	H	>100	0.05±5.4	0.0005	6.50
2j	OC ₂ H ₅	CH ₃	15.72±0.6	0.27±1.7	0.017	7.47
2k	F	H	24.18±31.5	0.04±2.8	0.0016	6.39
2l	F	CH ₃	0.14±0.2	18.7±0.4	133.57	7.36
2m	Cl	H	35.42±3.6	0.08±4.6	0.002	7.19
2n	Cl	CH ₃	0.57±4.4	7.21±1.8	12.64	8.16
2o	Br	H	0.03±0.9	0.56±0.4	18.70	7.73
2p	Br	CH ₃	0.24±1.7	0.03±0.9	0.13	8.71
2r	I	H	0.53±0.5	3.52±8.5	6.64	8.79
2s	I	CH ₃	0.95±6.8	1.06±1.2	1.12	9.76
Galantamin			1.05±0.45	13.22±0.46	12.6	
Neostigmin			0.07±0.01	0.09±0.002	1.29	
Ambenonyum			1.89±0.001	4.61±0.005	2.43	

^a AChE için %50 inhibe edici konsantrasyonu

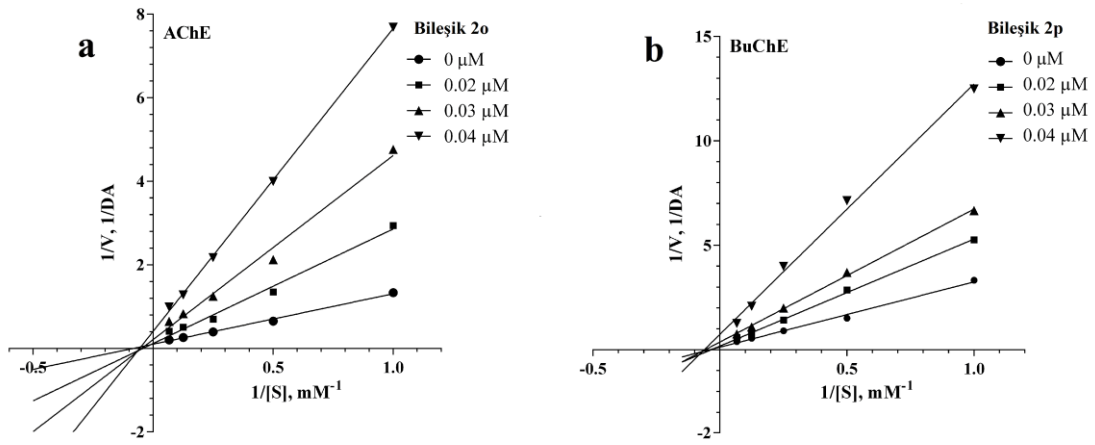
^b BuChE için %50 inhibe edici konsantrasyonu

^c AChE için seçicilik = IC₅₀ (BuChE)/ IC₅₀ (AChE).

^d Log P değerleri, Chemdraw Ultra versiyon 7.0 (Cambridge Soft., USA)

c. Kinetik Çalışmalar

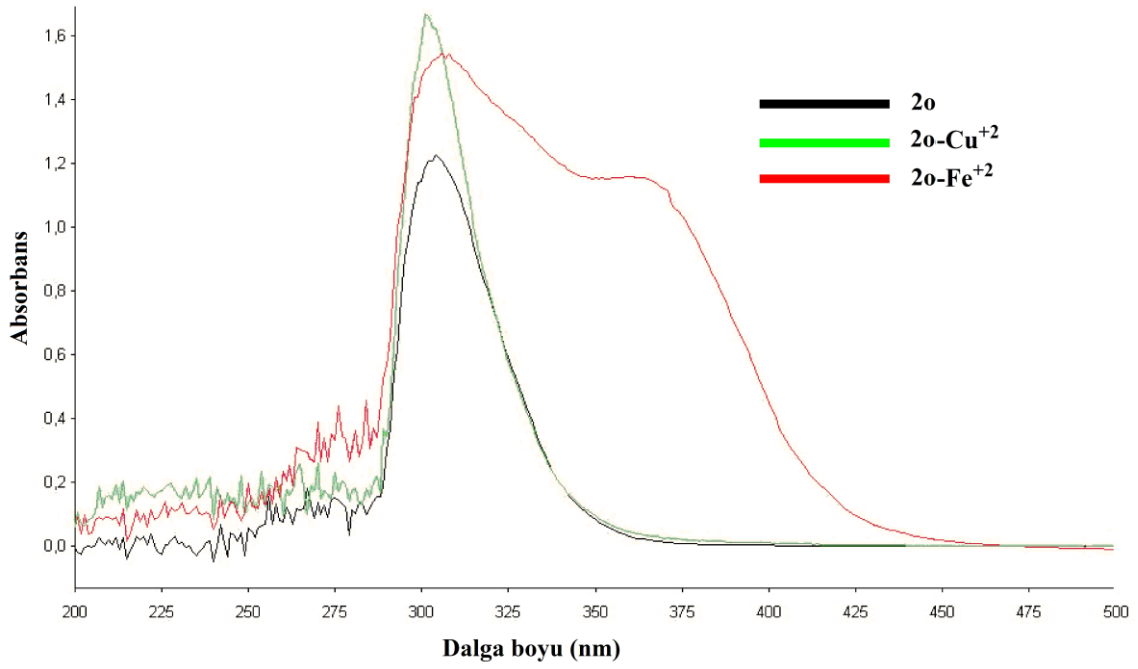
Kinetik çalışmalar için seri içerisinde **2o** ve **2p** bileşikleri seçildi. Çünkü bu bileşiklerin AChE ve BuChE enzimlerine karşı en yüksek inhibitör aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Deney inhibitör bileşik olmadan ve inhibitör bileşik varlığında (**2o** ve **2p**) 0.02, 0.03 ve 0.04 μM konsantrasyonlarda gerçekleştirilmiştir. Substrat konsantrasyon aralığı ise 0.1–1.5 mM aralığında tutulmuştur. Elde edilen veriler GraphPad Prism programına aktarılarak Lineweaver-Burk eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 3.75).⁷⁴



Şekil 3.75. **2o** (a) ve **2p** (b) inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği

d. Cu^{+2} ve Fe^{+2} Metal Şelasyonu Üzerinde Spektrofotometrik Çalışmalar

Metal şelasyon çalışması, oda sıcaklığında, çözücü olarak etanol kullanılarak, 200 ile 500 nm arasında değişen dalga boyu aralığında UV-vis spektrofotometre (Thermo Electron Helios) cihazı yardımı ile yapıldı. **2o** bileşiğinin CuSO_4 ve FeSO_4 yokluğunda ve varlığında 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, UV absorbans değerleri 1 cm genişliğindeki kuvarz küvet kullanılarak ölçüldü. Ölçümler reaksiyon karışımının son hacmi 3 ml, test bileşikleri ve metallerin birebir oranda final konsantrasyonları 100 μM olacak şekilde yapıldı. Ölçümler üçer kez tekrar edildi.⁸²



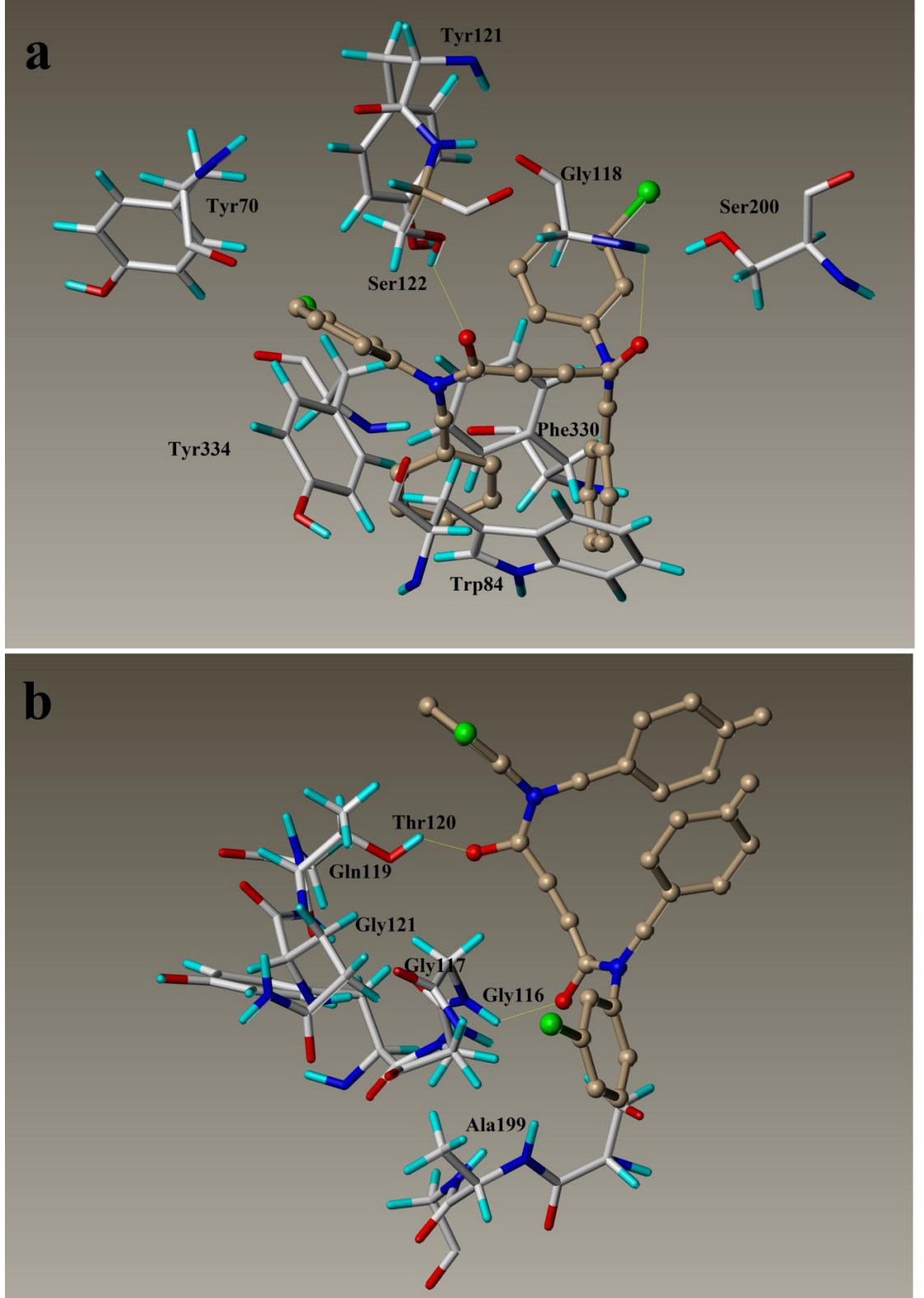
Şekil 3.76. 2o bileşiğinin (100 μ M) ve 100 μ M Cu⁺² ve Fe⁺² ile oluşturduğu komplekslerin UV spektrumu

e. Moleküler Modelleme

Moleküler bağlanma çalışması, Surfex-Dock (Sybyl-X 2.0 Tripos) programı kullanılarak yapıldı. En güçlü inhibitör özellikte bulunan **2o** ve **2p** bileşiklerinin 3 boyutlu yapıları Sybyl Sketcher programı yardımıyla çizildi. Bu 3 boyutlu yapıların enerjileri, Gasteiger-Huckel şarj yöntemi ile Tripos kuvvet alanında maksimum tekrarlanma sayısı 5000 olacak şekilde Steepest descent konjüge gradyan metodu kullanılarak 0.001 kcal/mol gradyana kadar minimize edildi.

Simülasyon sistemi, protein veri bankasından elde edilen Torpedo Californica (TcAChE-1ACJ) ve insan bütilkolinesteraz (HuBuChE-1P0I) enzimlerinin aydınlatılmış kristal yapıları ile kuruldu. Moleküler bağlanma işleminin başlangıcında, tüm su molekülleri, ligandlar her iki enzimin kristal yapılarından uzaklaştırılırken ve etrafa rastgele dağılı halde bulunan tüm hidrojen atomları enzim yapısına ilave edildi. Surfex-Dock programı yardımıyla yapılan bağlanma hesaplamaları, ligand tarafından

oluşturulmuş protomol (ligandın enzime bağlandığı bölge) üzerinden yapıldı. Eşik değeri olarak 0.5, bloat değeri olarak 0 parametreleri kullanıldı.

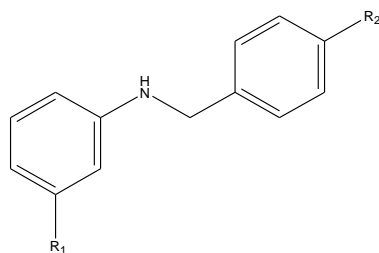


Şekil 3.77. (a) 2o-1ACJ ve (b) 2p-1P0I komplekslerinin moleküler simülasyonu

4. BULGULAR

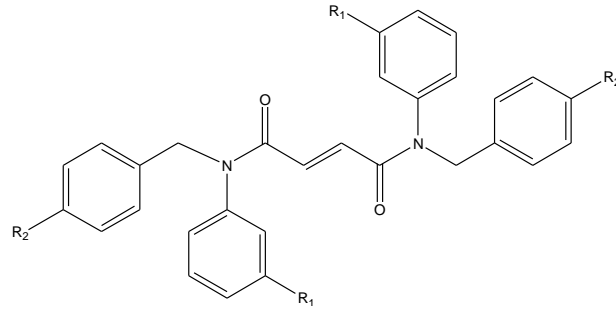
4.1. Deneysel ve Spektral Bulgular

Tez kapsamında sentezi tasarlanan bileşikler başarıyla sentezlenmiş ve saflaştırılmıştır. Bileşik sentezine ilişkin deneysel veriler Tablo **4.1** ve Tablo **4.2**' de sunulmuştur. Sentezlenen bileşiklerin yapısı $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve ESI-MS spektrumları ile doğrulanmıştır. Spektrumlar ve değerlendirmeleri materyal ve metod bölümünde detaylı bir biçimde verilmiş olup, bu spektral analizlerin toplu değerlendirmeleri Tablo **4.3-4.6**' de sunulmuştur.



Tablo 4.1. 1a-s bileşiklerinin genel sentezine ilişkin veriler

Bileşik	R ₁	R ₂	Kimyasal Formül	Mol. Ağırlık	Verim (%)
1a ⁷⁵	CH ₃	H	C ₁₄ H ₁₅ N	197.12	60
1b	CH ₃	CH ₃	C ₁₅ H ₁₇ N	211.14	45
1c ⁷⁶	CF ₃	H	C ₁₄ H ₁₂ F ₃ N	251.09	38
1d	CF ₃	CH ₃	C ₁₅ H ₁₄ F ₃ N	265.11	58
1e	C ₂ H ₅	H	C ₁₅ H ₁₇ N	211.14	42
1f	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₁₆ H ₁₉ N	225.15	42
1g ⁷⁷	OCH ₃	H	C ₁₄ H ₁₅ NO	213.12	65
1h	OCH ₃	CH ₃	C ₁₅ H ₁₇ NO	227.13	56
1i	OC ₂ H ₅	H	C ₁₅ H ₁₇ NO	227.13	26
1j	OC ₂ H ₅	CH ₃	C ₁₆ H ₁₉ NO	241.15	35
1k ⁷⁸	F	H	C ₁₃ H ₁₂ FN	201.10	65
1l	F	CH ₃	C ₁₄ H ₁₄ FN	215.11	54
1m ⁷⁹	Cl	H	C ₁₃ H ₁₂ ClN	217.07	58
1n	Cl	CH ₃	C ₁₄ H ₁₄ ClN	231.08	42
1o ⁸⁰	Br	H	C ₁₃ H ₁₂ BrN	261.02	50
1p	Br	CH ₃	C ₁₄ H ₁₄ BrN	275.03	36
1r ⁸¹	I	H	C ₁₃ H ₁₂ IN	309.00	40
1s	I	CH ₃	C ₁₄ H ₁₄ IN	323.02	39



Tablo 4.2. Sentezlenen **2a-s** bileşiklerinin sentezine ilişkin deneysel veriler

Bileşik	R ₁	R ₂	Kimyasal Formül	Mol. Ağırlık	Erime Derecesi (°C)	Verim (%)
2a	CH ₃	H	C ₃₂ H ₃₀ N ₂ O ₂	474.0	180-184	61
2b	CH ₃	CH ₃	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₂	502.2	202-204	55
2c	CF ₃	H	C ₃₂ H ₂₄ F ₆ N ₂ O ₂	582.2	161-165	52
2d	CF ₃	CH ₃	C ₃₄ H ₂₈ F ₆ N ₂ O ₂	610.2	176-180	46
2e	C ₂ H ₅	H	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₂	502.6	138-140	16
2f	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₃₆ H ₃₈ N ₂ O ₂	530.5	171-173	50
2g	OCH ₃	H	C ₃₂ H ₃₀ N ₂ O ₄	506.6	180-182	76
2h	OCH ₃	CH ₃	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₄	534.6	192-194	37
2i	OC ₂ H ₅	H	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₄	535.7	184-188	55
2j	OC ₂ H ₅	CH ₃	C ₃₆ H ₃₈ N ₂ O ₄	562.1	178-182	52
2k	F	H	C ₃₀ H ₂₄ F ₂ N ₂ O ₂	482.7	162-165	73
2l	F	CH ₃	C ₃₂ H ₂₈ F ₂ N ₂ O ₂	510.2	189-191	34
2m	Cl	H	C ₃₀ H ₂₄ Cl ₂ N ₂ O ₂	515.4	178-180	44
2n	Cl	CH ₃	C ₃₂ H ₂₈ Cl ₂ N ₂ O ₂	543.3	197-199	36
2o	Br	H	C ₃₀ H ₂₄ Br ₂ N ₂ O ₂	604.4	174-178	56
2p	Br	CH ₃	C ₃₂ H ₂₈ Br ₂ N ₂ O ₂	633.3	196-198	59
2r	I	H	C ₃₀ H ₂₄ I ₂ N ₂ O ₂	698.6	210-212	50
2s	I	CH ₃	C ₃₂ H ₂₈ I ₂ N ₂ O ₂	726.4	142-147	39

Tablo 4.3. Sentezlenen **2a-s** bileşiklerinin ¹H-NMR verileri

Bileşik	δ ppm
2a	2.31 (s, 6H, 2xCH ₃), 4.88 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.75-6.74 (d, 2H, J= 7.60 Hz), 6.81 (s, 2H, fumaril CH=CH), 6.89 (s, 2H), 7.13-7.11 (d, 4H, J= 7.60 Hz), 7.16-7.14 (m, 2H), 7.22-7.18 (m, 6H), 7.26-7.24 (d, 2H, J= 7.6 Hz).
2b	2.29 (s, 6H), 2.32 (s, 6H), 4.83 (s, 4H, 2x CH ₂ -N), 6.74-6.72 (d, 2H, J= 7.7 Hz), 6.81 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.88 (s, 2H), 7.00 (bs, 8H, 7.12-7.10 (d, 2H, J= 7.8 Hz), 7.22-7.18 (m, 2H).
2c	4.92 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.83 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.12-7.10 (m, 6H), 7.26-7.24 (m, 2H), 7.29-7.26 (m, 6H), 7.50-7.48 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.60 (s, 2H).
2d	2.29 (s, 6H, 2xAr-CH ₃), 4.87 (s, 4H, 2x CH ₂ -N), 6.80 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.00-6.90 (d, 2H, J= 7.9 Hz), 7.05-7.03 (d, 4H, J=8.6 Hz), 7.11-7.09 (d, 4H, J= 7.8 Hz), 7.27-7.26 (m, 2H), 7.49-7.47 (d, 2H, J=7.4 Hz), 7.59 (s, 2H).
2e	1.19-1.15 (t, 6H, 2xCH ₂ CH ₃), 2.62-2.57 (q, 4H, 2xCH ₂ CH ₃), 4.88 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.90 (s, 2H, etilen protonları CH=CH) , 6.78-6.77 (d, 2H, J= 7.9 Hz), 7.15-7.13 (m, 6H), 7.24-7.22 (m, 6H), 7.26 (s, 2H).
2f	1.20-1.16 (t, 6H, 2xCH ₂ CH ₃), 2.28 (s, 6H, 2x Ar-CH ₃), 2.63-2.58 (q, 4H, 2xCH ₂ CH ₃), 4.84 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.78-6.76 (bs, 4H), 6.88 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.03 (bs, 8H), 7.15-7.13 (d, 2H, J= 7.69 Hz), 7.26-7.21 (m, 2H).
2g	2.31 (s, 6H, 2xOCH ₃), 4.89 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.75-6.73 (d, 2H, J= 7.60 Hz), 6.81 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.90 (s, 2H), 7.13-7.11 (d, 4H, J= 7.3 Hz), 7.16-7.14 (m, 2H), 7.22-7.18 (m, 6H), 7.26-7.24 (d, 2H, J= 7.6 Hz).
2h	2.28 (s, 6H, 2xAr-CH ₃), 3.73 (s, 6H, 2xOCH ₃), 4.84 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.45 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.56-6.54 (d, 2H, J= 7.6 Hz), 6.90 (s, 2H), 7.04 (bs, 8H), 7.23-7.21 (d, 2H, J= 8.0 Hz), 7.26-7.25 (m, 2H).
2i	1.39- 1.36 (t, 6H, 2x CH ₂ CH ₃), 3.93-3.91 (q, 4H, 2xCH ₂ CH ₃), 4.88 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.50 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.55-6.53 (d, 2H, J= 7.60 Hz), 6.92 (s, 2H), 7.17-7.15 (d, 4H, J= 7.6 Hz), 7.19-7.16 (m, 2H), 7.23-7.21 (m, 6H), 7.26-7.24 (d, 2H, J= 8.4 Hz).
2j	1.40-1.37 (t, 6H, 2xAr-OCH ₂ CH ₃), 2.28 (s, 6H, 2xAr-CH ₃), 3.96-3.91 (q, 4H, 2xOCH ₂ CH ₃), 4.83 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.50 (s, 2H), 6.54-6.52 (d, 2H, J= 8.05 Hz), 6.84-6.82 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 6.90 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.06-7.04 (bs, 8H), 7.26-7.19 (m, 2H).
2k	4.90 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.73 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.78-6.76 (d, 2H, J= 7.9 Hz), 7.07-7.05 (m, 2H), 7.16-7.30 (d, 4H, J= 7.4 Hz), 7.30- 7.25 (m, 6H), 7.33-7.30 (d, 2H, J= 8.0 Hz).
2l	2.29 (s, 6H, 2xAr-CH ₃), 4.85 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.78-6.70 (m, 4H), 6.87 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.03-7.01 (d, 4H, J=8.3 Hz), 7.06-7.04 (d, 4H, J= 8.3 Hz), 7.30-7.28 (d, 2H, J=8.0 Hz), 7.34-7.32 (m, 2H).
2m	4.89 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.84- 6.83 (d, 2H, J= 7.7 Hz), 6.86 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 7.03 (s, 2H), 7.15-7.13 (d, 4H, J= 8.1 Hz), 7.25-7.24 (m, 2H), 7.29-7.26 (m, 6H), 7.34-7.32 (d, 2H, J= 8.0 Hz).
2n	2.29 (s, 6H, 2xAr-CH ₃) , 4.84 (s, 4H, 2x CH ₂ -N), 6.81 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.84 (s, 2H), 7.02 (bs, 8H), 7.06-7.04 (d, 2H, J= 8.2 Hz), 7.28-7.24 (m, 2H), 7.32-7.30 (d, 2H, J= 8.0 Hz).
2o	4.88 (s, 4H, 2x CH ₂ -N); 6.85 (s, 2H, etilen protonları CH=CH); 6.88 (bs, 2H); 7.14 (m, 4H); 7.21-7.20 (m, 4H); 7.24 (bs, 6H); 7.48-7.46 (d, 2H, J= 7.8 Hz).
2p	2.29 (s, 6H, 2xCH ₃), 4.84 (s, 4H, 2x CH ₂ -N), 6.83 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.87-6.85 (d, 2H, J= 8.0 Hz), 7.03-7.00 (d, 4H, J= 8.0 Hz), 7.06-7.00 (d, 4H, J= 8.0 Hz), 7.18 (s, 2H), 7.22-7.20 (d, 2H, J=8.0 Hz), 7.48-7.46 (m, 2H).
2r	4.87 (s, 4H, 2x CH ₂ -N), 6.84 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.91-6.89 (d, 2H, J= 7.6 Hz), 7.08-7.04 (m, 2H), 7.15-7.13 (d, 4H, J= 7.3 Hz), 7.24 (bs, 6H), 7.49 (s, 2H), 7.68-7.66 (d, 2H, J= 7.8 Hz).
2s	2.30 (s, 6H, 2xAr-CH ₃), 4.60 (s, 4H, 2xCH ₂ -N), 6.66 (s, 2H, etilen protonları CH=CH), 6.97-6.95 (d, 2H, J= 7.9 Hz), 7.05-7.01 (bs, 8H), 7.08 (s, 2H); 7.13- 7.12 (m, 2H); 7.69-7.67 (d, 2H).

Tablo 4.4. Sentezlenen **2a-s** bileşiklerinin ^{13}C -NMR verileri

Bileşik	δ ppm, 400 MHz
2a	21.29 (Ar-CH ₃), 53.58 (CH ₂ -N), 125.28, 127.40 (CH=CH), 128.35, 128.49, 128.63, 129.06, 129.041, 132.07, 137.07, 139.75, 141.22, 164.43 (C=O).
2b	21.09 (Benzilik-CH ₃), 21.29 (Ar-CH ₃), 53.33 (CH ₂ -N), 125.33, 128.50 (CH=CH), 128.61, 129.01, 129.37, 132.07, 134.06, 137.00, 139.69, 141.30, 164.38 (C=O).
2c	53.49 (CH ₂ -N), 124.87, 125.20 (CH=CH), 127.85, 128.63, 130.41, 131.82, 132.29, 136.20, 141.65, 163.94 (C=O).
2d	21.08 (Ar-CH ₃), 53.25 (CH ₂ -N), 125.11, 128.62 (CH=CH), 129.26, 130.35, 131.88, 132.28, 133.17, 137.57, 141.72, 163.90 (C=O).
2e	15.21 (CH ₂ -CH ₃), 28.53 (CH ₂ -CH ₃), 53.50 (CH ₂ -N), 125.37, 127.39, 127.79, 128.34, 128.69, 129.49 (CH=CH), 132.12, 137.12, 141.24, 164.47 (C=O).
2f	15.21 (CH ₂ -CH ₃), 21.08 (Ar-CH ₃), 28.53 (CH ₂ -CH ₃), 53.26 (CH ₂ -N), 125.43, 127.41, 127.72, 128.67, 129.00, 129.44 (CH=CH), 132.12, 134.11, 137.00, 141.32, 145.93, 164.42 (C=O).
2g	21.09 (OCH ₃), 53.57 (CH ₂ -N), 125.28, 127.39, 128.49, 128.63 (CH=CH), 129.05, 129.41, 132.07, 137.07, 139.74, 141.22, 164.43 (C=O).
2h	21.09 (Ar-CH ₃), 53.18 (OCH ₃), 55.33 (CH ₂ -N), 113.70, 113.93, 120.52, 128.66 (CH=CH), 130.30, 132.11, 134.03, 137.08, 142.42, 160.35, 164.32 (C=O).
2i	14.66 (OCH ₂ CH ₃), 53.45 (OCH ₂ CH ₃), 63.59 (CH ₂ -N), 114.34, 120.29, 127.43, 128.39 (CH=CH), 128.66, 130.31, 132.11, 137.08, 142.31, 159.77, 164.39 (C=O).
2j	14.66 (OCH ₂ CH ₃), 21.08 (Ar-CH ₃), 53.19 (OCH ₂ CH ₃), 63.59 (CH ₂ -N), 114.27, 114.36, 120.35, 128.64 (CH=CH), 129.04, 130.26, 132.11, 134.06, 137.03, 142.39, 159.74, 164.34 (C=O).
2k	53.45 (CH ₂ -N), 115.56, 115.67, 124.11, 127.70 (CH=CH), 128.56, 130.86, 130.95, 132.18, 136.50, 142.66, 161.67, 164.07 (C=O).
2l	21.11 (Ar-CH ₃), 53.19 (CH ₂ -N), 115.38, 115.60, 124.15, 128.57 (CH=CH), 129.21, 130.81, 130.90, 132.18, 137.38, 142.73, 161.65, 164.13 (C=O).
2m	53.51 (CH ₂ -N), 126.68, 127.73, 128.21, 128.56 (CH=CH), 128.62, 128.69, 130.65, 132.20, 135.26, 136.42, 142.32, 164.04 (C=O).
2n	21.11 (Ar-CH ₃), 53.19 (CH ₂ -N), 115.38, 115.60, 124.15, 128.57 (CH=CH), 128.69, 129.21, 130.81, 130.90, 132.18, 137.38, 142.73, 164.13 (C=O).
2o	53.54 (CH ₂ -N), 123.10, 127.20, 127.74, 128.57, 128.63 (CH=CH), 130.91, 131.06, 131.61, 132.20, 136.40, 142.42, 164.02 (C=O).
2p	21.10 (Ar-CH ₃), 53.29 (CH ₂ -N), 123.05, 127.24, 128.61, 129.21 (CH=CH), 130.85, 131.06, 131.52, 132.21, 133.37, 137.40, 142.51, 163.98 (C=O).
2r	53.55 (CH ₂ -N), 127.72, 127.89, 128.55 (CH=CH), 128.66, 131.03, 132.21, 136.40, 136.84, 137.49, 142.30, 164.01 (C=O).
2s	21.15 (Ar-CH ₃), 51.58 (CH ₂ -N), 128.21, 128.28, 129.26 (CH=CH), 129.45, 130.41, 132.73, 137.11, 137.37, 137.54, 140.35, 163.85 (C=O).

Tablo 4.5. Sentezlenen **2a-s** bileşiklerinin ESI-MS verileri

Bileşik	M ⁺ +1 Hesaplanan*	M ⁺ +1 Ölçülen [#]
2a	475.0	475.1
2b	503.2	503.6
2c	583.2	583.4
2d	611.2	611.2
2e	503.6	503.8
2f	531.5	531.6
2g	507.6	507.7
2h	535.6	535.6
2i	536.7	536.8
2j	563.1	563.1
2k	483.7	483.9
2l	511.2	511.0
2m	516.4	516.7
2n	544.4	544.5
2o	605.4	605.5
2p	634.3	634.3
2r	699.6	699.7
2s	727.4	727.5

*: ChemDraw 2007 versiyonu ile hesaplanan

[#]: MS (LC-MS) VG Waters Micromass ZQ (USA) spektrometresinde bulunan

Tablo 4.6. Sentezlenen **2a-s** bileşiklerinin λ max ve $\log \epsilon$ verileri

Bileşik	λ max*	$\log \epsilon$
2a	298	1.184
2b	297	1.152
2c	301	0.488
2d	298	0.715
2e	303	1.958
2f	296	0.831
2g	297	1.158
2h	296	0.999
2i	296	1.039
2j	296	0.999
2k	301	0.637
2l	301	0.746
2m	296	1.078
2n	296	0.972
2o	296	0.724
2p	300	0.991
2r	301	0.550
2s	307	1,405

* Thermo Electron Helios (α) (UVA114903, England) spektrometresinde bulunan değer

5. TARTIŞMA

5.1. Sentez Çalışmaları

Sentez sürecinin ilk basamağında, başlangıç bileşikleri olan benzanilin türevi (**1a-s**) bileşikler çözücüsüz faz transfer katalizli mikrodalga ısıtma yöntemi kullanılarak sentezlendi. Fumaramit (**2a-s**) türevi sonuç bileşikleri daha önceki çalışmamızda rapor edilen benzer bir prosedür yardımıyla⁸³ 16-76% reaksiyon yüzde verimleriyle başarıyla sentezlendi. Elde edilen spektroskopik bulgular tahmin edilen yapılarla birebir uyumlu bulundu. Bileşiklerin sentez aşamaları **Şekil 3.1** üzerinde gösterildi.

Proton nükleer manyetik rezonans (¹H-NMR) spektrumunda, etilen köprüsü protonlarının rezonans sinyallerinin genellikle 6.45-6.90 ppm aralığında singlet olarak, aromatik proton sinyallerinin ise 6.51 and 7.68 ppm aralığında geldiği görüldü. Azota bağlı metilen protonları da 4.80-4.92 ppm aralığında singlet olarak görüldü.

Karbon nükleer manyetik rezonans (¹³C-NMR) spektrumunda karbonil atomlarının karakteristik rezonans frekansları genellikle 164.47-163.85 ppm aralığında görüldü. Aromatik halkalara ait karbon atomlarının sinyalleri 113.70-161.67 ppm dalga aralığında ve azota bağlı metilen karbonuna ait sinyal ise 51.58-63.59 ppm dalga aralığında görüldü. Pozitif elektron iyonizasyonu yöntemiyle elde edilen kütle spektrumlarında görülen moleküler iyonizasyon pikleri (M⁺) sentezlenen bileşiklerin molekül ağırlıklarıyla tamamen uyumlu bulundu. Sonuç olarak değerlendirilen tüm spektral veriler ışığında sentezlenen bileşiklerin (**2a-s**) yapıları doğrulandı.

5.2. Kolinesteraz İnhibisyon Aktivitesi

Bileşiklerin (**2a-s**) AChE ve BuChE enzimlerine karşı inhibisyon aktiviteleri Ellman'ın modifiye edilmiş kolorimetrik yöntemi kullanılarak ölçüldü. Deneyde neostigmin, ambenonyum ve galantamin gibi ticari kolinesteraz inhibitörü bileşikler referans olarak kullanıldı.

Tüm test edilen bileşiklerin IC_{50} değerleri ve onların selektivite indeksleri **Tablo 3.1'** de özetlendi. **Tablo 3.1'** e bakıldığında tüm fumaramit türevi bileşiklerin (**2a-s**) mikromolar konsantrasyonda her iki enzime karşı iyi bir inhibisyon aktivitesi gösterdiği görüldü. Sentezlenen bileşikler arasındaki **2o** kodlu bileşik, referans bileşikler olan neostigmin ($IC_{50}= 0.07 \mu M$), galantamin ($IC_{50}= 1.05 \mu M$) ve ambenonyum ($IC_{50}= 1.89 \mu M$)' dan sırasıyla 2.33, 35 ve 63 kat daha güçlü olmak üzere, AChE enzimine karşı ($IC_{50}= 0.03 \mu M$) seri içerisindeki en etkili bileşik olarak bulundu. Aynı zamanda BuChE enzimine karşı en güçlü inhibisyon gösteren $0.03 \mu M$ IC_{50} değerine sahip **2p** kodlu bileşik ise referans bileşiklerden neostigmin ($IC_{50}= 0.09 \mu M$), ambenonyum ($IC_{50}= 4.61 \mu M$) ve galantamin ($IC_{50}= 13.22 \mu M$)' den sırasıyla 3, 154 ve 441 kat daha güçlü inhibisyon gösterdiği tespit edildi.

Hedeflenen fumaramit türevi bileşikler (**2a-s**) farklı elektronik özelliklere sahip çeşitli meta süstitüe anilin türevleri kullanılarak sentezlendi. Genel olarak bakıldığında fenil halkasının meta konumunda indüktif olarak elektron çekici özellikte ve hidrojen bağı yapabilme kapasiteleri olan halojen grupları (F, Cl, Br, I) taşıyan bileşikler (**2k-s**) hem AChE hem de BuChE enzimlerine karşı seri içindeki en etkili bileşikler olduğu görülmektedir. Bu yaklaşımı doğrulamak adına, **Tablo 3.1'** e bakıldığında anilin halkasına meta pozisyondan indüktif olarak elektron verici özellikte metil (CH_3) grubu bağlı bulunan **2a-b** bileşikler düşük AChE inhibisyon aktivitesi göstermesine karşın aynı pozisyonda elektron çekici özelliği yüksek olan triflorometil (CF_3) grubu bağlı bulunan **2c-d** bileşikler artmış bir AChE inhibisyonu göstermiştir. Elektron verici özellikte grup taşıyan bileşiklerden **2b** ($-CH_3$) ve **2i** ($-OC_2H_5$) bileşiklerinin de seri içerisinde en zayıf etkili AChE inhibitörleri oldukları, etil grubu taşıyan (**2e** ve **2f**) bileşikler de BuChE enzimine karşı en zayıf etkili inhibitör bileşik oldukları saptandı. Aktivite sonuçları, hem H bağı yapabilme hemde indüktif olarak elektron çekme gücü

yüksek olan meta-sübstitüe halojen gruplarının hem AChE hem BuChE enzim inhibisyonlarına karşı olumlu bir katkı yaptığını gösterdi. Ayrıca halojen taşıyan bileşiklerin kendi aralarında yapılan aktivite karşılaştırmasında, elektron çekici etkisi yüksek halojen taşıyan bileşiğin her iki enzime karşı da inhibisyon aktivitesinin yüksek olduğunu göstermesi elektronegativitenin kolinesteraz enzim inhibisyonunda çok önemli bir parametre olduğunu bizlere gösterdi.

Absorbsiyon, dağılım, metabolizasyon, atılım ve toksisite gibi fizikokimyasal özelliklerden bir diğeri olan lipofilisite, ilaç tasarımı ve keşfinde kullanılan, farmakolojik aktivite üzerinde önemli bir etkiye sahip bir diğere parametredir. İlacın etkisini gösterebilmesi için kan beyin engelini geçmek zorunda olan sinir sistemi ilaçları için lipofiliklik ayrı bir öneme sahiptir. Bu anlamda aktivite sonuçları ve bileşiklerin log P değerleri çalışma kapsamında değerlendirilmiş ancak aktivite sonuçları ve lipofiliklik arasında herhangi anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Çalışılan bileşiklerin partiyon katsayısının logaritma (logP) değerleri ChemDraw Ultra ver. 7.0 (CambridgeSoft, USA) bilgisayar programı yardımıyla bulunmuştur. Bileşiklerin Log P değerleri **Tablo 3.1**'de verilmiştir.

5.3. Enzim Kinetiği Çalışmaları

Enzim kinetiği çalışması için, seri içerisinde en etkili AChE (**2o**) ve BuChE (**2p**) inhibitörü bulunan bileşikler seçildi. İnhibisyon tipi, Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla aydınlatıldı. Bu grafik, **2o** inhibitör bileşiğinin konsantrasyonunun artmasıyla hem eğimin hemde kesişim noktasının arttığını göstermektedir ki bu da karışık tipte (yarışmalı ve yarışmasız) inhibisyona işaret etmektedir (**Şekil 3.75a**). Bu yüzden **2o** bileşiğinin, AChE enziminin hem katalitik aktif bölgesiyle hem de periferik aktif bölgesiyle etkileştiği söylenebilir. **Şekil 3.75b**'de ise, **2p** bileşiğinin artan inhibitör

konsantrasyonu ile Lineweaver-Burk doğrusu x eksenini aynı noktada keser ki bu da tipik bir non-kompetitif (yarışmasız) inhibisyonudur.

5.4. Moleküler Modelleme Çalışması

Moleküler modelleme çalışmaları, seri içerisinde en etkili AChE inhibitörü **2o** bileşiği ve en etkili BuChE inhibitörü **2p** bileşiğinin ilgili enzimlerle olan muhtemel etkileşimlerini incelemek üzere bir simülasyon olarak tasarlandı. Bu simülasyon SYBYL X 2.0 bilgisayar programı yardımıyla gerçekleştirildi. Enzimlerin 3 boyutlu kristal yapıları protein veri bankasından alındı. Simülasyon sonuçları **Şekil 3.77a'** da görüldüğü üzere bize **2o** bileşiğinin Torpedo californica (TcAChE-1ACJ) enzimiyle birden fazla bağlanma yapabildiğini gösterdi. 1ACJ-**2o** kompleksinde, **2o** bileşiğinin molekül yapısındaki karbonil grubunun, enzimin periferik aktif bölgesinde bulunan Ser122 (2.0 Å) aminoasitine ait OH grubu ve enzimin katalitik aktif bölgesinde Gly 118 (2.5 Å) aminoasitine ait NH grubu ile hidrojen bağı yaptığı görülmektedir. Meta konumundaki brom atomu ile enzimin orta geçitindeki Tyr70 (3.5 Å) aminoasitinin -OH grubunun aralarında hidrojen bağı yaptığı düşünülmektedir. 3-Bromo fenil yapısının enzimin Trp84 and Phe330 aminoasit artığı üzerinde lokalize olduğu görülmektedir. Bu fenil halkası Phe330 aminoasidinin fenil halkasıyla paralel konumlanmakta ve π - π etkileşim (3.3-3.7 Å) göstermektedir.

Meta-süstitüe fenil halkası, enzimin katalitik aktif bölgesindeki Trp84 (3.5 Å) aminoasit artığının -NH₂ grubu ile brom atomu arasındaki hidrojen bağı ve Trp84 (3.3-3.7 Å) artığının indol parçasıyla fenil halkasının π - π etkileşmesi gibi iki tip etkileşim göstermektedir. Tüm bu simülasyon çalışmaları **2o** bileşiğinin, AChE enziminin hem katalitik hem periferik bölgesini etkilediğini göstermekte ve dolayısıyla kinetik çalışmada da ortaya çıkan karışık tip (mixed-type) enzim inhibisyonu sonucunu desteklemektedir.

En güçlü BuChE inhibitörü olan **2p** bileşiğinin, HuBuChE (1P0I) enziminin Thr120 ve Gly 116 aminoasit artıklarıyla etkileşim gösterdiği görüldü (**Şekil 3.77b**). **2p** bileşiği molekül yapısında bulunan karbonil gruplarından birinin, HuBuChE enziminin katalitik aktif bölgesindeki Thr120 (2.7 Å) aminoasit artığının OH grubu ile, yapıda bulunan diğer karbonil grubunun ise Gly 116 aminoasit artığının NH grubu ile hidrojen bağı etkileşmesi yaptığı görülmektedir. **2p** bileşiği için yapılan simülasyon çalışmaları bu BuChE inhibitörü bileşiğin enzimin sadece katalitik bölgesiyle etkileşime girebildiğini göstermektedir.

5.5. Metal Şelasyon Etkisi

En güçlü inhibitor bileşik olan **2o** bileşiğinin Cu^{+2} ve Fe^{+2} gibi metaller ile şelat yapabilme yeteneğini bulmak amacıyla 200-500 nm dalga boyu aralığında çözücü olarak etanol kullanılarak spektrofotometrik bir çalışma yapıldı. **2o** bileşiğinin etanoldeki çözeltisinin UV absorbansı, Cu^{+2} ve Fe^{+2} ile titrasyonu sonucu değişiklik gösterdi (**Şekil 3.76**). Her iki metal ile reaksiyon sonucu ölçülen absorbans değerinde artış görüldü. Bu sonuç **2o** bileşiğinin güçlü bir kolinesteraz inhibitörü olmasının yanında etkili bir Cu^{+2} ve Fe^{+2} metal şelatörü olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Özetle, bu çalışma kapsamında 18 yeni fumaramit türevi bileşik sentezlendi ve bunların asetilkolinesteraz ve bütilkolinesteraz enzimlerine karşı inhibisyon aktiviteleri değerlendirildi. Etkili bulunan inhibitör bileşikler üzerinde enzim kinetiği çalışmaları, metal şelasyon ve moleküler modelleme çalışmaları yapıldı. İnhibisyon aktivitesi sonuçlarına göre genel olarak orta-yüksek düzeyde antikolinesteraz etkiye sahip **2a-s** serisi fumaramit türevi bileşiklerinden, **2o** bileşiği AChE enzimine karşı ve **2p** bileşiği ise BuChE enzimlerine karşı düşük mikromolar konsantrasyonda seri içerisinde en etkili bileşikler olarak saptandı. **2o** bileşiği $IC_{50} = 0.03 \mu M$ konsantrasyonda seri içinde en etkili AChE inhibitörü olarak bulundu. Ayrıca **2o** bileşiği BuChE enzimine karşı da $IC_{50} = 0.56 \mu M$ konsantrasyonda güçlü bir afinite gösterdi. Fakat seri içerisinde en etkili BuChE inhibitörü **2p** ($IC_{50} = 0.03 \mu M$) bileşiği oldu. Kinetik çalışmalar bileşikler için inhibisyon mekanizmalarının her bir enzime göre farklılık gösterebildiğini ortaya koydu. Zira **2o** bileşiği AChE enzime karşı karışık tipte inhibisyon gösterirken, **2p** bileşiği yarışmasız enzim inhibisyonu gösterdi. Moleküler bağlanma çalışmaları, modellenen **2o** bileşiğinin TcAChE enziminin hem katalitik hem de periferik aktif bölgelerinde çok sayıda etkileşmeye girebildiğini gösterdi. Bu sonuç, **2o** bileşiğinin yüksek inhibisyon gücünü ve inhibisyon mekanizmasını doğrular niteliktedir. Sonuç olarak, elde edilen bu bulgular ışığında sentezlenen fumaramit türevi bileşiklerin kolinesteraz enzimlerinin her ikisi üzerinde de etkili inhibitör bileşikler olduğu tespit edildi.

İleriki çalışmalarımızda bu kimyasal yapı korunarak veya yapılacak ufak modifikasyonlarla, Alzheimer hastalığı başta olmak üzere diğer sinir sistemi hastalıkları üzerinde de etkili olabilecek yeni bileşiklerin sentezi ve çalışmanın *in vivo* deneylerle desteklenerek daha ileri düzeyde çalışmalar yapılabilmesi düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Burns A. Dementia - a Clinical Approach, 2nd Edition - Cummings,J, Benson,F. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 1992, 7: 920.
2. Beeri R, Le Novere N, Mervis R, Huberman T, Grauer E, Changeux JP, Soreq H. Enhanced hemicholinium binding and attenuated dendrite branching in cognitively impaired acetylcholinesterase-transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*, 1997, 69: 2441-2451.
3. Skoog I, Nilsson L, Palmertz B, Andreasson LA, Svanborg A. A population-based study of dementia in 85-year-olds. *The New England Journal of Medicine* 1993, 328: 153-158.
4. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1999, 66: 137-147.
5. Dickson DW. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiology of Aging*, 1997, 18: 21-26.
6. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *The Lancet*, 1993, 342: 697-699.
7. Gaeta A, Hider RC. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *British Journal of Pharmacology*, 2005, 146: 1041-1059.
8. Bush AI, Tanzi RE. Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics*, 2008, 5: 421-432.
9. Zatta P, Drago D, Bolognin S, Sensi SL. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2009, 30: 346-355.
10. Perez LR, Franz KJ. Minding metals: tailoring multifunctional chelating agents for neurodegenerative disease. *Dalton Transactions*, 2010, 39: 2177-2187.
11. Schultz MD, Susan K. Principles of neural science, *The American Journal of Psychiatry*, 2001, 158: 662.

12. Darvesh S, Grantham DL, Hopkins DA. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *Journal of Comparative Neurology*, 1998, 393: 374-390.
13. Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 1991, 253: 872-879.
14. Guillozet AL, Smiley JF, Mash DC, Mesulam MM. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Annals of Neurology*, 1997, 42: 909-918.
15. Mesulam MM, Geula C. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Annals of Neurology*, 1994, 36: 722-727.
16. Greig NH, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway HW, Perry T, Lee B, Ingram DK, Lahiri DK. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Current Medical Research & Opinion*, 2001, 17: 159-165.
17. Carson KA, Geula C, Mesulam MM. Electron microscopic localization of cholinesterase activity in Alzheimer brain tissue. *Brain Research*, 1991, 540: 204-208.
18. Layer PG. Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1991, 11: 7-33.
19. Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, Taylor P, Hinrichs SH, Lockridge O. Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000, 293: 896-902.
20. Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, Quinn B. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiology Disease*, 2002, 9: 88-93.
21. Xie XS, Lu HP. Single-molecule enzymology. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 15967-15970.
22. Sahin HA. Asetilkolin, kolinesterazlar ve Alzheimer hastalığı. *Demans*, 2002, 2: 69-73.
23. Sternfeld M, Shoham S, Klein O, Flores-Flores C, Evron T, Idelson GH, Kitsberg D, Patrick JW, Soreq H. Excess "read-through" acetylcholinesterase

- attenuates but the "synaptic" variant intensifies neurodeterioration correlates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97: 8647-8652.
24. Nordberg A. Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 2006, 20: 12-18.
 25. Geula C, Mesulam MM. Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 1995, 9 Suppl 2: 23-28.
 26. Beach TG, Kuo YM, Spiegel K, Emmerling MR, Sue LI, Kokjohn K, Roher AE. The cholinergic deficit coincides with Abeta deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2000, 59: 308-313.
 27. Mesulam MM. The systems-level organization of cholinergic innervation in the human cerebral cortex and its alterations in Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research*, 1996, 109: 285-297.
 28. Mesulam MM, Geula C. Acetylcholinesterase-rich neurons of the human cerebral cortex: cytoarchitectonic and ontogenetic patterns of distribution. *Journal of Comparative Neurology*, 1991, 306: 193-220.
 29. Wright CI, Geula C, Mesulam MM. Protease inhibitors and indolamines selectively inhibit cholinesterases in the histopathologic structures of Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, 695: 65-68.
 30. Wright CI, Geula C, Mesulam MM. Neurological cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Annals Neurology*, 1993, 34: 373-384.
 31. Mesulam MM, Hersh LB, Mash DC, Geula C. Differential cholinergic innervation within functional subdivisions of the human cerebral cortex: a choline acetyltransferase study. *Journal of Comparative Neurology*, 1992, 318: 316-328.
 32. Shaw KT, Utsuki T, Rogers J, Yu QS, Sambamurti K, Brossi A, Ge YW, Lahiri DK, Greig NH. Phenserine regulates translation of beta -amyloid precursor protein mRNA by a putative interleukin-1 responsive element, a target for drug development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98: 7605-7610.

33. Ikari H, Spangler EL, Greig NH, Pei XF, Brossi A, Speer D, Patel N, Ingram DK. Maze learning in aged rats is enhanced by phenserine, a novel anticholinesterase. *Neuroreport*, 1995, 6: 481-484.
34. Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 1991, 6: 487-498.
35. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 1991, 82: 239-259.
36. Budimir A. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharmaceutica*, 2011, 61: 1-14.
37. Hung YH, Bush AI, Cherny RA. Copper in the brain and Alzheimer's disease. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2010, 15: 61-76.
38. Crouch PJ, Barnham KJ, Bush AI, White AR. Therapeutic treatments for Alzheimer's disease based on metal bioavailability. *Drug News & Perspectives*, 2006, 19: 469-474.
39. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the Neurological Sciences*, 1998, 158: 47-52.
40. Faller P. Copper and zinc binding to amyloid-beta: coordination, dynamics, aggregation, reactivity and metal-ion transfer. *Chembiochem*, 2009, 10: 2837-45.
41. Hureau C, Faller P. Aβ-mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimie*, 2009, 91: 1212-1217.
42. Good PF, Perl DP, Bierer LM, Schmeidler J. Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Annals Neurology*, 1992, 31: 286-292.
43. Farlow MR, Evans RM. Pharmacologic treatment of cognition in Alzheimer's dementia. *Neurology*, 1998, 51: S36-44; 65-67.
44. Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology*, 1998, 50: 136-145.
45. Doody RS, Stevens JC, Beck C, Dubinsky RM, Kaye JA, Gwyther L, Mohs RC, Thal LJ, Whitehouse PJ, DeKosky ST, Cummings JL. Practice parameter: management of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality

- Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 2001, 56: 1154-1166.
46. Sirvio J. Strategies that support declining cholinergic neurotransmission in Alzheimer's disease patients. *Gerontology*, 1999, 45 Suppl 1: 3-14.
 47. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *The Journal of American Medical Association*, 1994, 271: 992-998.
 48. Maelicke A. Pharmacokinetic rationale for switching from donepezil to galantamine. *Clinical Therapeutics*, 2001, 23 Suppl A: 8-12.
 49. Wilkinson D, Murray J. Galantamine: a randomized, double-blind, dose comparison in patients with Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 2001, 16: 852-857.
 50. Burns A, Rossor M, Hecker J, Gauthier S, Petit H, Moller HJ, Rogers SL, Friedhoff LT. The effects of donepezil in Alzheimer's disease - results from a multinational trial. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 1999, 10: 237-244.
 51. Breteler MM, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Mortimer JA, et al. Medical history and the risk of Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. (EURODEM Risk Factors Research Group). *International Journal of Epidemiology*, 1991, 20 Suppl 2: 36-42.
 52. Evans JG, Wilcock G, Birks J. Evidence-based pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2004, 7: 351-369.
 53. Imbimbo BP, Troetel WM, Martelli P, Lucchelli F. A 6-month, double-blind, placebo-controlled trial of eptastigmine in Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 2000, 11: 17-24.
 54. Villetti G, Bergamaschi M, Bassani F, Bolzoni PT, Maiorino M, Pietra C, Rondelli I, Chamiot-Clerc P, Simonato M, Barbieri M. Antinociceptive activity of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist N-(2-Indanyl)-glycinamide hydrochloride (CHF3381) in experimental models of inflammatory and neuropathic pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 306: 804-814.

55. Imbimbo BP. Pharmacodynamic-tolerability relationships of cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Central Nervous System Drugs*, 2001, 15: 375-390.
56. Farlow MR. NMDA receptor antagonists. A new therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Geriatrics*, 2004, 59: 22-27.
57. Skrzypek A, Matysiak J, Niewiadomy A, Bajda M, Szymanski P. Synthesis and biological evaluation of 1,3,4-thiadiazole analogues as novel AChE and BuChE inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013,62:311-319
58. Musileka K, Komloova M, Holas O, Hrabnova M, Pohanka M, Dohnal V, Nachone F, Dolezal M, Kucaa K. Preparation and in vitro screening of symmetrical bis-isoquinolinium cholinesterase inhibitors bearing various connecting linkage e Implications for early myasthenia gravis treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011,46:811-818
59. Wettstein A. Cholinesterase inhibitors and Ginkgo extracts--are they comparable in the treatment of dementia? Comparison of published placebo-controlled efficacy studies of at least six months' duration. *Phytomedicine*, 2000, 6: 393-401.
60. Delanty N, Dichter MA. Antioxidant therapy in neurologic disease. *Archives of Neurology*, 2000, 57: 1265-1270.
61. Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwel N, Matheis RJ, Noskin O, Richards JA, Schoenberger NE. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2000, 81: 668-678.
62. Wolfe MS. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1: 859-866.
63. Ghosh AK, Bilcer G, Harwood C, Kawahama R, Shin D, Hussain KA, Hong L, Loy JA, Nguyen C, Koelsch G, Ermolieff J, Tang J. Structure-based design: potent inhibitors of human brain memapsin 2 (beta-secretase). *Journal of Medicinal Chemistr*, 2001, 44: 2865-2868.
64. Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *The Journal of Neuroscience*, 1993, 13: 1676-1687.
65. Findeis MA. Peptide inhibitors of beta amyloid aggregation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002, 2: 417-423.

66. Matsubara E, Hirai S, Amari M, Shoji M, Yamaguchi H, Okamoto K, Ishiguro K, Harigaya Y, Wakabayashi K. Alpha 1-antichymotrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. *Annals Neurology*, 1990, 28: 561-567.
67. Breitner JC, Gau BA, Welsh KA, Plassman BL, McDonald WM, Helms MJ, Anthony JC. Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology*, 1994, 44: 227-232.
68. McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*, 1996, 47: 425-432.
69. Brenner DE, Kukull WA, Stergachis A, van Belle G, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Larson EB. Postmenopausal estrogen replacement therapy and the risk of Alzheimer's disease: a population-based case-control study. *American Journal of Epidemiology*, 1994, 140: 262-267.
70. Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *The Lancet*, 2000, 356: 1627-1631.
71. Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease*, 2000, 7: 321-331.
72. Bravo IG, Busto F, De Arriaga D, Ferrero MA, Rodriguez-Aparicio LB, Martinez-Blanco H, Reglero A. A normalized plot as a novel and time-saving tool in complex enzyme kinetic analysis. *Biochemical Journal*, 2001, 358: 573-583.
73. Kappe CO, Dallinger D. The impact of microwave synthesis on drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5: 51-63.
74. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7: 88-95.
75. Laine DI, Xie H, Buffet N, Foley JJ, Buckley P, Webb EF, Widdowson KL, Palovich MR, Belmonte KE. Discovery of novel 8-azoniabicyclo[3.2.1]octane carbamates as muscarinic acetylcholine receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17: 6066-6069.

76. Du Y, Oishi S, Saito S. Selective N-alkylation of amines with alcohols by using non-metal-based acid-base cooperative catalysis. *Chemistry*, 2011, 17: 12262-7.
77. Pati H, Weisburch P, Lemon A, Lee M. Synthesis of N-benzylated anilines from the reaction of anilines and benzyl chloroformate. *Synth Commun*, 2004, 34: 933-940.
78. Ma D, Cai Q, Zhang H. Mild method for Ullmann coupling reaction of amines and aryl halides. *Organic Letters*, 2003, 5: 2453-2455.
79. Gonzalez-Arellano C, Yoshida K, Luque R, Gai PL. Highly active and selective supported iron oxide nanoparticles in microwave-assisted N-alkylations of amines with alcohols. *Green Chemistry*, 2010, 12: 1281-1287.
80. Chiappe C, Piccioli P, Pieraccini D. Selective N-alkylation of anilines in ionic liquids. *Green Chemistry*, 2006, 8: 277-281.
81. Fleischer S, Zhou SL, Junge K, Beller M. An Easy and General Iron-catalyzed Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Anilines. *Chemistry-an Asian Journal*, 2011, 6: 2240-2245.
82. Huang W, Lv D, Yu H, Sheng R, Kim SC, Wu P, Luo K, Li J, Hu Y. Dual-target-directed 1,3-diphenylurea derivatives: BACE 1 inhibitor and metal chelator against Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, 18: 5610-5615.
83. Yerdelen KO, Gul HI. Synthesis and anticholinesterase activity of fumaramide derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 2013, 22: 4920-4929.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Edip TOSUN Doğum tarihi: 15.01.1988 Doğum yeri: Diyarbakır Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0543 447 84 83 Faks: - E-mail: edip_10293@hotmail.com
Eğitim
Lise: Diyarbakır Yunus Emre Lisesi (2005) Lisans: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2005-2011) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı (2012-2014)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derecede
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
-
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/

Konu: Etik Alt Kurul Kararı

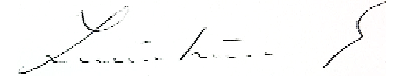
08/10/2013

Sayın: Yrd. Doç. Dr. Kadir. Özden YERDELEN

İlgi: 25.09.2013 tarih ve 798 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Alt Etik Kurulunun 08.10.2013 tarihinde almış olduğu 12' nolu karar ile "Büt-2-endioik asit bis-(benzil-fenil-amit) Türevi Bileşiklerin Sentezi, Asetilkolinesteraz ve Butilkolinesteraz Enzimlerine Karşı Aktivitelerinin Araştırılması" başlıklı, yüksek lisans öğrenciniz Edip TOSUN ile beraber yürüteceğiniz çalışmanızın etik kurulunuz tarafından kabulüne karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.



Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Etik Alt Kurul Başkanı

Toplantı Tarihi: 08.10.2013

Toplantı Sayısı: 3

Karar No:12

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Kadir Özden YERDELEN' in yürütücülüğünde Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Büt-2-endioik asit bis-(benzil-fenil-amit) Türevi Bileşiklerin Sentezi, Asetilkolinesteraz ve Butilkolinesteraz Enzimlerine Karşı Aktivitelerinin Araştırılması" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 25.09.2013 tarih ve 798 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğunun mevcut oybirliği ile kabulüne karar verildi.