



**3,6-DİSÜBSTİTÜE BENZOKSAZOL-2(3H)-ON/BENZOTİYAZOL-2(3H)-ON
TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE ALZHEİMER HASTALIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ**

Merve ERDOĞAN

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2020

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Merve ERDOĞAN
24.08.2020

3,6-DİSÜBSTİTÜE BENZOKSAZOL-2(3H)-ON/BENZOTİYAZOL-2(3H)-ON TÜREVLERİNİN
SENTEZİ VE ALZHEİMER HASTALIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK
İNCELENMESİ
(Doktora Tezi)

Merve ERDOĞAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2020

ÖZET

Tez kapsamında, benzoksazolon ve benzotiyazolon halka sistemlerine sahip 40 bileşik ayrıca benzoksazol ve benzotiyazol yapısında 2 türev olmak üzere 42 yeni bileşik sentez edildi. Sentez edilen bileşiklerin yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HRMS ve elementel analiz yöntemleri ile aydınlatıldı. Bileşiklerin asetilkolinesteraz (AKE) ve bütirikolinesteraz (BKE) inhibitör aktiviteleri 100 µM konsantrasyonda in vitro Ellman yöntemiyle değerlendirilerek %50'nin üzerinde inhibisyon gösteren bileşiklerin IC₅₀ değerleri hesaplandı. En yüksek AKE inhibitör aktivite gösteren bileşik 39 (IC₅₀=0,34 µM) ve en yüksek BKE inhibitör aktivite gösteren bileşik 34 (IC₅₀=2,98 µM) kinetik çalışmalar için seçilerek inhibisyon tipleri belirlendi. İleri aktivite çalışmaları kapsamında ise IC₅₀ değerlerine göre seçilen 8 bileşiğin enflamatuvar belirteçlerin (IL-1β, IL-6, TNF-α ve NO) düzeyleri üzerine etkileri, sitotoksiteleri ve apoptotik etkileri değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, bileşiklerin enflamatuvar belirteçlerin düzeylerini azalttıklarını, sitotoksik olmadıklarını ve apoptoza yol açmadıklarını göstermiştir. Ayrıca 8 bileşiğin fizikokimyasal özellikleri teorik olarak hesaplandı, hepsinin Lipinski kurallarına uygun ve kan beyin bariyerini geçebilecek özellikte olduğu belirlendi. Son olarak bağlanma modlarının belirlenmesi ve yapı-etki ilişkilerinin daha iyi yorumlanması amacıyla 8 bileşiğin MOE programı kullanılarak AKE (1EVE) ve BKE (1P0I) kristal yapıları ile moleküler docking çalışması gerçekleştirilmiştir.

Bilim Kodu : 1019
Anahtar Kelimeler : Alzheimer hastalığı, benzoksazolon/benzotiyazolon, enzim inhibisyonu
Sayfa Adedi : 176
Danışman : Prof. Dr. Deniz S. DOĞRUER

SYNTHESIS OF 3,6-DISUBSTITUTED BENZOXAZOL-2(3H)-ONE/BENZOTHIAZOL-2(3H)-ONE
DERIVATIVES AND IN VITRO INVESTIGATION OF THEIR EFFECTS ON ALZHEIMER'S DISEASE

(Ph. D. Thesis)

Merve ERDOĞAN

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

August 2020

ABSTRACT

In the scope of thesis, 42 new final compounds were synthesized, including 40 compounds with benzoxazolone and benzothiazolone ring systems as well as 2 compounds with benzoxazole and benzothiazole structures. The structures of the synthesized compounds were confirmed by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRMS and elemental analysis methods. The acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activities of the compounds were evaluated by in vitro Ellman method at 100 μM concentrations, and the IC_{50} values of the compounds that showed cholinesterase inhibition more than %50 were calculated. The inhibition types were determined by selecting the most potent AChE inhibitor compound 39 ($\text{IC}_{50} = 0,34 \mu\text{M}$) and the most potent BChE inhibitor compound 34 ($\text{IC}_{50} = 2,98 \mu\text{M}$) for kinetic studies. In further activity studies, the effects of 8 compounds selected according to IC_{50} values on the levels of inflammatory markers (IL-1 β , IL-6, TNF- α and NO), cytotoxicity and the induction of apoptosis were evaluated. The results showed that the compounds decrease the levels of inflammatory mediators and had no cytotoxic and apoptotic effects. In addition, the physicochemical properties of 8 compounds were theoretically calculated to determine their drug-likeness properties, all data were found to be consistent with Lipinski's rules. Finally, in order to determine binding modes and explain the structure-activity relationships of 8 compounds, molecular docking study with AChE (1EVE) and BChE (1P0I) crystal structures was performed by using MOE.

Science Code : 1019
Key Words : Alzheimer's disease, benzoxazolone/benzothiazolone, enzyme inhibition
Page Number : 176
Advisor : Prof. Dr. Deniz S. DOĞRUER

TEŞEKKÜR

Doktorama başladığım ilk günden itibaren yardımını ve desteğini esirgemeyen, tüm bilgi birikimini her aşamada cömertçe paylaşan, doktoranın bir yolculuk olduğunu öğreten, doktora sonrası akademik hayatım için özgüven aşılayan, etik değerlere daima riayet etmeyi öğütleyen ve asla pes etmemeyi aklıma kazıyan çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Deniz S. DOĞRUER'e çok teşekkür ederim.

Aklıma takılanları her zaman sorabildiğim, daima beni aydınlatan, her aşamada bilgi birikimiyle destek olan Dr. Burcu KILIÇ'a da teşekkürlerimi sunarım.

Biyolojik aktivite çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Rahşan Ilıkçı SAĞKAN'a moleküler docking çalışmalarını gerçekleştiren Dr. Fatma AKSAKAL'a teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nın olanaklarından yararlanmamı sağlayan anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Erden BANOĞLU'na, bilgileriyle görüş açımı geliştiren tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma da teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmamı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK-115S192), 100/2000 Doktora Programı kapsamında bursiyeri olduğum Yükseköğretim Kurulu'na ve 100/2000 bursunu kazanmamıza vesile olan Prof. Dr. Tijen ÖNKOL'a çok teşekkür ediyorum.

Çok kıymetli dostlarım Deniz Lengerli, Kübra İbiş, Sümeyye Turanlı ve Azize Gizem USLU'ya tüm güzel anılarımı ve zor zamanları benimleri paylaştıkları, sevgilerini ve yardımlarını her an koşulsuzca sundukları için gönülden teşekkür ederim.

Eğitimime evde başlayan ilk öğretmenlerim canım anneme ve babama, hayatımın her aşamasında beni maddi ve manevi olarak destekledikleri, ülkesine bağlı ve faydalı bir birey yetiştirmek için çabaladıkları ve her koşulda yanımda oldukları için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

δ	Sigma
ppm	parts per million (milyonda bir birim)
J	Eşleşme sabiti
Å	Angstrom
m/z	kütle/yük
nm	nanometre
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
μ L	mikrolitre
mM	milimolar
μ M	mikromolar
IC ₅₀	Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu
U	Ünite

Kısaltmalar

Açıklamalar

AH	Alzheimer Hastalığı
A β	Amiloid Beta peptit
APP	Amiloid prekürsör protein
APOE	Apolipoprotein E
AKE	Asetilkolinesteraz
ATK	Asetiltiyokolin iyodür
BKE	Butirilkolinesteraz
BTK	Butiriltiyokolin iyodür

Kısaltmalar	Açıklamalar
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BSA	Bovine serum albümin
CDK5	Cyclin-dependent kinase 5
DCM	Diklorometan
DMF	Dimetilformamit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMAP	4-(dimetilamino)piridin
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
FBS	Fetal bovine serum
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
HuAKE	Human asetilkolinesteraz
HuBKE	Human butirilkolinesteraz
IL-1β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
KAB	Katalitik aktif bölge
MOE	Molecular Operating Environment
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein-1 α
MTDL	Multiple Target Directed Ligand
NFY	Nörofibriler yumaklar
NMDA	N-metil D-aspartat
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
PAB	Periferal anyonik bölge
PDB	Protein Data Bank
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
ROT	Reaktif oksijen türleri

Kısaltmalar**Açıklamalar****RAT**

Reaktif azot türleri

TEA

Trietilamin

TNB

5-tiyo-2-nitrobenzoik asit

TNF- α Tümör nekrozis faktör- α **TcAKE***Torpedo californica* asetilkolinesteraz**TREM2**

Triggering receptor expressed on myeloid cells 2



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xvi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	7
2.2. Alzheimer Hastalığının Klinik Bulguları ve Evreleri.....	8
2.3. Alzheimer Hastalığının Tanısı	11
2.4. Alzheimer Hastalığına Neden Olduğu Düşünülen Risk Faktörleri	13
2.5. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi	16
2.5.1. Amiloid β plaklar	17
2.5.2. Nörofibriler yumaklar	19
2.5.3. Sinaps ve nöron kaybı.....	20
2.5.4. Granovasküler dejenerasyon ve Hirano cisimcikleri	20
2.5.5. Mitokondri hasarı ve oksidatif stres.....	21
2.5.6. Nörotransmitter eksikliği	21
2.5.7. Eksitotoksisite	22
2.6. Alzheimer Hastalığında Nöroenflamasyon	23
2.6.1. Glial hücreler	24
2.6.2. Enflamatuvar mediyatörler.....	28

	Sayfa
2.7. Alzheimer Hastalığının Tedavisi	33
2.7.1. Kolinergic hipotez.....	33
2.7.2. Amiloid hipotezi	38
2.7.3. Tau hipotezi.....	40
2.7.4. Diğer tedavi yaklaşımları	41
2.7.5. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Onaylanmış İlaçlar.....	43
2.8. Benzoksazon ve Benzotiazolon Halkalarını Farmasötik Kimyadaki Önemi ..	49
2.8.1. Benzoksazol ve benzoksazon halkalarının biyolojik aktiviteleri.....	51
2.8.2. Benzotiazol ve benzotiazolon halkalarının biyolojik aktiviteleri	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
3.1. Kimyasal Çalışmalar.....	57
3.1.1. Kimyasal çalışmalarda kullanılan gereçler	57
3.1.2. Kimyasal çalışmalardaki genel sentez yöntemleri	58
3.2. Analitik Kontroller	65
3.2.1. Erime derecesi tayini	65
3.2.2. İnce tabaka kromatografisi ile yapılan kontroller	65
3.2.3. Spektroskopik yöntemler.....	66
3.2.4. Elementel analizler	66
3.2.5. Yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumları.....	66
3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	67
3.3.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite tayini	67
3.3.2. Antiinflamatuvar aktivite çalışması	70
3.3.3. Apoptozun flow sitometride Annexin V bağlanması ile incelenmesi	72
3.3.4. Sitotoksikite çalışmaları (Hücre proliferasyon testi)	73
3.4. Moleküler Docking Çalışması	74

	Sayfa
3.5. Fizikokimyasal Parametre Hesaplama Çalışmaları	75
4. BULGULAR	77
4.1. Kimyasal Bulgular	77
4.1.1. <i>N</i> -(3-Metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)-3-(4-fenilpiperazin-1-il)propanamit (Bileşik 1)	77
4.1.2. 3-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 2)	78
4.1.3. 3-(4-(4-Klorofenil)piperazin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 3)	79
4.1.4. 3-(4-(4-Metilfenil)piperazin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 4)	80
4.1.5. 3-(4-(4-Metoksifenil)piperazin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 5)	81
4.1.6. 3-(4-(4-Triflorometilfenil)piperazin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 6)	82
4.1.7. 3-(4-Benzilpiperazin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 7)	83
4.1.8. 3-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 8)	84
4.1.9. 3-(4-(4-Klorobenzil)piperazin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 9)	85
4.1.10. 3-(4-(4-Metoksibenzil)piperazin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 10)	86
4.1.11. 3-(4-(4-Triflorometilbenzil)piperazin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 11)	87
4.1.12. 3-(4-Fenilpiperidin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 12)	88
4.1.13. 3-(4-Benzilpiperidin-1-il)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 13)	89
4.1.14. 3-(Benzil(metil)amino)- <i>N</i> -(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 14)	90

Sayfa

4.1.15. N-(3-Metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)-3-(4-fenilpiperazin-1-il)propanamit (Bileşik 15)	91
4.1.16. 3-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 16)	92
4.1.17. 3-(4-(4-Klorofenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 17)	93
4.1.18. 3-(4-(4-Metilfenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 18)	94
4.1.19. 3-(4-(4-Metoksifenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 19)	95
4.1.20. 3-(4-(4-Triflorometilfenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 20)	96
4.1.21. 3-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 21)	97
4.1.22. 3-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 22)	98
4.1.23. 3-(4-(4-Klorobenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 23)	99
4.1.24. 3-(4-(4-Metoksibenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 24)	100
4.1.25. 3-(4-(4-Triflorometilbenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 25)	101
4.1.26. 3-(4-Fenilpiperidin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 26)	102
4.1.27. 3-(4-Benzilpiperidin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 27)	103
4.1.28. 3-(Benzil(metil)amino)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 28)	104
4.1.29. 4-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)butanamit (Bileşik 29)	105
4.1.30. 4-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)butanamit (Bileşik 30)	106

Sayfa

4.1.31. 4-(4-Fenilpiperidin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)butanamit (Bileşik 31)	107
4.1.32. 5-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)pentanamit (Bileşik 32)	108
4.1.33. 5-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)pentanamit (Bileşik 33)	109
4.1.34. 5-(4-Fenilpiperidin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)butanamit (Bileşik 34)	110
4.1.35. 3-Metil-6-(3-(4-fenilpiperazin-1-il)propanoil)benzoksazol-2(3H)-on (Bileşik 35)	111
4.1.36. 3-Metil-6-(3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoil)benzoksazol-2(3H)-on (Bileşik 36)	112
4.1.37. 3-Metil-6-(3-(4-fenilpiperidin-1-il)propanoil)benzoksazol-2(3H)-on (Bileşik 37)	113
4.1.38. 3-Metil-6-(3-(4-fenilpiperazin-1-il)propanoil)benzotiyazol-2(3H)-on (Bileşik 38)	114
4.1.39. 3-Metil-6-(3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoil)benzotiyazol-2(3H)-on (Bileşik 39)	115
4.1.40. 3-Metil-6-(3-(4-fenilpiperidin-1-il)propanoil)benzotiyazol-2(3H)-on (Bileşik 40)	116
4.1.41. 3-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(2-fenilbenzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 41)	117
4.1.42. 3-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(2-fenilbenzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 42)	118
4.2. Biyolojik Aktivite Bulguları	119
4.2.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite bulguları	119
4.2.2. Antienflamatuvar aktivite bulguları	126
4.2.3. Apoptozis testi bulguları	129
4.2.4. Sitotoksisite testi bulguları.....	130
4.3. Moleküler Docking Bulguları.....	132
4.4. Fizikokimyasal Parametre Hesaplama Bulguları	136

Sayfa

5. TARTIŞMA.....	137
5.1. Kimyasal Bulguların Değerlendirilmesi.....	137
5.2. Biyolojik Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi.....	142
5.2.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite bulgularının değerlendirilmesi	142
5.2.2. Antienflamatuvar aktivite bulgularının değerlendirilmesi	147
5.2.3. Apoptozis bulgularının değerlendirilmesi.....	148
5.2.4. Sitotoksikite testi bulgularının değerlendirilmesi.....	148
5.3. Moleküler Docking Bulgularının Değerlendirilmesi	148
5.3.1. Asetilkolinesteraz için docking bulgularının değerlendirilmesi	149
5.3.2. Bütilkolinesteraz için docking bulgularının değerlendirilmesi.....	151
5.4. Fizikokimyasal Parametre Bulgularının Değerlendirilmesi.....	152
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	153
KAYNAKLAR	155
ÖZGEÇMİŞ.....	175

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kolinerjik hipoteze dayanarak geliştirilmiş ilaçların IC50 değerleri	44
Çizelge 2.2. Benzoksazol ve benzoksazolon halkaları üzerine yapılan güncel çalışmalar	52
Çizelge 2.3. (devam) Benzoksazol ve benzoksazolon halkaları üzerine yapılan güncel çalışmalar	53
Çizelge 2.4. Benzotiyazol ve benzotiyazolon halkaları üzerine yapılan güncel çalışmalar	55
Çizelge 2.5. (devam) Benzotiyazol ve benzotiyazolon halkaları üzerine yapılan güncel çalışmalar	56
Çizelge 4.1. Bileşiklerin % inhibisyon değerleri ve IC50 sonuçları	119
Çizelge 4.1. (devam) Bileşiklerin % inhibisyon değerleri ve IC50 sonuçları.....	120
Çizelge 4.2. Bileşik 39'un AKE inhibisyonu için hesaplanan Vmax ve Km değerleri	124
Çizelge 4.3. Bileşik 34'ün BKE inhibisyonu için hesaplanan Vmax ve Km değerleri.....	126
Çizelge 4.4. 10 µM konsantrasyonda flow sitometri apoptozis testinden alınan % değerler	129
Çizelge 4.5. Seçilen bileşiklerin hesaplanmış fizikokimyasal parametre bulguları	136
Çizelge 5.1. Kolinesteraz aktivite bulguları.....	143

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin yapısı.....	4
Şekil 2.1. Sağlıklı beyin ile Alzheimer'lı beyin arasındaki farklar	16
Şekil 2.2. Amiloid beta peptit oluşumu	17
Şekil 2.3. Amiloid beta peptit agregasyonu	18
Şekil 2.4. Nörofibriler yumakların oluşumu.....	20
Şekil 2.5. Asetilkolinin metabolik süreci	22
Şekil 2.6. Glial hücrelerin şekilleri	24
Şekil 2.7. Sağlıklı beyinde (A) ve AH'li beyinde (B) mikrogliaların durumu	26
Şekil 2.8. Sitokinler ile astrositler, nöronlar ve mikrogliaların ilişkisi.....	29
Şekil 2.9. AKE enzim aktif bölgesinin şematik gösterimi	36
Şekil 2.10. huBKE enzim aktif bölgesi	37
Şekil 2.11. AH tedavisinde kullanılan ilaçlar	43
Şekil 2.12. huAKE enzim aktif bölgesi ile donepezil etkileşimi	46
Şekil 2.13. TcAKE enzim aktif bölgesi ile rivastigmin etkileşimi.....	47
Şekil 2.14. huAKE enzim aktif bölgesi ile galatamin etkileşimi	48
Şekil 2.15. Benzoksazolon halkasının numaralandırılması ve tautomerik formları	49
Şekil 2.16. Benzotiyazolon halkasının numaralandırılması ve tautomerik formları	50
Şekil 2.17. Benzoksazol ve benzotiyazolon halka sistemlerinin numaralandırılması	51
Şekil 2.18. Benzoksazol ve benzoksazolon yapısı taşıyan ilaçlar	52
Şekil 2.19. Benzotiyazol ve benzotiyazolon yapısı taşıyan ilaçlar	54
Şekil 3.1. Ellman testinin genel reaksiyon mekanizması	68
Şekil 4.1. AKE inhibitörü bileşiklerin IC50 grafikleri	121
Şekil 4.1. (devam) AKE inhibitörü bileşiklerin IC50 grafikleri	122
Şekil 4.2. BKE inhibitörü bileşiklerin IC50 grafikleri	123

Şekil	Sayfa
Şekil 4.3. Bileşik 39'un AKE inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği	124
Şekil 4.4. Bileşik 39'un AKE inhibisyonu için Ki tayininde kullanılan derişim-eğim grafiği	125
Şekil 4.5. Bileşik 34'ün BKE inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği	125
Şekil 4.6. Bileşik 39'un AKE inhibisyonu için Ki tayininde kullanılan derişim-eğim grafiği	126
Şekil 4.7. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda İL-1 β seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi	127
Şekil 4.8. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda İL-6 seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi	127
Şekil 4.9. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda TNF- α seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi	128
Şekil 4.10. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda NO seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi	128
Şekil 4.11. FITC-Annexin V-PI apoptozis deneyinden elde edilen Dot-plot görüntüleri (Seçilen maddelerin uygulanan fibroblast hücrelerinde 24 saat sonunda apoptotik etkisinin gösterilmesi) Kontrol grubu , madde uygulanmış fibroblast hücrelerinin dot-plot görüntüsü, Annexin V-PI-(Q3) populasyonu yani canlı populasyon; Annexin V+PI- (Q4) erken apoptozise giden hücreler ; Annexin V-PI+ (Q1) populasyonu ölü hücreler ; Annexin V+PI+ (Q2) populasyonu geç apoptotik ve nekrotik hücreleri göstermektedir.	130
Şekil 4.12. Sitotoksisite testi için seçilen bileşiklerin % hücre canlılığı grafikleri	131
Şekil 4.13. Seçilen bileşiklerin AKE kristali ile elde edilen docking sonuçları	133
Şekil 4.14. (devam) Seçilen bileşiklerin AKE kristali ile elde edilen docking sonuçları ..	134
Şekil 4.15. Seçilen bileşiklerin BKE kristali ile elde edilen docking sonuçları	135
Şekil 5.1. 6-Amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on/6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on sentez şeması.....	137
Şekil 5.2. Benzoksazolon propanamit serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması	138
Şekil 5.3. Benzotiyazolon propanamit serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması	138
Şekil 5.4. Bütanamit ve pentanamit serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması.....	139
Şekil 5.5. Keton serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması	139
Şekil 5.6. Bileşik 41'in sentez şeması.....	140

Şekil	Sayfa
Şekil 5.7. Bileşik 42'in sentez şeması.....	140
Şekil 5.8. Donepezil ve bileşik 39'un kimyasal yapıları.....	145



1. GİRİŞ

20. yüzyılın başlarından günümüze kadar tıp biliminde yaşanan gelişmeler ve genel olarak toplumların sosyoekonomik düzeyinin iyileşmesi, ortalama yaşam süresinin uzamasına ve Alzheimer hastalığı (AH) gibi yaşa bağlı olarak ortaya çıkan hastalıkların görülme sıklığının artmasına neden olmaktadır. Demansın en yaygın formu olan ve tüm demans vakaların yarısından fazlasını oluşturan AH ise genellikle yaşlılıkla ortaya çıkan, başta unutkanlık olmak üzere çeşitli zihinsel ve davranışsal bozukluklara yol açan, karmaşık ve nedeni tam olarak bilinmeyen ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır [1]. Dünya Alzheimer Raporu 2019 yılı verilerine göre dünya genelinde 50 milyon demans hastası vardır ve bu sayının 2050 yılında üç katına ulaşması beklenmektedir [2]. Bu veriler değerlendirildiğinde vaka sayısı ve bu sayının artış hızı, hastalığın ne kadar kritik ve tedavisinin ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Dolayısıyla dünya genelinde hastalığın tedavisi üzerine yapılan çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir.

AH'nin Alois Alzheimer tarafından tanımlandığı 1906 yılından günümüze kadar bulguları, risk faktörleri ve patofizyolojisi hakkında çok önemli bilgiler edinilmişse de kesin nedeni tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle hastalığın tedavisi araştırılırken kolinerjik eksiklik, hücre dışı amiloid beta (A β) plaklar ve hücre içi nörofibriler yumaklar (NFY) gibi önem arz eden patofizyolojik bulgulardan faydalananarak oluşturulan hipotezler kullanılmaktadır [3].

AH'nin tedavisi amacıyla geliştirilen hipotezlerden üzerinde en çok çalışılanı kolinerjik hipotezdir ve güncel olarak tedavide kullanılan dört bileşikten üçü; donepezil, galantamin ve rivastigmin kolinerjik hipotez temel alınarak geliştirilmiştir. Tedavide kullanılan dördüncü bileşik ise glutamat seviyesindeki artışı düzenleyen N-metil-D-aspartat antagonisti memantindir [4]. Üzerinde önemle durulan A β ve tau hipotezleri vasıtasıyla geliştirilen pek çok molekül bulunmakla birlikte klinik denemelerde yeterince etkinlik gösterememeleri veya ölümcül yan etkileri sebebiyle onay alamamışlardır [5].

Kolinerjik hipotez, merkezi sinir sisteminde hafıza ve öğrenmeden sorumlu bir nörotransmitter olan asetilkolinin AH ile birlikte azalan seviyesini hastalığa ait bulgularla

ilişkilendirmekte ve asetilkolin miktarını artırmak amacıyla hidrolizinden sorumlu kolinesteraz enzimlerini inhibe etmeyi amaçlamaktadır. Asetilkolini hidroliz ederek kolinerjik iletimi sonlandıran asetilkolinesteraz (AKE) (E.C 3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (BKE) (E.C 3.1.1.8) serin hidrolaz ailesine ait enzimlerdir. Her ne kadar iki enzim de asetilkolini hidroliz etse de seçicilikleri ve kinetikleri birbirinden farklılık göstermektedir. İki enzim arasındaki farklılıklardan biri de aktif bölgelerinde yer alan amino asitlerin türüdür. AKE enzim aktif bölgesinde 14 aromatik amino asit taşırken bu sayı BKE’de 8’e düşmüştür. Bu durum BKE enzim aktif bölgesinin daha geniş hacimde olmasıyla sonuçlanmaktadır. Aktif bölgelerindeki amino asitler ufak farklılıklar gösterse de AKE ve BKE enzimlerinden ikisi de enzim aktif bölgelerinde katalitik aktif bölge (KAB) ve periferik anyonik bölge (PAB) adı verilen iki ana bölüm bulundurmaktadır. KAB, silindirik şeklindeki aktif bölgenin dibinde bulunup temel katalitik işlevi gerçekleştirirken, PAB aktif cebin girişinde yer alır ve ligandların yönlendirilişinden sorumludur. AKE enziminin PAB’ının aynı zamanda A β peptit ile etkileşerek A β agregasyonunu tetiklediği ve dolayısıyla plak oluşumuna neden olduğu öne sürülmektedir. Bu açıdan ele alındığında enzim aktif bölgesinde hem KAB hem de PAB ile etkileşerek inhibisyon yapan moleküllerin tedavi açısından daha başarılı olacağı düşünülmektedir [6].

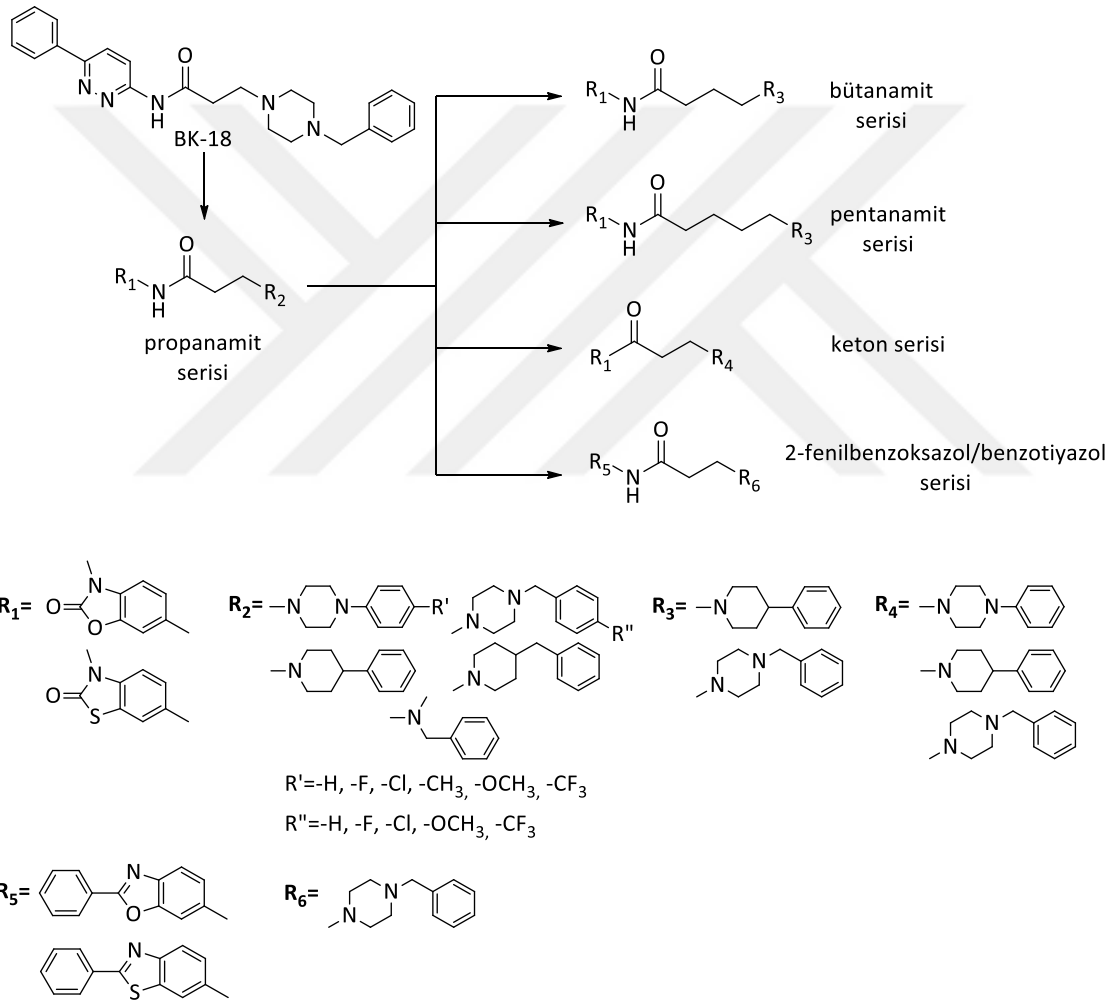
AH’de kolinerjik eksiklik gibi önemli bir diğer patofizyolojik bulgu da nöroenflamasyondur. AH’nin karakteristik bulgularından olan A β plakları ve NFY’yi ortadan kaldırmak amacıyla beyindeki immün sistem hücreleri mikroglia ve astrositlerden; interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi pro-enflamatuvar sitokinler, kemokinler ve nitrik oksit (NO) gibi enflamatuvar mediyatörler salınır. Salınan bu enflamatuvar mediyatörler, amiloid prekürsör protein salımını tetikleyerek amiloid β peptit üretimini ve agregasyonunu artırır. Oluşan A β plaklar ise tekrar enflamatuvar sitokinlerin salımına neden olur. Dolayısıyla başta beyindeki plakları ve yumakları ortadan kaldırmak için oluşan immün sistem yanıtı ile kronik enflamasyon ortaya çıkmakta ve durum bir kısır döngü halini almaktadır. Bu bilgiler ile antienflamatuvar ilaç kullanan bireylerde AH riskinin azalması durumu birleştirildiğinde AH tedavisinde kolinerjik inhibisyonun yanında antienflamatuvar etkinliğinde önemli olabileceği de düşünülmektedir [7].

AH tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleri hastalığın ilerlemesini durduramazlar ve hastalığın sadece semptomatik tedavisinde etkilidirler. Hastalığın karmaşık ve çok faktörlü olması sebebiyle tek bir patolojik hedef üzerinden etki ederek, istenilen farmakolojik etkileri ortaya çıkaracak bir molekülün hastalığın tedavisinde yeterli olamadığı, bunun yerine hastalığın çoklu patolojik hedefleri ile etkileşebilecek moleküllerin hastalığın tedavisinde etkili olacağı düşünülmektedir. Bu amaca yönelik olarak son yıllarda AH için ilaç geliştirme çalışmalarında çoklu hedefe yönelik ligand (Multiple Target Directed Ligand, MTDL) tasarımı benimsenmiş durumdadır [8]. Biz de tezimizde bu yaklaşımı uygulayarak çoklu hedefle etkileşmesini planladığımız moleküller sentez ettik.

2017 yılında grubumuz üyesi Burcu Kılıç tarafından sunulan tez çalışmasında, 3-(4-benzilpiperazin-1-il)-N-(6-fenilpiridazin-3-il)propanamit bileşiğinin (BK-18) 10 μ M konsantrasyonda AKE enzimini %55 oranında inhibe ettiği bildirilmiş ve bileşiğin yüksek AKE inhibitör aktivite göstermemesi piridazin halkasının elektronca zengin olmayışı ile ilişkilendirilmiştir [9]. Yapılan literatür incelemelerinde; elektronca zengin halkalara sahip bileşiklerin AKE enziminin PAB ile daha iyi etkileştiği ve bu bölge ile etkileşebilen bileşiklerin A β agregasyonunu daha iyi inhibe edebileceği bilgisine ulaşılmıştır.

Bu verilerden hareketle çalışmamızda elektronca zengin olmaları nedeniyle AKE aktif bölgesindeki PAB ile daha iyi etkileşebileceği öngörülen benzoksazolon ve benzotiyazolon halka sistemleri seçilmiştir. Benzoksazolon/benzotiyazolon halka sistemleri ile ilgili olarak grubumuz da dahil olmak üzere günümüze kadar pek çok çalışma yapılmış ve antienflamatuvar aktivite başta olmak üzere bu halka sistemleri ile ilişkili farklı biyolojik aktiviteye sahip çok sayıda bileşik bildirilmiştir [10-18]. Ayrıca bu halka sistemlerine sahip olan ve günümüzde de kullanılmakta olan ilaçlar da mevcuttur. Tüm bu veriler ışığında sunulan tez çalışmamızda, 3-metil-benzoksazolon ve 3-metil-benzotiyazolon halkalarının 6. konumlarında propanamit yan zinciri taşıyan ve yan zincirin sübstitüe siklik tersiyer amin yapıları ile sonlandığı propanamit türevi 28 bileşik sentez edilmiştir. Sentez edilen propanamit türevi bileşiklerin kolinesteraz inhibitör aktiviteleri Ellman testi ile incelendikten sonra en yüksek AKE ve BKE inhibitör aktiviteye sahip propanamit türevi öncü bileşikler belirlenmiş ve söz konusu bileşikler üzerinde yapılan kimyasal düzenlemeler ile öncü bileşiklerden daha güçlü AKE/BKE inhibitör aktiviteye sahip olabileceğini

öngördüğümüz bileşikler sentez edilmiştir. Bu amaca yönelik olarak karbon zincirinin uzatıldığı bütanamit ve pentanamit türevi bileşikler, amit fonksiyonel grubunun keton grubu ile değiştirildiği türevler ve benzoksazolon/benzotiyazolon halkalarındaki karbonil grubunun fenil halkası ile değiştirildiği türevler sentez edilmiştir. Sonuç olarak tez çalışmamızda, benzoksazolon ve benzotiyazolon halkalarına sahip propanamit türevi 28 bileşik ve öncü bileşikler üzerinden yaptığımız yapısal değişiklikler ile elde ettiğimiz 14 bileşik olmak üzere 42 yeni bileşik sentez edilmiştir.



Şekil 1.1. Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin yapısı

Tez kapsamında sentez edilen bileşiklerin yapı aydınlatma çalışmalarının tamamlanmasının ardından kolinesteraz inhibitör etkileri Ellman testi ile incelenmiş, en yüksek AKE ve BKE inhibitör aktivite gösteren iki bileşiğe inhibisyon tiplerinin belirlenmesi amacıyla enzim kinetiği çalışması uygulanmıştır. İnhibitör aktiviteye sahip olan türevler ve aktif olmayan

eşleniklerinden bazıları seçilerek, kolinesteraz enzimleri ile nasıl etkileştiklerinin açıklanması için moleküler docking çalışmaları yapılmıştır. Kolinesteraz enzimleri üzerine yapılan çalışmalara ek olarak en yüksek AKE ve BKE inhibitör aktivite gösteren sekiz bileşik antienflamatuvar etkilerinin tayini için seçilmiş ve belirli enflamasyon belirteçlerine karşı etkinlikleri ölçülmüştür. Aynı bileşiklere güvenlik profillerinin belirlenmesi amacıyla sitotoksikite testi ve apoptozis indüksiyonu testi uygulanmıştır. Ayrıca fizikokimyasal parametreleri ve ilaç olabilirlik özellikleri Molinspiration programı ile değerlendirilmiştir.





2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Latince “de” (yok) ve “mens” (akıl) kelimelerinin birleşmesinden türeyen demans, kişinin günlük aktiviteleri gerçekleştirme yeteneğini etkileyen hafıza, dil, problem çözme ve mantıklı düşünme becerilerinde gerileme ile tanımlanan bir belirtiler bütünüdür [19]. Demans vakalarının yaklaşık %70’lik kısmını Alzheimer hastalığı (AH) oluşturmaktadır [20]. Yaşlı popülasyonda demansın en yaygın formu olan Alzheimer ise kronik, ölümcül ve kompleks nörodejeneratif bir hastalıktır. World Alzheimer Report 2019’a göre dünyada 50 milyon demans hastası bulunmaktadır ve bu rakamın 2050 yılında 152 milyona çıkması beklenmektedir. Bu sayısal değerler her üç saniyede yeni bir demans hastasının oluştuğunu göstermektedir [2].

AH 1906 yılında Alois Alzheimer tarafından Aguste D. isimli hastanın ölümü sonrasında keşfedilmiştir ve senil demans olarak tanımlanmıştır. Aynı enstitüde birlikte çalıştıkları Emil Kraepelin daha sonra hastalığa Alzheimer adının verilmesini önermiştir. 51 yaşındaki kadın hastada gözlenen ilerleyen bilişsel kayıplar, halüsinasyon, deliryum gibi belirtiler sebebiyle otopsi yapılmış ve nörofibriler yumaklara, plaklara ve aterosklerotik değişimlere rastlanmıştır [21].

Bilim insanları üzerinde uzun yıllardır büyük bir gayretle çalışsa da hastalığın nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Demans vakalarının yıllar içerisinde katlanarak artması ve sağlık giderleri içerisinde önemli bir yer tutması hastalığa dikkat çekmektedir. Buna ek olarak 2000 yılında dünyada 65 yaş üzeri 420 milyon insan varken 2030 yılında bu rakamın 973 milyona ulaşması beklenmektedir [20]. Bu nedenle AH’yi tedavi edebilecek bileşiklerin geliştirilmesi önemli ve güncel bir konudur.

2.2. Alzheimer Hastalığının Klinik Bulguları ve Evreleri

AH'nin en önemli ve en erken klinik belirtisi, istisnalar olmakla birlikte hafıza bozukluğudur (amnezi). Daha az sıklıkla, dil bozuklukları, görsel uzamsal anormallikler ve yürütücü işlev bozuklukları başlangıç semptomu olarak görülebilmektedir [22]. Deklaratif epizodik bellek (belirli bir zamanda ve yerde meydana gelen olayların belleği) hipokampüse ve diğer medial temporal lob yapılarına bağlı olduğu için AH'de genellikle daha erken evrede etkilenmektedir. İşlemsel bellek ve motor öğrenmeyi destekleyen subkortikal sistemler ise hastalığın oldukça geç dönemlerine kadar nispeten korunmaktadır. Anlamsal bellek, ön temporal lobda neokortikal temporal bölgeler tarafından desteklendiği için kelime bilgisi ve kavramlar belirli bir evreye kadar korunabilmektedir. Uzak ve yakın anıların bellek kısımları birbirinden farklı olduğu için yakın geçmiş kısmı hastalığın en başından beri belirgin bir şekilde bozulmuştur [23, 24]. Hafıza bozuklukları zamanla daha da ilerler ve başka hafıza kısımları da zarar görmeye başladığı için durum ağırlaşır. Hafıza genellikle hastalardan 5 ila 10 dakikalık bir süre içerisinde bir dizi kelimeyi veya nesneyi öğrenmelerini ve hatırlamalarını isteyerek test edilir. Seçici ipuçları ile nesneleri hatırlama yeteneğinin bozulması medial temporal lobun hasarını gösterdiği için AH'de önemli bir belirteçdir [25]. Oryantasyon ve güncel olaylar hakkında sorular da faydalı hafıza testleridir.

Hastalığın erken evrelerinden itibaren yargılama, problem çözme ve yürütme işlevinde problemlere rastlanmaktadır [26]. Aile üyeleri ve iş arkadaşları hastayı daha az organize veya daha az motive bulabilir ve birlikte yürütülmesi gereken işlerde sorunlar oluşabilir. Hastalık ilerledikçe, genellikle görevleri tamamlayamama ve akıl yürütme yeteneğinin azalması durumu ortaya çıkar. Hasta olduğunu fark edememe veya reddetme durumu (anosognozi) hastadan hastaya değişen bir özellik olmakla birlikte hastaların durumlarını hafife almaları yaygındır [27]. Bu durumda yapmaması gereken faaliyetleri de kabullenmedikleri için hastanın güvenliği etkilenebilir. Hastalığın ilerleyen evrelerinde farkındalık zamanla azalır. Hastalığın gidişatının ve değişimlerin farkında olan hastalarda ise depresyona girme olasılığı artar [28].

Davranışsal ve psikolojik belirtiler AH'de, özellikle hastalığın orta ve geç döneminde yaygındır. Bunlar ilgisizlik, sosyal ayrışma ve sinirlilik gibi nispeten ince semptomlarla

başlayabilir. Çevreye duyulan ilgisizlik durumunun, yaşlılık kaynaklı depresyondan ayırt edilmesi zor olabilir ve bu nedenle özenle araştırılmalıdır. Hastada geç ve orta evrede günlük hayatını daha çok etkileyen, saldırganlık, bilinçsizce dolaşmak ve halüsinasyonlar gibi davranışsal bozukluklar da ortaya çıkmaktadır.

Motor görevleri yerine getirmede güçlük (apraksi), genellikle hafızada ve dilde oluşan problemlerden sonra ortaya çıkar [29]. Klinik apraksi ilk önce karmaşık, çok aşamalı motor aktiviteleri yerine getirememekle başlar daha sonra giyinme, yemek yeme, eşyaları kullanma ve diğer kişisel bakım görevlerini yapmakta zorlanma ile devam eder. AH'nin orta ila geç aşamalarında hastanın hayatını tek başına idame edememesinin en önemli nedenlerindendir [30].

Koku işlevindeki değişiklikler AH'li hastalarda yaygındır ve tanı aracı olarak da araştırılmıştır. Bununla birlikte değerlendirmede belirli bir standart oluşturmanın zorluğu koku değerlendirmesinin yaygın kullanımını sınırlandırmıştır [31, 32].

Uyku bozukluğu Alzheimer hastalarında sık görülen bir belirtidir. AH'li hastalar, uyumadan yatakta daha fazla zaman geçirirler ve AH'si olmayan yaşlı yetişkinlere kıyasla daha fazla bölünmüş uykuya sahiptirler. Bu değişiklikler amiloid β depolardan kaynaklanmaktadır ve hastalığın erken evrelerinde farkedilmesine yardımcı olabilir [33, 34].

Epileptik nöbetler, AH'li hastalarının yüzde 10 ila 20'sinde, genellikle hastalığın sonraki aşamalarında ortaya çıkar [35]. Otozomal dominant AH formları olanlar da dahil olmak üzere genç hastalar, hastalığın erken döneminde ortaya çıkabilecek nöbetler için daha yüksek risk altında olabilir [36, 37]. Epileptik nöbetler gibi miyoklonus(seyirme) da geç dönemde ortaya çıkan bir belirtidir ve hastaların sıklıkla düşmesine sebebiyet vermektedir.

Alzheimer hastalığı yıllar içerisinde ilerlemekte ve yukarıda verilen belirtiler zamanla şiddetlenmektedir. Dolayısıyla hastaya AH tanısı konulduktan sonra ortalama 5-8 yıl hayatta kalmaktadır [38]. Bu süre ve hastalığın ilerleyişi hastadan hastaya farklılık göstermektedir.

AH 4 evrede incelenmektedir;

Erken evre Alzheimer hastalığı

Genel olarak fark edilmesi zor bir evredir. AH'nin erken evresinde hastalar günlük yaşam aktivitelerinde belirgin bir bozulma göstermezler fakat karmaşık iş görevlerinde performansları düşebilir. Hastalar zorluklardan kaçınma ve problemlerini önemsiz gösterme veya küçümseme eğilimindedir. Ayrıca, hastalarda klinik tanı konulmadan beş yıl önce sosyal yoksunluk ve depresyon dahil olmak üzere bilişsel olmayan davranış değişiklikleri görülebilir [39-41].

Hafif evre Alzheimer hastalığı

Çoğu hastada, öğrenme ve hafıza bozukluğunun görüldüğü evredir. Hastanın planlama, yargılama ve organize etme yeteneğinin azalması sadece karmaşık görevlerde değil, aynı zamanda daha zor ev işlerinde de (banka hesabını yönetme; yemek hazırlama vb.) kendini gösterilebilir. AH'nin hafif evresinde, hastalar çoğu zaman bağımsız olarak yaşayabilirler. Ancak, birçok alanda önemli bilişsel zorluklar nedeniyle, çeşitli organizasyonel konularda desteğe ihtiyaçları olacaktır. Depresyon belirtileri hastalığın hafif evresinde başlayabilir [41-43].

Orta evre Alzheimer hastalığı

Yakın geçmişe ait hafızanın belirgin şekilde bozulması nedeniyle, hastalar geçmişte yaşıyor gibi görünebilir. Akıl yürütme, planlama ve düzenleme bu aşamada önemli ölçüde bozulmaktadır. Kelime bulma güçlükleri, hatalı yazma, okuma becerisinde azalma ve metinlerin anlaşılabilmesi söz konusudur. Hastaların dikkatlerini toplamaları çok zor hale gelir ve durumları hakkında farkındalıklarını yavaş yavaş kaybederler. Ev aletlerini kullanma, giyinme ve yeme becerileri konularında da problem yaşarlar. Ayrıca mekânsal yönelim, görme problemleri ve tanıdık yüzleri tanıyamama durumu başlar. Bu aşamadaki Alzheimer hastalarının üçte birinde, bilişsel eksikliklerinin yanı sıra şüphecilik, hezeyan ve sanrılar gözlenmektedir. Hastaların yaklaşık %20'sinde ise şiddetli kolinerjik eksiklik ile ilişkili olarak halüsinasyonlar gelişir. Hastalar genellikle duygusal kontrolü kaybeder ve fiziksel veya sözlü

saldırganlığın eşlik edebileceği öfke nöbetleri geliştirir. Mali ve hukuki konuları yönetemezler [41].

İleri evre Alzheimer hastalığı

Neredeyse tüm bilişsel işlevler ciddi şekilde bozulduğundan, hastalığın geç aşamasında en temel anılar bile hatırlanamaz hale gelir. Dil basit ifadelerle hatta tek kelimelere indirgenmiştir. Hastalar en basit ihtiyaçları bile gideremez ve günlük yaşamsal faaliyetlerini sürdüremez. Duygusal olarak aşırı duyarlılık meydana geldiği için hastalar genellikle hemşire müdahalelerini yanlış yorumlarlar ve bu agresif reaksiyonlara yol açabilir. Huzursuzluk ve saldırganlık gibi belirtiler şiddetli bir ağrının veya sirkadiyen ritmin bozulmasının sonucu olabilir. Hastaların büyük bir kısmı aşırı ilgisizlik ve yorgunluk gösterir. Hastalar yemek yerken desteğe ihtiyaç duyar ve en temel motor fonksiyonlar (çiğneme ve yutma) bile bozulabilir. Miyoklonus ve epileptik nöbetler, bazı hastalarda görülebilir. Semptomların uzun süre devam etmesi, hastalığın şiddeti, yaş, erkek cinsiyeti ve hastanın sahip olduğu diğer hastalıklar AH'de mortalite için önemli risk faktörleridir. Pnömoni ardından miyokard enfarktüsü ve sepsis AH'de en sık ölüm nedenleridir [41, 44].

2.3. Alzheimer Hastalığının Tanısı

AH'de oluşan patolojik değişiklikler in vivo olarak ölçülemediklerinden hastalığın kesin tanısı ancak hasta öldüğünde otopsi ile koyulabilmektedir. Günümüzde tanı için manyetik rezonans, pozitron emisyon tomografi ve beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunan biyobelirteçler kriter olarak kullanılmaktadır. Çeşitli görüntüleme ajanları ve biyobelirteçler üzerinde çalışmalar halen sürmektedir.

Fiziksel ve nörolojik muayene

Alzheimer hastalığının erken evrelerinde hastalarda bilişsel bozukluk belirgin fiziki ve nörolojik farklılıklar oluşmaz. Temel reflekslerde bozulma miyoklonus ve nöbetler hastalığın genellikle son evrelerinde ortaya çıkmaktadır [45].

Mental durum değerlendirmesi

AH'de tanı koymaya yardımcı olması için çeşitli mental durum değerlendirme testleri oluşturulmuştur. Bilişsel testler hastalığın bulgularını doğru değerlendirecek biçimde çoklu bilişsel işlevleri değerlendiren tarama testleri, öğrenme ve bellek testleri, görsel-mekansal işlev testleri, yürütücü işlev testleri, dil fonksiyonu testleri, dikkat ve konsantrasyon testleri, pratik fonksiyon testleri olarak sınıflandırılmıştır [46].

Biyobelirteçler

BOS' da bulunan α -sinüklein, TAR (transactive response) DNA-bağlı protein-43 (TDP-43) ve vasküler değişimler diğer klinik kriterlerle desteklendikleri takdirde tanı açısından kriter olarak kabul edilmektedir [47]. Bu belirteçlerin hastalığı taşımayan sağlıklı yaşı beyindeki oranlarıyla kıyaslanarak sonuca varılabilmektedir. Biyobelirteçlerin çok önemli olmalarının diğer bir nedeni de klinik çalışmalarda kullanılabilecek olmaları ve dolayısıyla hastalığın tedavisinin bulunabilmesi için kolaylık ve avantaj sağlamalarıdır [48]. Bu sebeplerden ötürü başka biyobelirteçler üzerine çokça araştırma yapılmaktadır. Son yıllarda sinaptik bir protein olan nörogranin üzerine çalışmalar sürmektedir ve artan nörogranin seviyesinin Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir [49]. Presnaptik bir protein olan SNAP25 (Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa) üzerine çalışmalar da sürmektedir [50].

Kan, BOS' dan daha kolay ulaşılabilir olduğu için kanda keşfedilecek biyobelirteçler büyük önem taşımaktadır. Kanda bulunabilecek santral sinir sistemi proteinlerinin ölçülmesi hedeflense de hem kanda az miktarda bulunmaları hem de plazma proteazları tarafından parçalanmaları nedeniyle henüz mümkün olamamaktadır [51].

Görüntüleme teknikleri

Tanı konulmak istenen hastalarda genellikle bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans kullanılmaktadır. Ayrıca pozitron emisyon tomografi tekniği ile A β plakları görüntülemeyi sağlamak amacıyla 3 yeni görüntüleme ajanı onay almıştır. Bunlar florbetapir, florbetaben

ve flutemetamoldür [52]. Fakat sadece plakları görüntülemek tanı koymak için yeterli değildir. Görüntüleme çalışmaları kapsamında hipokampüsün volümünün ölçülmesinin daha sağlıklı sonuç vereceği tahmin edilmekle birlikte karmaşık yazılımlar gerektirdiğinden kullanımı yaygınlaşmamaktadır [51].

2.4. Alzheimer Hastalığına Neden Olduğu Düşünülen Risk Faktörleri

AH'nin en önemli risk faktörlerinden biri yaştır ve hastaların büyük çoğunluğunu 65 yaş üzeri bireylerden oluşmaktadır. Hastalığın görülme sıklığı yaşla birlikte artar, 65-74 yaş grubunda bu oran %3'iken 85 yaş ve üstünde ise neredeyse iki katına ulaşmaktadır [20, 53].

AH, 65 yaş altı bireylerde görüldüğünde erken başlangıçlı AH, 65 yaş üstü bireylerde görüldüğünde ise geç başlangıçlı AH olarak adlandırılmaktadır ve geç başlangıçlı AH tüm vakaların yaklaşık %95'ini oluşturmaktadır. Klinik olarak büyük farklılıklar sergilemeseler de erken başlangıçlı AH daha hızlı bir ilerleme göstermekte ve kalıtımla ilişkili olduğu belirtilmektedir. APP, PSEN1 ve PSEN2 (sırasıyla amiloid prokürsör protein, presenilin 1 ve presenilin 2) genlerinin A β oluşumunda görevli olduğu düşünülen proteinleri kodladığı ve bu üç gende meydana gelen mutasyonların erken başlangıçlı AH'ye neden olduğu bildirilmiştir. Bu genler aynı zamanda hastalığın tanısında biyobelirteç olarak değerlendirilirken erken başlangıçlı AH gelişme riskinin yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. Ayrıca erken başlangıçlı AH patogenezinde rol oynayabileceği düşünülen yeni genler üzerine çalışmalar halen sürmektedir [20, 54, 55].

Geç başlangıçlı AH ise esas olarak APOE (apolipoprotein E geni) genindeki bir polimorfizmle, ϵ 4 allelinin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Apolipoprotein E (ApoE), 19. kromozom üzerinde bulunan, APOE geni tarafından kodlanan ve lipid metabolizmasında rol oynayan bir proteindir. Üç farklı APOE alleli vardır (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4) ve bu alleller 3 farklı apoE izoformu (apoE2, apoE3 ve apoE4) oluşmasına yol açar. Bir popülasyonda allelleri taşıma sıklığı farklılık (ϵ 2: %5-10, ϵ 3: %65-70 ve ϵ 4: %15-20) göstermektedir. Ayrıca farklı toplumlarda yapılan çalışmalar da APOE allel dağılımlarının farklılıklarını ortaya koymuştur. APOE ϵ 4 alleli, geç başlangıçlı Alzheimer için temel risk faktörüken tam tersine ϵ 2 alleli AH gelişmesi riskini azaltır. ApoE ile hastalık arasındaki ilişkinin ne olduğu henüz tam olarak anlaşılamasa

da bazı mekanizmalar önerilmiş ve in vitro çalışmalarda tutarlı sonuçlar sunulmuştur. Bu çalışmaların bazılarında, apoE4 izoformunun, A β peptide bağlanıp fibrillerdeki polimerizasyonu ve birikmeyi teşvik ettiği, apoE2 ve apoE3 izoformlarının ise bu peptidin atılımını arttırdığı ve beyin dokusunda birikmesini engellediği bildirilmiştir [20, 54, 55].

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar 6. kromozomda bulunan TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2) genindeki eksikliğin, AH gelişimi için risk oranını %2.9 arttırdığını göstermiştir. TREM2 proteini, merkezi sinir sisteminin fagositik hücreleri olan mikrogliaların yüzeyinde yüksek oranda eksprese edilmektedir ve merkezi sinir sisteminde fagositik ve enflamatuvar yanıtları düzenleme işlevine sahiptir. TREM2 reseptörü için yapılan çalışmalar, apoptotik nöronal hücrelerin fagositik kapasitesini etkilediğini göstermiştir. TREM2 eksikliğinde oluşan hücresel kirlilikler pro-enflamatuvar bir çevre oluşturmaktadır. Bunun sonucunda da A β peptit uzaklaştırma kapasitesinin TREM2 reseptör eksikliğinde azaldığını ve dolayısıyla A β plak birikiminin arttığını gözlemlemişlerdir [20, 54, 55].

Serebrovasküler hastalıklar nedeniyle ortaya çıkan Serebral perfüzyon bozukluğunun, bilişsel işlevi bozan A β 'nin birikimini arttırarak ve tau hiperfosforilasyonuna rol oynayan bir serin-treonin kinaz olan sikline bağımlı kinaz 5'in (Cyclin-dependent kinase 5, CDK5) aşırı ekspresyonu ile AH riskini artırabileceği olabileceği bildirilmiştir[55-57].

Hipertansiyon probleminde AH riskinin arttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Özellikle orta yaşta hipertansiyonu olan bireylerin ilerleyen yaşlarda kognitif fonksiyonlarında gerileme olduğu da bildirilmiştir. Hipertansiyonun, vasküler duvarlarda hipoperfüzyon, iskemi ve serebral hipoksiye yol açarak AH gelişimini tetikleyen değişikliklere neden olabileceği ve kan beyin bariyerine zarar vererek AH üzerinde olumsuz etki yaratabileceği düşünülmektedir [54, 55, 58].

Çalışmalar, tip 2 diabetes mellitusun AH gelişme riskini artırdığını göstermektedir. Bu ilişki için insülin direnci, insülin eksikliği, hiperglisemi, serebrovasküler hasar ve vasküler enflamasyon ile ilgili çeşitli mekanizmalar önerilmektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar insülin direnci veya eksikliği durumunun β ve γ sekretaz gibi etki gösterdiğini

dolayısıyla A β 'nin beyinde birikiminin arttığını göstermiştir. A β üzerindeki etkisinin yanı sıra tau hiperfosforilasyonuna da neden olarak NFY oluşturmaktadır [54, 59].

AH ile obezite arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılmamakla birlikte obezitenin de bir risk unsuru olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bir diğer çalışmada kötü beslenmeye işaret eden düşük kilonun da yüksek kilo ve obezite gibi ilerleyen yaşamda AH riskini artırabileceği belirtilmiştir [54, 60].

Hiperkolesterolemi ve ateroskleroz da AH için risk unsuru olarak değerlendirilmektedir. Çalışmalar Alzheimer'lı hastaların sağlıklı bireylere göre kolesterollerinin %10 fazla olduğunu ve sirkülasyonda artan kolesterol seviyesinin kan beyin bariyerine zarar verdiğini ortaya koymaktadır. Bu bilgiye ek olarak, hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalar, hiperkolesteroleminin, nörofibriler yumakları artırdığını, nöroenflamasyona ve kolinerjik nöronlarda işlev bozukluğuna neden olduğunu ayrıca A β peptid birikimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle hastalığın kandaki kolesterol seviyesini düşüren statin türevi ilaçları kullanan kişilerde gerileyeceği düşünülmüş fakat klinik çalışmalarla kanıtlanmamıştır [61, 62].

Pek çok hastalıkla ilişkili olan stres AH'de de bir risk faktörü olarak görülmektedir. Fareler üzerine yapılan bir çalışmada, stresin kortisol salgısına neden olarak hipotalamus ve prefrontal kortekste A β peptid birikimine yol açtığı ve uzun süreli strese maruz kalmanın nörodejenerasyon ile sonuçlandığı bildirilmiştir [63].

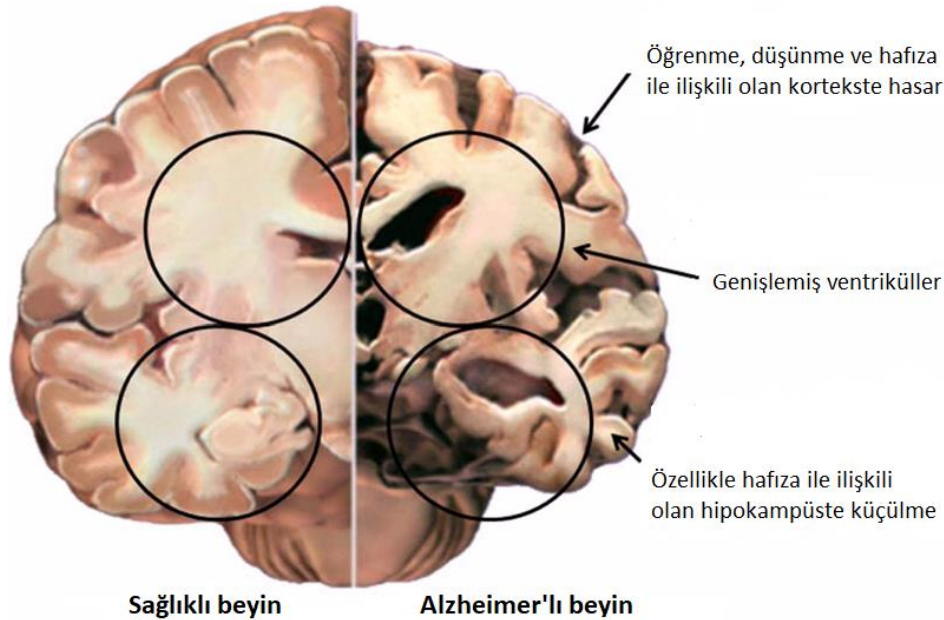
İlk yetişkinlik yıllarında yaşanan depresyon vakalarının ilerleyen yıllarda AH için risk oluşturduğu düşünülmektedir. Bir çalışma pozitron emisyon tomografi yardımıyla majör depresyonu olan bazı hastalarda hipocampal atrofi ve A β birikimini göstermiştir [64].

Uyku bozukluğu ve AH arasında çift taraflı bir ilişki bulunmaktadır. Uyku bozukluğu AH için hem bir belirti hem de risk faktörüdür. Spesifik olarak insomniası olan hastalarda AH riski artarken uykuda solunum bozukluğu olan hastalarda tüm demans tipleri için risk artmaktadır [65].

Ayrıca sigara içmenin de AH risk faktörlerinden olabileceği bildirilmiştir. Serbest radikallerin üretimini ve oksidatif stresi artırdığı, bağışıklık sisteminde pro-enflamatuvar yanıtı tetiklediği, lökositleri aktive ettiği ve sonuç olarak oksidatif hasara yol açtığı bilinmektedir. [66].

2.5. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

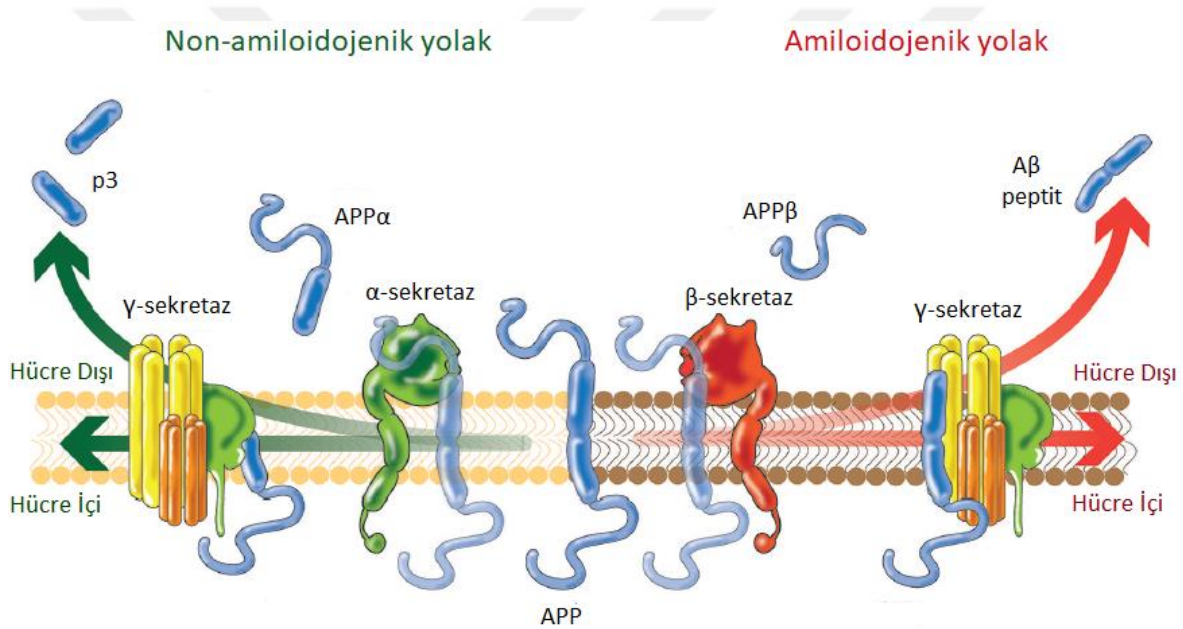
AH'nin patolojik süreci, nöronların ölümü ve sinaptik bağlantıların kaybı ile karakterizedir [20, 67]. Bu süreci neyin başlattığı ise halen belirsizliğini korumaktadır. Nöron kaybının bir sonucu olarak, ventriküllerde ve sulkusta genişleme ayrıca kortikal atrofi gözlenir. Hastalığın en belirgin patofizyolojik bulguları korteks boyunca senil plaklar, nörofibriler yumaklar ve nükleus bazalis Meynert'te kolinerjik nöronların kaybıdır. Hipokampus, entorhinal korteks ve neokorteks nöron kaybından en ciddi şekilde etkilenen bölgelerdir. Bu nöronal kayıplar AH'li hastalarda, noradrenerjik, dopaminerjik ve serotonerjik sistemler de dahil olmak üzere nörotransmitter sistemlerde sorunlara yol açarak yaygın olarak görülen bilişsel, davranışsal ve psikiyatrik semptomlara neden olurlar [68, 69].



Şekil 2.1. Sağlıklı beyin ile Alzheimer'lı beyin arasındaki farklar

2.5.1. Amiloid β plaklar

Proteinler amino asitlerden oluşan ve vücudumuzda çok önemli metabolik fonksiyonların yerine getirilmesini sağlayan makromoleküllerdir. Her proteinin üç boyutlu yapısı yani katlanma şekli ve fonksiyonu kendine özgüdür. Proteinlerin katlanma şekillerindeki bozulma fonksiyonlarının değişmesine neden olabilmektedir. AH'nin en karakteristik bulgularından A β plaklar ve NFY da bu şekilde oluşmuşlardır. AH'nin klinik semptomlarından bilişsel bozulma ve hafızadaki düşüş de hatalı katlanmış A β peptitlerin ve hiperfosforile tau proteinlerinin agregat oluşturması ile ilişkilidir [70].



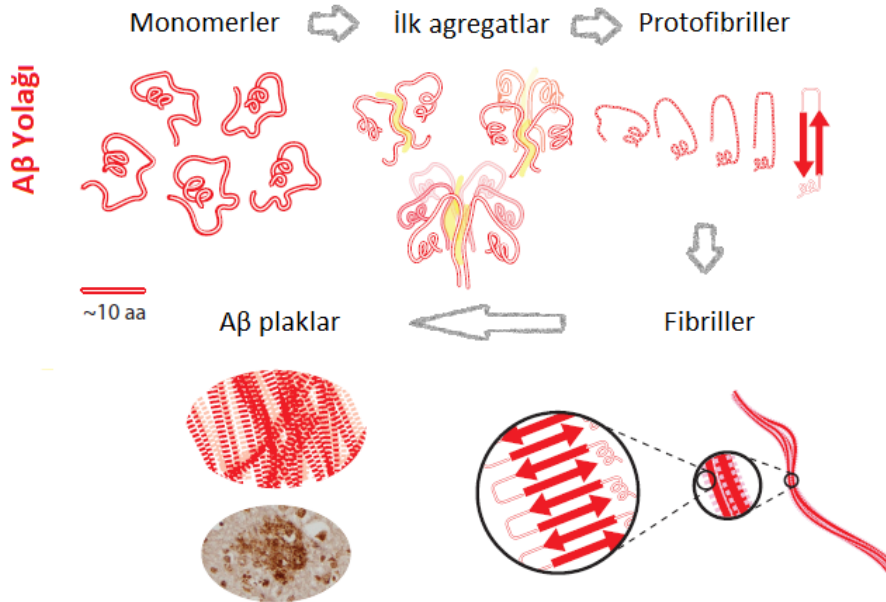
Şekil 2.2. Amiloid beta peptit oluşumu

Amiloid prekürsör protein (APP), temel rolü tam olarak anlaşılamayan fakat nöronal plastisite ve sinaps oluşumu açısından önemli olduğu düşünülen nöronal dokuda sinaps çevresinde lokalize transmembran bir proteindir [71]. 21. kromozom üzerinde bulunan APP geninin oluşturduğu izoformların amino asit sayılarının 365 ila 770 arasında değiştiği ve bu izoformlardan APP695'in merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir [72]

APP yıkımı amiloidojenik veya nonamiloidojenik olmak üzere iki farklı yolak vasıtasıyla gerçekleşebilmektedir. Nonamiloidojenik yolda α ve γ -sekretaz aktivitesi sonucunda

APP'den çözünebilen APP α ve p3 proteinleri oluşur. Amiloidojenik yolda ise önce β sonra γ sekretaz aktivitesi ile nörotoksik 40 veya 42 aminoasit taşıyan sırasıyla A β_{40} ve A β_{42} peptitleri oluşmaktadır [73-75]. Sağlıklı kişilerde bu iki yolak arasında bir denge varken AH'li bireylerde nonamiloidojenik yoldan amiloidojenik yolağa kayma durumu söz konusudur. APP, PSEN1 ve PSEN2 genlerindeki mutasyonların ve bazı başka etkenlerin iki yolak arasında dengesizliğe neden olabilecekleri belirtilmektedir. Ayrıca bu mutasyonlar çökme eğilimi daha fazla olan A β_{42} 'nin A β_{40} 'a oranını da artırmaktadır [76].

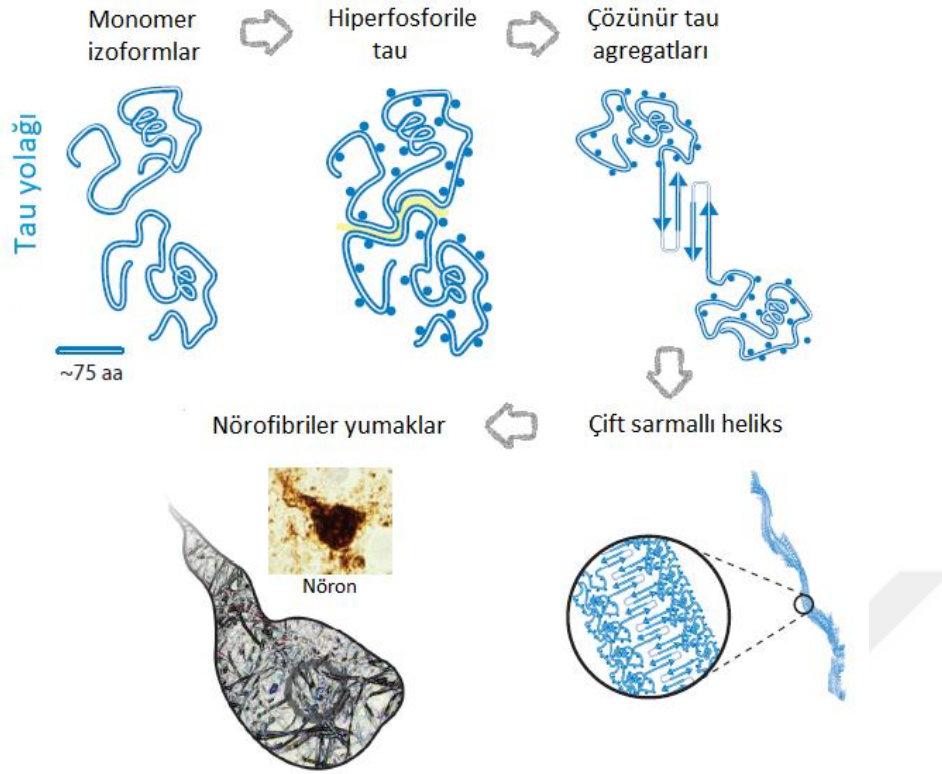
Dengenin amiloidojenik yolağa kayması sonucunda üretimi artan A β , çeşitli konformasyonel değişikliklere uğrar ve bu değişiklikler sonucunda oligomer formuna dönüşür. Oligomerler de hücre dışı A β plakların yapısal bileşeni olarak görülen çökmeye eğilimli fibrilleri oluşturur [77]. A β plaklar beyin hücrelerinin ölümü ve dolayısıyla kognitif fonksiyonlardaki bozulma ile ilişkilendirilmektedir. Çeşitli araştırmalarda bu plakların nöron apoptozisini ve oksidatif stresi tetikleyerek nörotoksik etki yaptığını gösterilmiştir. Ayrıca A β 'nin; hücre içi kalsiyum birikimi, nitrik oksit üretimi ve nöroenflamasyonu tetiklediği ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır [78].



Şekil 2.3. Amiloid beta peptit agregasyonu

2.5.2. Nörofibriler yumaklar

Tau, 17. kromozomda bulunan gen tarafından kodlanan periferel sinir sisteminde ve pek çok dokuda bulunan mikrotübül ilişkili bir proteindir. Nöronlarda hücre iskeletinin önemli bir bileşeni olan tau proteininin mikrotübüllerin gelişmesinde, stabilizasyonunda ve polimerizasyonda rolü olduğu bilinmekte ve fosforilasyon derecesinin mikrotübül etkileşiminde önemli yeri olduğu düşünülmektedir. Bunlara ek olarak hücrenin şeklini, hareketini ve mikrotübül plazma membran iletişimini düzenlemede de etkin olduğu belirtilmektedir. Mikrotübüller hücre iskeletindeki rollerinin yanı sıra hem nöronal plastisiteyi ve polariteyi sağladıkları için hem de nörotransmitter ve protein içeren veziküllerin taşınmasında rol oynadıkları için tau proteininin görevi daha da önem kazanmaktadır [79]. AH ile birlikte tau proteininin fosforilasyonu artmakta ve hiperfosforile olmuş tau proteinin de mikrotübüle bağlanma yeteneği ortadan kalkmaktadır. Bu durum da, aksonal taşımayı ve sinaptik metabolizmayı bozarak mikrotübüllerin stabilizasyonunu kaybetmesine ve dolayısıyla nöronal ölüme neden olmaktadır [80]. Doğal işlevini kaybedip tübülünlere bağlanamayan hiperfosforile tau proteini, çift sarmallı heliksler halinde hücre içerisinde çökerek AH'nin karakteristik bulgularından olan NFY'yi oluşturmaktadır. Yaşla beraber sağlıklı beyinlerde de NFY'ler olduğu fakat Alzheimerlı hastalarda arttığı ve ilerlediği bildirilmiştir [20]. Tau fosforilasyonuna çeşitli kinazlar rol almakla birlikte nöronlardaki en önemli tau kinaz, glukojen sentaz kinaz 3 β olarak değerlendirilmektedir [80].



Şekil 2.4. Nörofibriler yumakların oluşumu

2.5.3. Sinaps ve nöron kaybı

A β plaklar ve NFY'dan sonra hastalığın en karakteristik bulguları nöron ve sinaps kaybıdır. Her ikisi de AH'nin erken evresinde makroskopik kortikal atrofiye neden olmaktadır. Sinaps kaybı kognitif düşüş ile paralel olacak şekilde hipokampus, entorhinal kortekste ve neokorteks bölgelerinde görülmektedir. Nöronal kayıp sinaptik kayıptan sonra başlamakta ve ilk olarak entorhinal korteksi, locus coeruleus ve Meynert'in bazal çekirdeğini etkilemektedir [81]. Sinaptik kaybın nedeninin A β plaklar olduğu düşünülürken nöron kaybında etkisi olan faktörlerin NFY, A β plaklar, sinaptik kayıp ve kolinerjik eksiklik olduğu görüşü yaygındır [82].

2.5.4. Granovasküler dejenerasyon ve Hirano cisimcikleri

Granovasküler dejenerasyon ve Hirano cisimcikleri AH ile birlikte diğer nörodejeneratif hastalıklarda ve hatta normal yaşlanma durumunda da ortaya çıkan lezyonlardır. Granovasküler dejenerasyona sıklıkla hipokampüsteki pramidale nöronların sitoplazmasında

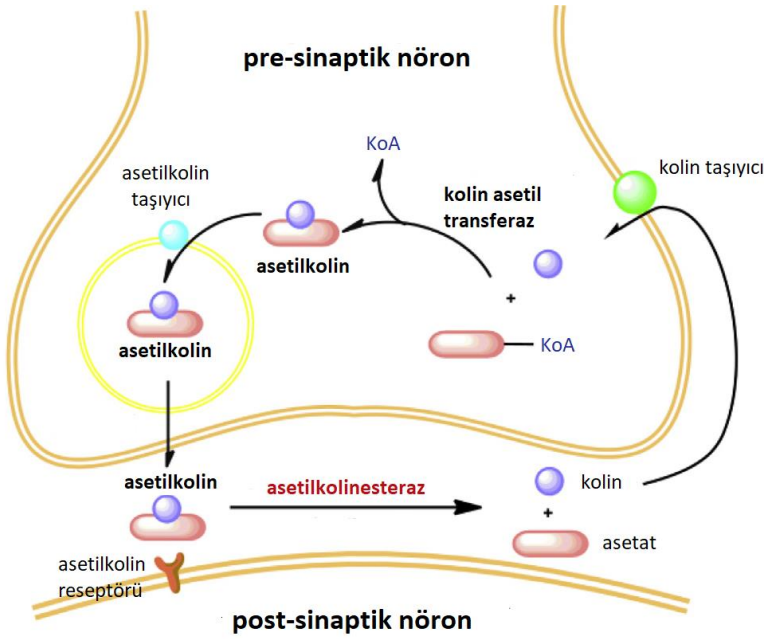
rastlanmakta ve apoptoziste etkili olduğu düşünölmektedir [82]. Granovasköler dejenerasyon gibi Hirano cisimcikleri de hipokampöste görölen, aktin ve diğör hücre iskeleti proteinlerini yapısında bulunduran çubuk benzeri agregatlardır [81].

2.5.5. Mitokondri hasarı ve oksidatif stres

AH'de Aβ varlığı beyindeki sitokrom c oksidaz da dahil olmak üzere önemli mitokondriyal enzimleri inhibe eder. Bu durumun sonucunda, elektron taşınması, ATP üretimi, oksijen tüketimi ve mitokondriyal membran potansiyeli bozulur. Mitokondriyal süperoksit radikal oluşumundaki artış ve hidrojen peroksite dönüşüm, oksidatif stres, sitokrom c salınımına ve apoptozise neden olur. Ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif azot türleri (RAT) mikrogliaların uyarılmasına neden olmakta ve uyarılmış mikroglialar da nitrik oksit radikalinin salımına başlamaktadır. Ayrıca ROT ve RAT membran lipidlerinin peroksidasyonu, esansiyel proteinlerin oksidasyonu, iyonik dengesizlik, glukoz transportunda bozulma gibi pek çok yapısal sorunu beraberinde getirmektedir [83].

2.5.6. Nörotransmitter eksikliği

Asetilkolin, merkezi sinir sisteminde öğrenme, dikkat ve hafıza gibi çok önemli işlevlerde rolü olan ve tüm kolinerjik nöronlar tarafından kullanılan bir nörotransmitterdir [84]. 1970'li yılların ortasında AH'li bireylerde kortikal asetilkolin sentezinde görevli kolin asetil transferaz enziminde %90'lık bir azalmanın olduğu gösterilmiş ve takip eden çalışmalarda da kolin geri alımı, asetilkolin salımı ve kolinerjik nöron miktarında azalma olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar Aβ'nin kolin geri alımını ve asetilkolin salımını negatif etkilediğini belirtmektedir [85]. Kortekste kolinerjik iletimin bozulması aynı zamanda karar verme mekanizmasını da tamamıyla etkilemektedir. Bilişsel ve davranışsal sorunların yanı sıra depresyon ve apati (ilgisizlik) gibi psikiyatrik semptomlar da ortaya çıkabilmektedir [86].



Şekil 2.5. Asetilkolinin metabolik süreci

Biyopsi ve bazı post-mortem çalışmalara göre AH sürecinde, hafıza ve öğrenmeyi etkilemesi açısından asetilkolin kadar büyük önem taşımasalar da başka nörotransmitterlerin eksikliği de gözlenmektedir. Kolinerjik sistemin yanında dopaminerjik, serotonerjik, kateşolaminerjik ve GABAerjik (gamaaminobütirik asit) sistemlerde de eksiklikler literatürde bildirilmiştir [87].

2.5.7. Eksitotoksisite

Memeli merkezi sinir sisteminin temel uyarıcı nörotransmitteri olan glutamat hafıza ve öğrenme ile ilişkilidir. Etkisini N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörüne bağlanarak gösteren glutamatın rol aldığı uyarıcı nörotransmisyonunda bir hata olması durumu değişik nöropatolojik hastalıklara sebebiyet verebilmektedir. Aβ plakların glutamat geri alımını engellemesi nedeniyle sinaptik aralıkta artan glutamat seviyesi, NMDA reseptörlerinin sürekli uyarılmasına ve eksitotoksisite olarak tanımlanan nöronal hücre ölümüne neden olmaktadır. Sinaptik NMDA reseptör sinyalinin yetersiz olması nöronal hücre yaşamını tehlikeye atarken, glutamaterjik sistemin aşırı uyarılması nörodejenerasyona veya eksitotoksisiteye neden olmaktadır [88].

2.6. Alzheimer Hastalığında Nöroenflamasyon

Enflamasyon, hasar oluşturan etkeni ve hasarın ortaya çıkardığı nekrotik hücreleri ve dokuları ortadan kaldırmak için gelişen hücresel bir yanıttır. Doku eski sağlıklı koşullara dönmediği takdirde enflamasyon çevre dokuları da içine alan kronik bir hal alır. Kronik enflamasyon durumunun devam etmesi ise ciddi doku hasarlarına neden olabilmektedir. AH'nin patofizyolojik özelliklerinden olan enflamasyonda ateş ve ağrı gibi karakteristik enflamatuvar yanıtların gözlenmemesi, akut enflamasyon yerine kronik enflamasyon durumunun hâkim olduğu anlamına gelmektedir [89, 90].

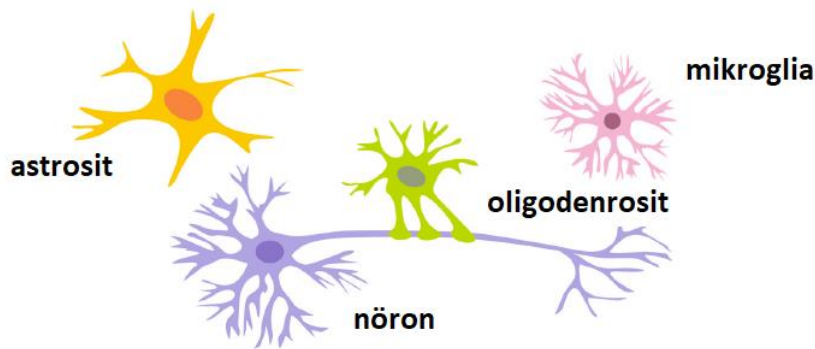
AH nedeniyle oluşan kronik enflamasyonda, pro-enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarının arttığı ve bu durumun merkezi sinir sisteminde bulunan mikroglia ve astrositlerin uyarılmasıyla ortaya çıktığı bildirilmiştir [90]. Pro-enflamatuvar sitokinlerin ve diğer enflamatuvar mediyatörlerin (kemokinler, prostaglandinler, lökotrienler, tromboksanlar, reaktif oksijen türleri, çeşitli radikaller, NO, proteazlar, proteaz inhibitörleri ve C-reaktif protein) oluşturduğu enflamasyonun, hastalığın patolojik göstergelerinden olan A β plakları ve NFY'yi temizlemek amacıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir. Aynı zamanda enflamasyon mediyatörleri ve oluşturdukları oksidatif stresin nöroprotektif etkiye sahip çözünür APP fraksiyonu oluşumunu engelleyerek amiloidojenik yolağı indüklediği ve A β_{42} peptit üretimini artırdığı bilinmektedir. Dolayısıyla ortaya çıkan kısır döngüde söz konusu faktörlerin tek başına veya birlikte nöronal disfonksiyona ve hücre ölümüne neden olabileceği düşünülmektedir [7, 90, 91].

1990'lı yıllardan beri yapılan çalışmalar nöroenflamasyonun A β plaklar ve NFY ile birlikte AH'nin üç önemli patofizyolojik bulgusundan biri olduğunu göstermektedir. AH'de görülen nöroenflamasyon, A β plakları ve NFY'yi ortadan kaldırmak için oluşmuşsa da ilerleyen evrelerde nöroenflamasyonun kendisinin de plakların ve yumakların oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir. Bu bilgilere ek olarak, agregre olmadan önce de A β_{42} peptidin pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6 ve TNF- α) ve bir kemokin olan makrofaj enflamatuvar protein-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)'nın üretimini artırdığı tespit edilmiştir [7, 92-94].

AH patolojisi olan beyinlerde, enflamasyon kaynaklı lezyonların A β plakların hem içinde hem de çevresinde kümелendikleri gösterilmiştir. Mikroglia ve astrositlerin A β plaklar etrafında kümelenmelerinden yola çıkarak, bu yapıların A β plaklar ile doğrudan aktive oldukları ve bunun sonucunda glial hücrelerden pro-enflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve serbest radikallerin sekresyonu bildirilmiştir. Sağlıklı beyinlerde mikroglia, plak oluşumunun erken evresinde hücre dışı A β peptitleri uzaklaştırarak A β 'nin klerensine katkıda bulunur. Hastalık durumunda ise ekstraselüler alanda çözünmeyen A β agregatların oluşumu ile mikroglia aktivasyonunun gerçekleştiği, A β plakların içine ve etrafına göçünün tetiklendiği, ardından mikroglial pro-enflamatuvar yüzey reseptörlerinin (CD45, CD36 ve CD40) indüklendiği bildirilmiştir. Sonrasında mikrogliaların, CD40 ekspresyonu ve bunu takip eden sitokin üretimi ile artan aktivitelerine rağmen, A β 'yi fagosit etmede başarısız oldukları ifade edilmiştir. Ayrıca mikrogliaların A β tarafından aktive edilmesi sonucu majör doku uygunluk kompleksi 2 'nin hücre yüzeyindeki ekspresyonunun artması ile IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin ve IL-8, MIP-1 α ve MCP-1 gibi kemokinlerin miktarı da artmaktadır. Tüm bu faktörlerin AH patolojisini daha da kötüleştirdiği bildirilmiştir [92, 95-100].

2.6.1. Glial hücreler

Glial hücreler merkezi sinir sisteminde bulunan fakat impuls oluşturmeyen hücrelerdir. Merkezi sinir sisteminde yer alma nedenleri homeostasisi sağlamak, nöronları korumak, destek sağlamak ve miyelin üretmektir. Glial hücreler mikroglia ve makroglia (astrositler ve oligodendrositler) olmak üzere ikiye ayrılır.

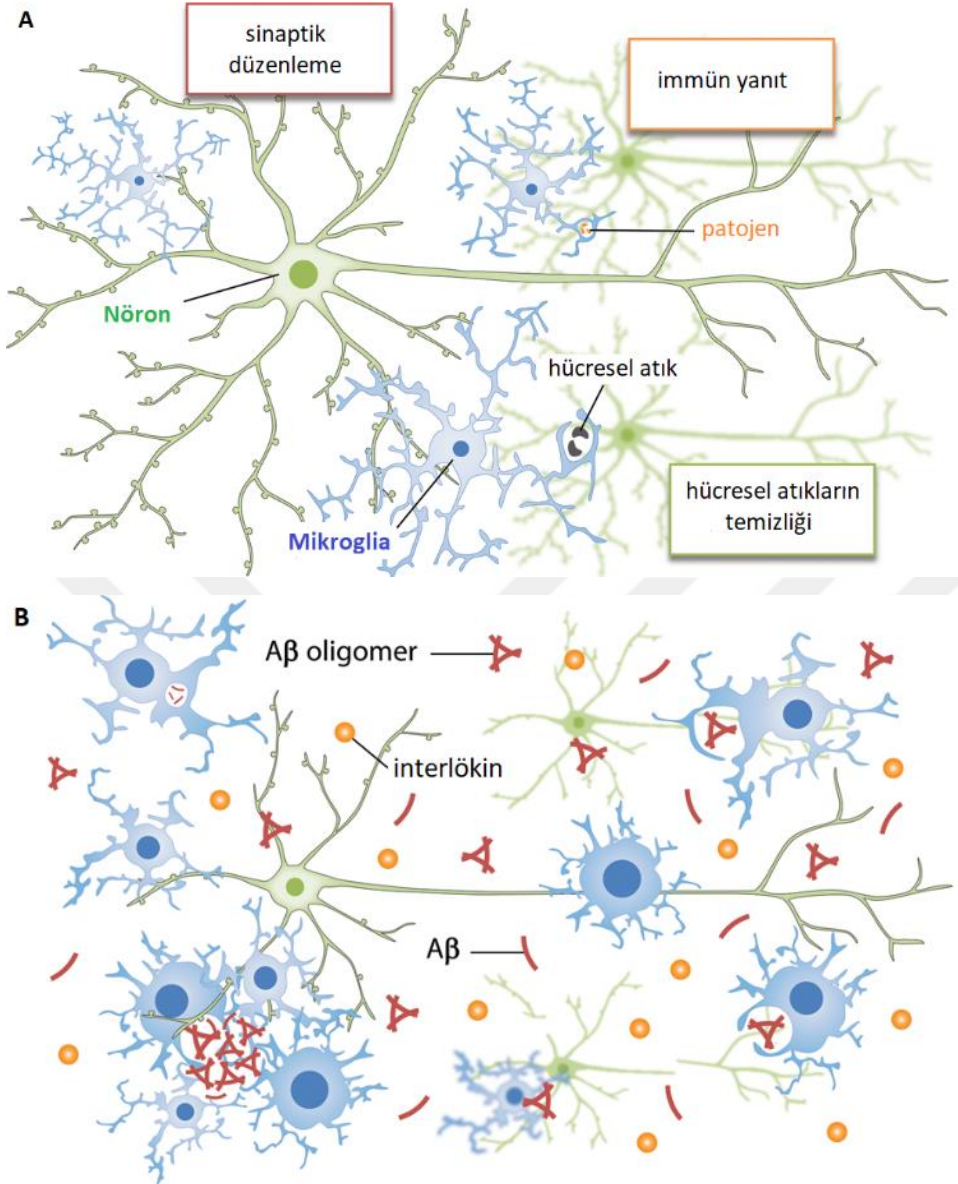


Şekil 2.6. Glial hücrelerin şekilleri

Mikroglialar

Morfolojik olarak küçük somalara sahip dallanmış hücreler olarak tanımlanan mikroglialar, merkezi sinir sisteminin makrofajları olarak bilinen ve hücrelerin yaklaşık %10'luk kısmını oluşturan bağışıklık hücreleridir. Sağlıklı bir beyinde mikroglia inaktif yani dinlenme durumundadır. Dinlenme durumunda hücre somaları sabittir, dallanmış kısımlar uzar ve geri çekilir, bu özellikleri çevrelerindeki nöronlar ve diğer glia hücreleri ile iletişim kurmalarını sağlar [7].

Nöronların çevresinde sağlıklı koşullarda çok fazla iletim ve etkileşim vardır, bunlar pek çok sinyal mekanizması ile yönetilmektedir. Bu iletişim klasik nörotransmitter reseptörleri, kemokin ve sitokin reseptörleri ile sağlanmaktadır. İnvazyon, yaralanma veya hastalık gibi merkezi sinir sistemini tehdit eden unsurlar ile mikroglialar aktive olmakta, bunun sonucunda hücrenin geri çekilmesi, genişlemesi veya migrasyonu ile sonuçlanan morfolojik değişiklikler gerçekleşmektedir. Mikrogliaların M1 ve M2 olmak üzere iki fenotipi vardır. M1 fenotipi enflamatuvar yanıtı tetiklerken M2 fenotipi anti-enflamatuvar yanıtı tetiklemektedir. AH durumunda karşılaşılan çeşitli durumlar M1 formunun baskın olarak bulunmasına neden olmaktadır. AH'de mikrogliaların aktivasyonunu tetikleyen birincil olayın A β plak varlığı olduğu, plak aktivasyonu ile mikrogliaların plakların yanına göç ettiği ve fagositik işlemleri başlattığı bildirilmiştir. Çalışmalar aktif mikrogliaların A β plakları fagosite ettiğini fakat bu işlemten sonra hücrenin büyüdüğünü ve fagositoz işlemine devam edemediğini göstermiştir. AH patogenezinin başlarında, oluşan bağışıklık yanıtının A β 'nin temizlenmesinde ve AH ile ilişkili patolojiler üzerinde olumlu etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, bağışıklık sisteminin uzun süreli aktivasyonunun, reaktif mikroglialara neden olduğu ve mikroglialardan nöronal hasar oluşturan pro-enflamatuvar sitokinlerin salımını tetiklediği bu durumun da AH patolojisini kötüleştirdiği bildirilmiştir [101]. Ayrıca sürekli aktivasyon mikrogliaların A β 'ya bağlanma yeteneklerini ve parçalayıcı enzim aktivitesini azaltırken, pro-enflamatuvar sitokinlerin salımı azalmamaktadır. Dolayısıyla pro-enflamatuvar sitokinlerin mikroglialardan sürekli salımı, nöroenflamasyonu şiddetlendirmekte ve nörodejenerasyona neden olarak daha fazla mikroglia aktivasyonuna yol açmaktadır. [7, 90, 102].



Şekil 2.7. Sağlıklı beyinde (A) ve AH'li beyinde (B) mikrogliaların durumu

Astrositler

Adını yıldız biçimindeki şeklinden alan astrositler, homeostatik dengenin korunması için anahtar olmalarının yanı sıra gliotransmitter salımı, nöroenerjetik, enflamasyon, sinaptik aktivitenin modülasyonu, iyonik denge ve kan beyin bariyerinin bakımı gibi çok önemli süreçlerle ilişkili glial hücrelerdir. Ayrıca Aβ klerensi, nöronların beslenmesine destek sağlamak ve Aβ plakları ile nöronlar arasında koruyucu bir bariyer oluşturmak da görevleri arasındadır. Astrositlerden salınan çok sayıda gliotransmitter, korteks ve hipokampus gibi

farklı beyin yapılarında sinaptik plastisiteyi kontrol eder ve hafıza, öğrenme gibi önemli süreçlerinin içerisinde yer alır [98, 99].

A β miktarındaki patolojik artış ile kalsiyum disregülasyonu dahil olmak üzere glial hücrelerde fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler oluşur ve mikroglialar gibi astrositler de A β 'yi parçalamak için plaklara yakın noktalarda aktive olurlar. AH'de A β plaklarda çok sayıda astrositin bulunması, plaklardan kemotaktik moleküller ürettildiğini düşündürmektedir. Astrositlerin aktivasyonu, pro-enflamatuvar stokinlerin salımı nedeniyle oluşan enflamasyon ve oksidatif stres ile sonuçlanır. A β plaklar gibi A β ₄₂ de mikroglia ve astrositlerden pro-enflamatuvar mediyatörlerin (özellikle IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NO) salınmasına neden olmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, A β ile ilişkili olarak Alzheimer hastalarının beyinlerinde yüksek seviyede NOS (nitrik oksit sentaz)-pozitif astrosit bulunduğu, bu durumun NO salımını artırdığı ve nöronal hasar oluşturduğu belirtilmiştir. Farklı çalışmalarda, serebral vazodilatasyon, sinaptik iletim ve nöronal-glial sinyalizasyon ile ilişkili astrositlerde NMDA reseptörlerinin ekspresyonu tanımlanmıştır. Astrositlerden A β tarafından indüklenen glutamat sekresyonu, NMDA reseptörlerinin fazla uyarılması yoluyla nöronal disfonksiyona ve nöronal-glial iletişimin bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca A β 'nin insan astrositlerinde hücre içi bir sinyali aktive ederek fosforlanmış tau üretimini ve salımını da indüklediği gösterilmiştir. Tüm bu bilgiler glial hücreler ve AH patofizyolojisi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır [90, 103].

Oligodendrositler

Oligodendrositler miyelin üreten, nöron morfolojisini ve işlevini korumak için önemli olan glial hücrelerdir. Astrositler ve mikroglia ile kıyaslandığında A β plaklardan nasıl etkilendikleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Yapılan çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar A β plakların bulunduğu yerlerde miyelin kılıfın zarar gördüğünü ve miyelin kılıf vasıtasıyla hücrenin beslenmesine katkı sağlayan oligodendrositlerle etkileşim azaldığından oluşan hasarın nöronların hassaslaşarak ölmesine neden olduğunu göstermiştir. Bu duruma ek olarak A β plakların oligodendrositlerin gelişimini ve olgunlaşmasını da engellediği düşünülmektedir. Ayrıca nöroenflamasyon, oksidatif stres ve apoptozis de oligodendrositlerde hasara ve hücre ölümüne neden olabilmektedir [94, 104].

2.6.2. Enflamatuvar mediyatörler

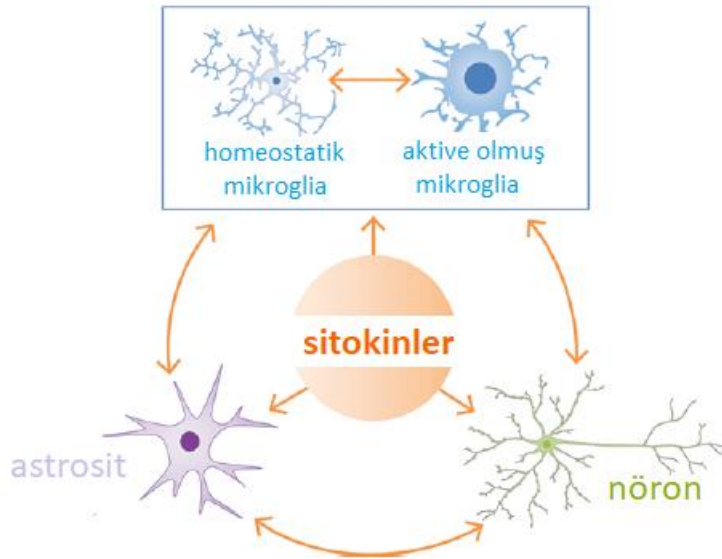
Sitokinler

Sitokinler, molekül ağırlığı 8,000 ile 40,000 Dalton arasında değişen, otokrin veya parakrin olarak salgılanabilen, hücreler arasında mediyatör olarak davranan antikor olmayan proteinlerdir. Başlangıçta hücresel kaynaklarını belirtmek için lenfokinler ve monokinler olarak adlandırılırsalar da kısa bir süre sonra neredeyse tüm çekirdeklenmiş hücrelerin bu proteinleri sentezleyebildiği farkedildiğinden "sitokin" teriminin en iyi açıklama olduğu anlaşılmıştır. Sitokinlerin aydınlatılmış amino asit dizisi motifi veya üç boyutlu yapıları yoktur. Bu nedenle sınıflandırılmaları biyolojik aktivitelerine göre yapılmaktadır. Sitokinlerin biyolojik aktiviteleri hedef hücre tipine ve aktivasyon durumuna, lokal sitokin konsantrasyonuna, reseptör tipine ve diğer sitokin araçları ile etkileşime bağlı olduğundan oldukça karmaşıktır. Sitokinler genellikle çeşitli bağışıklık hücreleri (T-lenfositler, makrofajlar ve natural killer hücreler gibi) ve başka birtakım hücreler (Schwann hücreleri ve fibroblastlar gibi) tarafından salgılanırlar. Sitokinlerin dahil olduğu biyolojik olaylar, hücre proliferasyonun uyarılması ya da inhibe edilmesi, sitotoksite/apoptozis, antiviral aktivite, hücre büyümesinin ve farklılaşmasının sağlanması, enflamatuvar yanıt ve membran yüzey proteinlerinin ekspresyonunun düzenlenmesidir. Genel olarak, periferik enflamasyon sırasında, aktif makrofajlar tarafından salınan sitokinler, diğer enflamatuvar hücreleri aktive ederek veya işlevlerini inhibe ederek immünomodülasyonda rol oynar ve böylece bu etkiler arasında bir denge kurarlar. Sitokinlerin temel işlevlerinden biri de immün sistemin temelini oluşturan T hücrelerinin oluşumunun düzenlenmesidir [90, 95, 104].

Sitokinleri genel olarak interlökinler (IL), interferonlar (İFN), koloni uyarıcı faktörler (CSF), tümör nekrozis faktörler (TNF) ve bazı büyüme faktörleri (GF) başlıkları altında sınıflandırabiliriz [90].

Sitokinlerin birçoğunun nöronlar veya glia tarafından üretildiği gösterilmiş ve AH durumunda beyin, kan ve BOS'da seviyelerinde değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Ayrıca IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , granülosit-makrofaj koloni uyarma faktörü (GMSF), IFN- α , IL-8 reseptörü B tipi (IL-8RB) ve CSF-1 reseptörlerinin de beyin dokusundaki seviyelerinin arttığı

belirlenmektedir. Diğer faktörlerden farklı olarak interlökinler, nöronlar ve astrositler arasındaki sinyalleri koordine ederler ve ayrıca birden fazla merkezi sinir sistemi hücre tipinde birkaç hücre içi sinyal yolunu aktive ederek enflamatuvar yanıtı yönlendirebilmektedirler [90, 95, 96] .



Şekil 2.8. Sitokinler ile astrositler, nöronlar ve mikrogliaların ilişkisi

İnterlökin-1

Güçlü pro-enflamatuvar bir sitokin olan IL-1'in sağlıklı beyine kıyasla AH'li beyin dokusunda altı kat fazla eksprese edildiği ve nörotik plaklarla ilişkili mikrogliyalarda miktarının arttığı deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Aβ plak gelişimi sırasında, IL-1-pozitif mikrogliyanın erken ortaya çıkması IL - 1'in plakla ilişkili süreçte ve dolayısıyla nöronal distrofide önemli olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca IL-1 Aβ plaklarda akut faz reaktanı olan alfa-1-antikimotripsin (α -1-ACT) ile ilişkilidir ve AH'li beyinde yükselen başka bir nörotrofik sitokin (nöronların gelişimine katkıda bulunan biyomolekül sınıfı) S100 β 'yi indükler, her ikisi de daha fazla nöronal distrofiye neden olmaktadır. Bunun yanı sıra AH'nin karakteristik özelliklerinden olan kolinerjik kayıpla ilişkili olarak nöronal asetilkolinesteraz enziminin aktivitesini artırdığı da bildirilmiştir. Çalışmalar ayrıca tau hiperfosforilasyonu ile sonuçlanan p38 mitojenle aktifleşen protein kinaz (p38 MAPK) sinyalinin IL-1 ile ilişkili nöronal hasarda rol oynayabileceğini düşündürmektedir [90, 94, 95, 105].

IL-1 sitokin ailesi IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki agonist protein içermektedir. IL-1 β , TNF- α ve IL-6 dahil olmak üzere diğer pro-enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun düzenlenmesindeki rolü nedeniyle nöroenflamasyon açısından büyük önem taşımaktadır. Kendi etkinliğinin yanı sıra diğer pro-enflamatuvar mediyatörlerin salımını tetiklemesi nedeniyle IL-1 β 'nin seviyesinin azalmasının nöroenflamasyon ve nörodejenerasyonun başlangıcını geciktirebileceği düşünülmektedir [106]. IL-1 β seviyeleri sağlıklı beyine kıyasla AH'li beyinde başta frontal korteks olmak üzere parietal korteks, temporal korteks, talamus, hipotalamus ve diğer bölgelerde de önemli ölçüde yükselir. IL-1 β , glial hücrelerden APP sekresyonunun artmasını, protein kinaz C'nin aktivasyonunu ve γ -sekretaz aktivitesinin artmasını teşvik ederek APP'nin amiloidojenik yolağını destekler. IL-1 β 'nin A β plak agregasyonunu tetiklemesi, agrege olan plakların daha fazla mikrogliya aktivasyonuna neden olması ve mikrogliya aktivasyonunun da IL-1 β üretimi ile sonuçlanması kısır bir döngü oluşturmaktadır [7].

Nöroenflamasyon açısından en önemli pro-enflamatuvar sitokinleri oluşturan IL-1 β ailesinin öncü molekülü yoktur, kaspaz-1 ve kaspaz-8 enzimleri tarafından aktive edilirler. Kaspaz enzimleri de inflamazom denilen makromoleküller ile aktive edilmektedir. NLRP3 (Nod-like receptor pyrin domain-containing 3) A β 'yi tespit edebildiği düşünülen bir inflamazomdur ve bu nedenle AH açısından çokça incelenmektedir. Yapılan transgenik çalışmalar ile NLRP3'ün eksikliğinde bilişsel fonksiyonların geliştiğini gösterilmiştir. Ayrıca pro-enflamatuvar sitokinlerin salımı sonrasında artan iNOS ile nöronal ortama daha çok NO ulaşmakta ve bu durum da mitokondriyal solunum sorunları, sinaptik hasar ve nöronal apoptozis ile sonuçlanmaktadır. Tüm bilgi ve bulgular birleştirildiğinde sitokinlerin nöroenflamasyondaki önemi ortaya çıkmaktadır [92, 95-100].

İnterlökin-6

İnterlökin-6, AH patogenezinde rol oynayan, salındığı miktara ve durumuna bağlı olarak pro-enflamatuvar veya antienflamatuvar etki gösteren, önemli, çok fonksiyonlu bir sitokindir. Alzheimer hastalarının entorhinal korteksinde ve üst temporal giyrusunda IL-6 mRNA seviyesinin arttığı gösterilmiştir. IL-6, nöronal dokunun homeostazı için çok önemlidir bununla birlikte IL-6'nın aşırı üretimi de kronik nöroenflamasyon ve

nörodejenerasyona yol açmaktadır. 10 yıllık uzun süreli bir çalışmada, orta yaşın üzerinde artmış IL-6 seviyesinin kognitif fonksiyonlar üzerindeki negatif etki oluşturduğunu gösterilmiştir [107]. Buna ek olarak çeşitli çalışmalar, A β plakların glial hücrelerden IL-6'nın sentezini ve salımını uyardığını bildirmektedir. Hipokampus ve kortekste yoğun olarak bulunan IL-6 reseptörlerinin aktivasyonunun, serumda ve BOS'da sıkça rastlanan IL-6/çözünür IL-6 reseptör kompleksine bağlanarak APP transkripsiyonunu ve ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiş ve ayrıca A β peptidin, IL-1 β ile ilişkili bir mekanizma yoluyla astrositler tarafından doğrudan veya dolaylı olarak IL-6 üretimini arttırdığı da bildirilmiştir. Bu nedenle, IL-6, IL-1 tarafından başlatılan enflamatuvar yanıtı güçlendiren ikincil bir işlemci gibi de görülmektedir. Tüm bunların yanı sıra IL-6'nın p35 yolağı vasıtasıyla CDK5 aktivitesini artırarak tau hiperfosforilasyonuna neden olduğu, dolayısıyla karakteristik AH patolojileri arasında önemli bir köprü oluşturduğu düşünülmektedir. [7, 95, 108, 109].

TNF- α

Genel olarak mikrogial hücreler ve astrositlerden salınan TNF- α , AH'deki en önemli pro-enflamatuvar sitokinlerden biridir ve enflamatuvar yanıt sırasında sitokin yolağının başlatılmasında ve düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. TNF- α , lökositlerin ve bağışıklık hücrelerinin enflamatuvar alanlara göç etmesine yardımcı olmak amacıyla vasküler endotelyal adezyon moleküllerinin seviyelerini arttırabilmektedir. AH'li beyinde TNF- α ekspresyonunun artmış olduğu kanıtlanmıştır. Ancak TNF- α 'nın serum ve BOS düzeyleri üzerine yapılmış çalışmalar arasında tutarlılık bulunmamaktadır. Bununla birlikte 6 yıl süren bir çalışmada AH'ye ilerleyen hafif kognitif bozukluğu olan hastaların BOS'unda, aktivasyonu ile TNF- α 'nın etkilerinin ortaya çıkarmasını sağlayan çözünür TNFR1 ve TNFR2 (sırasıyla TNF reseptör 1 ve 2) yüksek düzeyde belirlenmiştir [110]. TNFR1, A β tarafından indüklenmiş apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada TNFR1 içermeyen farelerde azalmış A β plak birikimi, azalmış hipokampal mikrogial aktivasyon ve bilişsel görevlerde gelişmiş performans gözlenmiştir. İn vitro çalışmalar da A β peptidin TNF- α üretimine yol açan mikrogial ve astroglial aktivasyonu indüklediğini göstermiştir. Ayrıca TNF- α üretiminin de nitrik oksit oluşumunu uyararak ve başka enflamatuvar yanıtları tetiklediği ve var olan durumu daha da kötüleştirdiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra TNF- α tek başına APP'nin üretimini uyarabildiği gibi

interferon-gama gibi diğer sitokinlerle birlikte de çalışabilmektedir. Ek olarak TNF- α , β -sekretaz ve γ -sekretaz aktivitesini artırıp amiloidojenik yolağı aktive ederek A β plak birikimine katkı da sunabilmektedir [7, 89, 108, 111].

Kemokinler

Kemokin ailesi, enflamasyon sırasında kemotaksi, lökositlerin enflamasyon alanına taşınması ve lökosit fonksiyonunun modülasyonunu yapan 50'den fazla farklı molekülden oluşur. AH'li beyinde kemokin üretiminin önemi, mikrogliya ve astrositlerin nöroenflamasyon alanına göçünün düzenlenmesindeki fonksiyonundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca kemokinlerin, AH'de miktarlarının arttığı, A β agregatlarının mikrogliya ve astrositler tarafından fagosite edilmesinde de önemli görevlerinin olabileceği düşünülmektedir. Kemokinler yapısal olarak dört ayrı alt aileye ayrılır, bunlar α (CXC), β (CC), γ (C) ve δ (CX₃C)'dir. [89, 90, 104, 112, 113].

NO

NO beyinde, sinaptik plastisite ve kan akışı gibi çeşitli fizyolojik süreçleri düzenleyen hücreler arası bir sinyal molekülüdür. Membranlar arasında serbestçe dağılabilen bir mediyatör olan NO, vazodilatör, enflamatuvar mediyatör ve nöromodülatör gibi çoklu fizyolojik etkilere sahiptir. NO üç farklı NO sentaz (NOS) izoformu ile sentezlenir. Bunlardan ilki olan nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), nöronların belirli bir kısmında eksprese edilmektedir, özellikle NMDA tipi reseptörlerinin glutamat ile uyarılmasından sonra aktive olur. İkincisi, beyin endotelial hücrelerinde ve bazı astrositlerde eksprese edilen endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve sonuncusu normalde sağlıklı beyinde üretilmeyen ancak glial ve endotelial hücrelerden pro-enflamatuvar sitokinler, bakteriyel/viral bileşenler varlığında veya hipoksi durumunda eksprese edilen yüksek seviyelerde NO üreten indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)'dir [114]. AH patolojisinde tüm NOS türlerinin düzeyi değişmektedir. NO sinyalinin etkisi lokal hücresel ortama bağlı olmakla birlikte merkezi sinir sisteminde, protein nitrosilasyonu ve mitokondriyal solunumun inhibisyonu gibi birçok sinyal yolağıyla ilişkilendirilmektedir. AH'li beyinde NO, esas olarak nöronlar, mikrogliya ve astrositler tarafından eksprese edilen NOS'dan üretilir. NO'nun oluşturduğu

stresin sinaptik proteinler de dahil olmak üzere tüm hücrel proteinleri etkileyebildiği gösterilmiştir. NO'un etkisini, sistein kalıntılarının S-nitrosilasyonu veya tirozin kalıntılarının nitrasyonu ile gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Aβ peptit, amino asit dizisinin tirozin 10 amino asitini bir nitrasyon hedefi olarak gösterir. Bu pozisyondaki nitrasyon, peptitin agregasyon eğilimini güçlü bir şekilde artırır ve nitratlanmış Aβ, ağırlıklı olarak plakların çekirdeğinde bulunur. Bu mekanizmanın Aβ birikiminin başlamasında anahtar rol oynadığı düşünülmektedir [104, 115-117].

2.7. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

AH'nin 1906 yılında Alois Alzheimer tarafından tanımlanmasına rağmen hastalığın nedeni ve tedavisi tam olarak bulunamamıştır. Güncel olarak tedavide kullanılan ilaçlar hastalığın semptomlarını gidermeye yönelik ve sadece hastalığın erken ve orta evlerinde etkili olduğundan tedavi ile ilgili arayışlar sürmektedir. Bu bağlamda hastalığın patofizyolojik özelliklerinden yola çıkılarak pek çok hipotez ortaya atılmış ve hipotezler ile ilişkili tedavi hedefleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

2.7.1. Kolinerjik hipotez

1970'li yılların başında AH üzerine yapılan biyokimyasal çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda 1970'li yılların ortasında asetilkolinin sentezinden sorumlu olan kolinasetil transferaz enziminin neokortikal alanda eksikliği rapor edilmiştir. Bu gelişmenin sonrasında azalmış kolin alımı, asetilkolin salınımı ve Meynertin bazal çekirdeğindeki kolinerjik kayıp hastalık ile birlikte oluşan kolinerjik eksikliği doğrulamış ve bu bilgiler ile asetilkolinin öğrenme ve hafızadaki rolü birleştirilerek kolinerjik hipotez ileri sürülmüştür. Kolinerjik hipoteze göre, AH'nin temel klinik bulgusu olan yeni bilgileri öğrenme güçlüğü ve unutkanlık, neokorteks ve hipokampüsteki asetilkolin eksikliği ile ilişkilidir. Asetilkolin öğrenme ve hafızadaki rolünün yanı sıra uyku-uyanıklık arasındaki denge ve serebral kan dinamikleri açısından da önemlidir. Dolayısıyla kognitif fonksiyonları iyileştirmek ve düzeni sağlamak amacıyla asetilkolin miktarı artırılmalıdır [85, 118-120].

AKE ve BKE omurgalılarda asetilkolin hidrolizden sorumlu enzimlerdir. Bununla birlikte sağlıklı bir beyinde asetilkolin hidrolizinden sorumlu olan esas enzim AKE'dir. Ayrıca AKE'nin aktif bölge cebinin girişinde bulunan PAB aracılığıyla Aβ peptitler ile etkileşime girerek Aβ peptitlerin agregasyonuna yol açması enzimin non-kolinerjik bir fonksiyonu olarak ifade edilmiştir. BKE enzimi de AKE gibi asetilkolini hidroliz eden bir diğer kolinesterazdır. Sağlıklı bir beyinde AKE'nin bağıl bolluğunun BKE'den fazla olduğu, hastalık durumunda ise AKE'nin düzeyinin azaldığı ancak BKE'nin düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Bu nedenle AH tedavisinde her iki kolinesteraz inhibisyonunun, beyindeki asetilkolin miktarının artırılması ve Aβ agregasyonunun azaltılması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Ancak kolinesteraz inhibitörlerinin etkinliği sağlam kolinerjik nöronların varlığına bağlıdır ve bu nedenle sadece hastalığın erken ve orta evrelerinde etkilidirler. Bu nedenle hastalığın ileri evresinde de kullanılabilecek inhibitörlere ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde daha iyi inhibitörlerin geliştirilmesi için çalışmalar sürmektedir [85, 118-120].

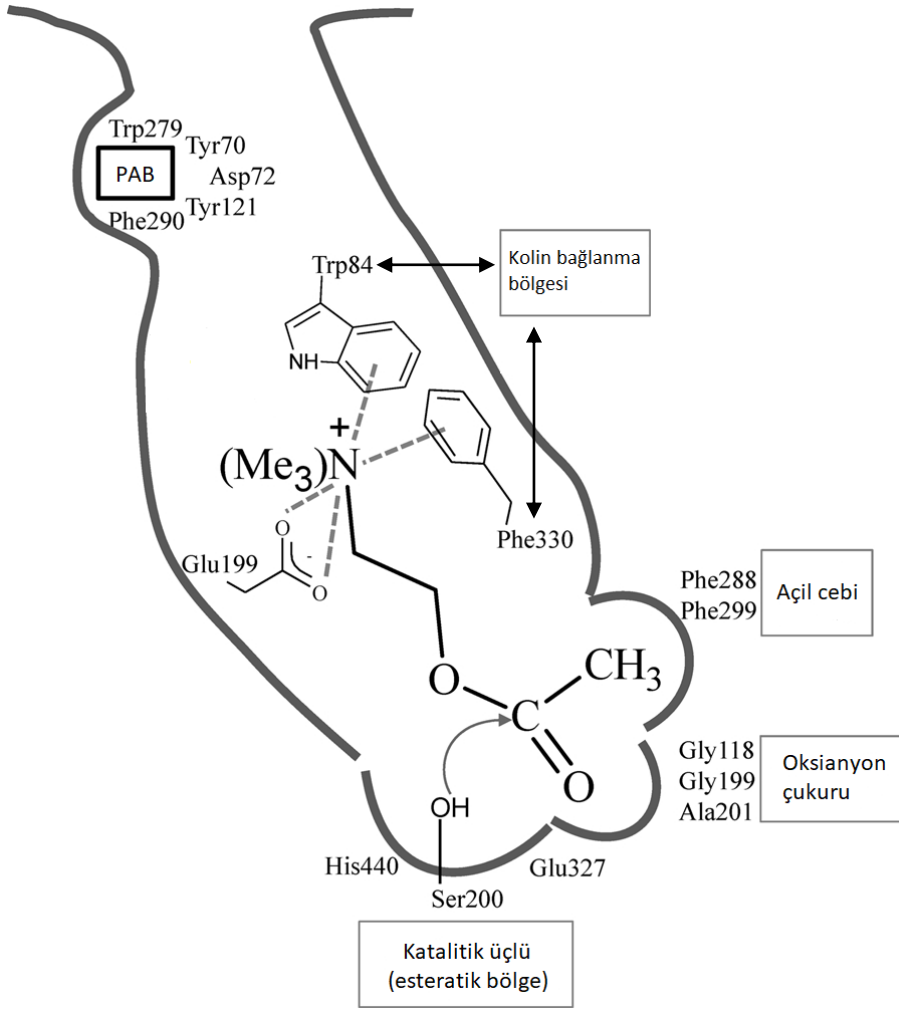
Asetilkolinesteraz

Kristal yapısı ilk defa 1991 yılında J. L. Sussman tarafından aydınlatılan ve serin hidrolaz enzim ailesine dahil olan AKE (E.C. 3.1.1.7)'nin temel biyolojik rolü, nörotransmitter asetilkolinin hızlı hidrolizi ile kolinerjik sinapslarda sinirsel iletimin sonlandırılmasıdır. 537 amino asitten oluşan enzim saniyede 250.000 asetilkolin molekülünü hidroliz edebilmektedir ve sinirsel iletimin olduğu kas ve sinir sistemi lifleri gibi pek çok dokuda bulunmaktadır [121-126].

AKE, 14 aromatik amino asidin oluşturduğu 20 Å uzunluğunda ve 5 Å genişliğinde ince uzun bir silindir şeklinde enzim aktif bölgesine sahiptir. Enzimin aktif bölge cebi; PAS, açıl cebi, kolin bağlanma bölgesi, oksianyon çukuru ve katalitik üçlü (esteratik bölge) olmak üzere beş alt bölgeden meydana gelir. Aromatik amino asitlerce zengin olan ve aktif bölge cebinin girişinde bulunan kısım PAS olarak adlandırılır. Katalitik üçlü, oksianyon çukuru, kolin bağlanma bölgesi ve açıl cebi substratı hidroliz etmek için birlikte çalışırlar ve bu dördü birlikte katalitik aktif bölgeyi (KAB) oluşturur [121-126].

Enzim aktif bölgesinin giriş kısmında yer alan periferik anyonik bölge Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp289 ve Tyr334 amino asitlerinden oluşmaktadır. İnhibitörlerin bağlanmasını düzenlemesinin yanı sıra A β peptid etkiyleşim kurulması açısından büyük önem taşımaktadır.

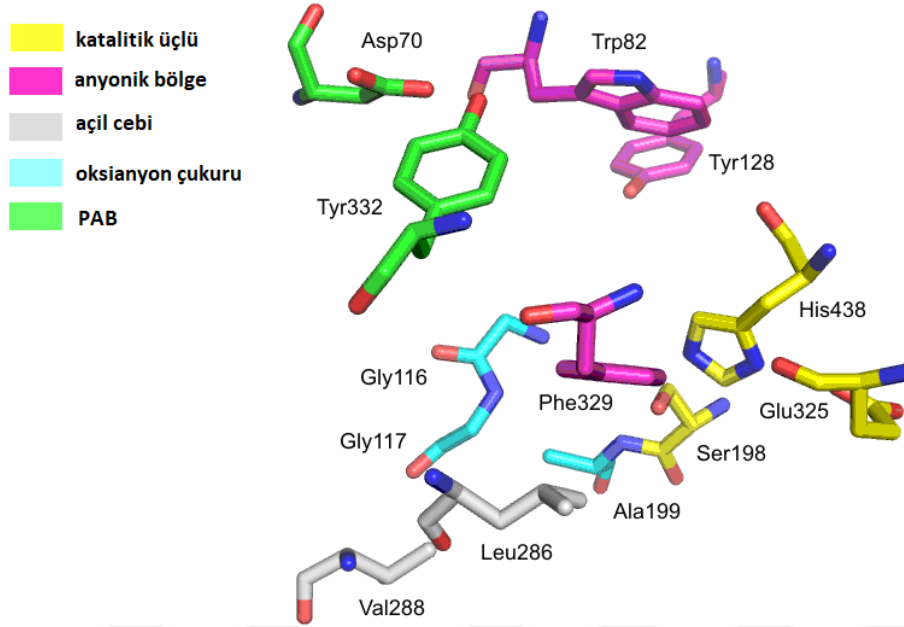
Esteratik bölge veya katalitik üçlü, Ser200, Glu327 ve His 440 amino asitlerinden oluşur. Bu üçlü, silindirik şeklindeki aktif bölgenin en alt kısmında yer alır ve enzimin temel fonksiyonu olan hidroliz işlemini gerçekleştirir. Oksianyon çukurunu oluşturan Gly118, Gly119 ve Ala201 amino asitleri ise substratı stabilize edilerek katalitik üçlüye sunulmasından sorumludur. Oksianyon çukuru gibi katalitik üçlünün görevini kolaylaştırmanın yanı sıra substrat seçiciliğinden de sorumlu olan açıl cebi Trp233, Phe288, Phe290 ve Phe331 aromatik amino asitlerinden oluşmaktadır. Kolin bağlama bölgesi veya anyonik bölge olarak tanımlanan bölge ise; Trp84, Tyr130, Phe330 ve Phe331 gibi elektronca zengin amino asitlerden oluşur ve bu bölgeyle etkileşebilen inhibitörler ile π - π veya katyon- π etkileşimleri yaparlar. Ayrıca asetilkolin gibi kuaterner amonyumun grubu taşıyan ligandların katalitik üçlüye ulaşımında bir aracı görevi görmektedirler [121-126]. Tezimizde yapılan moleküler docking çalışmasında *Torpedo californica* türüne ait AKE (TcAKE) enzim yapısı kullanıldığından bu türe ait numaralandırma sistemi sunulmuştur.



Şekil 2.9. AKE enzim aktif bölgesinin şematik gösterimi

Butirilkolinesteraz

Kolin olmayan esterleri de hidroliz edebildiğinden psödokolinesteraz veya spesifik olmayan kolinesteraz olarak tanımlanan BKE (E.C. 3.1.1.8), serin hidrolaz ailesine dahil bir enzimdir. AKE ve BKE yapısal olarak yüksek derecede benzerlik göstermektedir ve *human* BKE (huBKE) aydınlatılana kadar AKE enziminden yola çıkılarak elde edilen homoloji modeller kullanılmıştır. AKE genellikle kas, beyin dokusu ve eritrositlerde bulunurken BKE karaciğer, akciğer, böbrek ve kalpte bulunmaktadır. AH'de BKE seviyesi arttığından tedavi için muhtemel bir hedef oluşturmaktadır. BKE'nin tam aktivitesi bilinmemekle birlikte AKE yokluğunda kolinerjik iletimde rol almakta ve kokain, asetilsalisilik asit, eroin gibi diğer esterlerin hidrolizini katalizlemektedir [123, 127-130].



Şekil 2.10. *huBKE* enzim aktif bölgesi

BKE enzim aktif bölgesi de AKE aktif bölgesi gibi 20 Å uzunluktadır. BKE enzim aktif bölgesi de AKE aktif bölgesi gibi 14 amino asitten oluşur ancak bunların sadece 8 tanesi aromatik amino asittir. Geri kalan 6 amino asit alifatiktir. Bu nedenle BKE aktif bölgesi AKE ile kıyaslandığında 200 Å³ daha büyüktür. BKE enzim aktif bölgesinde de yine PAS, açıl cebi, kolin bağlanma bölgesi, oksianyon çukuru ve katalitik üçlü (esteratik bölge) bulunmaktadır. Esteratik bölge veya katalitik üçlü Ser198, Glu325 ve His438 amino asitlerinden oluşur. Kolin bağlanma bölgesinde Trp82 ile Ala328 yer almaktadır yani fenilalanin yerine alanin gelmiştir bu da AKE inhibitörleriyle BKE inhibitörlerinin farklı olmasına katkı sağlamaktadır. Substratları stabilize etmek açısından yardımcı olan oksianyon çukuru BKE’de de Gly116, Gly117 ve Ala119 amino asitlerinden oluşur. AKE’de açıl cebinde bulunan Phe295 ve Phe297 yerini Val288 ve Leu286’ya bırakmıştır. Açıl cebindeki aromatik amino asitlerin yerini alifatik olanlara bırakmasıyla oluşan açıklık BKE enziminin daha az spesifik olmasıyla ve daha hacimli substratlarla etkileşebilmesiyle sonuçlanmaktadır. Bağlanma açısından büyük önem taşıyan periferik anyonik bölgede ise Asp70 ve Tyr332 anahtar amino asitlerdir bunun yanında Asn68 ve Ala277 de bulunmaktadır [123, 127-130]. Tezimizde yapılan moleküler docking çalışmasında *human* türüne ait BKE (*huBKE*) enzim yapısı kullanıldığından bu türe ait numaralandırma sistemi sunulmuştur.

2.7.2. Amiloid hipotezi

Kolinerjik hipotezden sonra üzerinde en çok çalışılan bir diğer yaklaşım amiloid hipotezidir. Amiloid kaskat hipotezi olarak da adlandırılan hipotez, APP'nin oluşumu ve işlenmesindeki anormallikleri ve AH'de önemli patofizyolojik yolları tetikleyen A β peptidin üretimi ile klerensi arasındaki dengesizlikleri açıklar. A β peptitler amino asit sayıları 37 ila 43 arasında değişen izoformlara sahiptir. Ancak 40 ve 42 amino asit taşıyan izoformlar daha yaygındır. Nörotik plakların diğer bir deyişle A β plakların temelini oluşturan A β_{42} 'nin hidrofobik ve toksik olduğu bildirilmiştir. A β plakların pek çok ikincil mekanizma ile nörotoksik etki yapması AH tedavisinde önemli bir hedef olmasına neden olmaktadır [131].

A β temelli tedavi yaklaşımlarından ilki A β oluşumunu azaltmak için sekretaz aktivitesinin düzenlenmesine dayanmaktadır. Bu bağlamda nonamiloidojenik yolağı aktive etmek için α -sekretaz aktivitesinin artırılması veya amiloidojenik yolağın etkisinin azaltılması için β ve γ -sekretazların inhibe edilmesi amacıyla çeşitli bileşiklerin geliştirildiği bildirilmiştir. Dermatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan asitretinin α -sekretaz aktivitesini artırarak BOS'da çözünür APP α miktarını artırdığı gösterilmiş ve erken ve orta evreli AH tedavisi için faz 2 çalışmaları tamamlanmıştır. Nöroprotektif etkisi olduğu düşünülen ve yeşil çayda bulunan polifenolik epigallokateşin-gallatın da α -sekretaz aktivitesini artırdığı hem de A β agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş ve faz 2/3 çalışmaları erken evre AH için tamamlanmıştır. β -sekretaz ve γ -sekretaz inhibitörleri üzerine pek çok klinik çalışmalar yapılmış fakat hiçbirinde önemli düzeyde iyileştirici etki gözlenmemiş ve ayrıca bu inhibitörlerin önemli yan etkileri olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte bir γ -sekretaz inhibitörü olan semagacestat faz 3 çalışmalarına kadar ulaşmış ancak yeterince etkili olmadığı gerekçesiyle çalışmalar sonlandırılmıştır. [132-135].

Diğer bir tedavi yaklaşımı A β transportunun düzenlenmesidir. Apolipoproteinlerin kan beyin bariyerini geçmemelerine rağmen merkezi sinir sistemi ve perifer arasındaki A β hareketini düzenleyerek A β metabolizması ve taşınmasında önemli roller oynadıkları bildirilmiştir. Apolipoprotein E ϵ 4 kandan beyine A β geçişini artırmaktadır. Bu geçişin reseptör aracılığıyla yapıldığı ve lipoprotein reseptör ilişkili proteinin (LRP) aktif rol oynadığı bildirilmiştir. Yaşla birlikte LRP miktarı azalmakta A β atılım sistemi bozulmaktadır. Perifer

çözünür LRP miktarının artması, A β atılımının artmasını sağladığından potansiyel bir hedef olarak görülmektedir. Ayrıca ileri glikasyon son ürün reseptörleri (RAGE) ile A β 'nin etkileştiği böylece merkezi sinir sistemine A β girişinin arttığı da ifade edilmektedir. AH ile birlikte RAGE miktarı arttığından, RAGE'inde A β transportunun düzenlenmesinde bir hedef olabileceği bildirilmiştir. RAGE antagonisti bir molekül klinik çalışmalarda denenmiş ancak faz 2 aşamasında çalışmaların durdurulduğu bildirilmiştir [132-134].

A β agregasyonunun önlenmesi de A β temelli tedavi yaklaşımlarından biridir. Bu yaklaşımda monomerik A β 'ye bağlanarak oligomerizasyonun ve sonuçta agregasyonun önlenmesi amaçlanmaktadır. Bu yaklaşımı hedefleyen bir bileşik olan tramiprosate için faz 3 çalışmalarının sürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca ELND005 için de faz 2 çalışmaları tamamlanmıştır. Bunlara ek olarak GV-971 kodlu molekül üzerine, A β agregasyon inhibitörü olarak iki ayrı klinik çalışma yürütüldüğü bunlardan birinde faz 3 klinik çalışmaları tamamlandığı diğerinde ise faz 1'de farmakokinetik çalışmalarının devam ettiği bildirilmiştir [132-134].

AH süresince, plazmin, neprilisin ve insülin degradasyon enzimi gibi A β parçalayıcı enzimlerin miktarının azaldığı belirtilmektedir. Bu bilgidен yola çıkılarak AH tedavisinde A β klerensinin artırılması hedeflerden biri olarak düşünülmüştür. Çeşitli hayvan modellerinde, A β plakları parçalayan plazmin enzimini bloke eden plazminojen aktivatör inhibitör 1'in inhibe edilmesiyle, plazmadaki ve beyindeki A β miktarını azaldığı gösterilmiştir [132, 133].

Yapılan çeşitli hayvan modeli çalışmalarda immunoterapinin A β düzeyini azalttığını gösterilmiştir. İmmunoterapi aktif ve pasif immünizasyon olarak iki şekilde yapılabilmektedir. Aktif immünizasyon, aşılardan vasıtasıyla yapılırken pasif immünizasyon antikorların direkt verilmesiyle sağlanır. Aktif immünizasyon ilk aşamada A β düzeyini azaltmakla birlikte serebral enflamasyon gibi çok önemli yan etkilerle sonuçlanmıştır. Sonraki çalışmalarda da A β düzeyi yine başarıyla düşürülse de demans semptomlarında iyileşmeye rastlanılmadığından iptal edilmiştir. Bununla birlikte faz 2 çalışmaları tamamlanan CAD106'in aktif immunoterapi açısından umut verici olduğu düşünülmektedir. Pasif immünizasyonda bapinezumab ve solanezumab faz 3 çalışmalarını tamamlamalarına

rağmen kognitif fonksiyonlarda yeterince etki gösteremediklerinden onaylanmamıştır [132-135].

2.7.3. Tau hipotezi

Nöronal hücrelerde yer alan tau proteininin mikrotübül stabilizasyonunda görevli olduğu bilinmektedir. Tau proteininin fosforilasyon için çeşitli bölgeleri bulunmaktadır ve mikrotübüllere bağlanma yeteneği fosforilasyon durumuna bağlıdır. Hiperfosforile tau proteinin mikrotübüllere afinitesi azaldığı bildirilmiştir. AH'de mikrotübül bağlama ve stabilize edici rolünü kaybeden hiperfosforile tau proteini, çift sarmal iplikler halinde topaklanarak nörodejenerasyona sebebiyet verir. Aβ plaklar ve hiperfosforile tau proteinleri nörodejenerasyonun en önemli iki sebebi olarak görüldüğünden AH tedavisinde önemli bir hedeftir [131].

Tau proteininin hiperfosforilasyonu mikrotübüllerin stabilize olmasının önündeki ilk engel olduğundan anahtar hedef olarak görülmektedir. Tau fosforilasyonunda birincil enzim olan glikojen sentez kinaz-3β (GSK-3β)'nin inhibe edilmesiyle tau hiperfosforilasyonunun engellenmesi amaçlanmaktadır. Klinik çalışmalarda lityum ve valproat'ın test edildiği fakat etkilerinin yeterli bulunmadığı bildirilmiştir. Yine tideglusib isimli bileşiğin de GSK-3β'yi inhibe ederek tau hiperfosforilasyonunun önüne geçtiği gösterilmiş fakat klinik çalışmalarda yeterince etkin olmadığı belirtilmiştir [132-135].

Tübülinlere bağlanarak mikrotübül stabilizasyonunu sağlamak da tau temelli hedeflerden biridir. Bu amaçla geliştirilmiş olan TPI-287'nin faz 1 çalışmaları yakın zamanda tamamlanmıştır. Mikrotübül stabilizasyonu için paklitaksel ve epitilone D de denemiş ancak toksik yan etkileri nedeniyle klinik çalışmalarından olumlu sonuçlar elde edilememiştir [132-135].

Ayrıca tau oligomerizasyonunun engellenmesinin tau temelli AH tedavisinde etkin bir hedef olabileceği düşünülmüş ve çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Metilen mavisinin Aβ ve tau agregasyon inhibitörü olduğu bilinmektedir. Buradan yola çıkılarak elde edilen TRx0014 ve TRx0237 (LMTM) üzerinde yapılan klinik çalışmalar halen devam etmektedir [132-135].

Başka bir strateji de polimerize taunun parçalanmasını arttırmak ve böylece toksisitesini azaltmaktır. Bu bağlamda denatüre olan proteinlerin katlanmasında rol alan ısı şok proteini 90 hedef olarak görülmektedir. Isı şok proteini 90 inhibitörü olan kurkuminin, NFY oluşumunu baskılayarak ve halihazırda oluşmuş olan NFY'lerin çözünmesini teşvik ederek AH tedavisine katkısı olacağı bildirilmiştir [132-135].

Hiperfosforile tau miktarını azaltmak ve semptomları iyileştirmek için tau immünizasyonu üzerine çalışmalar da yürütülmektedir. Aktif immünizasyon için AADvac-1 ve ACI-35 aşılarının klinik çalışmalarının devam ettiği, pasif immünizasyon için ise ABBV-8E12 ile ilgili faz 2 çalışmalarının tamamlandığı, RO7105705'in de halen faz 2 çalışmalarını sürdürdüğü bildirilmiştir [132-135].

2.7.4. Diğer tedavi yaklaşımları

Nörotransmitter seviyelerinin düzenlenmesi içeren tedavi hedefleri

Glutamaterjik nöronların sinaptik plastisiteyi, nöronal büyüme ve farklılaşmayı dolayısıyla kognitif fonksiyonları ve hafızayı düzenlediği bilinmektedir. Ancak AH'de artmış glutamat seviyesinin NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasına ve bu sonucunda eksitotoksisiteye neden olduğu belirtilmektedir [135, 136]. 2014 yılında, NMDA reseptör antagonisti olan memantin ve donepezilin yeni bir formülasyonu onaylanmış, piyasaya Namzaric® ticari ismiyle sunulmuştur [137].

Nörodejenerasyonda hipokampal bölgenin nöronları göz önüne alındığında öncelikli olarak kolinerjik nöronlar ardından da glutamaterjik nöronlar etkilenirken bilinmeyen nedenlerden dolayı GABAerjik (gama amino bütirik asit) nöronların göreceli olarak korunduğu gözlenmiştir. Bu nedenle tam olarak açıklanamasa da GABAerjik fonksiyonun tehlikeli olacağına inanılmış ve GABA antagonistleri araştırılmaya başlanmıştır. GABA B reseptör antagonisti olan SGS742'nin kognitif fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiş ve faz 2 çalışmaları tamamlanmıştır. Fakat ileri çalışmalara devam edilmemiştir [133, 138].

Serotonin reseptörlerinin AH'deki rolü tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Fakat AH'de serotonin reseptörlerinin ve 5-HT pozitif nöronların yoğunluğunun önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. 5-HT₆ antagonisti olan SB-742457 (intepirdine), faz 2 çalışmalarında tek başına ve donepezil ile kombinasyonları halinde denendiğinde pozitif sonuçlar vermiştir. Fakat ilerleyen çalışmalarda yeterince etkili olmadığı gözlemlendiğinden geri çekilmiştir. Ayrıca 5-HT₆ reseptör agonistleri ve antagonistleri incelendiğinde her ikisinin de belirtiler üzerine olumlu etkiler yaptığı fark edilmekle birlikte ve durum henüz açıklığa kavuşturulamamıştır [132, 139].

Bilişsel işlevlerde önemli rol oynayan beyin kısımlarında bulunan histamin H3 reseptörleri, bloke edildiğinde sinaptik aralığa asetilkolin, dopamin, noradrenalin gibi nörotransmitterlerin salımının arttığı bilinmektedir. H3 reseptör antagonisti olan GSK239512'nin faz 2 çalışmaları tamamlanmıştır [133, 135].

Antienflamatuvar tedavi yaklaşımı

Non-steroidal antienflamatuvar ilaçları uzun süreli kullanan hastalarda AH görülme sıklığının düşmesi bu ilaçların hastalık açısından yararlı etkileri olabileceğini düşündürmüştü ve araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Yapılan bir çalışma ile fenamat sınıfı non-steroidal antienflamatuvar ilaçların in vitro olarak NLRP3 inflamazom aktivasyonunu inhibe ettiğini ve transgenik farelerde azalmış mikrogliya aktivasyonu sağladığını göstermiştir [140].

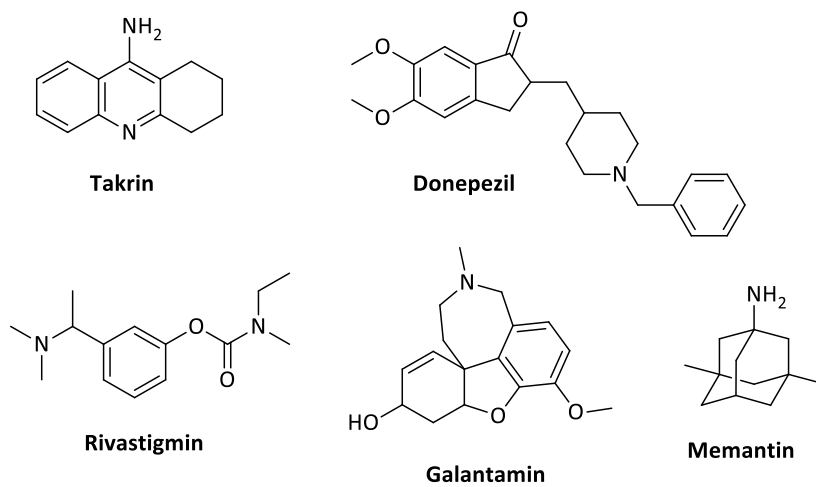
İbuprofen, AH insidansına karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilen ve en çok kullanılan non-steroidal antienflamatuvar ilaçlardan biridir. Fakat yapılan klinik çalışmalarla AH'de bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisi olduğu kanıtlanamamıştır. Erken evre AH'de ibuprofen ve mast hücre stabilizörü olarak kullanılan kromolin (ALZT-OP1) kombinasyonunun faz 3 klinik çalışması devam etmektedir (NCT02547818) [141]. Ayrıca AH ile ilgili olarak, antienflamatuvar bir ilaç olan salsalatın da faz 1 klinik çalışmalarının sürdüğü bildirilmiştir. TNF- α inhibitörü olan etanersept ile ilgili faz 2 çalışmasının yakın zamanda yapıldığı ve olumlu sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir [134, 142].

Oksidatif strese yönelik tedavi yaklaşımı

ROT'un, enzimler, membran lipitleri ve DNA da dahil olmak üzere önemli makromoleküllere atak ederek hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir. Vitaminler (E, C ve karotenoidler) ve fitokimyasalların dahil olduğu bazı doğal antioksidanlar ve sentetik bileşiklerin bu durumun önüne geçerek AH'de koruma sağlayabileceği düşünülmektedir. Örneğin E vitamini ve memantin kombinasyonu faz 3 çalışmalarını tamamlamıştır. Diğer bir antioksidan kombinasyon olan E vitamini ve selenyum kombinasyonu da faz 3 çalışmalarını tamamlamıştır [133, 143]. Bu bağlamda çeşitli flavonoid ve karotenoidlerin AH deneysel modelleri üzerindeki nöroprotektif etkileri incelenmektedir [144]. Güçlü bir antioksidan olan melatonin için de faz 2 çalışmasını tamamlanmıştır ve bunun yanında besin desteği olarak etkisi de incelenmektedir [132, 145]. Ayrıca antioksidan özellikte polifenolik bir bileşik olan resveratrolün de faz 2 çalışmalarını tamamlandığı bildirilmiştir [146].

2.7.5. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Onaylanmış İlaçlar

Güncel olarak AH tedavisinde kullanılan dört ilaç bulunmaktadır. Bunlardan donepezil, galantamin ve rivastigmin AKE inhibitörüken memantin NMDA reseptör antagonistidir. Kolinerjik hipotezi temel alınarak geliştirilmiş ve onaylanmış ilk ilaç olan takrin ise hepatotoksitesi nedeniyle günümüzde kullanılmamaktadır [147, 148].



Şekil 2.11. AH tedavisinde kullanılan ilaçlar

Çizelge 2.1. Kolinerjik hipoteze dayanarak geliştirilmiş ilaçların IC₅₀ değerleri [149]

İlaçlar	AKE için IC ₅₀ değeri	BKE için IC ₅₀ değeri
Takrin	100-200 nM	20-40 nm
Donepezil	2-10 nM	2-10 µM
Rivastigmin	0.7-1.5 µM	0.3-1 µM
Galantamin	300-700 nM	7-20 µM

Takrin

AH tedavisinde onaylanan ilk AKE inhibitörü olan takrin 1993 yılında Cognex® adıyla piyasaya çıkmıştır. Antibakteriyel bir molekül olarak tasarlanan takrinin, düşük antibakteriyel etki göstermesi başka farmakolojik aktivitelerinin de incelenmesine ve AKE inhibitörü olarak keşfedilmesine neden olmuştur. Takrin tetrahidroaminoakridin kimyasal yapısına sahiptir, seçici olmayan geri dönüşlü kolinesteraz enzim inhibisyonu yapmaktadır ve BKE enzimini AKE'den daha çok inhibe etmektedir. Hızlı absorbe edilir fakat yüksek derecede ilk geçiş eliminasyonuna uğradığından oral biyoyararlanımı düşüktür. Gıdalar ile birlikte tüketildiğinde oral biyoyararlanımı düşmekle birlikte gastrointestinal yan etkileri de azalmaktadır. Düşük biyoyararlanımının yanı sıra yarılanma ömrü de çok kısadır. Bu nedenle gün içinde dört kere kullanılması gerekmektedir. Hem sık sık tekrarlanmasının gerekmesi hem de hepatotoksik etkileri nedeniyle takrin günümüzde kullanılmamaktadır. Fakat iyi derecede enzim inhibisyonu yapması nedeniyle yapısal iskeleti korunarak çeşitli hibrit formlarının hazırlandığı çalışmalar süregelmektedir [150-152].

Takrin, nikotinik reseptörlere afinitesinin daha yüksek olmasıyla birlikte muskarinik reseptörlere de bağlanabilmektedir. Ayrıca monoamin oksidaz enziminin iki izoformunu da inhibe edebilmekte ve sinir uçlarındaki dopamin ile serotoninin miktarını artırarak antidepresan etki de sağlamaktadır [153]. Tüm bu özellikler ve sentetik olarak modifikasyona uygun kimyasal yapısı takrinin değerli kılmaktadır [154]. Kolinesteraz enzimlerinin katalitik aktif bölgesiyle güçlü etkileşimler yapan takrinin, periferik anyonik bölge ile etkileşim yapabilecek çeşitli gruplarla hibritleri oluşturulduğunda güçlü inhibitör

etki gösteren moleküllerin oluştuğu bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli farmakolojik etkilere sahip gruplarla birleştirildiğinde çoklu etki gösteren hibritlerinin ortaya çıktığı belirtilmiştir. Örneğin takrin-melatonin hibritiyle ve takrin-flavonoid hibritiyle enzim inhibisyonuna ek olarak antioksidan ve nöroprotektif etki sağlandığı bildirilmiştir [155]. Takrin ve mefenamik asit hibritinin de antienflamatuvar etki amaçlanarak geliştirildiği ifade edilmiştir.

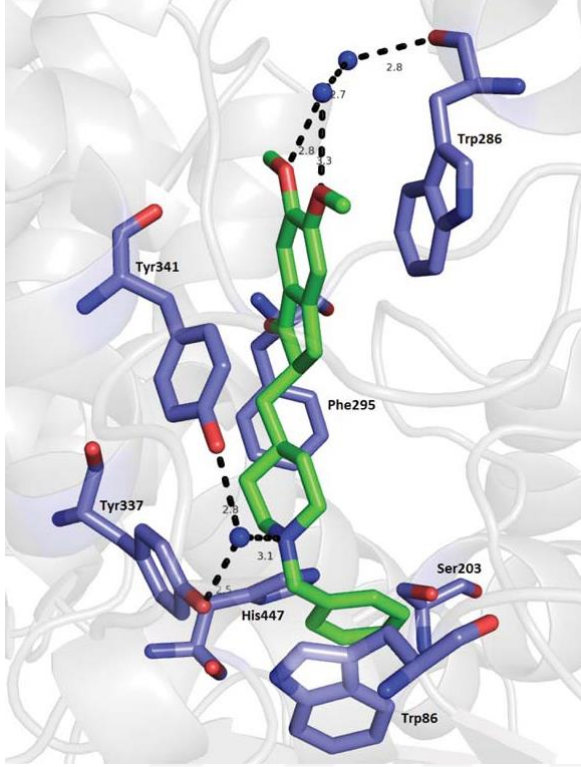
Donepezil

1996 yılında hafif ve orta evre AH tedavisi için onaylanan donepezil, piyasaya Aricept® ismi ile sunulmuştur. AKE'ye kovalent olmayan bağlarla bağlanan selektif ve non-kompetitif tip kinetik sergileyen bir inhibitördür. Oral biyoyararlanımı yüksektir ve yarılanma ömrü hayli uzundur. Ayrıca oral biyoyararlanımı gıdalardan etkilenmemektedir. Karaciğer toksisitesi de oluşturmadığından AH tedavisinde halen en güvenilir ve efektif ilaç olarak değerlendirilmektedir [156, 157]. Takrin ile kıyaslandığında uzun yarılanma süresi ve beyin dokusuna seçiciliği ile öne çıkmaktadır [150].

Donepezil her iki kolinesterazı da inhibe etmekle birlikte AKE'ye seçici olduğu bildirilmektedir [6]. Donepezilin güçlü enzim inhibisyonu yapmasının yanı sıra Aβ kaynaklı nörotoksitenin önüne geçtiği, Aβ agregasyonunu azalttığı, glutamat konsantrasyonunu azalttığı, antioksidan ve antienflamatuvar etkisi olduğu bildirilmektedir [153]. Ayrıca donepezil, güçlü inhibitör etkisi ve düzgün farmakokinetik profili nedeniyle ilaç geliştirme çalışmalarında tercih edilen bir moleküldür. Rivastigmin, takrin ve Huperzin A (doğal kaynaklı AKE inhibitörü) gibi moleküllerle güçlü inhibitör etki gösteren hibritlerinin hazırlandığı bildirilmiştir [158].

Donepezilin kimyasal yapısı incelenerek indanon halkası, piperidin halkasındaki azot ve benzil kısımlarının AKE enzimi ile etkileşimde önemli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca molekülün AKE enzim aktif bölgesindeki amino asitler ile yaptığı direkt etkileşimler kadar su molekülleri vasıtasıyla yaptığı etkileşimlerin de önem taşıdığı bildirilmiştir. Donepezilin indanon halkasının enzim aktif bölgesinin girişinde yer alan Trp279 ile, benzil kısmının ise kolin bağlanma bölgesinde yer alan Trp84 ile π - π etkileşimi yaptığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra piperidin azotunun da Phe330 ve Tyr334 ile su molekülleri aracılığıyla hidrojen bağı

yaptığı bildirilmiştir [6, 158]. Ayrıca indanon halkasındaki dimetoksi grupları su molekülleri aracılığıyla Trp279 karbonil üzerinden ek etkileşimler sağlamaktadır [4].



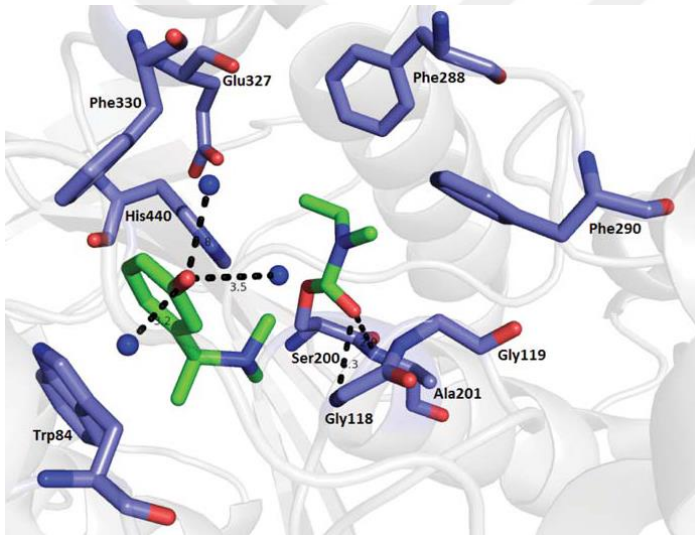
Şekil 2.12. *huAKE* enzim aktif bölgesi ile donepezil etkileşimi

Rivastigmin

Doğal bir alkaloid olan fizostigminin kolinerjik eksikliği gidermek amacıyla etkin olabileceği düşünülmüş ve kolinesteraz enzimlerini yavaş geri dönüşlü ve non-selektif olarak inhibe ettiği gözlenmiştir. Fizostigmin, oral biyoyararlanımı yüksek olmasına rağmen eliminasyon yarılanma ömrünün kısa olması ve gün içerisinde doz tekrarı gerektirmesi nedeniyle kullanılamamaktadır. Buradan yola çıkılarak elde edilen karbamat yapısında ve kolinesteraz enzimlerini psödo tersinmez şekilde inhibe eden rivastigmin 2000 yılında onaylanarak Exelon® ticari ismiyle piyasaya sürülmüştür. Hızlı absorbe olmasına karşılık ilk geçiş eliminasyonuna uğradığından oral biyoyararlanımı %40 civarındadır. Daha iyi çözünmesini sağlamak amacıyla tartarat tuzu olarak kullanılmaktadır. Kandaki konsantrasyonunu ayarlamak için transdermal olarak kullanıldığı taktirde günde bir kez uygulanabileceği bildirilmiştir [150, 159].

AH süresince beyindeki AKE/BKE oranı değiştiği gibi AKE enziminin formu da değişmektedir. Sağlıklı beyinlerde G4 (tetramer) formu baskın olarak bulunmaktayken AH'den sonra G1 (monomer) formu artmış olarak gözlenmektedir. Rivastigminin temel iki avantajından ilki iki kolinesterazı da inhibe etmesi dolayısıyla, diğeri ise G1 formuna seçici olarak bağlanmasıdır [4, 160, 161].

Rivastigmin ile AKE etkileşimleri incelendiğinden, karbamoil kısmının Ser200 ile kovalent bağ yaparak ayrıldığı, kalan kısmında bulunan fenil halkasının da katalitik aktif bölgedeki Trp84 ve Phe330 ile π - π etkileşimi yaptığı bildirilmiştir. Ayrıca kalan kısımdaki fenolun üç su molekülü ile hidrojen bağı yaparak stabilize edildiği görülmüştür [4].



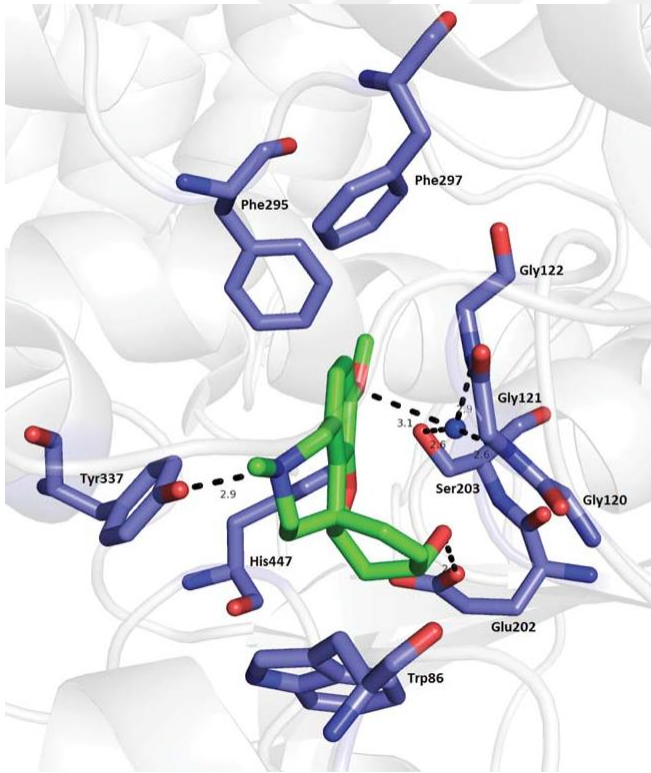
Şekil 2.13. TcAKE enzim aktif bölgesi ile rivastigmin etkileşimi

Galantamin

Galantamin ilk olarak *Galanthus woronowii* türünden izole edilen doğal bir alkaloiddir ve Amaryllidaceae familyasındaki diğer türlerin soğanlarında da bulunmaktadır. Yapısal olarak kodeine benzeyen galantamin, seçici, kompetitif ve geri dönüşlü bir enzim inhibitörüdür. AKE'yi BKE'ye göre daha iyi inhibe etmektedir. 2001 yılında onaylanarak Reminyl® isimli preparatıyla piyasaya giriş yapmıştır. Çok hızlı absorbe edilebilen galantaminin oral biyoyararlanımı %85 ile %100 arasında değişmektedir. Yiyeceklerle birlikte kullanıldığında absorpsiyonu azalmaktadır [156, 162].

Galantamin diğ er AKE inhibitörlerinden farklı olarak nikotinik asetilkolin reseptörlerinin pozitif allosterik modülasyonunu yapması nedeniyle kognitif fonksiyonları olumlu yönde etkilemektedir. Ayrıca nikotinik reseptörler üzerindeki allosterik modülatör etkisi sayesinde sinaptik aralıkta, hafıza ve duygusal durum için önemli olduğu bilinen noradrenalin, dopamin ve GABA gibi nörotransmitterlerin miktarını da artırdığı bildirilmiştir. Bunların yanı sıra oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu da savunulmaktadır [4, 153, 163].

Galantaminin enzim aktif bölgesinin cebinde yer alan kolin bağlanma bölgesi ve açıl cebi ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Ayrıca katalitik   l deki Ser200 ile su molekülleri aracılığıyla etkileşim yaptėı da bildirilmektedir. Bunların yanı sıra hidroksil grubunun oksianyon çukurundaki aminoasitlerle su köprüsü aracılığıyla H bağı yaptėı ve N-metil yapısının da Phe330 ile katyon- π etkileşimi saėladėı gösterilmiştir [4].



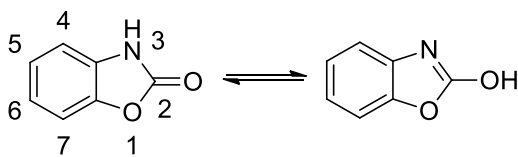
şekil 2.14. *huAChE* enzim aktif bölgesi ile galatamin etkileşimi

Memantin

Memantin, 2003 yılında onaylanmış ve Ebixa® (Amerika’da Namenda®) ismiyle kullanıma girmiş NMDA reseptör antagonistidir. Nöronları artmış glutamat aktivitesi sonucu oluşan eksitotoksisteden korumaktadır. İlk olarak 1968 yılında antidiyabetik bir ilaç olarak patentlenmiş fakat kandaki glukoz oranını düşürmediği görülmüştür. Farklı farmakolojik etkilerinin araştırılması amacıyla tekrar test edildiğinde merkezi sinir sisteminde aktif olduğu bulunmuş ve 1989 yılında tekrar piyasaya sunulmuştur [164]. NMDA reseptör afinitesi ortalama olan memantin, non-kompetitif bir antagonisttir. Memantin potensinin glutamat konsantrasyonu ile ilişkili olduğu, normal glutamat konsantrasyonunda NMDA reseptörünü zayıf bir şekilde inhibe ederken yüksek glutamat seviyelerinde güçlü bir inhibisyon profili sergilediği bildirilmiştir. Etki mekanizması nöroprotektif olarak tanımlanabilir. Memantin absorpsiyonu iyi olduğu, gıdalarla alımdan da etkilenmediği ve bunların yanı sıra oral biyoyararlanımı da %100’e yakın olduğu belirtilmektedir [4, 153]. AH tedavisinde orta ve ileri evrede monoterapi olarak veya kolinesteraz inhibitörleri ile birlikte kullanılmaktadır [165]. Fakat tıpkı kolinesteraz inhibitörleri gibi memantin de hastalığın semptomlarına yönelik tedavi sunmaktadır [166-168].

2.8. Benzoksazolon ve Benzotiyazolon Halkalarını Farmasötik Kimyadaki Önemi

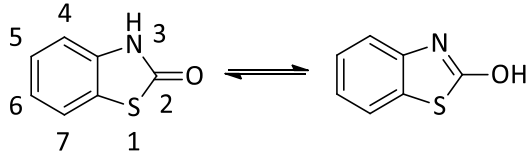
1,3-Benzoksazol-2(3H)-on, benzen ve 2-oksazolinon halkalarının kaynaşmasından oluşmuş bisiklik bir halka sistemidir. 2(3H)-benzoksazolon, 2-okso-3H-benzoksazol ve 2-benzoksazolinon olarak da isimlendirilmektedir. Erime derecesi 139-140 °C’dir ve sulu çözeltilerinde asidik pH’da noniyonize formda bulunurken bazik pH’da iyonize halde bulunur. 2(3H)-benzoksazolon ile 2-hidroksibenzoksazol arasında tautomerik bir dengenin olduğu ve bu dengede laktam formunun baskın olarak bulunduğu bildirilmiştir [169-172].



1,3-benzoksazol-2(3H)-on

Şekil 2.15. Benzoksazolon halkasının numaralandırılması ve tautomerik formları

1,3-benzotiyazol-2(3H)-on ise benzen ve 2-tiyazolinon halkalarının kaynaşmasından oluşmuş bir halka sistemidir. 2(3H)-benzotiyazolon, 2-okso-3H-benzotiyazol ve 2-benzotiyazolinon olarak da adlandırılabilir. Ayrıca benzoksazolon gibi fenolik karakterde olup sulu bazik çözeltilerinde iyonize formda bulunduğu ve tautomerik dengenin de laktam yönünde olduğu bildirilmiştir [173, 174].



1,3-benzotiyazol-2(3H)-on

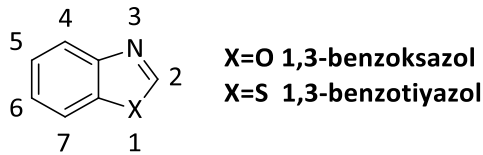
Şekil 2.16. Benzotiyazolon halkasının numaralandırılması ve tautomerik formları

Farmasötik Kimya açısından önemli halka sistemlerinden benzoksazolon ve benzotiyazolon yapıları birbirinin bioizosteri olan halkalardır. Yapısal olarak önemli avantajlara sahiptirler. Lipofilik ve hidrofilik özellikleri bir arada taşıyan elektronca zengin halka sistemleridir. Ayrıca iki tane hidrojen bağ akseptörüne ve bir tane hidrojen bağ donörüne sahiptirler [12].

Ayrıca bu halkaların, fenol ve kateşol eşdeğerlerine göre metabolik olarak daha dayanıklı olmaları bir diğer avantajları olarak bildirilmiştir. Bu yapıların yerine benzoksazolon veya benzotiyazolon biyoizosterlerinin kullanılmasıyla farmakokinetik profilin iyileştiği, stabilite problemlerinin çözüldüğü dolayısıyla ilaç olabilirlik açısından daha başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Sonuç olarak kimyasal modifikasyona uygun yapıları organik sentezlerde kolaylık sağlamak ve farklı farmakolojik etkiler için sağlam temel oluşturmaktadır [12].

Benzoksazolon ve benzotiyazolon halka sistemlerinin tepkimeleri genel olarak üç temel başlık altında incelenmektedir. Bunlardan birincisi 3 numaralı konumdaki N üzerinden yer değiştirme tepkimesi, ikincisi 6 numaralı konumdan elektrofilik aromatik yer değiştirme tepkimesi ve üçüncüsü de halka açılması veya genişlemesi tepkimeleridir [12, 16, 17, 175-177].

Benzoksazol ve benzotiyazol halkalarının tepkimleri de genel olarak üç temel başlık altında incelenebilmektedir. Bunlar 2 numaralı konumdan yürüyen tepkimeler, benzen halkası üzerinden elektrofilik aromatik yer değiştirme tepkimeleri ve halka açılması tepkimeleridir [178].

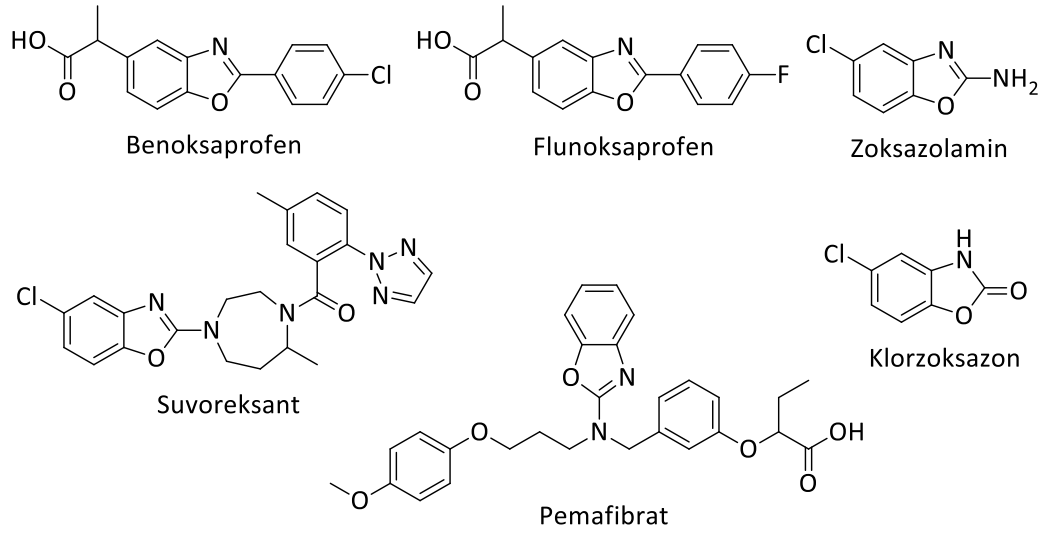


Şekil 2.17. Benzoksazol ve benzotiyazolon halka sistemlerinin numaralandırılması

2.8.1. Benzoksazol ve benzoksazolon halkalarının biyolojik aktiviteleri

Klinikte kullanılan benzoksazol ve benzoksazolon halka sistemlerini taşıyan çeşitli ilaçlar bulunmaktadır. Belsombra® ticari ismi ile satılan suvoreksant benzoksazol yapısına sahip insomnia tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Antienflamatuvar ve kas gevşetici bir ilaç olan klorzoksazon da Paraflex® ve Prafon Forte® ticari isimleriyle piyasada bulunmaktadır. Kas gevşetici bir ilaç olan zoksazolamin ve antienflamatuvar etkili flunoksaprofen onaylandıktan sonra hepatotoksisiteye neden oldukları belirlendiğinden günümüzde kullanılamamaktadır. Aynı şekilde antienflamatuvar bir ilaç olan benoksaprofen yan etkileri ve ilaca bağlı ölümler nedeniyle piyasadan çekilmiştir [179, 180]. Hiperlipidemi tedavisinde kullanılması amacıyla 2017 yılında Japonya’da onaylanan ve klinik çalışmaları halen süren pemafibrat da benzoksazol yapısı taşımaktadır [181].

Benzoksazol ve benzoksazolon halka sistemleri üzerinde yapılan çeşitli kimyasal düzenlemeler ile farklı farmakolojik etkilere sahip moleküllerin elde edildiği bildirilmiştir. Bu halka sistemlerinin taşıyan bileşiklerin antimikrobiyal, antienflamatuvar, analjezik, antifungal, antikonvülzan, antikanser, antihiperglisemik, anti-tüberküloz, anti-HIV ve antihelmintik aktivite gösterdiği belirtilmiştir [175, 182, 183]. Çizelge 2.2’de benzoksazol ve benzoksazolon yapısına sahip bileşikler ve aktiviteleri ilgili güncel çalışmalar sunulmuştur.

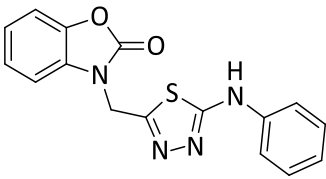
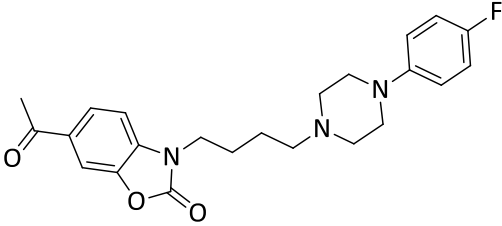
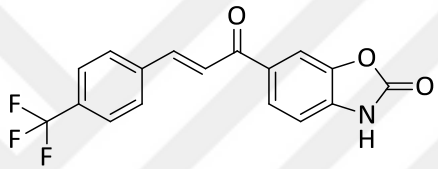
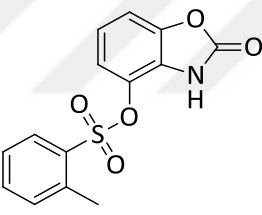
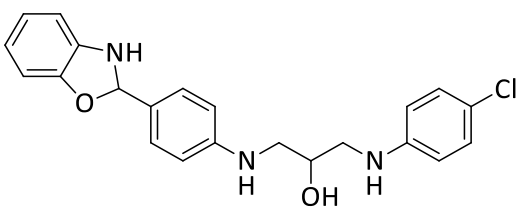
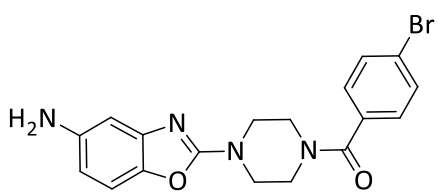


Şekil 2.18. Bezoksazol ve benzoksazolon yapısı taşıyan ilaçlar

Çizelge 2.2. Benzoksazol ve benzoksazolon halkaları üzerine yapılan güncel çalışmalar

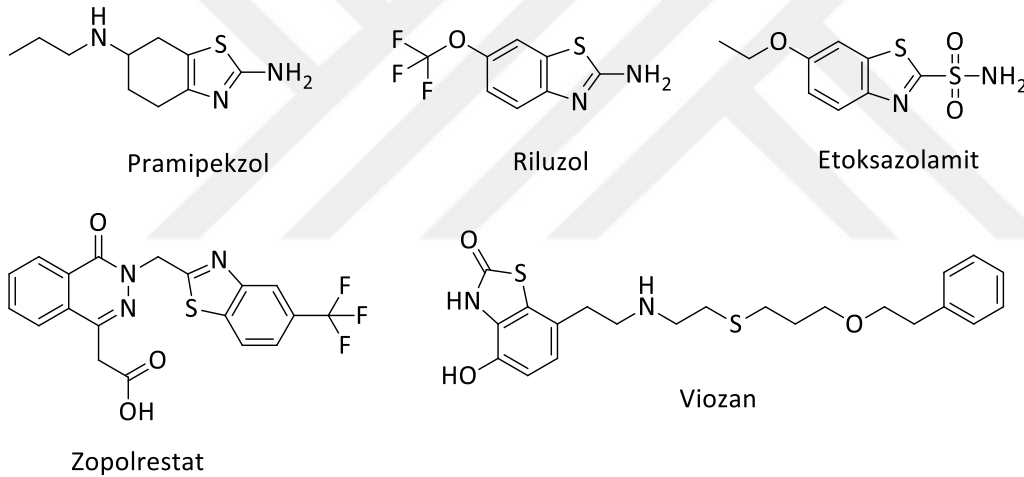
Referans	Molekül Yapısı	Biyolojik Etkisi
[184]		Antienflamatuvar (COX-2 inhibitörü)
[185]		Antienflamatuvar (COX-2 inhibitörü)
[186]		Asit seramidaz inhibitörü
[187]		Anti-HIV-1

Çizelge 2.2. (devam) Benzoksazol ve benzoksazolon halkaları üzerine yapılan güncel çalışmalar

[182]		Anti-HIV-1
[188]		Sigma-2 reseptör ligandı
[189]		Karbonik anhidraz inhibitörü
[10]		Antienflamatuvar
[190]		AKE inhibitörü ve antioksidan
[191]		Kolinesteraz inhibitörü

2.8.2. Benzotiyazol ve benzotiyazolon halkalarının biyolojik aktiviteleri

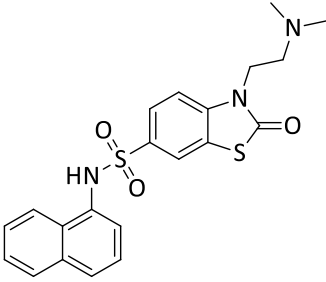
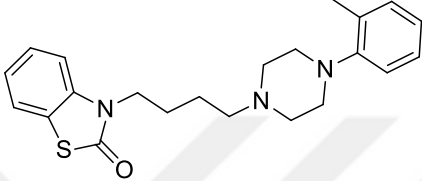
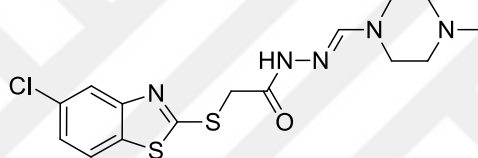
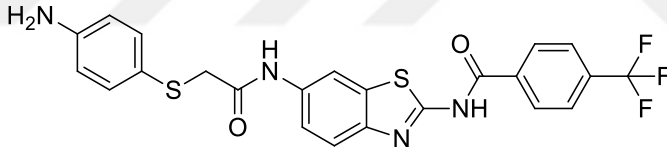
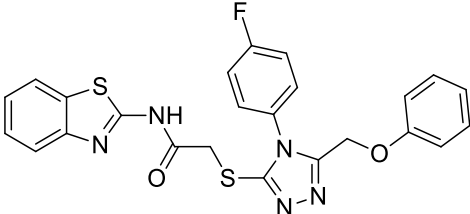
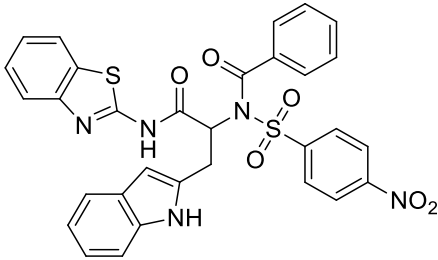
Benzotiyazol ve benzotiyazolon halka sistemleri ilaç tasarımında çokça tercih edildiklerinden çeşitli biyolojik etkileri olan ilaçların yapısında bulunmaktadır. Pramipekzol (PEXOLA®) 4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiyazol yapısı taşıyan ve Parkinson hastalığının tedavisinde levodopayla veya tek başına kullanılabilen bir ilaçtır. Riluzole de aynı şekilde benzotiyazol halkası içerir ve amiotrofik lateral skleroz hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Aldoz redüktaz inhibitörü olarak diyabet tedavisinde kullanılması planlanan zopolrestat ve karbonik anhidraz inhibitörü olan etoksazolamit de aynı motife sahip bileşiklerdir. Benzotiyazolon yapısındaki Viozan™ ise kronik obstrüktif akciğer hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanmış bir bileşiktir [11].



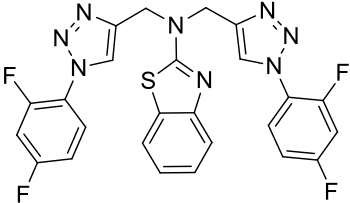
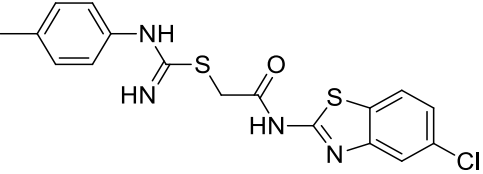
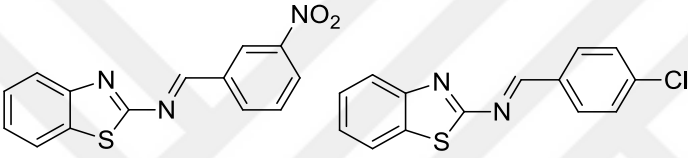
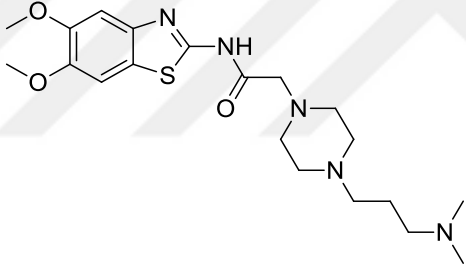
Şekil 2.19. Benzotiyazol ve benzotiyazolon yapısı taşıyan ilaçlar

Benzotiyazol ve benzotiyazolon halkalarının antitüberküler, antiviral, antimikrobiyal, antimalaryal, antikonvülzan, antihelmintik, antidiyabetik, antikanser, analjezik ve antienflamatuvar etkileri üzerine yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır [192, 193]. Bunlardan güncel bir kısmı Çizelge 2.3’de sunulmuştur.

Çizelge 2.3. Benzotiyazol ve benzotiyazolün halkaları üzerine yapılan güncel çalışmalar

Referans	Molekül Yapısı	Biyolojik Etkisi
[194]		5-HT ₆ antagonisti (AH tedavisi)
[195]		5-HT ₇ reseptör ligandı
[196]		Antikanser
[197]		Antikanser
[198]		Antienflamatuvar
[199]		Antienflamatuvar ve analjezik

Çizelge 2.3. (devam) Benzotiyazol ve benzotiyazolon halkaları üzerine yapılan güncel çalışmalar

[200]		Antimikrobiyal
[201]		Antikonvülsan
[202]		Antimalaryal
[203]		AKE inhibitörü (AH tedavisi)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Kimyasal çalışmalarda kullanılan gereçler

Tasarlanan moleküllerin kimyasal sentezleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler teknik ve analitik saflıkta olup çeşitli firmalardan temin edilmiştir. Kullanılan maddeler ve aletler aşağıda listelenmiştir.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Firma

1,3-Benzoksazol-2(3*H*)-on

Sigma Aldrich

1,3-Benzotiyazol-2(3*H*)-on

Sigma Aldrich

Benzotiyazol

Sigma Aldrich

2-Amino-5-nitrofenol

Sigma Aldrich

Benzoik asit

Sigma Aldrich

Dimetilsülfat

Sigma Aldrich

Kalay klorür

Sigma Aldrich

Alüminyum klorür

Sigma Aldrich

Kloropropiyonil klorür

Sigma Aldrich

Etil 4-bromobutirat

Sigma Aldrich

Etil 5-bromovalerat

Sigma Aldrich

1-Fenilpiperazin

Sigma Aldrich

1-(4-Klorofenil)piperazin

Sigma Aldrich

1-(4-Florofenil)piperazin

Sigma Aldrich

1-(4-Triflorometilfenil)piperazin

Sigma Aldrich

1-(4-Metilfenil)piperazin

Sigma Aldrich

1-(4-Metoksifenil)piperazin

Sigma Aldrich

1-Benzilpiperazin

Sigma Aldrich

4-Benzilpiperidin

Sigma Aldrich

N-Benzilmetilamin	Sigma Aldrich
4-Fenilpiperidin	Sigma Aldrich
1-(4-Metoksibenzil)piperazin	Sigma Aldrich
1-(4-Klorobenzil)piperazin	Sigma Aldrich
1-(4-Florobenzil)piperazin	Sigma Aldrich
1-(4-(Triflorometil)benzil)piperazin	Sigma Aldrich
<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilkarbodiimid hidroklorür (EDC)	Sigma Aldrich
4-(Dimetilamino)piridin (DMAP)	Sigma Aldrich
Demir	Sigma Aldrich
Metil akrilat	Sigma Aldrich
Polifosforik asit	Sigma Aldrich
Trietilamin (TEA)	Sigma Aldrich
Potasyum karbonat	Merck
Sodyum karbonat	Merck
Sodyum iyodür	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Potasyum hidroksit	Merck
Hidroklorik asit	Merck

3.1.2. Kimyasal çalışmalardaki genel sentez yöntemleri

3-Metil-1,3-benzoksazol-2(3*H*)-on [177]

5 g (0,037 mol) benzoksazolon 50 ml 1M NaOH çözeltisi içerisinde çözüldü. Üzerine 3,5 ml (0,037 mol) dimetilsülfat ilave edildi ve 30 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği suya boşaltıldı çöken ürün süzüldü, kurutuldu ve kristalizasyon yapılmaksızın bir sonraki basamak için kullanıldı. Verim= 4,38 g (%80). Erime derecesi= 84°C'dir.

3-Metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on

2 g (0,013 mol) benzotiyazon, 20 ml 1M NaOH çözeltisi ve 1,48 ml (0,016 mol) dimetilsülfat kullanılarak yukarıdaki yöntemle göre yapıldı. Verim=1,98 g (%90). Erime derecesi= 76 °C'dir.

3-Metil-6-nitro-1,3-benzoksazol-2(3H)-on [204]

15 ml %65'lik nitrik asit, yağ banyosunda 40°C'ye kadar ısıtıldı ve balon içi sıcaklığın 40-50 °C'de olması sağlanarak 3 g (0,02 mol) 3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on porsiyonlar halinde ilave edildi. İlave tamamlandıktan sonra yarım saat karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği buzlu suya boşaltılıp 15 dakika daha karıştırıldı ve çöken ürün süzüldü. Kristalizasyon yapılmaksızın bir sonraki basamak için kullanıldı. Verim= 3,32 g (%85). Erime derecesi= 181-182 °C'dir.

3-Metil-6-nitro-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on

10 ml %65'lik nitrik asit ve 2 g (0,012 mol) 3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on kullanılarak yukarıdaki yöntemle göre sentez edildi. Verim=2,31 g (%91). Erime derecesi= 163-165 °C'dir.

6-Amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on [16]

2 g (0,01 mol) 3-metil-6-nitro-1,3-benzoksazol-2(3H)-on iki boyunlu balona alındı üzerine 40 ml etanol ve 8 ml 6 N HCl çözeltisinden ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Kaynamaya başladıktan sonra 11,8 g (0,05 mol) SnCl₂.2H₂O porsiyonlar halinde ilave edildi ve ilaveden sonra 30 dakika kaynatıldı. Süre sonunda etanol uçuruldu ve balon içeriği sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 10-11 arasına getirildi. Ardından diklorometan ile ekstraksiyon yapılarak organik faz alındı ve kuruluğa kadar uçurularak ürün elde edildi. Elde edilen ürün kristalizasyon yapılmaksızın bir sonraki basamak için kullanıldı. Verim= 1,5 g (%87). Erime derecesi= 154°C'dir.

6-Amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on

2 g (0,009 mol) 3-metil-6-nitro-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 40 ml etanol, 8 ml 6 N HCl ve 10,74 g (0,048 mol) kalay klorür kullanılarak yukarıdaki yönteme göre yapıldı. Verim= 1,54 g (%90). Erime derecesi= 188-189 °C'dir.

3-Kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit

500 mg (0,003 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on 6 ml DMF içerisinde çözüldü. Çözeltiye 37 mg (0,0003 mol) DMAP ve 0.32 ml (0,0022 mol) TEA ilave edilerek 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra buz banyosuna alınarak 0,38 ml (0,004 mol) kloropropiyonil klorür ilave edildi ve 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği buzlu suya boşaltılıp karıştırıldı. Çöken madde vakumdan süzülde, kurutuldu ve kristalizasyon yapılmaksızın bir sonraki basamak için kullanıldı. Verim= 518 mg (%67). Erime derecesi= 204 °C (dekompoze)'dir. (CAS numarası: 1888921-51-4)

3-Süstitüe-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit türevlerinin genel sentez yöntemi (Yöntem A)

382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit 25 ml asetonitril içerisinde çözüldü ve 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür ilave edilerek 1.5 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Daha sonra balon içeriği oda sıcaklığına soğutulduktan sonra üzerine 525 mg (0,0038 mol) potasyum karbonat ve 0,0038 mol uygun amin türevi ilave edilerek 5 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Süre sonunda asetonitril uçuruldu. Balon içeriği suyla yıkanarak süzölüp kurutuldu. Uygun çözücünden kristallendirildi.

Propanoik asit türevlerinin sentez yöntemi [9]

Uygun amin türevi (0,01 mol) 10 ml diklorometan içerisinde çözüldü. Üzerine metil akrilat (0,011 mol) ilave edilerek oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Süre sonunda diklorometan uçuruldu, ester türevi izole edilmeden, balona 15 ml %5'lik sodyum hidroksit çözeltisi ilave

edilerek 2 saat ısıtıldı ve karşılık gelen karboksilik asit türevlerinin sodyum tuzları elde edildi. Balon içeriği nötralize edildikten sonra çöken katı süzüldü, kurutuldu ve propanamit türevi sonuç bileşiklerin sentezinde kullanıldı.

3-Süstitüe-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit türevlerinin genel sentez yöntemi (Yöntem B)

0,0011 mol uygun propanoik asit türevi 20 ml diklorometan içinde çözüldü. Üzerine EDC (0,0012 mol) ve DMAP (0,0002 mol) ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda 0,001 mol 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on eklenerek bir gece oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra çözücü uçuruldu, elde edilen kalıntı su ile muamele edildi, süzüldü, kurutuldu ve uygun solvan ile kristallendirilerek saflaştırıldı.

Bütanoik asit türevlerinin sentez yöntemi

4-Fenilpiperidin veya 1-benzilpiperazin (0,01 mol) 20 ml asetronitril içerisinde çözüldü. Üzerine etil 4-bromobutirat (0,01 mol) ve potasyum karbonat (0,015 mol) ilave edilerek 6 saat kaynatıldı. Süre sonunda balon içeriği süzüldü, süzüntü kuruluğa kadar uçuruldu. Elde edilen ester türevi üzerine 15 ml %5'lik sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek 2 saat ısıtıldı ve karşılık gelen karboksilik asit türevlerinin sodyum tuzu elde edildi. Balon içeriği nötralize edildikten sonra karboksilik asit türevleri çökmediğinden su uçuruldu ve aseton ile muamele edilerek, çöken sodyum klorür ayrıldı, süzüldü ve süzüntü uçuruldu. Elde edilen yağ eter yardımıyla katılaştırılarak bütanamit türevi sonuç bileşiklerin sentezinde kullanıldı.

4-Süstitüe-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)bütanamit türevlerinin genel sentez yöntemi

0,0011 mol uygun butanoik asit türevi, 0,0012 mol EDC, 0,0002 mol DMAP, 0,001 mol 6-amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on ve 20 ml diklorometan kullanılarak yöntem B'ye göre elde edildi.

4-Süstitüe-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)butanamit türevlerinin genel sentez yöntemi

0,0011 mol uygun butanoik asit türevi, 0,0012 mol EDC, 0,0002 mol DMAP, 0,001 mol 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on ve 20 ml diklorometan kullanılarak yöntem B'ye göre elde edildi.

Pentanoik asit türevlerinin sentez yöntemi

4-Fenilpiperidin veya 1-benzilpiperazin (0,01 mol), etil 5-bromovalerat (0,01 mol), potasyum karbonat (0,015 mol) ve 20 ml asetonitril kullanılarak butanoik asit türevlerinin sentez yöntemine göre elde edildi.

5-Süstitüe-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)pentanamit türevinin genel sentez yöntemi

0,0011 mol uygun pentanoik asit türevi, 0,0012 mol EDC, 0,0002 mol DMAP, 0,001 mol 6-amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on ve 20 ml diklorometan kullanılarak yöntem B'ye göre elde edildi.

5-Süstitüe-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)pentanamit türevlerinin genel sentez yöntemi

0,0011 mol uygun pentanoik asit türevi, 0,0012 mol EDC, 0,0002 mol DMAP, 0,001 mol 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on ve 20 ml diklorometan kullanılarak yöntem B'ye göre elde edildi.

6-(3-Kloropropanoil)-3-metilbenzoksazol-2(3H)-on [175]

Alüminyum klorür (0,09 mol) balona alınıp üzerine 1,2 ml (0,025 mol) DMF buz banyosunda ilave edildi. İlave tamamlandıktan sonra buz banyosundan çıkarılarak balon içeriği yaklaşık 45 °C'ye ayarlandı. Daha sonra 3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on (0,01 mol) ve

kloropropiyonil klorür (0,015 mol) ilave edilerek 2 saat ısıtıldı. Süre sonunda balon içeriği soğutulup buzlu suya boşaltıldı. Çöken madde vakumdan süzülde, kurutuldu ve kristalizasyon yapılmaksızın bir sonraki basamak için kullanıldı. Verim= 1,73 g (%72). Erime derecesi= 184 °C.

6-(3-kloropropanoil)-3-metilbenzotiyazol-2(3H)-on

Alüminyum klorür (0,09 mol), 1,2 ml (0,025 mol), 3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on (0,01 mol) ve kloropropiyonil klorür (0,015 mol) kullanılarak yukarıdaki yönteme göre sentez edildi. Verim= 2,17 g (%85). Erime derecesi= 132 °C.

6-(3-Süstitüepropanoil)-3-metilbenzoksazol-2(3H)-on türevlerinin genel sentez yöntemi

500 mg (0,002 mol) 6-(3-kloropropanoil)-3-metilbenzoksazol-2(3H)-on, 880 mg (0,006 mol) sodyum iyodür, 676 mg (0,005 mol) potasyum karbonat, 0,003 mol uygun amin türevi ve 25 ml asetonitril kullanılarak yöntem A'ya göre sentez edildi.

6-(3-Süstitüepropanoil)-3-metilbenzotiyazol-2(3H)-on türevlerinin genel sentez yöntemi

500 mg (0,0021 mol) 6-(3-kloropropanoil)-3-metilbenzotiyazol-2(3H)-on, 945 mg (0,0063 mol) sodyum iyodür, 733 mg (0,0053 mol) potasyum karbonat, 0,0032 mol uygun amin türevi ve 25 ml asetonitril kullanılarak yöntem A'ya göre sentez edildi.

6-Nitro-2-fenilbenzoksazol [205]

1 g (0,0065 mol) 2-amino-5-nitrofenol ve 0,79 g (0,0065 mol) benzoik asit balona alınıp üzerleri polifosforik asit ile kaplandı. 2 saat 140 °C'de yağ banyosunda karıştırıldı. Deney sonlandırılıp balon içeriği soğutuldu, sonrasında buzlu suya boşaltılarak sodyum hidroksit çözeltisi ile nötrale edildi. Çöken katı süzülerek bir sonraki basamakta kullanılmak üzere saklandı. Verim= 1,4 g (%90). Erime derecesi= 180 °C.

6-Amino-2-fenilbenzoksazol [205]

0,9 g (0,004 mol) 6-nitro-2-fenilbenzoksazol iki boyunlu balona alındı üzerine 40 ml etanol ve 7 ml 1,2 N HCl çözeltisinden ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Kaynamaya başladıktan sonra 0,6 g (0,011 mol) demir ilave edildi. 2 saat sonunda deney sonlandırıldı. Balon içeriğinden demiri uzaklaştırmak için Celite®'den süzöldü. Süzöntü alınarak sodyum hidroksit çözeltisi ile bazik pH'ya ayarlandı. Çöken katı süzölerek alındı ve başka bir işlem yapmadan bir sonraki basamakta kullanıldı. Verim=375 mg (%48). Erime derecesi= 173°C'dir.

3-Süstitüe-N-(2-fenilbenzoksazol-6-il)propanamit türevinin genel sentez yöntemi

0,0011 mol 3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoik asit, 0,0012 mol EDC, 0,0002 mol DMAP, 0,001 mol 6-amino-2-fenilbenzoksazol ve 20 ml diklorometan kullanılarak yöntem B'ye göre sentez edildi.

6-nitrobenzotiyazol [206]

3g (0,022 mol) benzotiyazol 2 boyunlu balona alınarak üzerine 6 ml derişik sülfirik asit ilave edildi. Buz banyosunda bir süre karıştırıldıktan sonra porsiyonlar halinde nitrik asit eklendi. Balon içeriği 4-6 °C arasında tutularak 30 dakika karıştırıldı ve İTK ile kontrol edilerek deney sonlandırıldı. Balon içeriği buzlu suya boşaltıldı. Çöken katı süzölerek alındı ve etanolden kristallendirildi. Verim=1327 mg (%33). Erime derecesi= 173-174°C'dir.

2-amino-5-nitrobenzentiyoil

0,5 g (0,0028 mol) 6-nitrobenzotiyazol üzerine 30 ml %20'lik potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek kaynatılmaya başlandı. 5 saat sonunda deney sonlandırıldı. Balon içeriği soğutulup %37'lik hidroklorik asit ile nötralize edildi. Çöken katı süzölerek alındı ve ek bir işlem yapılmadan bir sonraki basamakta kullanıldı. Verim=280 mg (%59). Erime derecesi= 87-89°C.

6-Nitro-2-fenilbenzotiyazol

1 g (0,0059 mol) 2-amino-5-nitrobenzotiyol ve 0,79 g (0,0065 mol) benzoik asit balona alınıp üzerleri polifosforik asit kullanılarak 6-nitro-2-fenilbenzoksazol sentez yöntemine göre elde edildi. Verim= 1,23 g (%82). Erime derecesi= 188 °C.

6-Amino-2-fenilbenzotiyazol

1,2 g (0,0047 mol) 6-nitro-2-fenilbenzotiyazol, 40 ml etanol, 7 ml 1,2 N HCl ve 0,8 g (0,014 mol) kullanılarak 6-amino-2-fenilbenzoksazol sentez yöntemine göre elde edildi. Verim=420 mg (%40). Erime derecesi= 206°C'dir.

3-Süstitüe-N-(2-fenilbenzotiyazol-6-il)propanamit türevinin genel sentez yöntemi

0,0011 mol 3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoik asit, 0,0012 mol EDC, 0.0002 mol DMAP, 0.001 mol 6-amino-2-fenilbenzotiyazol ve 20 ml diklorometan kullanılarak yöntem B'ye göre sentez edildi.

3.2. Analitik Kontroller

3.2.1. Erime derecesi tayini

Bileşiklerin erime dereceleri Stuart SMP-50 dijital erime derecesi tayin cihazında belirlenmiştir.

3.2.2. İnce tabaka kromatografisi ile yapılan kontroller

Kimyasal sentez çalışmalarında ve bileşiklerin saflık kontrollerinde Silikajel 60 F254 (Merck) hazır alüminyum plaklar kullanıldı. Çözücü sistemi olarak benzen:metanol (45:5) ve diklorometan:metanol (48:2) kullanıldı. Lekelerin belirlenmesinde UV ışığından (254 ve 366 nm), Dragendorff ve bromokrezol belirteçlerinden yararlanıldı.

3.2.3. Spektroskopik yöntemler

¹H-NMR spektrumları

Spektrumlar maddelerin DMSO-d₆ içindeki çözeltilerinden yararlanılarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki Varian Mercury 400 MHz Digital FT-NMR spektrofotometresinden kaydedildi.

¹³C-NMR spektrumları

Spektrumlar maddelerin DMSO-d₆ içindeki çözeltilerinden yararlanılarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki Varian Mercury 400 MHz Digital FT-NMR spektrofotometresinden kaydedildi.

3.2.4. Elementel analizler

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki CHNS-932 (LECO) Elementel Analiz cihazında yapılmıştır.

3.2.5. Yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumları

Bileşiklerin tam kütle ölçümleri, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki ultraperformanslı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UPLC) (Waters Corporation, Milford, USA) ile birleştirilmiş Micromass LCT Premier XE, Waters (Milford, MA, USA) marka yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresinde (HRMS), elektron sprey iyonizasyon (ESI) yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

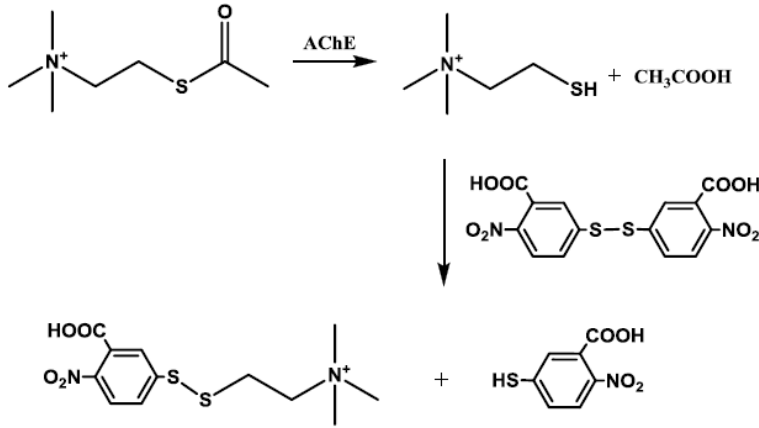
3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.3.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite tayini

Kullanılan maddeler	Üretici
Asetilkolinesteraz Enzimi (<i>Electrophorus electricus</i> , tipVI-S, 200-1,000 ünite/mg protein)	Sigma Aldrich
Butirilkolinesteraz Enzimi (At serumu, ≥900 ünite/mg protein)	Sigma Aldrich
Asetiltiyokolin iyodür	Sigma Aldrich
Butiriltiyokolin iyodür	Sigma Aldrich
5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Sigma Aldrich
Galantamin hidrobromür	Sigma Aldrich
Donepezil hidroklorür monohidrat	Sigma Aldrich
Magnezyum klorür anhidrit	Sigma Aldrich
Tris (hidroksimetil) aminometan (Tris HCl)	Sigma Aldrich
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma Aldrich
Sodyum klorür	Sigma Aldrich

Kullanılan Aletler	Marka ve Model
Ultra saf su cihazı	Merck Millipore Simplicity 185
Mikroplak okuyucu	Molecular Devices Versamax Tunable Microplate Reader

Sentezlerini gerçekleştirdiğimiz bileşiklerin AKE ve BKE inhibitör aktiviteleri, IC_{50} değerleri ve kinetik çalışmaları spektrofotometrik bir yöntem olan Ellman testi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde asetilkolinesteraz enzimi substrat olarak kullanılan asetiltiyokolini hidroliz eder ve bu hidroliz sonucunda ortaya çıkan tiyokolin, Ellman reaktifi olarak da bilinen 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asiti (TNB) oluşturur. TNB oluşumu ile açığa çıkan sarı renk 412 nm'de ölçülür, renk şiddeti AKE aktivitesi ile doğru orantılıdır. Deneydeki reaksiyon mekanizması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Ellman testinin genel reaksiyon mekanizması

Asetilkolinesteraz inhibitör aktivitelerinin tayin yöntemi

Deneylerde kullanılmak üzere 50 mM Tris HCl (pH 8.0) tampon çözeltisi kullanılmıştır. Tampon 4°C’de muhafaza edilir ve 5 günde bir yenilenir. 6.8 mM DTNB çözeltisi (100 mM NaCl ve 20 mM MgCl₂ içeren), tampon çözelti kullanılarak her kullanımdan önce taze olarak hazırlanır. AKE substratı olarak; 10 mM ATK, soğuk su ile çözülerek her kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır. AKE enzimi (500 U/mg), deneylerde doğrudan kullanılmak üzere, tampon çözelti ile gerekli seri seyreltme işlemlerinden sonra, 0.5 U/ml derişimli 0.5 ml’lik kısımlar halinde ependorf tüplere alınarak -80 °C’ de saklanmıştır. Kullanım öncesinde gerekli miktarda enzim çözeltisi 0 °C’ ye alınmıştır. Referans olarak, 10 mM galantamin ve 10 mM donepezil çözeltisi su ile çözülerek hazırlanılmış ve 0 °C’ de muhafaza edilmiştir.

Çalışmada test edilecek bileşikler final hacimde 100 µM konsantrasyonlu olacak şekilde DMSO kullanılarak çözülmüştür. Ancak test çözeltilerinin hazırlanmasında AKE aktivitesini etkilememesi için DMSO miktarının final hacmin %1’ini aşmamasına dikkat edilmiştir. Aktivite çalışmasında 96 kuyucuklu mikropalak kullanılmıştır. Her kuyucukta final hacim 200 µl olacak şekilde; 168 µl tampon, 10 µl DTNB, 10 µl AKE ve 2 µl test çözeltisi ilave edilir. İlk üç kuyucuk kör olarak kullanılmak üzere AKE çözeltisi içermeyecek şekilde, sonraki 3 kuyucuk tam aktivite olarak kullanılmak üzere test çözeltisi yerine 2 µl solvan karışımı eklenerek hazırlanmıştır. Referans olarak kullanılmak üzere ise galantamin ve donepezil çözeltisi içeren 3’er kuyucuk daha hazırlanmıştır. Son olarak tüm kuyucuklara 10 µl ATK hızla

ilave edilip mikropalak okuyucuya yerleştirilmiş, 30 saniyede bir tarama olacak şekilde, 15 dakika boyunca, 412 nm dalga boyunda kinetik ölçüm yapılmıştır.

Butirilkolinesteraz inhibitör aktivitelerinin tayin yöntemi

Deneylerde kullanılmak üzere 50 mM Tris HCl (pH 8.0) tampon çözeltisi kullanılmıştır. Tampon 4°C’de muhafaza edilir ve 5 günde bir yenilenir. 6.8 mM DTNB çözeltisi (100 mM NaCl ve 20 mM MgCl₂ içeren), tampon çözelti kullanılarak her kullanımdan önce taze olarak hazırlanır. BKE substratı olarak; 30 mM BTK, soğuk su ile çözülerek her kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır. BKE enzimi (132 U/mg), deneylerde doğrudan kullanılmak üzere, tampon çözelti ile gerekli seri seyreltme işlemlerinden sonra, 0.8 U/ml derişimli 0.5 ml’lik kısımlar halinde ependorf tüplere alınarak -80 °C’ de saklanmıştır. Kullanım öncesinde gerekli miktarda enzim çözeltisi 0 °C’ ye alınmıştır. Referans olarak 1 mM galantamin ve 1 mM donepezil çözeltisi su ile çözülerek hazırlanılmış ve 0 °C’ de muhafaza edilmiştir. Çalışmada test edilecek bileşikler final hacimde 100 µM konsantrasyonlu olacak şekilde DMSO kullanılarak çözülmüştür. Ancak test çözeltilerinin hazırlanmasında BKE aktivitesini etkilememesi için DMSO miktarının final hacmin % 1’ini aşmamasına dikkat edilmiştir. Aktivite çalışmasında 96 kuyucuklu mikropalak kullanılmıştır. Her kuyucukta final hacim 200 µl olacak şekilde; 168 µl tampon, 10 µl DTNB, 10 µl BKE ve 2 µl test çözeltisi ilave edilir. İlk üç kuyucuk kör olarak kullanılmak üzere BKE çözeltisi içermeyecek şekilde, sonraki 3 kuyucuk tam aktivite olarak kullanılmak üzere test çözeltisi yerine 2 µl solvan karışımı eklenerek hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere ise galantamin ve donepezil çözeltisi içeren 3’er kuyucuk daha hazırlanmıştır. Son olarak tüm kuyucuklara 10 µl BTK hızla ilave edilip mikropalak okuyucuya yerleştirilmiş, 30 saniyede bir tarama olacak şekilde, 5 dakika boyunca, 412 nm dalga boyunda kinetik ölçüm yapılmıştır.

Kolinesteraz inhibitör aktivite test sonuçlarının hesaplanması

AKE ve BKE inhibitör aktivitenin hesaplanması amacıyla öncelikle tam aktivite (kontrol) absorbans değerinin 0.8’e en yakın olduğu dakikanın verileri alınmıştır. Sonrasında çalışılan üç kuyucuğun ortalaması alınmış ve elde edilen absorbans değerinden kör absorbans

sonuçları çıkarılarak düzeltme yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki denkleme yerleştirilerek hesaplamalar yapılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 \times (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{inhibitör}} / A_{\text{kontrol}})$$

Bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin tayini

100 µM'da %50'nin üzerinde AKE ve BKE inhibisyonu gösteren bileşiklerin IC₅₀ değerleri ölçülmüştür. Ölçümlerde, inhibisyon tayininde belirtilen deney yöntemi kullanılmıştır. Bileşiklerin IC₅₀ değerleri, GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California USA) programında, bileşik derişiminin logaritmasına karşı elde edilen % inhibisyon verilerinin non-lineer regresyonu ile oluşturulan sigmoid doz-cevap grafikleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Enzim inhibisyon kinetiği tayini

AKE ve BKE için en düşük IC₅₀ değerine sahip bileşikler seçilerek inhibisyon tiplerinin belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Kinetik ölçümlerinde bileşiklerin ve substratın konsantrasyonları değiştirilerek inhibisyon tayininde kullanılan yöntemle ölçümleri yapılmıştır. Değişen substrat miktarında elde edilen absorbans değerleri enzim hızının göstergesi olarak kabul edilmiştir. Hesaplamalar için GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California USA) programında 1/[absorbans] değerine karşı 1/[substrat] değerlerinin regresyonu ile Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuştur. İnhibisyon sabitlerinin (K_i) hesaplanmasında da bu grafikler kullanılmıştır.

3.3.2. Antienflamatuvar aktivite çalışması

Hücre kültürü, LPS stimülasyonu ve sitokin ölçümü

THP1 hücre hattı, Atlas Bioteknoloji'den temin edildi. Hücreler, %5 CO₂, 37 ° C'de %10 ısı ile inaktive FBS (fetal bovin serumu) ile desteklenen RPMI (Roswell Park Memorial Institute,

besi yeri) içinde kültüre edildi. 24 well platede her bir kuyuya 40.000 THP1 hücresi ekildi. Uygulama öncesi hücrelerin 24 saat boyunca ortama alışmaları sağlandı.

Hücrelere 100 ng LPS (lipopolisakkarit) uygulandıktan 1 saat sonra, test bileşikleri ve referans 10 μ M dozda plakdaki kuyucuklara tatbik edildi. 24 Saatlik inkübasyon süresi sonunda hücreler santrifüj edilerek elde edilen kültür süpernatantlarında Human Nitric Oxide seviyeleri kit protokolüne göre ölçüldü. Altta kalan hücre pelletlerinde ise protein izolasyonları yapıldıktan sonra elde edilen örneklerden ELISA yöntemi kullanılarak Human Interleukin 1 Beta, Human Interleukin 6, Human Tumor Necrosis Factor Alpha ölçümleri yapılmıştır. Kit içerisinde gelen mikropak, araştırılan biyomolekülün antikoru ile önceden kaplanmıştır. Protein izolasyonu yapılan hücre pelletlerinden elde edilen örnekler, araştırılan biyomolekülün antikoru ile kaplı kuyucuklara eklenirler. Sonra araştırılan biyomolekülün biyotinle işaretlenmiş antikoru eklenir ve numunedeki biyomoleküle bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklendiğinde biyomolekülün biyotinle işaretlenmiş antikoruna bağlanır. Bir inkübasyondan aşamasından sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama işlemiyle uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi ilave edilir ve araştırılan biyomolekülün miktarıyla orantılı olarak renklenme oluşur. Renklenme reaksiyonu, asidik durdurma çözeltisi ilave edilerek sonlandırılır. Optik dansite (OD), 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri, araştırılan molekülün konsantrasyonuyla orantılıdır. Numune içindeki araştırılan biyomolekülün seviyesini belirlemek için, kullanılan standartların konsantrasyonu ve bu standartların OD değeri yatay-dikey eksen üzerine grafik çizilerek hesaplanır. Standart konsantrasyonların ve OD değerlerinin grafikteki kesiştiği noktalara göre en uygun eğri çizilerek standart bir eğri oluşturulur. Numunelerin OD'si standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki araştırılan molekülün konsantrasyonu hesaplanır. İstatistiksel analiz için SPSS (Statistic Program for Social and Science) programı ve one-way ANOVA testi kullanıldı. ANOVA testi doğruluk değeri $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

Protein izolasyonu

24 saat sonunda uygulama yapılan hücre pelletlerinden protein izolasyonu GeneALL ProtinEx™ Animal cell /tissue Protein İzolasyon Kit (GeneALL Biotechnology) protokolüne göre yapılmıştır.

3.3.3. Apoptozun flow sitometride Anneksin V bağlanması ile incelenmesi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunan ve membran fosfolipitlerinden olan fosfatidilserinin apoptotik hücrelerde dış yüzeye doğru yer değiştirdiği bildirilmiştir. Anneksin V'nin ise fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu ve floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücrelerin tespit edilmesine olanak sağladığı belirtilmiştir. Propidyum iyodür (PI) gibi ikincil bir boya yardımıyla da apoptotik hücrelerin evrelerini belirlemenin mümkün olduğu bildirilmiştir. Erken apoptotik hücrelerin sadece Anneksin V ile bağlandıkları, geç apoptotik hücrelerin Annexin V ile bağlanmalarının yanı sıra PI ile de boyandıkları; canlı hücrelerin ise Anneksin V'ye bağlanmadıkları ve PI ile boyanmadıkları gösterilmiştir. Bu çalışma için FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, USA) protokolü uygulandı. Hücreler 72 saat sonunda tripsinize edildikten sonra 800 rpm'de 5 dakika satrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti son konsantrasyon 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde 1X Annexin V Binding Buffer ile çözüldü. Bu süspansiyondan 200µl alındı ve üzerine 1µl AnnexinV-FITC, 5 µl PI ilave edilerek vortekslendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda 400µl "Annexin V binding buffer" eklenip vortekslendi ve 30 dakika içinde flow sitometride (BD Accuri Plus) okuma yapıldıktan sonra sonuçlar BD Accuri Software programı kullanılarak analiz edildi.

3.3.4. Sitotoksosite çalışmaları (Hücre proliferasyon testi)

Hücre Hattı

Çalışmada kullanılan 3T3 fibroblast hücre hattı Şap Enstitüsü hücre koleksiyonundan temin edildi.

Hücre Kültürü Besi Ortamının Hazırlanması

Hücre kültürü vasatı içine son konsantrasyonu 100 U/ml olacak şekilde penisilin, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde streptomisin, son konsantrasyonu 0,2 mM olacak şekilde L-glutamin ve son konsantrasyonu %10 olacak şekilde 0,45 µm gözenek çaplı steril filtreden süzülerek fetal bovin serumu (FBS) ilave edildi. Tüm bileşenler 0,22 µm gözenek çaplı steril filtreden süzüldü.

Monolayer Hücre Kültürünün Hazırlanması

T25 cm² hücre kültürü üretme kabında bulunan 3T3 fibroblast hücreleri tek tabaka hücre kültürü, önce Ca-Mg içermeyen fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7.2) ile ön yıkama yapıldı ve Tripsin/EDTA (%0,025 tripsin / %0,02 etilendiaminterasetik asit) solüsyonu ile 37°C inkübatörde tripsinizasyona bırakılarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücreler %10 FBS serum içeren besi ortamı ile homojenize edilerek T75 cm² hücre üretme kabına aktarılıp pasajlama yoluyla ölçek büyütme işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamada hücreler yine kültür kabı yüzeyini %80 kapladığında, tripsinizasyon yapılır, serumlu besi ortamı ile hücreler homojenize edilir, canlılık kontrolü ve hücre sayımı için 0,9 ml numune alınır. Alınan numune içine 0,1 ml tripan mavisi konuldu ve hemasitometre kullanılarak ışık mikroskopunda hücre sayımı yapıldı. Hücre canlılığı ve sayımı flow sitometrik yöntemle kontrol edildi. (BD Accuri C6 Flow Sitometri, USA).

3T3 Fibroblast Hücrelerinde Proliferasyon Çalışması

3T3 fibroblast hücreleri, ısı ile inaktifleştirilmiş %10'luk FBS (fetal bovin serumu), 2µM L-glutamin, 100 µg/ml streptomisin ve 100 u/ml penisilin içeren DMEM (Dulbecco's modified

eagles medium) vasatında %5 karbondioksit içeren ve 37°C olan inkübatörde kültüre edildi. Tripsinizasyondan sonra 96 kuyucuklu kültür plaklarına kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra test edilecek bileşenler değişik konsantrasyonlarda (10, 1, 0,1 μ M) eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hiçbir madde uygulanmamış hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. Deneyin sonunda 10 μ l MTT solüsyonu (5 mg/ml) her kuyucuğa eklendi ve Mikrotiter plaklar 4 saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklardaki reaksiyona girmeyen süpernatantlar çıkarılarak üzerlerine 100 μ l sodyum dodesil sülfat (SDS) eklendi. (Roche MTT Cell Proliferation Kit). Daha sonra mor formazon kristalleri eriyinceye kadar 24 saat inkübatörde bekletildikten sonra kuyucukların absorban değerleri 570 nm dalga boyunda mikropate ELISA okuyucuda belirlendi. Bütün gruplar en az 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Hücre canlılığı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = 100 \times \frac{(\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{kör}})}{(\text{OD}_{\text{kontrol}} - \text{OD}_{\text{kör}})}$$

3.4. Moleküler Docking Çalışması

Moleküler kenetlenme (docking) çalışmalarında kullanılan AKE ve BKE enzimlerinin kristal yapıları sırasıyla 1EVE [207] ve 4POI [208] erişim kodlarıyla RCBS protein veri bankasından (<http://www.rcsb.org/pdb>) alınmıştır. Moleküler docking çalışmaları Molecular Operating Environment (MOE) [209] programı ile gerçekleştirilmiştir. Ligand veya enzimden 4.5 Å mesafeden daha uzakta bulunan bağlı bileşikler ve su molekülleri enzimlerin kristal yapısından silinmiştir. Enzim-ligand kompleksi protonlanmış ve AMBER99 kuvvet alanı ile minimize edilmiştir. Enzim yükleri AMBER99, ligand yükleri ise MMF94X kuvvet alanları kullanılarak saptanmıştır. Enzimlerin aktif bölgesi, MOE yazılımı içerisinde yer alan “site finder” modülü ile tespit edilmiştir. Her bir ligand için enzimin aktif bölgesine en iyi kenetlenen 30 ligand pozu, triangle matcher algoritması ile London dG ve GBVI/WSA dG skorlama fonksiyonları kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen bütün pozlar incelenmiş ve her bileşiğin en düşük bağlanma enerjisine sahip en iyi skorlanmış pozu ilgili enzimle etkileşimlerinin araştırılması için seçilmiştir.

3.5. Fizikokimyasal Parametre Hesaplama Çalışmaları

Sentez edilen bileşiklerden en aktif olanlar seçilerek ilaç olabilirliklerini değerlendirmek için bazı fizikokimyasal parametreleri hesaplanmıştır. Molekül ağırlığı, logP, topolojik polar yüzey alanı (tPSA), hidrojen bağı akseptör (HBA) sayısı, hidrojen bağı donör (HBD) sayısı ve moleküler hacim değerleri Molinspiration online hesaplama programı kullanılarak elde edilmiştir. Ayrıca bileşiklerin kan beyin bariyeri penetrasyonları admetSAR online programı kullanılarak belirlenmiştir.

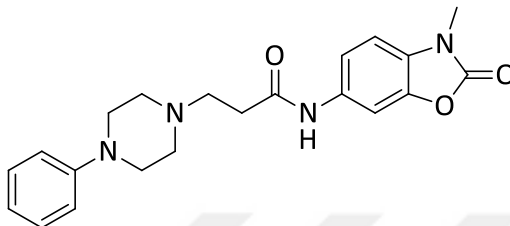




4. BULGULAR

4.1. Kimyasal Bulgular

4.1.1. *N*-(3-Metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)-3-(4-fenilpiperazin-1-il)propanamit (Bileşik 1)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-*N*-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K₂CO₃ ve 0,58 ml (0,0038 mol) 1-fenilpiperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Asetonitrilden kristallendirildi. 502 mg elde edildi, verim %88'dir. Erime derecesi: 215.9°C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.13 (s, 1H, N-H), 7.72 (d, 1H, *J*=1.7 Hz, H⁷), 7.26 (dd, 1H, *J*=8.2 Hz, *J*=1.7 Hz, H⁵), 7.19-7.13 (m, 3H, H^{3'}, H^{5'}, H⁴), 6.90 (d, 2H, *J*=8 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 6.74 (t, 1H, *J*=8 Hz, H^{4'}), 3.28 (s, 3H, N-CH₃), 3.11 (t, 4H, *J*=4.9 Hz, H³, H⁵-piperazin), 2.67 (t, 2H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.55 (t, 4H, *J*=4.9 Hz, H², H⁶-piperazin), 2.48 (m, 2H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.01, 154.10, 150.96, 141.73, 134.37, 128.85, 127.14, 118.73, 115.30, 114.43, 108.76, 101.49, 53.68, 52.42, 48.17, 34.10, 27.97.

C₂₁H₂₄N₄O₃ için;

Hesaplanan: 381.1927

HRMS (m/z) [M+H]⁺

Bulunan: 381.1929

C₂₁H₂₄N₄O₃ için;

Hesaplanan % C=66.30

H=6.36

N=14.73

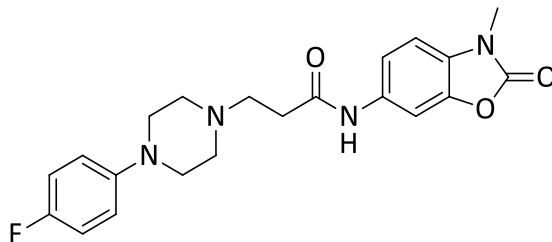
Elementel Analiz

Bulunan % C=65.98

H=6.39

N=14.85

4.1.2. 3-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 2)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K₂CO₃ ve 685 mg (0,0038 mol) 1-(4-florofenil)piperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Asetonitrilden kristallendirildi. 537 mg elde edildi, verim %90'dır. Erime derecesi: 239.3 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.12 (s, 1H, N-H), 7.72 (d, 1H, J=1.7 Hz, H⁷), 7.26 (dd, 1H, J=8.3 Hz, J=1.7 Hz, H⁵), 7.14 (d, 1H, J=8.3 Hz, H⁴), 7.03-6.99 (m, 2H, H^{3'}, H^{5'}), 6.93-6.90 (m, 2H, H^{2'}, H^{6'}), 3.28 (s, 3H, N-CH₃), 3.05 (t, 4H, J=4.7 Hz, H³, H⁵-piperazin), 2.67 (t, 2H, J=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.54 (t, 4H, J=4.7 Hz, H², H⁶-piperazin), 2.50-2.47 (m, 2H, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 169.94, 155.87 (d, J=233.9 Hz), 154.04, 147.81, 141.67, 134.31, 127.07, 116.95 (d, J=7.6 Hz), 115.11 (d, J=21.4 Hz), 114.37, 108.69, 101.42, 53.59, 52.34, 48.88, 34.04, 27.91.

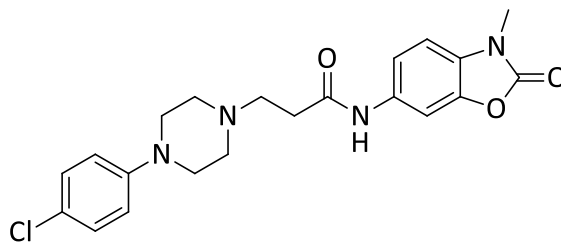
C₂₁H₂₃FN₄O₃ için; Hesaplanan: 399.1832

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 399.1837

C₂₁H₂₃FN₄O₃ için; Hesaplanan % C=62.90 H=5.82 N=14.06

Elementel Analiz Bulunan % C=62.54 H=5.99 N=14.06

4.1.3. 3-(4-(4-Klorofenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 3)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K_2CO_3 ve 747 mg (0,0038 mol) 1-(4-klorofenil)piperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Butanolden kristallendirildi. 454 mg elde edildi, verim %73'tür. Erime derecesi: 249.7°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 10.11 (s, 1H, N-H), 7.72 (s, 1H, H^7), 7.26 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, H^5), 7.19 (d, 2H, $J=9$ Hz, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 7.14 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, H^4), 6.91 (d, 2H, $J=9$ Hz, $H^{2'}$, $H^{6'}$), 3.31 (s, 3H, N- CH_3), 3.10 (bt, 4H, H^3 , H^5 -piperazin), 2.66 (t, 2H, $J=7$ Hz, -N- $\underline{CH_2}$ - CH_2 -), 2.53 (bt, 4H, H^2 , H^6 -piperazin), 2.50-2.46 (m, 2H, -N- $\underline{CH_2}$ - $\underline{CH_2}$ -, DMSO ile birlikte).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 169.92, 154.04, 149.69, 141.66, 134.29, 128.46, 127.08, 122.16, 116.68, 114.38, 108.69, 101.43, 53.57, 52.18, 47.91, 34.03, 27.91.

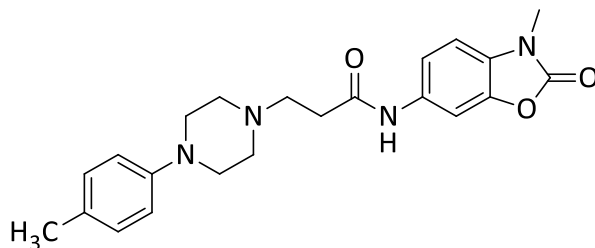
$C_{21}H_{23}ClN_4O_3$ için; Hesaplanan: 415.1537

HRMS (m/z) $[M+H]^+$ Bulunan: 415.1539

$C_{21}H_{23}ClN_4O_3$ için; Hesaplanan % C=58.68 H=5.59 N=13.10

Elementel Analiz Bulunan % C=58.28 H=5.92 N=12.97

4.1.4. 3-(4-(4-Metilfenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 4)



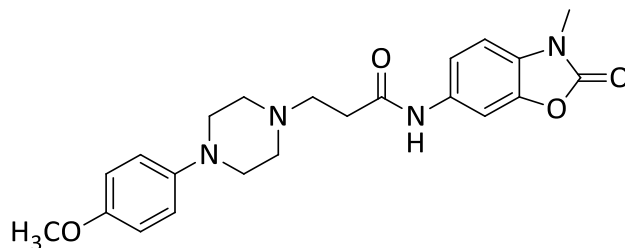
382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K_2CO_3 ve 670 mg (0,0038 mol) 1-(4-metilfenil)piperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 473 mg elde edildi, verim %80'dir. Erime derecesi: 244°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 10.14 (s, 1H, N-H), 7.74 (d, 1H, $J=2$ Hz, H^7), 7.28 (dd, 1H, $J=8.5$ Hz, $J=2$ Hz, H^5), 7.16 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H^4), 7.01 (d, 2H, $J=8.6$ Hz, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 6.82 (d, 2H, $J=8.6$ Hz, H^2 , $H^{6'}$), 3.31 (s, 3H, N- CH_3), 3.06 (t, 4H, $J=4.9$ Hz, H^3 , H^5 -piperazin), 2.68 (t, 2H, $J=7$ Hz, -N- $\underline{CH_2}$ - CH_2 -), 2.56 (t, 4H, $J=4.9$ Hz, H^2 , H^6 -piperazin), 2.52-2.49 (m, 2H, -N- $\underline{CH_2}$ - $\underline{CH_2}$ -, DMSO ile birlikte), 2.19 (s, 3H, fenil- CH_3).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 169.94, 154.04, 148.84, 141.66, 134.31, 129.22, 127.46, 127.07, 115.51, 114.37, 108.70, 101.42, 53.63, 52.38, 48.60, 34.04, 27.91, 19.92.

$C_{22}H_{26}N_4O_3$ için;	Hesaplanan:	395.2083		
HRMS (m/z) $[M+H]^+$	Bulunan:	395.2083		
$C_{22}H_{26}N_4O_3 \cdot 0.5C_2H_5OH$ için;	Hesaplanan %	C=66.16	H=7.00	N=13.41
Elementel Analiz	Bulunan %	C=65.76	H=7.05	N=13.42

4.1.5. 3-(4-(4-Metoksifenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 5)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K_2CO_3 ve 730 mg (0,0038 mol) 1-(4-metoksifenil)piperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 498 mg elde edildi, verim %81'dir. Erime derecesi: 214.7°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 10.12 (s, 1H, N-H), 7.71 (d, 1H, $J=2$ Hz, H^7), 7.26 (dd, 1H, $J=8.4$ Hz, $J=2$ Hz, H^5), 7.14 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H^4), 6.86 (d, 2H, $J=9$ Hz, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 6.78 (d, 2H, $J=9$ Hz, $H^{2'}$, $H^{6'}$), 3.65 (s, 3H, O-CH₃), 3.29 (s, 3H, N-CH₃), 2.99 (t, 4H, $J=4.7$ Hz, H^3, H^5 -piperazin), 2.66 (t, 2H, $J=7$ Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.54 (t, 4H, $J=4.8$ Hz, H^2, H^6 -piperazin), 2.49-2.46 (m, 2H, $J=7$ Hz, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 169.95, 154.04, 152.78, 145.30, 141.67, 134.31, 127.08, 117.19, 114.39, 114.14, 108.69, 101.44, 55.08, 53.61, 52.45, 49.52, 34.04, 27.91.

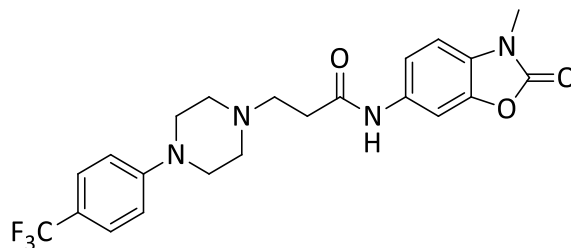
$C_{22}H_{26}N_4O_4$ için; Hesaplanan: 411.2032

HRMS (m/z) $[M+H]^+$ Bulunan: 411.2028

$C_{22}H_{26}N_4O_4 \cdot 1H_2O$ için; Hesaplanan % C=61.66 H=6.58 N= 13.07

Elementel Analiz Bulunan % C=61.77 H=6.68 N=13.17

4.1.6. 3-(4-(4-Triflorometilfenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 6)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K_2CO_3 ve 875 mg (0,0038 mol) 1-(4-(triflorometil)fenil)piperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Butanolden kristallendirildi. 255 mg elde edildi, verim %38'dir. Erime derecesi: 257°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 10.10 (s, 1H, N-H), 7.72 (d, 1H, $J=1.7$ Hz, H^7), 7.47 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 7.27 (dd, 1H, $J=8.3$ Hz, $J=1.7$ Hz, H^5), 7.14 (d, 1H, $J=8.3$ Hz, H^4), 7.04 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, $H^{2'}$, $H^{6'}$), 3.31 (s, 3H, N-CH₃), 3.25 (t, 4H, $J=4.9$ Hz, H^3 , H^5 -piperazin), 2.67 (t, 2H, $J=7$ Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.54 (t, 4H, $J=4.9$ Hz, H^2 , H^6 -piperazin), 2.51-2.47 (m, 2H, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 169.89, 154.03, 153.13, 141.68, 134.29, 127.10, 125.99 (q, $J=3.9$ Hz), 124.88 (q, $J=269$ Hz), 117.71 (q, $J=31.7$), 114.46, 114.03, 108.63, 101.50, 53.54, 52.03, 46.92, 34.04, 27.89.

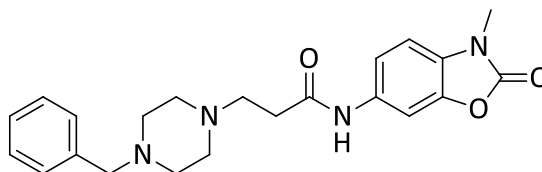
$C_{22}H_{23}F_3N_4O_3$ için; Hesaplanan: 449.1801

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 449.1801

$C_{22}H_{23}F_3N_4O_3$ için; Hesaplanan % C=58.79 H=5.17 N=12.49

Elementel Analiz Bulunan % C=58.39 H=4.95 N=12.67

4.1.7. 3-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 7)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K₂CO₃ ve 670 mg (0,0038 mol) 1-benzilpiperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. 2-propanolden kristallendirildi. 414 mg elde edildi, verim %70'tir. Erime derecesi: 183.5 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.12 (s, 1H, N-H), 7.69 (d, 1H, J=2 Hz, H⁷), 7.31-7.19 (m, 6H, H⁵, fenil protonları), 7.14 (d, 1H, J=8.4 Hz, H⁴), 3.42 (s, 2H, -CH₂- C₆H₅), 3.29 (s, 3H, N-CH₃), 2.59 (t, 2H, J=7.2 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.43 (t, 2H, J=7.2 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.41-2.35 (m, 8H, piperazin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 169.98, 154.07, 141.71, 138.16, 134.35, 128.72, 128.05, 127.10, 126.79, 114.38, 108.71, 101.45, 61.98, 53.64, 52.59, 52.40, 34.04, 27.94.

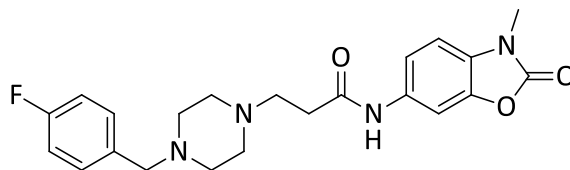
C₂₂H₂₆N₄O₃ için; Hesaplanan: 395.2083

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 395.2083

C₂₂H₂₆N₄O₃ için; Hesaplanan % C=66.99 H=6.64 N=14.20

Elementel Analiz Bulunan % C=66.86 H=6.64 N=14.15

4.1.8. 3-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 8)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K_2CO_3 ve 737 mg (0,0038 mol) 1-(4-florobenzil)piperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Butanolden kristallendirildi. 457 mg elde edildi. Verim %74'tür. Erime derecesi: 164.2 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 10.12 (s, 1H, N-H), 7.69 (d, 1H, $J=2$ Hz, H^7), 7.31-7.23 (m, 2H, $H^{2'}$, $H^{6'}$, H^5), 7.15-7.08 (m, 3H, $H^{3'}$, $H^{5'}$, H^4), 3.41 (s, 2H, $-CH_2-C_6H_5$) 3.29 (s, 3H, N- CH_3), 2.59 (t, 2H, $J=7$ Hz, $-N-CH_2-CH_2-$), 2.42 (t, 2H, $J=7$ Hz, $-N-CH_2-CH_2-$), 2.40-2.30 (m, 8H, piperazin).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 169.95, 161.12 (d, $J=240.8$ Hz), 154.04, 141.67, 134.30 (d, $J=2.3$ Hz), 134.27, 130.50 (d, $J=8.4$ Hz), 127.06, 114.74 (d, $J=20.5$ Hz), 114.33, 108.69, 101.40, 60.99, 53.61, 52.44, 52.36, 33.99, 27.91.

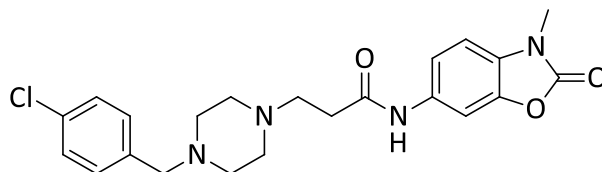
$C_{22}H_{25}FN_4O_3$ için; Hesaplanan: 413.1989

HRMS (m/z) $[M+H]^+$ Bulunan: 413.1986

$C_{22}H_{25}FN_4O_3$ için; Hesaplanan % C=64.06 H=6.16 N=13.43

Elementel Analiz Bulunan % C=63.62 H=6.15 N=13.50

4.1.9. 3-(4-(4-Klorobenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 9)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K₂CO₃ ve 0,70 ml (0,0038 mol) 1-(4-klorobenzil)piperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Metanolden kristallendirildi. 437 mg elde edildi, verim %68'dir. Erime derecesi: 170 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.11 (s, 1H, N-H), 7.71 (d, 1H, J=1.6 Hz, H⁷), 7.36 (d, 2H, J=8.4 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 7.30 (d, 2H, J=8.4 Hz, H^{3'}, H^{5'}), 7.26 (dd, 1H, J=8.4 Hz, J=1.6 Hz, H⁵), 7.15 (d, 1H, J=8.4 Hz, H⁴), 3.44 (s, 2H, -CH₂-C₆H₅), 3.31 (s, 3H, N-CH₃), 2.62 (t, 2H, J=7.2 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.44 (t, 2H, J=7.2 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.42-2.32 (m, 8H, piperazin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 169.96, 154.07, 141.71, 137.28, 134.34, 131.31, 130.47, 128.04, 127.09, 114.38, 108.70, 101.45, 61.01, 53.63, 52.51, 52.38, 34.03, 27.95.

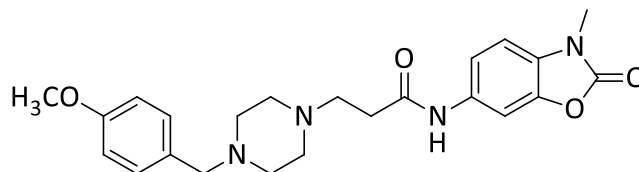
C₂₂H₂₅ClN₄O₃ için; Hesaplanan: 429.1693

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 429.1693

C₂₂H₂₅ClN₄O₃ için; Hesaplanan % C=60.33 H=5.98 N=12.79

Elementel Analiz Bulunan % C=60.29 H=6.13 N=12.79

4.1.10. 3-(4-(4-Metoksibenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 10)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K₂CO₃ ve 784 mg (0,0038 mol) 1-(4-metoksibenzil)piperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 216 mg elde edildi, verim %34'tür. Erime derecesi: 168.7 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.12 (s, 1H, N-H), 7.70 (d, 1H, J=1.6 Hz, H⁷), 7.26 (dd, 1H, J=8.4 Hz, J=1.6 Hz, H⁵), 7.18 (d, 2H, J=8.2 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 7.14 (d, 1H, J=8.4 Hz, H⁴), 6.86 (d, 2H, J=8.2 Hz, H^{3'}, H^{5'}), 3.73 (s, 3H, O-CH₃), 3.37 (s, 2H, -CH₂-C₆H₅), 3.31 (s, 3H, N-CH₃), 2.61 (t, 2H, J=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.44 (t, 2H, J=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.42-2.32 (m, 8H, piperazin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.49, 158.68, 154.59, 142.21, 134.86, 130.45, 127.59, 114.87, 113.95, 109.23, 101.94, 61.89, 55.43, 54.16, 52.97, 52.91, 34.53, 28.45.

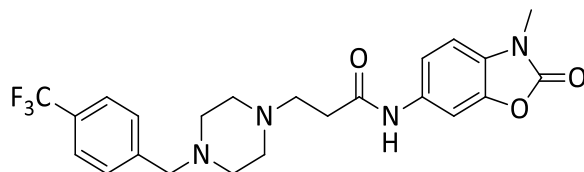
C₂₃H₂₈N₄O₄ için; Hesaplanan: 425.2189

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 425.2189

C₂₃H₂₈N₄O₄ için; Hesaplanan % C=64.39 H=6.69 N=13.05

Elementel Analiz Bulunan % C=64.42 H=6.47 N=13.22

4.1.11. 3-(4-(4-Triflorometilbenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 11)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K₂CO₃ ve 0,75 ml (0,0038 mol) 1-(4-triflorometilbenzil)piperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. 2-propanolden kristallendirildi. 451 mg elde edildi, verim %65'tir. Erime derecesi: 163.8 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.15 (s, 1H, N-H), 7.69 (d, 1H, J=2 Hz, H⁷), 7.65 (d, 2H, J=8.2 Hz, H^{3'}, H^{5'}), 7.49 (d, 2H, J=8.4 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 7.24 (dd, 1H, J=8.7 Hz, J=2 Hz, H⁵), 7.14 (d, 1H, J=8.7 Hz, H⁴), 3.55 (s, 2H, -CH₂- C₆H₅), 3.31 (s, 3H, N-CH₃), 2.63 (t, 2H, J=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.45 (t, 2H, J=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.43-2.38 (m, 8H, piperazin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 169.94, 154.05, 141.68, 134.32, 129.25, 127.48 (q, J=31.4 Hz), 127.07, 125.62, 124.32 (q, J=3.6 Hz), 124.28 (q, J=269.9 Hz), 114.34, 108.69, 101.41, 61.19, 53.61, 52.47, 52.36, 34.01, 27.92.

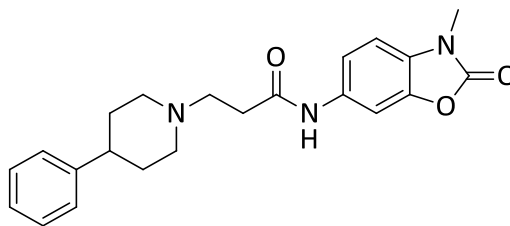
C₂₃H₂₅F₃N₄O₃ için; Hesaplanan: 463.1957

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 463.1957

C₂₃H₂₅F₃N₄O₃ için; Hesaplanan % C=59.73 H=5.45 N=12.11

Elementel Analiz Bulunan % C=59.39 H=5.73 N=12.08

4.1.12. 3-(4-Fenilpiperidin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 12)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K₂CO₃ ve 612 mg (0,0038 mol) 4-fenilpiperidin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Metanolden kristallendirildi. 472 mg elde edildi, verim %83'tür. Erime derecesi: 171.2 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.15 (s, 1H, N-H), 7.72 (d, 1H, *J*=2 Hz, H⁷), 7.28-7.14 (m, 7H, H⁴, H⁵, fenil protonları), 3.29 (s, 3H, N-CH₃), 2.98 (d, 2H, *J*=11.2 Hz, H^{2e}, H^{6e}-piperidin), 2.65 (t, 2H, *J*=7.2 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.49-2.43 (m, 3H, H₄-piperidin, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte), 2.05 (td, 2H, *J*=11.2 Hz, *J*=2 Hz, H^{2a}, H^{6a}-piperidin, 1.75-1.59 (m, 4H, H³, H⁵-piperidin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.09, 154.06, 146.12, 141.70, 134.37, 128.22, 127.07, 126.58, 125.89, 114.36, 108.71, 101.43, 53.99, 53.40, 41.71, 34.19, 33.03, 27.92.

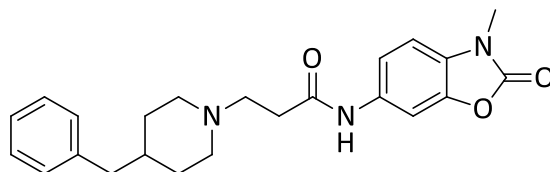
C₂₂H₂₅N₃O₃ için; Hesaplanan: 380.1974

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 380.1973

C₂₂H₂₅N₃O₃ için; Hesaplanan % C=69.64 H=6.64 N=11.07

Elementel Analiz Bulunan % C=69.51 H=6.62 N=11.26

4.1.13. 3-(4-Benzilpiperidin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 13)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K₂CO₃ ve 0,68 ml (0,0038 mol) 4-benzilpiperidin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 312 mg elde edildi, verim %53'tür. Erime derecesi: 164.1 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.16 (s, 1H, N-H), 7.69 (d, 1H, *J*=2 Hz, H⁷), 7.26-7.12 (m, 7H, H⁴, H⁵, fenil protonları), 3.29 (s, 3H, N-CH₃), 2.83 (d, 2H, *J*=10.8 Hz, H^{2e}, H^{6e}-piperidin), 2.56 (t, 2H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.47 (m, 2H, -CH₂-C₆H₅, DMSO ile birlikte), 2.41 (t, 2H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 1.86 (t, 2H, *J*=10.8 Hz, H^{2a}, H^{6a}-piperidin), 1.53-1.45 (m, 3H, H^{3e}, H^{5e}, H⁴-piperidin), 1.18-1.13 (m, 2H, H^{3a}, H^{5a}-piperidin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.06, 154.05, 141.68, 140.25, 134.35, 128.86, 127.99, 127.04, 125.61, 114.31, 108.69, 101.38, 53.94, 52.89, 42.22, 37.24, 34.14, 31.68, 27.91.

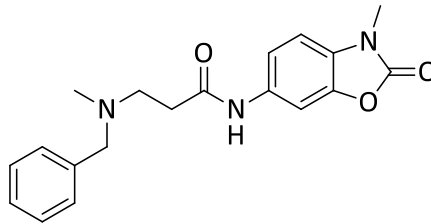
C₂₃H₂₇N₃O₃ için; Hesaplanan: 394.2131

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 394.2130

C₂₃H₂₇N₃O₃ için; Hesaplanan % C=70.21 H=6.92 N=10.68

Elementel Analiz Bulunan % C=69.91 H=6.86 N=10.85

4.1.14. 3-(Benzil(metil)amino)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 14)



382 mg (0,0015 mol) 3-kloro-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)propanamit, 675 mg (0,0045 mol) sodyum iyodür, 525 mg (0,0038 mol) K_2CO_3 ve 0,49 ml (0,0038 mol) N-metilbenzilamin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. 2-propanolden kristallendirildi. 264 mg elde edildi, verim %52'dir. Erime derecesi: 165.5°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 10.05 (s, 1H, N-H), 7.69 (s, 1H, H⁷), 7.28-7.20 (m, 6H, H⁵, fenil protonları), 7.14 (d, 1H, $J=8$ Hz, H⁴), 3.51 (s, 2H, $-CH_2-C_6H_5$), 3.29 (s, 3H, N-CH₃), 2.70 (t, 2H, $J=6.8$ Hz, $-N-CH_2-CH_2-$), 2.49 (t, 2H, $J=6.8$ Hz, $-N-CH_2-CH_2-$), 2.15 (s, 3H, N₂-CH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 170.00, 154.11, 141.72, 134.38, 128.71, 128.08, 127.13, 126.87, 114.46, 108.73, 101.51, 60.99, 52.84, 41.50, 34.50, 27.97.

$C_{19}H_{21}N_3O_3$ için;

Hesaplanan: 340.1661

HRMS (m/z) [M+H]⁺

Bulunan: 340.1662

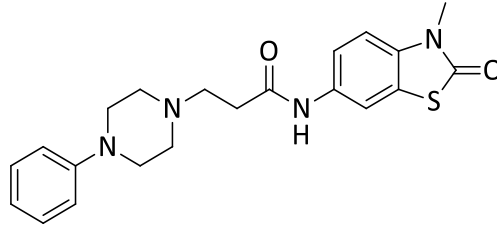
$C_{19}H_{21}N_3O_3$ için;

Hesaplanan % C=67.24 H=6.24 N=12.38

Elementel Analiz

Bulunan % C=66.84 H=6.47 N=12.40

4.1.15. *N*-(3-Metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)-3-(4-fenilpiperazin-1-il)propanamit (Bileşik 15)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3*H*)-on, 515 mg (0,0022 mol) 3-(4-fenilpiperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Metanolden kristallendirildi. 476 mg elde edildi, verim %60'dir. Erime derecesi: 178.6 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 10.14 (s, 1H, N-H), 7.95 (s, 1H, H⁷), 7.45 (dd, 1H, *J*=8.7 Hz, *J*=1.6 Hz, H⁵), 7.21 (d, 1H, *J*=8.7 Hz, H⁴), 7.18 (t, 2H, *J*=7.6 Hz, H^{3'}, H^{5'}), 6.90 (d, 2H, *J*=7.6 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 6.74 (t, 1H, *J*=7.6 Hz, H^{4'}), 3.35 (s, 3H, N-CH₃), 3.10 (m, 4H, H³, H⁵-piperazin), 2.67 (t, 2H, *J*=6.8 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.55 (m, 4H, H², H⁶-piperazin), 2.52-2.46 (m, 3H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 170.06, 168.41, 150.97, 134.89, 133.24, 128.87, 121.50, 118.75, 117.93, 115.31, 113.35, 111.29, 53.72, 52.43, 48.18, 34.07, 28.95.

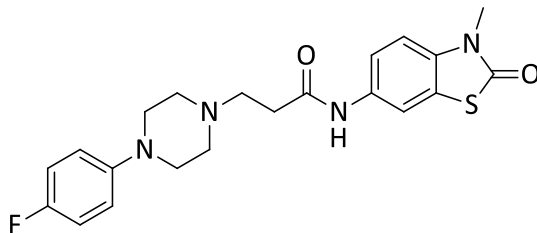
C₂₁H₂₄N₄O₂S için; Hesaplanan: 397.1698

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 397.1702

C₂₁H₂₄N₄O₂S için; Hesaplanan % C=63.61 H=6.10 N=14.13 S=8.09

Elementel Analiz Bulunan % C=63.40 H=6.04 N=13.91 S=7.99

4.1.16. 3-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 16)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 555 mg (0,0022 mol) 3-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Butanolden kristallendirildi. 588 mg elde edildi, verim %71'dir. Erime derecesi: 176.4 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.13 (s, 1H, N-H), 7.94 (d, 1H, J=1.7 Hz, H⁷), 7.45 (dd, 1H, J=8.7 Hz, J=1.7 Hz, H⁵), 7.21 (d, 1H, J=8.7 Hz, H⁴), 7.03-6.99 (m, 2H, H^{3'}, H^{5'}), 6.93-6.89 (m, 2H, H^{2'}, H^{6'}), 3.35 (s, 3H, N-CH₃), 3.05 (t, 4H, J=4.8 Hz, H³, H⁵-piperazin), 2.67 (t, 2H, J=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.55 (t, 4H, J=4.8 Hz, H², H⁶-piperazin), 2.51-2.47 (m, 3H, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.06, 168.42, 155.95 (d, J=234.7 Hz), 147.87 (d, J=2.3 Hz), 134.99, 133.25, 121.50, 117.95, 117.04 (d, J=7.6 Hz), 115.19 (d, J=22.1 Hz), 113.36, 111.29, 53.69, 52.42, 48.96, 34.07, 28.95.

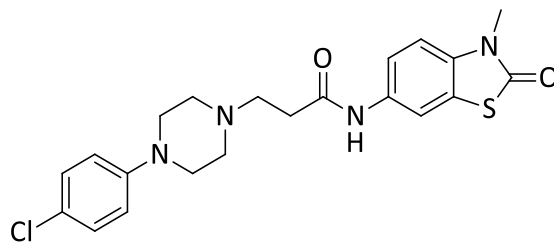
C₂₁H₂₃FN₄O₂S için; Hesaplanan: 415.1604

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 415.1608

C₂₁H₂₃FN₄O₂S için; Hesaplanan % C=60.85 H=5.59 N=13.52 S=7.74

Elementel Analiz Bulunan % C=60.46 H=5.90 N=13.17 S=7.60

4.1.17. 3-(4-(4-Klorofenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 17)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3*H*)-on, 591 mg (0,0022 mol) 3-(4-(4-klorofenil)piperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Butanolden kristallendirildi. 620 mg elde edildi, verim %72'dir. Erime derecesi: 200.3 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 10.11 (s, 1H, N-H), 7.93 (d, 1H, *J*=2 Hz, H⁷), 7.48 (dd, 1H, *J*=8.7 Hz, *J*=2 Hz, H⁵), 7.23 (d, 1H, *J*=8.7 Hz, H⁴), 7.21 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, H^{3'}, H^{5'}), 6.94 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 3.37 (s, 3H, N-CH₃), 3.22-3.10 (m, 6H, H³, H⁵-piperazin, -N-CH₂-CH₂-), 2.66-2.50 (m, 6H, H², H⁶-piperazin, -N-CH₂-CH₂-).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 169.53, 168.39, 149.45, 134.91, 133.29, 128.58, 122.52, 121.48, 118.00, 116.89, 113.38, 111.28, 53.19, 51.93, 47.41, 33.33, 28.95.

C₂₁H₂₃ClN₄O₂S için;

Hesaplanan: 431.1309

HRMS (m/z) [M+H]⁺

Bulunan: 431.1317

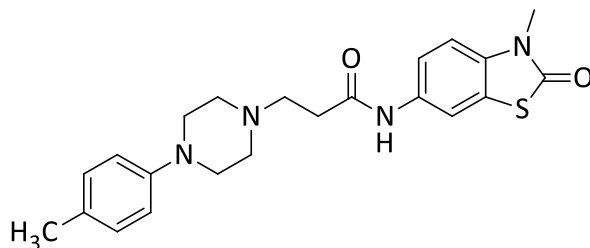
C₂₁H₂₃ClN₄O₂S.1H₂O için;

Hesaplanan % C=56.18 H=5.61 N=12.48 S=7.14

Elementel Analiz

Bulunan % C=56.14 H=5.75 N=12.38 S=7.09

4.1.18. 3-(4-(4-Metilfenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 18)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3*H*)-on, 546 mg (0,0022 mol) 3-(4-(4-metilfenil)piperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Butanolden kristallendirildi. 738 mg elde edildi, verim %90'dır. Erime derecesi: 216.8°C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 10.15 (s, 1H, N-H), 7.95 (d, 1H, *J*=2 Hz, H⁷), 7.46 (dd, 1H, *J*=8.8 Hz, *J*=2 Hz, H⁵), 7.22 (d, 1H, *J*=8.8 Hz, H⁴), 6.99 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, H^{3'}, H^{5'}), 6.80 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 3.35 (s, 3H, N-CH₃), 3.05 (t, 4H, *J*=4.7 Hz, H³, H⁵-piperazin), 2.67 (t, 2H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.55 (t, 4H, *J*=4.7 Hz, H², H⁶ piperazin), 2.52-2.47 (m, 3H, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte), 2.18 (s, 3H, fenil-CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 170.09, 168.43, 148.93, 135.01, 133.26, 129.32, 127.56, 121.51, 117.96, 115.60, 113.36, 111.32, 53.73, 52.47, 48.68, 34.08, 28.96, 20.02.

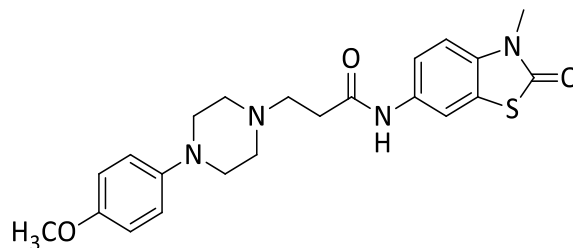
C₂₂H₂₆N₄O₂S için; Hesaplanan: 411.1855

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 411.1861

C₂₂H₂₆N₄O₂S için; Hesaplanan % C=64.36 H=6.38 N=13.65 S=7.81

Elementel Analiz Bulunan % C=64.27 H=6.44 N=13.55 S=7.76

4.1.19. 3-(4-(4-Metoksifenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 19)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 582 mg (0,0022 mol) 3-(4-(4-metoksifenil)piperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Butanolden kristallendirildi. 734 mg elde edildi, verim %86'dır. Erime derecesi: 192.6°C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.17 (s, 1H, N-H), 7.96 (d, 1H, J=2 Hz, H⁷), 7.46 (dd, 1H, J=8.9 Hz, J=2 Hz, H⁵), 7.23 (d, 1H, J=8.9 Hz, H⁴), 6.87 (d, 2H, J=8.8 Hz, H^{3'}, H^{5'}), 6.79 (d, 2H, J=8.8 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 3.67 (s, 3H, O-CH₃), 3.36 (s, 3H, N-CH₃), 3.00 (t, 4H, J=4.8 Hz, H³, H⁵-piperazin), 2.68 (t, 2H, J=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.56 (t, 4H, J=4.8 Hz, H², H⁶-piperazin), 2.51-2.48 (m, 3H, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.09, 168.43, 152.85, 145.37, 135.01, 133.26, 121.51, 117.95, 117.29, 114.21, 113.36, 111.32, 55.16, 53.73, 52.55, 49.59, 34.08, 28.96.

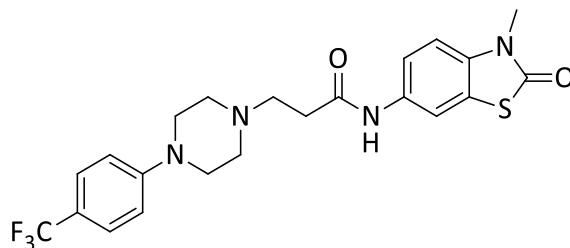
C₂₂H₂₆N₄O₃S için; Hesaplanan: 427.1804

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 427.1802

C₂₂H₂₆N₄O₃S için; Hesaplanan % C=61.95 H=6.14 N=13.14 S=7.52

Elementel Analiz Bulunan % C=62.17 H=6.20 N=13.09 S=7.52

4.1.20. 3-(4-(4-Triflorometilfenil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 20)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 665 mg (0,0022 mol) 3-(4-(4-(triflorometil)fenil)piperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 743 mg elde edildi, verim %80'dir. Erime derecesi: 213.6°C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.11 (s, 1H, N-H), 7.95 (d, 1H, J=1.6 Hz, H⁷), 7.50-7.47 (m, 3H, H^{3'}, H^{5'}, H⁵), 7.23 (d, 1H, J=8.4 Hz, H⁴), 7.05 (d, 2H, J=8.4 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 3.37 (s, 3H, N-CH₃), 3.28 (t, 4H, J=4.5 Hz, H³, H⁵-piperazin), 2.70 (t, 2H, J=6.8 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.57 (t, 4H, J=4.5 Hz, H², H⁶-piperazin), 2.54-2.49 (m, 3H, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 169.94, 168.33, 153.16, 134.94, 133.21, 126.02 (q, J=3.8 Hz), 124.90 (q, J=269.0 Hz), 121.43, 117.93, 117.75 (q, J=35.5 Hz), 114.04, 113.32, 111.18, 53.58, 52.06, 46.93, 34.01, 28.87.

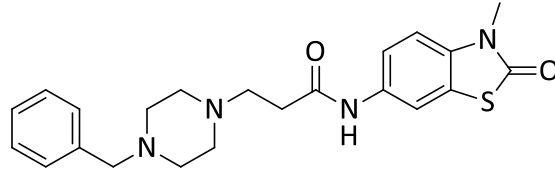
C₂₂H₂₃F₃N₄O₂S için; Hesaplanan: 465.1572

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 465.1574

C₂₂H₂₃F₃N₄O₂S için; Hesaplanan % C=56.89 H=4.99 N=12.06 S=6.90

Elementel Analiz Bulunan % C=56.97 H=4.86 N=12.11 S=6.91

4.1.21. 3-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 21)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 546 mg (0,0022 mol) 3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. 2-propanolden kristallendirildi. 575 mg elde edildi, verim %70'tir. Erime derecesi: 183.3°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 10.15 (s, 1H, N-H), 7.94 (d, 1H, $J=2$ Hz, H^7), 7.44 (dd, 1H, $J=8.6$ Hz, $J=2$ Hz, H^5), 7.33-7.22 (m, 6H, H^4 , fenil protonları), 3.44 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$), 3.37 (s, 3H, N- CH_3), 2.61 (t, 2H, $J=6.9$ Hz, $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.45 (t, 2H, $J=6.9$ Hz, $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.40-2.32 (m, 8H, piperazin).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 170.06, 168.40, 138.19, 134.99, 133.22, 128.78, 128.11, 126.85, 121.49, 117.89, 113.30, 111.31, 62.02, 53.71, 52.62, 52.45, 34.03, 28.95.

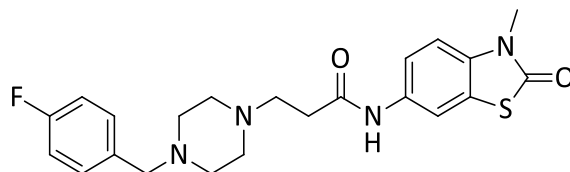
$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ için; Hesaplanan: 411.1855

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ Bulunan: 411.1847

$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ için; Hesaplanan % C=64.36 H=6.38 N=13.65 S=7.81

Elementel Analiz Bulunan % C=64.39 H=6.37 N=13.58 S=7.79

4.1.22. 3-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 22)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 585 mg (0,0022 mol) 3-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. 2-propanolden kristallendirildi. 608 mg elde edildi. Verim %71'dir. Erime derecesi: 176.7°C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.15 (s, 1H, N-H), 7.94 (d, 1H, *J*=2 Hz, H⁷), 7.44 (dd, 1H, *J*=8.8 Hz, *J*=2 Hz, H⁵), 7.32-7.28 (m, 2H, H^{2'}, H^{6'}), 7.23 (d, 1H, *J*=8.8 Hz, H⁴), 7.14-7.10 (m, 2H, H^{3'}, H^{5'}), 3.42 (s, 2H, -CH₂-C₆H₅), 3.37 (s, 3H, N-CH₃), 2.61 (t, 2H, *J*=7Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.45 (t, 2H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.40-2.30 (m, 8H, piperazin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.06, 168.40, 161.19 (d, *J*=240.8 Hz), 134.36, 134.33, 133.22, 130.58 (d, *J*=7.6 Hz), 121.49, 117.89, 114.82 (d, *J*=21.3 Hz), 113.30, 111.29, 61.06, 53.59, 52.51, 52.42, 34.03, 28.95.

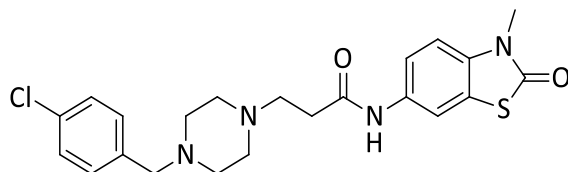
C₂₂H₂₅FN₄O₂S için; Hesaplanan: 429.1761

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 429.1754

C₂₂H₂₅FN₄O₂S için; Hesaplanan % C=61.66 H=5.88 N=13.07 S=7.48

Elementel Analiz Bulunan % C=61.27 H=5.81 N=12.93 S=7.48

4.1.23. 3-(4-(4-Klorobenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 23)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 622 mg (0,0022 mol) 3-(4-(4-klorobenzil)piperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 783 mg elde edildi, verim %88'dir. Erime derecesi: 184.9°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 10.11 (s, 1H, N-H), 7.93 (d, 1H, $J=2.1$ Hz, H^7), 7.44 (dd, 1H, $J=8.5$ Hz, $J=2.1$ Hz, H^5), 7.35 (d, 2H, $J=8.2$ Hz, $H^{2'}$, $H^{6'}$), 7.29 (d, 2H, $J=8.2$ Hz, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 7.22 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H^4), 3.43 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$), 3.36 (s, 3H, N- CH_3), 2.62 (t, 2H, $J=7$ Hz, $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.46 (t, 2H, $J=7$ Hz, $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.42-2.32 (m, 8H, piperazin).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 169.68, 168.32, 137.26, 134.95, 133.18, 131.30, 130.43, 128.00, 121.44, 117.88, 113.28, 111.19, 60.99, 53.62, 52.49, 52.36, 33.99, 28.89.

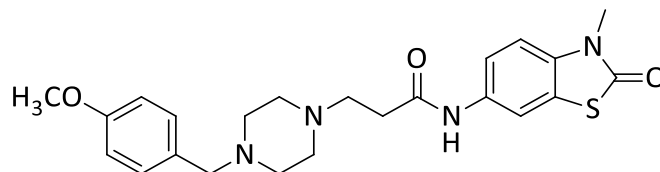
$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$ için; Hesaplanan: 445.1465

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ Bulunan: 445.1465

$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$ için; Hesaplanan % C=59.38 H=5.66 N=12.59 S=7.21

Elementel Analiz Bulunan % C=59.43 H=5.87 N=12.69 S=7.31

4.1.24. 3-(4-(4-Metoksibenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 24)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3*H*)-on, 612 mg (0,0022 mol) 3-(4-(4-metoksibenzil)piperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. 2-propanolden kristallendirildi. 608 mg elde edildi, verim %69' dur. Erime derecesi: 175.2 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 10.12 (s, 1H, N-H), 7.93 (d, 1H, *J*=2 Hz, H⁷), 7.43 (dd, 1H, *J*=8.4 Hz, *J*=2 Hz, H⁵), 7.22 (d, 1H, *J*=8.4 Hz, H⁴), 7.17 (d, 2H, *J*=8.2 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 6.86 (d, 2H, *J*=8.2 Hz, H^{3'}, H^{5'}), 3.72 (s, 3H, O-CH₃), 3.36 (s, 5H, -CH₂-C₆H₅, N-CH₃), 2.61 (t, 2H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.44 (t, 2H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.38-2.30 (m, 8H, piperazin).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 169.97, 168.31, 158.15, 134.93, 133.15, 129.93, 129.88, 121.42, 117.84, 113.42, 113.26, 111.18, 61.34, 54.89, 53.61, 52.42, 52.37, 33.97, 28.86.

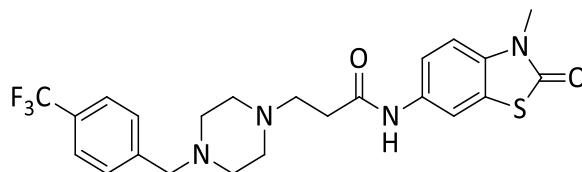
C₂₃H₂₈N₄O₃S için; Hesaplanan: 441.1960

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 441.1958

C₂₃H₂₈N₄O₃S için; Hesaplanan % C=62.70 H=6.41 N=12.72 S=7.28

Elementel Analiz Bulunan % C=62.59 H=6.59 N=12.69 S=7.32

4.1.25. 3-(4-(4-Triflorometilbenzil)piperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 25)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 696 mg (0,0022 mol) 3-(4-(4-triflorometilbenzil)piperazin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Butanolden kristallendirildi. 574 mg elde edildi, verim %60'tır. Erime derecesi: 190.8 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.11 (s, 1H, N-H), 7.93 (d, 1H, J=2 Hz, H⁷), 7.66 (d, 2H, J=8.2 Hz, H^{3'}, H^{5'}), 7.51 (d, 2H, J=8.2 Hz, H^{2'}, H^{6'}), 7.44 (dd, 1H, J=8.5 Hz, J=2 Hz, H⁵), 7.22 (d, 1H, J=8.5 Hz, H⁴), 3.54 (s, 2H, -CH₂-C₆H₅), 3.36 (s, 3H, N-CH₃), 2.62 (t, 2H, J=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.47 (t, 2H, J=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.42-2.37 (m, 8H, piperazin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 169.98, 168.34, 143.32, 134.96, 133.19, 129.25, 127.53 (q, J=31.5 Hz), 124.93 (q, J=3.8 Hz), 124.29 (q, J=269.7 Hz), 121.45, 117.89, 113.29, 111.20, 61.21, 53.63, 52.59, 52.37, 34.02, 28.89.

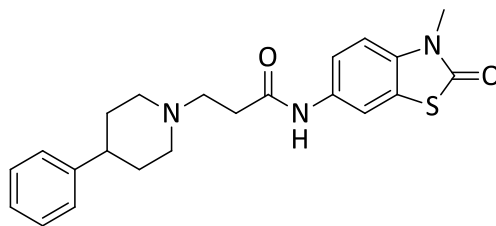
C₂₃H₂₅F₃N₄O₂S için; Hesaplanan: 479.1729

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 479.1727

C₂₃H₂₅F₃N₄O₂S için; Hesaplanan % C=57.73 H=5.27 N=11.71 S=6.70

Elementel Analiz Bulunan % C=57.78 H=5.48 N=11.62 S=6.74

4.1.26. 3-(4-Fenilpiperidin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 26)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3*H*)-on, 513 mg (0,0022 mol) 3-(4-fenilpiperidin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 577 mg elde edildi, verim %73'tür. Erime derecesi: 185.1 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 10.19 (s, 1H, N-H), 7.98 (d, 1H, *J*=2 Hz, H⁷), 7.47 (dd, 1H, *J*=8.8 Hz, *J*=2 Hz, H⁵), 7.30-7.15 (m, 6H, H⁴, fenil protonları), 3.37 (s, 3H, N-CH₃), 3.00 (d, 2H, *J*=11.6 Hz, H^{2e}, H^{6e}-piperidin), 2.67 (t, 2H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.51-2.44 (m, 3H, H⁴-piperidin, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte), 2.06 (td, 2H, *J*=11.6 Hz, *J*=2 Hz, H^{2a}, H^{6a}-piperidin), 1.76-1.59 (m, 4H, H³, H⁵-piperidin).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 170.20, 168.41, 146.19, 135.04, 135.23, 128.29, 126.66, 125.97, 121.50, 117.91, 113.32, 111.34, 54.08, 53.48, 41.78, 34.22, 33.09, 28.96.

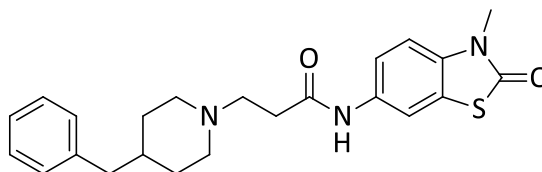
C₂₂H₂₅N₃O₂S için; Hesaplanan: 396.1746

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 396.1739

C₂₂H₂₅N₃O₂S için; Hesaplanan % C=66.81 H=6.37 N=10.62 S=8.11

Elementel Analiz Bulunan % C=66.83 H=6.43 N=10.65 S=8.12

4.1.27. 3-(4-Benzilpiperidin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 27)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 544 mg (0,0022 mol) 3-(4-benzilpiperidin-1-il)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. 2-propanolden kristallendirildi. 606 mg elde edildi, verim %74'tür. Erime derecesi: 156.4°C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.19 (s, 1H, N-H), 7.96 (d, 1H, *J*=2.3 Hz, H⁷), 7.43 (dd, 1H, *J*=9 Hz, *J*=2.3 Hz, H⁵), 7.28-7.13 (m, 6H, H⁴, fenil protonları), 3.37 (s, 3H, N-CH₃), 2.85 (d, 2H, *J*=10.9 Hz, H^{2e}, H^{6e}-piperidin), 2.58 (t, 2H, *J*=6.9 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.52-2.46 (m, 2H, -CH₂-C₆H₅, DMSO ile birlikte), 2.43 (t, 2H, *J*=6.9 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 1.87 (t, 2H, *J*=10.9 Hz, H^{2a}, H^{6a}-piperidin), 1.55-1.42 (m, 3H, H^{3e}, H^{5e}, H⁴-piperidin), 1.21-1.10 (m, 2H, H^{3a}, H^{5a}-piperidin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.19, 168.42, 140.35, 135.04, 133.21, 128.96, 128.09, 125.71, 121.50, 117.86, 113.27, 111.34, 54.05, 52.99, 42.30, 37.36, 34.18, 31.76, 28.97.

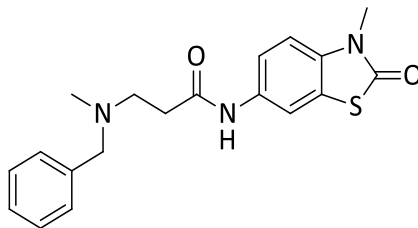
C₂₃H₂₇N₃O₂S için; Hesaplanan: 410.1902

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 410.1902

C₂₃H₂₇N₃O₂S için; Hesaplanan % C=67.45 H=6.65 N=10.26 S=7.83

Elementel Analiz Bulunan % C=67.83 H=6.68 N=10.31 S=7.83

4.1.28. 3-(Benzil(metil)amino)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 28)



360 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3*H*)-on, 425 mg (0,0022 mol) 3-(benzil(metil)amino)propanoik asit, 460 mg (0,0024 mol) EDC ve 49 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 270 mg elde edildi, verim %38'dir. Erime derecesi: 119.9°C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.07 (s, 1H, N-H), 7.94 (d, 1H, *J*=2 Hz, H⁷), 7.46 (dd, 1H, *J*=8.7 Hz, *J*=2 Hz, H⁵), 7.30-7.25 (m, 5H, fenil protonları), 7.23 (d, 1H, *J*=8.7 Hz, H⁴), 3.50 (s, 2H, -CH₂-C₆H₅), 3.37 (s, 3H, N-CH₃), 2.69 (t, 2H, *J*=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.54-2.48 (m, 3H, -N-CH₂-CH₂-), 2.15 (s, 3H, N₂-CH₃).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.04, 168.32, 138.85, 134.96, 133.18, 128.59, 127.99, 126.73, 121.40, 117.93, 113.33, 111.19, 61.02, 52.98, 41.51, 34.55, 28.89.

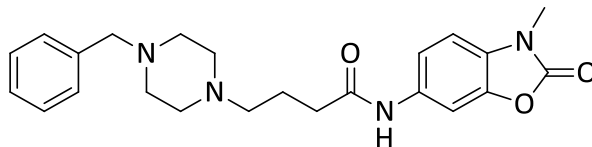
C₁₉H₂₁N₃O₂S için; Hesaplanan: 356.1433

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 356.1435

C₁₉H₂₁N₃O₂S için; Hesaplanan % C=64.20 H=5.95 N=11.82 S=9.02

Elementel Analiz Bulunan % C=63.92 H=6.14 N=11.75 S=8.98

4.1.29. 4-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)butanamit (Bileşik 29)



350 mg (0,002 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on, 616 mg (0,0022 mol) 4-(4-benzilpiperazin-1-il)butanoik asit, 491 mg (0,0024 mol) EDC ve 52 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Asetonitrilden kristallendirildi. 153 mg elde edildi, verim %18'dir. Erime derecesi: 190.3 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 9.94 (s, 1H, N-H), 7.73 (d, 1H, *J*=1.6 Hz, H⁷), 7.30-7.20 (m, 6H, fenil protonları, H⁵), 7.15 (d, 1H, *J*=1.6 Hz, H⁴), 3.41 (s, 2H, -CH₂-C₆H₅), 3.30 (s, 3H, N-CH₃), 2.40-2.24 (m, 12H, H-piperazin, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1.72 (p, 2H, *J*=7.2 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂-).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 171.04, 154.13, 141.71, 138.21, 134.57, 128.77, 128.09, 127.00, 126.82, 114.42, 108.71, 101.48, 62.00, 57.21, 52.72, 52.61, 34.30, 28.00, 22.10.

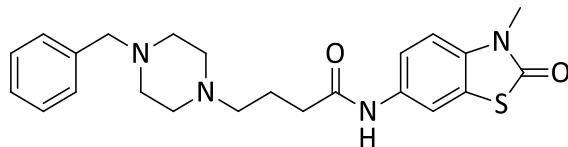
C₂₃H₂₈N₄O₃ için; Hesaplanan: 409.2240

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 409.2246

C₂₃H₂₈N₄O₃ için; Hesaplanan % C=67.63 H=6.91 N=13.72

Elementel Analiz Bulunan % C=67.29 H=7.29 N=13.64

4.1.30. 4-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)butanamit (Bileşik 30)



400 mg (0,0022 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3*H*)-on, 641 mg (0,0024 mol) 4-(4-benzilpiperazin-1-il)butanoik asit, 512 mg (0,0026 mol) EDC ve 54 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Butanolden kristallendirildi. 150 mg elde edildi, verim %16'dır. Erime derecesi: 87.3 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.92 (s, 1H, N-H), 7.94 (d, 1H, *J*=2 Hz, H⁷), 7.41 (dd, 1H, *J*=8.8 Hz, *J*=2 Hz, H⁵), 7.30-7.18 (m, 6H, fenil protonları, H⁴), 3.39 (s, 2H, -CH₂-C₆H₅), 3.31 (s, 3H, N-CH₃), 2.38-2.24 (m, 12H, H-piperazin, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1.69 (p, 2H, *J*=7.2 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂-).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 170.17, 168.29, 138.13, 135.09, 133.01, 128.68, 128.00, 126.73, 121.31, 117.83, 113.21, 111.16, 62.03, 57.19, 52.64, 52.53, 34.20, 28.86, 22.16.

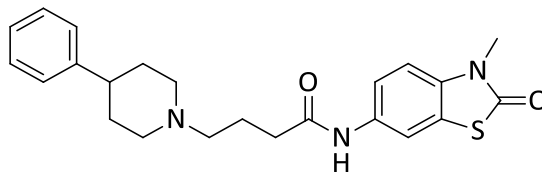
C₂₃H₂₈N₄O₂S için; Hesaplanan: 425.2011

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 425.2015

C₂₃H₂₈N₄O₂S.3H₂O için; Hesaplanan % C=57.72 H=7.16 N=11.71 S=6.81

Elementel Analiz Bulunan % C=57.49 H=7.00 N=11.80 S=6.70

4.1.31. 4-(4-Fenilpiperidin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)butanamit (Bileşik 31)



500 mg (0,0028 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3*H*)-on, 756 mg (0,0031 mol) 4-(4-fenilpiperidin-1-il)butanoik asit, 639 mg (0,0033 mol) EDC ve 68 mg (0,0005 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. 2-propanolden kristallendirildi. 600 mg elde edildi, verim %53'dir. Erime derecesi: 104.6°C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.95 (s, 1H, N-H), 7.99 (d, 1H, *J*=2 Hz, H⁷), 7.48 (dd, 1H, *J*=8.6 Hz, *J*=2 Hz, H⁵), 7.23-7.07 (m, 6H, fenil protonları, H⁴), 3.35 (s, 3H, N-CH₃), 2.91 (d, 2H, *J*=11.4 Hz, H^{2e}, H^{6e}-piperidin), 2.44-2.28 (m, 5H, H⁴-piperidin, -N-CH₂-CH₂-CH₂-), 1.91 (td, 2H, *J*=11.4 Hz, *J*=1.8 Hz, H^{2a}, H^{6a}-piperidin), 1.76 (p, 2H, *J*=6.8 Hz, -N-CH₂-CH₂-CH₂-) 1.68-1.48 (m, 4H, H³, H⁵-piperidin).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 171.24, 168.40, 146.34, 135.42, 133.04, 128.18, 126.60, 125.90, 121.46, 117.83, 113.15, 111.28, 57.74, 53.74, 41.98, 34.72, 33.12, 28.96, 22.45.

C₂₃H₂₇N₃O₂S için;

Hesaplanan: 410.1902

HRMS (m/z) [M+H]⁺

Bulunan: 410.1899

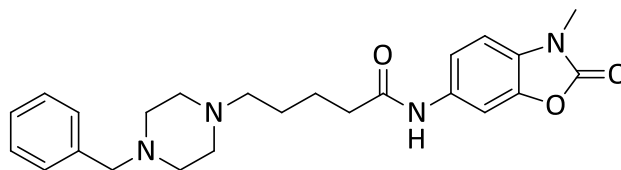
C₂₃H₂₇N₃O₂S.1,25H₂O için;

Hesaplanan % C=63.94 H=6.88 N=9.73 S=7.42

Elementel Analiz

Bulunan % C=63.96 H=7.07 N=9.88 S=7.51

4.1.32. 5-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzoksazol-6-il)pentanamit (Bileşik 32)



600 mg (0,0036 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on, 1110 mg (0,004 mol) 5-(4-benzilpiperazin-1-il)pentanoik asit, 841 mg (0,0044 mol) EDC ve 89 mg (0,0007 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Aseton-hekzan ile kristallendirildi. 347 mg elde edildi, verim %22'dir. Erime derecesi: 138.4 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 9.92 (s, 1H, N-H), 7.70 (d, 1H, J=1.6 Hz, H⁷), 7.30-7.17 (m, 6H, fenil protonları, H⁵), 7.12 (d, 1H, J=8.8 Hz, H⁴), 3.40 (s, 2H, -CH₂-C₆H₅), 3.28 (s, 3H, N-CH₃), 2.36-2.21 (m, 12H, H-piperazin, N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1.56 (p, 2H, J=7.5 Hz, N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1.41 (p, 2H, J=7.5 Hz, N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 171.07, 154.12, 141.72, 138.26, 134.50, 128.75, 128.08, 127.04, 126.81, 114.44, 108.71, 101.49, 62.10, 57.52, 52.77, 52.66, 36.17, 27.97, 25.90, 23.02.

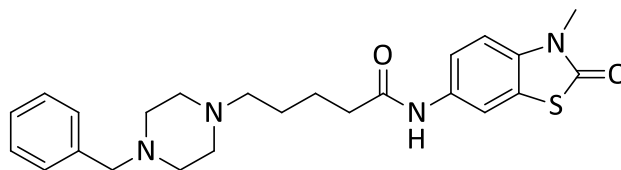
C₂₄H₃₀N₄O₃ için; Hesaplanan: 423.2396

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 423.2387

C₂₄H₃₀N₄O₃ için; Hesaplanan % C=68.22 H=7.16 N=13.26

Elementel Analiz Bulunan % C=67.97 H=7.45 N=13.11

4.1.33. 5-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)pentanamit (Bileşik 33)



600 mg (0,0033 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 1012 mg (0,0036 mol) 5-(4-benzilpiperazin-1-il)pentanoik asit, 767 mg (0,004 mol) EDC ve 81 mg (0,0007 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Aseton-hekzan ile kristallendirildi. 420 mg elde edildi, verim %41'dir. Erime derecesi: 120.8°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 9.96 (s, 1H, N-H), 7.97 (d, 1H, $J=2$ Hz, H^7), 7.47 (dd, 1H, $J=9$ Hz, $J=2$ Hz, H^5), 7.31-7.21 (m, 6H, fenil protonları, H^4), 3.43 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$), 3.36 (s, 3H, N- CH_3), 2.40-2.24 (m, 12H, H-piperazin, N- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.59 (p, 2H, $J=7.4$ Hz, N- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.44 (p, 2H, $J=7.4$ Hz, N- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 171.08, 168.37, 138.25, 135.10, 133.14, 128.74, 128.08, 126.80, 121.41, 117.93, 113.31, 111.24, 62.09, 57.51, 52.77, 52.65, 36.13, 28.93, 25.88, 23.03.

$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2\text{S} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ için;

Hesaplanan: 439.2168

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$

Bulunan: 439.2188

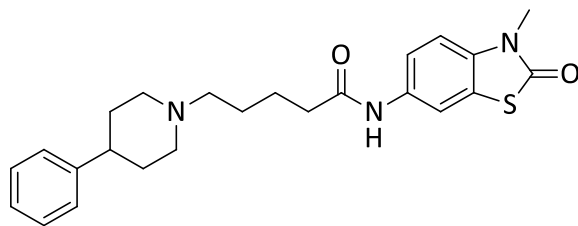
$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2\text{S} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ için;

Hesaplanan % C=59.60 H=7.29 N=11.58 S=6.63

Elementel Analiz

Bulunan % C=59.50 H=7.18 N=11.97 S=6.49

4.1.34. 5-(4-Fenilpiperidin-1-il)-N-(3-metil-2-okso-2,3-dihidro-1,3-benzotiyazol-6-il)pentanamit (Bileşik 34)



600 mg (0,0033 mol) 6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on, 967 mg (0,0036 mol) 5-(4-fenilpiperidin-1-il)pentanoik asit, 767 mg (0,004 mol) EDC ve 81 mg (0,0007 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. 2-propanolden kristallendirildi. 340 mg elde edildi, verim %24'dir. Erime derecesi: 169.2 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 9.96 (s, 1H, N-H), 7.95 (d, 1H, J=2.4 Hz, H⁷), 7.46 (dd, 1H, J=8.8 Hz, J=2.4 Hz, H⁵), 7.26-7.12 (m, 6H, fenil protonları, H⁴), 3.37 (s, 3H, N-CH₃), 2.92 (d, 2H, J=11.5 Hz, H^{2e}, H^{6e}-piperidin), 2.49-2.26 (m, 5H, H⁴-piperidin, -N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1.92 (td, 2H, J=11.5 Hz, J=2.4 Hz, H^{2a}, H^{6a}-piperidin), 1.70-1.54 (m, 6H, H³, H⁵-piperidin, -N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-) 1.46 (p, 2H, J=7.5 Hz, -N-CH₂-CH₂-CH₂-).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 171.14, 168.39, 146.32, 135.13, 133.14, 128.27, 126.64, 125.91, 121.42, 117.94, 113.32, 111.26, 57.91, 53.83, 42.00, 33.12, 28.95, 26.10, 23.16.

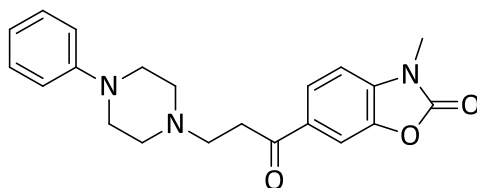
C₂₄H₂₉N₃O₂S için; Hesaplanan: 424.2059

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 424.2048

C₂₄H₂₉N₃O₂S için; Hesaplanan % C=68.05 H=6.90 N=9.92 S=7.55

Elementel Analiz Bulunan % C=68.10 H=7.20 N=9.90 S=7.56

4.1.35. 3-Metil-6-(3-(4-fenilpiperazin-1-il)propanoil)benzoksazol-2(3H)-on (Bileşik 35)



450 mg (0,0019 mol) 6-(3-kloropropanoil)-3-metilbenzoksazol-2(3H)-on, 840 mg (0,0056 mol) sodyum iyodür, 648 mg (0,0047 mol) K_2CO_3 ve 0,57 ml (0,0026 mol) 1-fenilpiperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 86 mg elde edildi, verim %13'tür. Erime derecesi: 162.8°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 7.94 (d, 1H, $J=8.6$ Hz, H^5), 7.89 (s, 1H, H^7), 7.34 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H^4), 7.19-7.15 (m, 2H, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 6.89 (d, 2H, $J=8.4$ Hz, $H^{2'}$, $H^{6'}$), 7.64 (t, 1H, $J=7.2$ Hz, $H^{4'}$), 3.35 (s, 3H, N-CH $_3$), 3.21 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, -CH $_2$ -CH $_2$ -N), 3.08 (t, 4H, $J=7.2$ Hz, H^3 , H^5 piperazin), 2.71 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, -CH $_2$ -CH $_2$ -N-), 2.55 (t, 4H, $J=7.2$ Hz H^2 , H^6 piperazin).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 197.60, 154.13, 150.99, 141.90, 135.94, 131.29, 128.85, 125.12, 118.71, 115.28, 108.63, 108.65, 52.99, 52.68, 48.14, 35.68, 28.30.

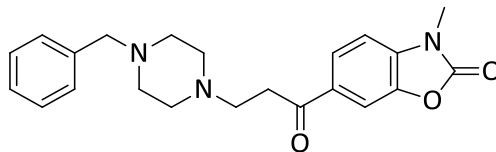
$C_{21}H_{23}N_3O_3$ için; Hesaplanan: 366.1818

HRMS (m/z) $[M+H]^+$ Bulunan: 366.1815

$C_{21}H_{23}N_3O_3$ için; Hesaplanan % C=69.02 H=6.34 N=11.50

Elementel Analiz Bulunan % C=68.62 H=6.66 N=11.50

4.1.36. 3-Metil-6-(3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoil)benzoksazol-2(3H)-on (Bileşik 36)



300 mg (0,0013 mol) 6-(3-kloropropanoil)-3-metilbenzoksazol-2(3H)-on, 563 mg (0,0039 mol) sodyum iyodür, 432 mg (0,0033 mol) K_2CO_3 ve 440 mg (0,0026 mol) 1-benzilpiperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 202 mg elde edildi, verim %43'tür. Erime derecesi: 129.6°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 7.93 (dd, 1H, $J=8.4$ Hz, $J=1.6$ Hz, H^5), 7.86 (d, 1H, $J=1.6$ Hz, H^7), 7.34 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H^4), 7.33-7.21 (m, 5H, fenil protonları), 3.43 (s, 2H, $-CH_2-C_6H_5$), 3.37 (s, 3H, N-CH₃), 3.16 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, $-CH_2-\underline{CH_2}$ -N), 2.65 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, $-\underline{CH_2}$ -CH₂-N-), 2.42-2.34 (m, 8H, H-piperazin).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 197.62, 154.12, 141.89, 138.23, 135.91, 131.28, 128.73, 128.09, 126.81, 125.08, 108.79, 108.63, 62.04, 53.03, 52.69, 52.58, 35.65, 28.29.

$C_{22}H_{25}N_3O_3$ için;

Hesaplanan: 380.1974

HRMS (m/z) $[M+H]^+$

Bulunan: 380.1989

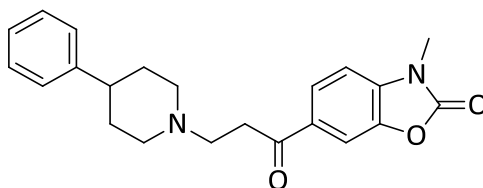
$C_{22}H_{25}N_3O_3$ için;

Hesaplanan % C=69.64 H=6.64 N=11.07

Elementel Analiz

Bulunan % C=69.24 H=6.84 N=11.05

4.1.37. 3-Metil-6-(3-(4-fenilpiperidin-1-il)propanoil)benzoksazol-2(3H)-on (Bileşik 37)



500 mg (0,002 mol) 6-(3-kloropropanoil)-3-metilbenzoksazol-2(3H)-on, 938 mg (0,006 mol) sodyum iyodür, 721 mg (0,005 mol) K_2CO_3 ve 507 mg (0,003 mol) 4-fenilpiperidin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 172 mg elde edildi, verim %23'tür. Erime derecesi: 137.7°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 7.99 (dd, 1H, $J=8.2$ Hz, $J=1.6$ Hz, H^5), 7.90 (d, 1H, $J=1.6$ Hz, H^7), 7.36 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, H^4), 7.30-7.15 (m, 5H, fenil protonları), 3.35 (s, 3H, N-CH₃), 3.21 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, -CH₂-CH₂-N-), 3.01 (d, 2H, $J=11.4$ Hz, H^{2e} , H^{6e} -piperidin), 2.71 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, -CH₂-CH₂-N-), 2.49-2.42 (m, 1H, H^4 -piperidin), 2.05 (td, 2H, $J=11.4$ Hz, $J=1.6$ Hz, H^{2a} , H^{6a} -piperidin), 1.76-1.54 (m, 4H, H^3 , H^5 -piperidin).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 197.71, 154.11, 146.23, 141.90, 135.90, 131.31, 128.26, 126.62, 125.92, 125.09, 108.79, 108.63, 53.73, 53.36, 41.79, 35.86, 33.06, 28.28.

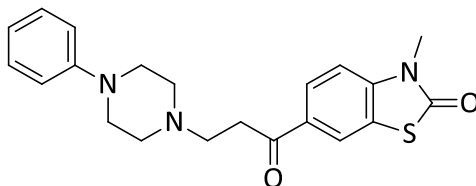
$C_{22}H_{24}N_3O_3$ için; Hesaplanan: 365.1865

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 365.1849

$C_{22}H_{24}N_3O_3$ için; Hesaplanan % C=72.50 H=6.64 N=7.69

Elementel Analiz Bulunan % C=72.12 H=6.78 N=7.80

4.1.38. 3-Metil-6-(3-(4-fenilpiperazin-1-il)propanoil)benzotiyazol-2(3H)-on (Bileşik 38)



500 mg (0,002 mol) 6-(3-kloropropanoil)-3-metilbenzotiyazol-2(3H)-on, 880 mg (0,006 mol) sodyum iyodür, 676 mg (0,005 mol) K_2CO_3 ve 0,6 ml (0,004 mol) 1-fenilpiperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 400 mg elde edildi, verim %54'dir. Erime derecesi: 134.1 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 8.33 (d, 1H, $J=2$ Hz, H^7), 8.00 (dd, 1H, $J=8.4$ Hz, $J=2$ Hz, H^5), 7.38 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H^4), 7.19-7.15 (m, 2H, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 6.89 (d, 2H, $J=8.4$ Hz, $H^{2'}$, $H^{6'}$), 7.64 (t, 1H, $J=7.2$ Hz, $H^{4'}$), 3.42 (s, 3H, N-CH₃), 3.20 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, -CH₂-CH₂-N), 3.08 (t, 4H, $J=4.8$ Hz, H^3 , H^5 -piperazin), 2.71 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, -CH₂-CH₂-N-), 2.55 (t, 4H, $J=4.8$ Hz, H^2 , H^6 -piperazin).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 197.54, 169.30, 150.98, 141.23, 131.88, 128.84, 126.99, 123.17, 121.68, 118.71, 115.29, 111.05, 52.94, 52.67, 48.14, 35.62, 29.25.

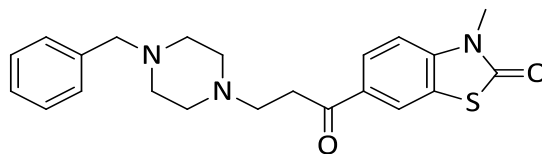
$C_{21}H_{23}N_3O_2S$ için; Hesaplanan: 382.1589

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 382.1577

$C_{21}H_{23}N_3O_2S$ için; Hesaplanan % C=66.12 H=6.08 N=11.01 S=8.41

Elementel Analiz Bulunan % C=65.83 H=6.47 N=11.09 S=8.49

4.1.39. 3-Metil-6-(3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoil)benzotiyazol-2(3H)-on (Bileşik 39)



300 mg (0,0012 mol) 6-(3-kloropropanoil)-3-metilbenzotiyazol-2(3H)-on, 540 mg (0,0036 mol) sodyum iyodür, 415 mg (0,003 mol) K_2CO_3 ve 317 mg (0,0018 mol) 1-benzilpiperazin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Etanolden kristallendirildi. 100 mg elde edildi, verim %22'dir. Erime derecesi: 99.9°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 8.31 (d, 1H, $J=2$ Hz, H^7), 7.97 (dd, 1H, $J=8.4$ Hz, $J=2$ Hz, H^5), 7.37 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H^4), 7.30-7.18 (m, 5H, fenil protonları), 3.41 (s, 2H, $-CH_2-C_6H_5$), 3.40 (s, 3H, N- CH_3), 3.14 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, $-CH_2-\underline{CH_2}-N$), 2.63 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, $-\underline{CH_2}-CH_2-N-$), 2.40-2.32 (m, 8H, H-piperazin).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 197.62, 169.33, 141.23, 138.25, 131.89, 128.76, 128.12, 126.99, 126.85, 123.20, 121.68, 111.08, 62.06, 53.00, 52.71, 52.61, 35.61, 29.28.

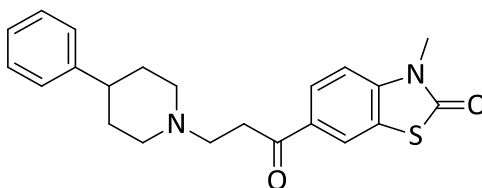
$C_{22}H_{25}N_3O_2S$ için; Hesaplanan: 396.1746

HRMS (m/z) $[M+H]^+$ Bulunan: 396.1734

$C_{22}H_{25}N_3O_2S$ için; Hesaplanan % C=66.81 H=6.37 N=10.62 S=8.11

Elementel Analiz Bulunan % C=66.44 H=6.54 N=10.57 S=7.95

4.1.40. 3-Metil-6-(3-(4-fenilpiperidin-1-il)propanoil)benzotiyazol-2(3H)-on (Bileşik 40)



500 mg (0,002 mol) 6-(3-kloropropanoil)-3-metilbenzotiyazol-2(3H)-on, 880 mg (0,006 mol) sodyum iyodür, 676 mg (0,005 mol) K_2CO_3 ve 476 mg (0,003 mol) 4-fenilpiperidin kullanılarak 25 ml asetonitril içinde yöntem A'ya uygun olarak sentezlendi. Aseton-hekzan ile kristallendirildi. 53 mg elde edildi, verim %7'dir. Erime derecesi: 103.7°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 8.33 (d, 1H, $J=1.3$ Hz, H^7), 8.30 (dd, 1H, $J=8.5$ Hz, $J=1.3$ Hz, H^5), 7.41 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H^4), 7.30-7.15 (m, 5H, fenil protonları), 3.45 (s, 3H, N-CH₃), 3.22 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, -CH₂-CH₂-N-), 3.01 (d, 2H, $J=11.6$ Hz, H^{2e} , H^{6e} -piperidin), 2.71 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, -CH₂-CH₂-N-), 2.51-2.42 (m, 1H, H^4 -piperidin), 2.06 (td, 2H, $J=11.6$ Hz, $J=2.1$ Hz, H^{2a} , H^{6a} -piperidin), 1.76-1.50 (m, 4H, H^3 , H^5 -piperidin).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 197.71, 169.32, 146.24, 141.22, 131.93, 128.28, 126.98, 126.64, 125.94, 123.19, 121.68, 111.07, 53.72, 53.33, 41.79, 35.81, 33.08, 29.25.

$C_{22}H_{24}N_2O_2S$ için;

Hesaplanan: 381.1637

HRMS (m/z) [M+H]⁺

Bulunan: 381.1625

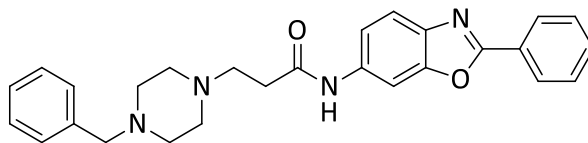
$C_{22}H_{24}N_2O_2S$ için;

Hesaplanan % C=69.44 H=6.37 N=7.36 S=8.43

Elementel Analiz

Bulunan % C=69.29 H=6.77 N=7.45 S=8.73

4.1.41. 3-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(2-fenilbenzoksazol-6-il)propanamit (Bileşik 41)



450 mg (0,0021 mol) 6-amino-2-fenilbenzoksazol, 585 mg (0,0024 mol) 3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoik asit, 493 mg (0,0026 mol) EDC ve 52 mg (0,0004 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Aseton-hekzan ile kristallendirildi. 155 mg elde edildi, verim %16'dır. Erime derecesi: 139.5 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.37 (s, 1H, N-H), 8.25 (s, 1H, H⁷), 8.18-8.15 (m, 2H, H^{2'}, H^{6'}), 7.70 (d, 1H, J=8.4 Hz, H⁴), 7.61-7.58 (m, 3H, H^{3'}, H^{4'}, H^{5'}), 7.37 (dd, 1H, J=8.4 Hz, J=1.6 Hz, H⁵), 7.32-7.21 (m, 5H, fenil protonları), 3.44 (s, 2H, -CH₂-C₆H₅), 2.65 (t, 2H, J=6.4 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.50-2.47 (m, 2H, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte), 2.45-2.38 (m, 8H, piperazin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.31, 161.82, 150.34, 138.13, 137.17, 136.88, 131.54, 129.17, 128.71, 128.02, 126.92, 126.76, 126.47, 119.50, 116.47, 101.18, 61.96, 53.59, 52.57, 52.38, 34.10.

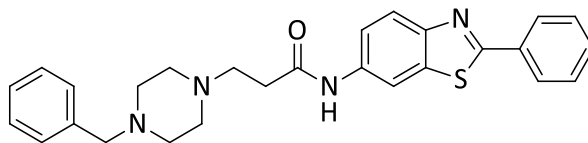
C₂₇H₂₈N₄O₂ için; Hesaplanan: 441.2291

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 441.2275

C₂₇H₂₈N₄O₂ için; Hesaplanan % C=73.61 H=6.41 N=12.72

Elementel Analiz Bulunan % C=73.42 H=6.75 N=12.73

4.1.42. 3-(4-Benzilpiperazin-1-il)-N-(2-fenilbenzotiyazol-6-il)propanamit (Bileşik 42)



400 mg (0,0017 mol) 6-amino-2-fenilbenzotiyazol, 483 mg (0,0019 mol) 3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoik asit, 407 mg (0,0021 mol) EDC ve 43 mg (0,0003 mol) DMAP kullanılarak 20 ml diklorometan içinde yöntem B'ye uygun olarak sentezlendi. Aseton-hekzan ile kristallendirildi. 200 mg elde edildi, verim %25'dir. Erime derecesi: 162.9°C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 10.36 (s, 1H, N-H), 8.51 (d, 1H, J=1.2 Hz, H⁷), 8.04-8.01 (m, 2H, H^{2'}, H^{6'}), 7.95 (d, 1H, J=8.8 Hz, H⁴), 7.54-7.50 (m, 4H, H⁵, H^{3'}, H^{4'}, H^{5'}), 7.31-7.19 (m, 5H, fenil protonları), 3.42 (s, 2H, -CH₂-C₆H₅), 2.63 (t, 2H, J=7 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.50-2.47 (m, 2H, -N-CH₂-CH₂-, DMSO ile birlikte), 2.42-2.36 (m, 8H, piperazin).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 170.33, 165.59, 149.38, 138.11, 136.93, 135.11, 132.87, 131.01, 129.26, 128.71, 128.03, 126.85, 126.77, 122.84, 118.81, 111.16, 61.94, 53.61, 52.55, 52.38, 34.09.

C₂₇H₂₈N₄OS için; Hesaplanan: 457.2062

HRMS (m/z) [M+H]⁺ Bulunan: 457.2078

C₂₇H₂₈N₄OS için; Hesaplanan % C=71.02 H=6.18 N=12.27 S=7.02

Elementel Analiz Bulunan % C=70.62 H=6.48 N=12.26 S=7.06

4.2. Biyolojik Aktivite Bulguları

4.2.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite bulguları

Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin AKE ve BKE inhibitör aktivite sonuçları Çizelge 4.1’de, IC₅₀ hesaplamaları için kullanılan doz-cevap eğrileri ise Şekil 4.1 ve 4.2’de sunulmuştur.

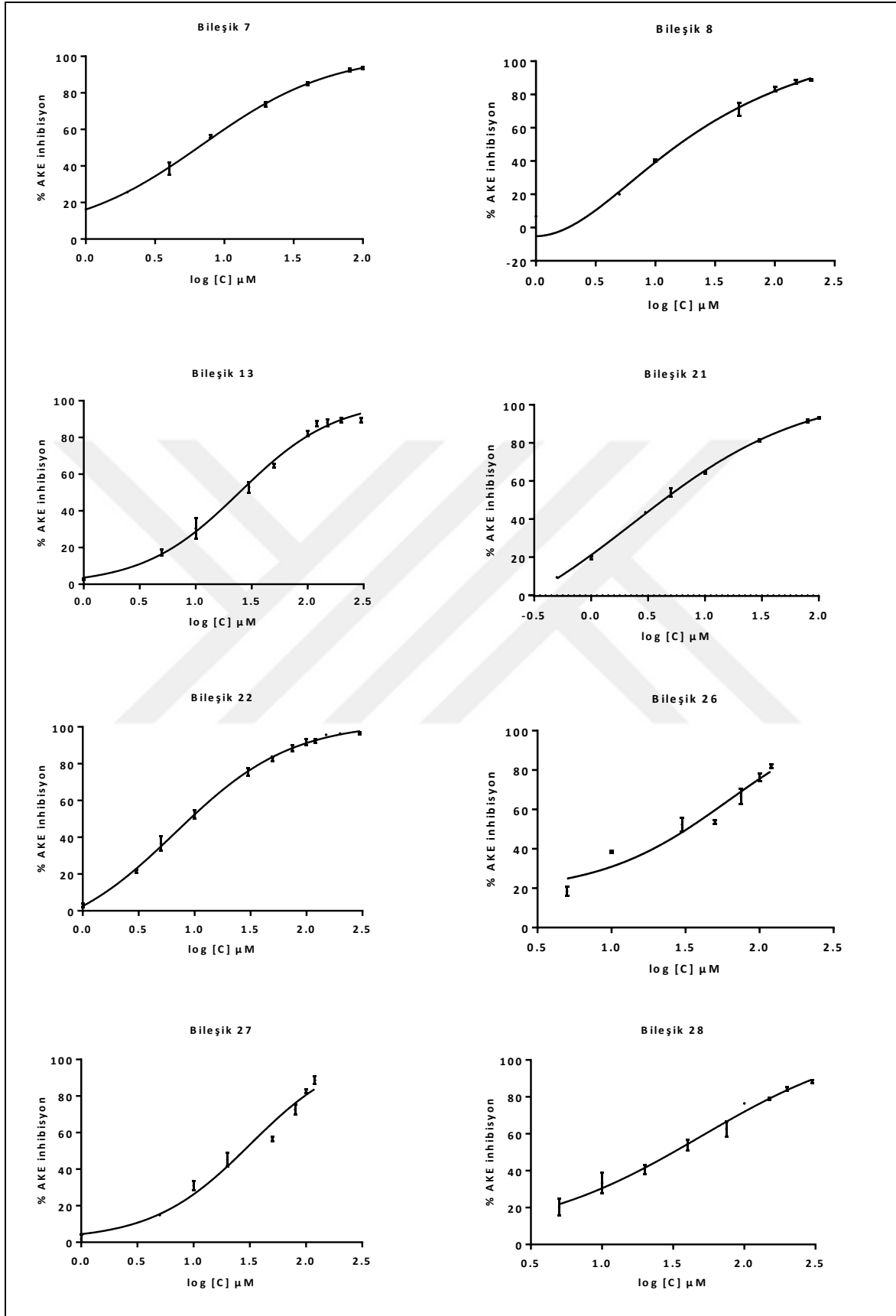
Çizelge 4.1. Bileşiklerin % inhibisyon değerleri ve IC₅₀ sonuçları

Bileşik	AKE için	AKE için	BKE için	BKE için
	% inhibisyon ± SD (100 µM)	IC ₅₀ ± SD (µM)	% inhibisyon ± SD (100 µM)	IC ₅₀ ± SD (µM)
1	32 ± 3.7	-	-	-
2	35 ± 3.3	-	-	-
3	30 ± 4.2	-	-	-
4	33 ± 3.7	-	-	-
5	29 ± 3.3	-	-	-
6	35 ± 3.2	-	-	-
7	81 ± 5.2	6.94 ± 1.06	30 ± 2.6	-
8	66 ± 4.3	16.10 ± 0.99	21 ± 1.8	-
9	40 ± 2.1	-	-	-
10	38 ± 3.2	-	-	-
11	35 ± 3.5	-	-	-
12	25 ± 2.7	-	-	-
13	64 ± 2.3	24.60 ± 1.15	47 ± 2.6	-
14	58 ± 1.1	52.40 ± 1.21	42 ± 3.5	-
15	34 ± 3.0	-	-	-
16	37 ± 3.2	-	-	-
17	32 ± 3.4	-	-	-
18	35 ± 2.8	-	-	-
19	31 ± 3.0	-	-	-
20	36 ± 3.1	-	-	-
21	92 ± 2.4	2.34 ± 0.61	-	-
22	74 ± 4.1	7.09 ± 1.09	52 ± 0.9	37.60 ± 1.84
23	37 ± 3.2	-	-	-
24	39 ± 3.4	-	-	-

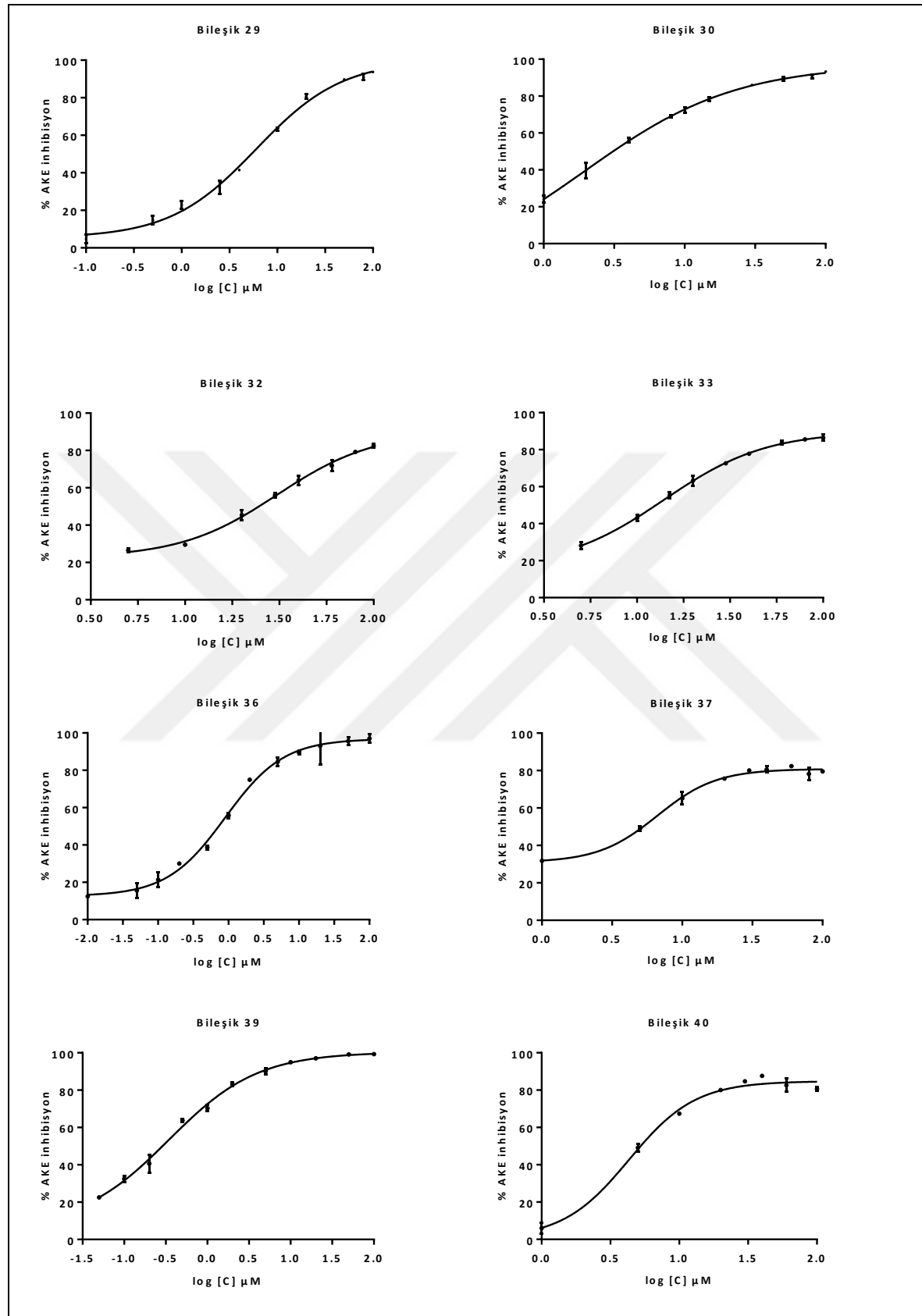
Çizelge 4.1. (devam) Bileşiklerin % inhibisyon değerleri ve IC₅₀ sonuçları

25	35 ± 3.7	-	-	-
26	60 ± 4.1	60.30 ± 2.24	81 ± 0.8	11.14 ± 1.07
27	62 ± 4.6	31.90 ± 1.46	60 ± 3.3	75.38 ± 1.99
28	63 ± 1.3	49.50 ± 1.54	70 ± 1.5	41.96 ± 1.12
29	94 ± 0.2	6.00 ± 1.13	-	-
30	93 ± 0.3	1.96 ± 0.42	-	-
31	32 ± 2.1	-	90 ± 1.6	9.65 ± 1.13
32	82 ± 1.0	30.86 ± 1.08	-	-
33	87 ± 1.7	13.96 ± 1.02	-	-
34	30 ± 2.3	-	96 ± 0.2	2.98 ± 1.02
35	27 ± 1.9	-	-	-
36	97 ± 2.3	0.89 ± 0.14	-	-
37	80 ± 0.7	6.65 ± 1.07	-	-
38	45 ± 2.5	-	-	-
39	99 ± 0.6	0.34 ± 0.16	-	-
40	81 ± 1.2	4.32 ± 1.18	79 ± 0.4	13.97 ± 1.15
41	-	-	-	-
42	-	-	-	-
Galantamin	89 ± 1.3	-	20 ± 0.5	-
Donepezil	98 ± 1.0	0.058 ± 0.01	67 ± 0.03	3.7 ± 0.10

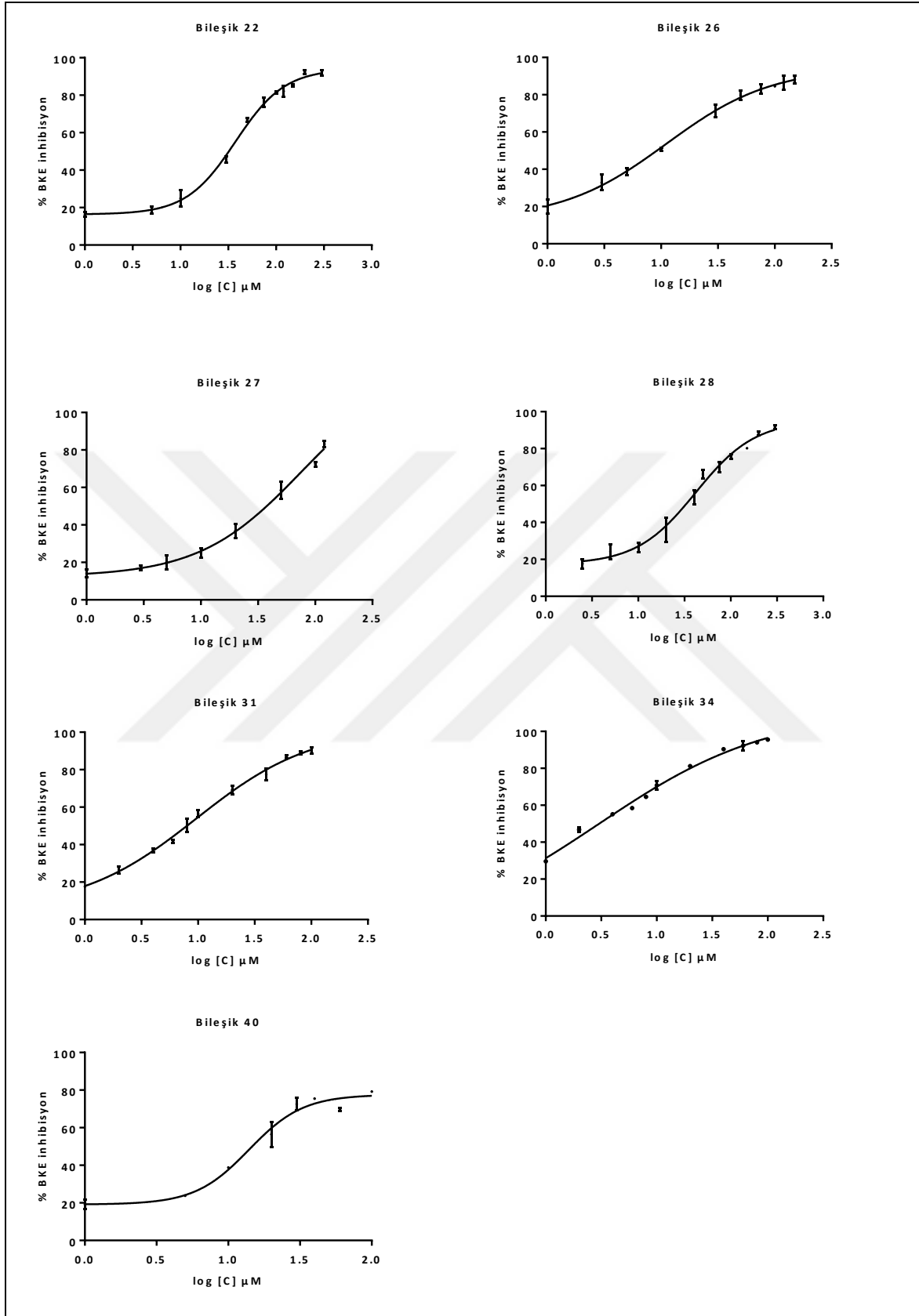
(-): inhibitör aktivite yok anlamına gelmektedir.



Şekil 4.1. AKE inhibitörü bileşiklerin IC_{50} grafikleri

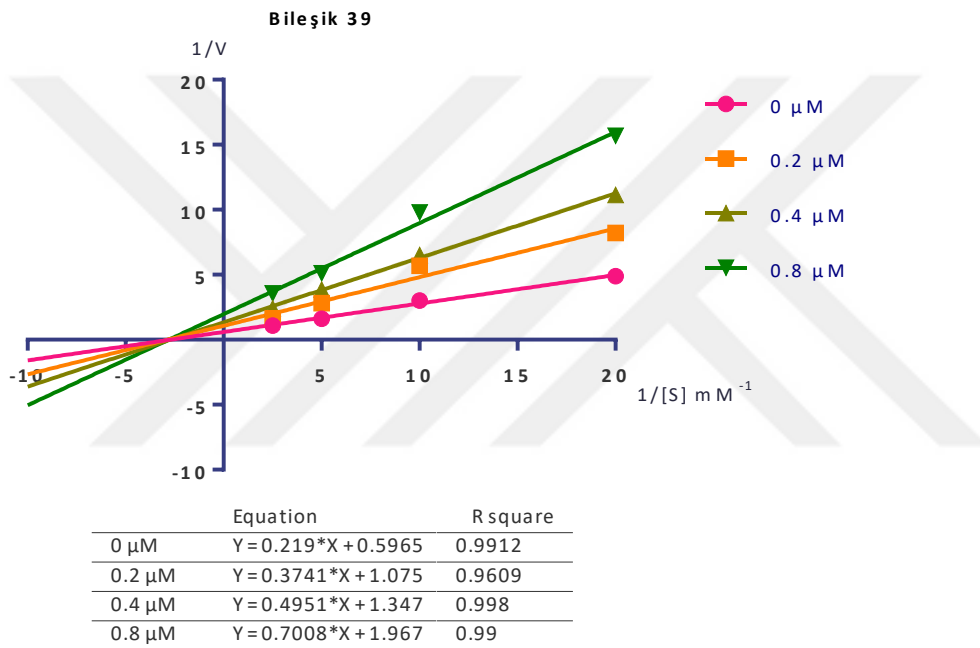


Şekil 4.1. (devam) AKE inhibitörü bileşiklerin IC₅₀ grafikleri



Şekil 4.2. BKE inhibitörü bileşiklerin IC₅₀ grafikleri

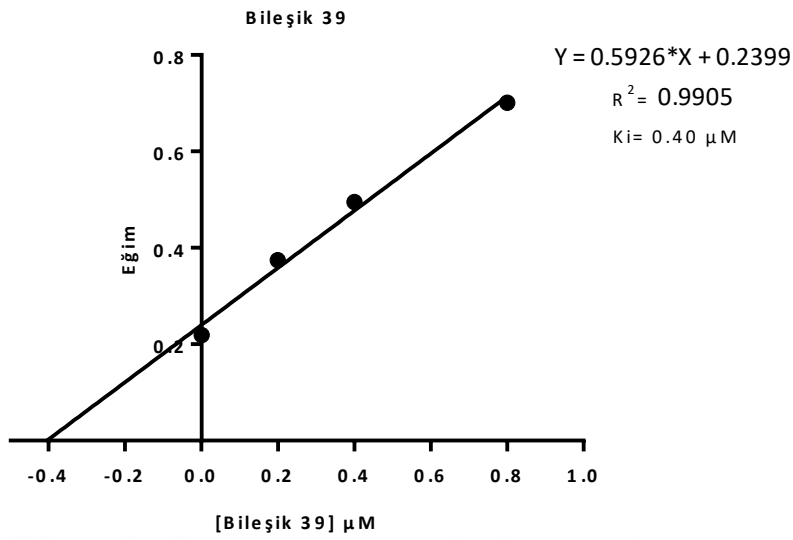
Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerden en güçlü AKE inhibitör etki gösteren bileşik 39 ($IC_{50} = 0.34 \mu M$) ve en güçlü BKE inhibitör etki gösteren bileşik 34 ($IC_{50} = 2.98 \mu M$) seçilerek inhibisyon kinetiklerinin belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Bu çalışmada Michaelis-Menten kinetiğine göre; enzim derişimi, sıcaklık ve pH sabitken, değişen substrat miktarları nedeniyle oluşan tepkime hızındaki değişim, inhibitörün farklı konsantrasyonları için ölçülmüştür. Elde edilen matematiksel değerler Lineweaver-Burk grafiklerine çevrilerek değerlendirilmiştir.



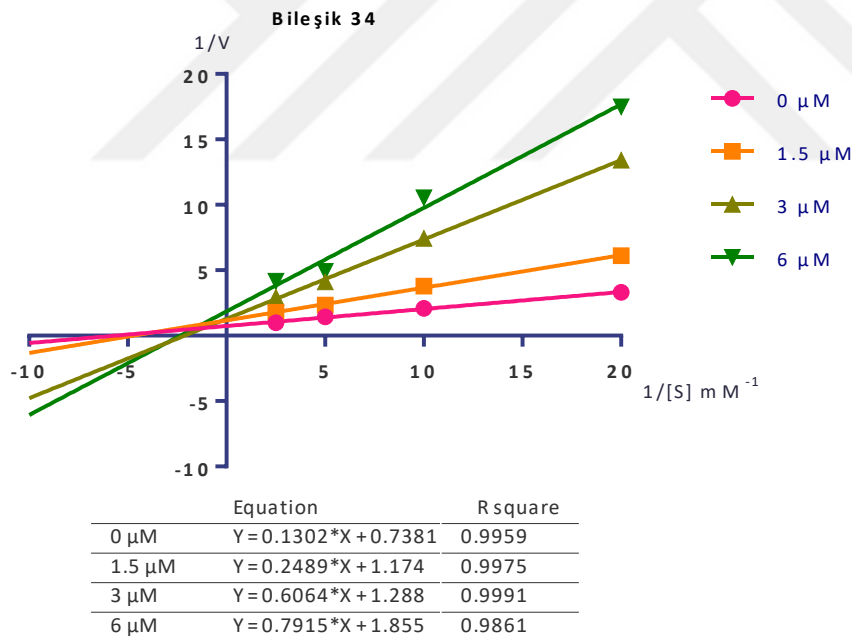
Şekil 4.3. Bileşik 39'un AKE inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.2. Bileşik 39'un AKE inhibisyonu için hesaplanan V_{max} ve K_m değerleri

[Bileşik 39]	V_{max}	K_m
0 μM	1,6764	0,3671
0,2 μM	0,9302	0,3480
0,4 μM	0,7423	0,3675
0,8 μM	0,5083	0,3562



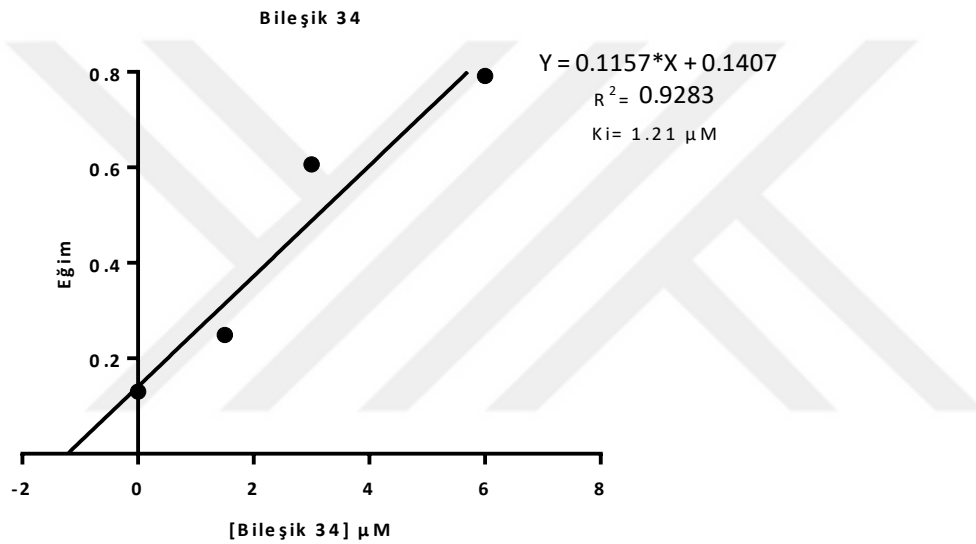
Şekil 4.4. Bileşik 39'un AKE inhibisyonu için K_i tayininde kullanılan derişim-eğim grafiği



Şekil 4.5. Bileşik 34'ün BKE inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği

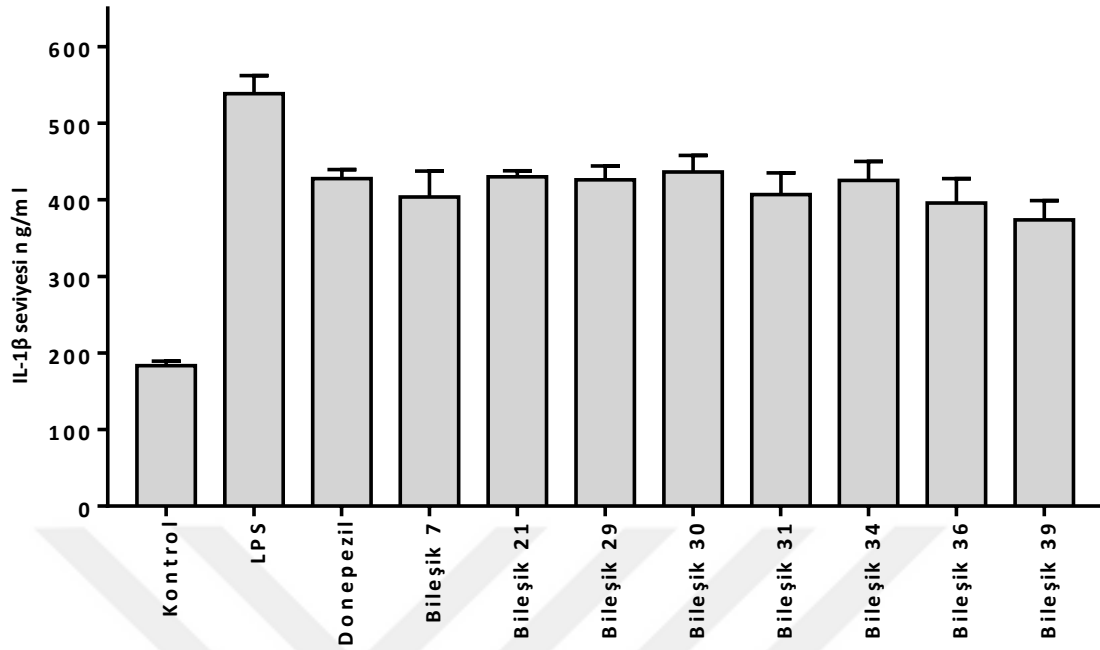
Çizelge 4.3. Bileşik 34'ün BKE inhibisyonu için hesaplanan V_{max} ve K_m değerleri

[Bileşik 34]	V_{max}	K_m
0 μ M	1,3548	0,1763
1,5 μ M	0,8517	0,2120
3 μ M	0,7763	0,4708
4,5 μ M	0,5390	0,4266

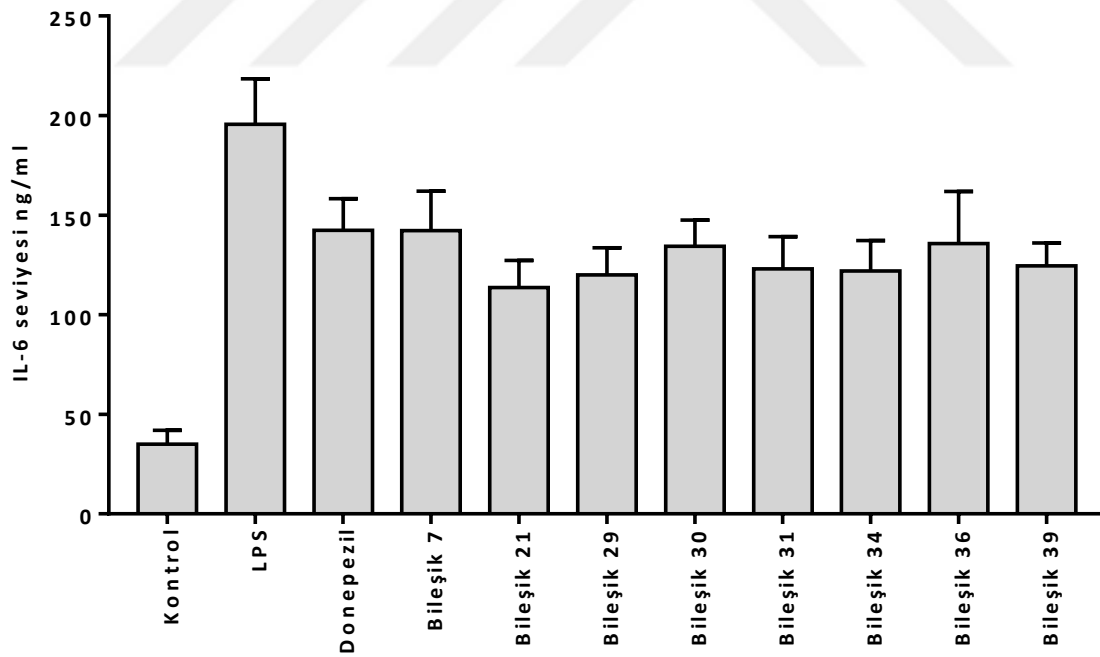
Şekil 4.6. Bileşik 39'un AKE inhibisyonu için K_i tayininde kullanılan derişim-eğim grafiği

4.2.2. Antienflamatuvar aktivite bulguları

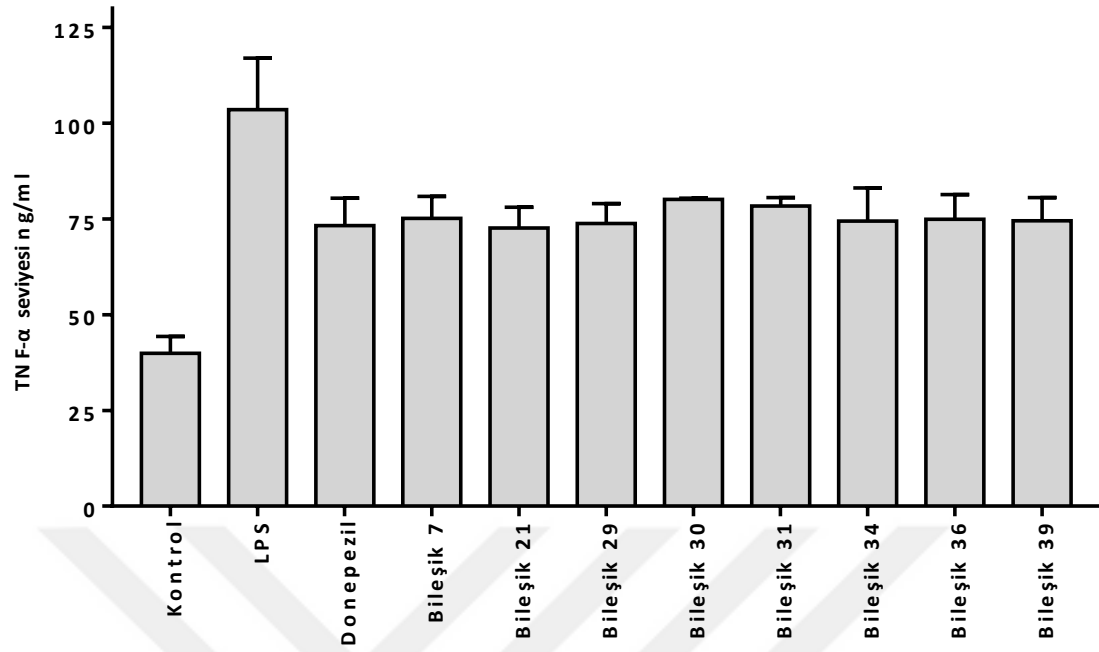
AKE ve BKE inhibitör aktivitesi en yüksek olan sekiz bileşiğin (Bileşik 7, 21, 29, 30, 31, 34, 36, 39) enflamatuvar belirteçler (IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO) üzerine etkileri incelenmiş ve bulgular Şekil 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10'da sunulmuştur.



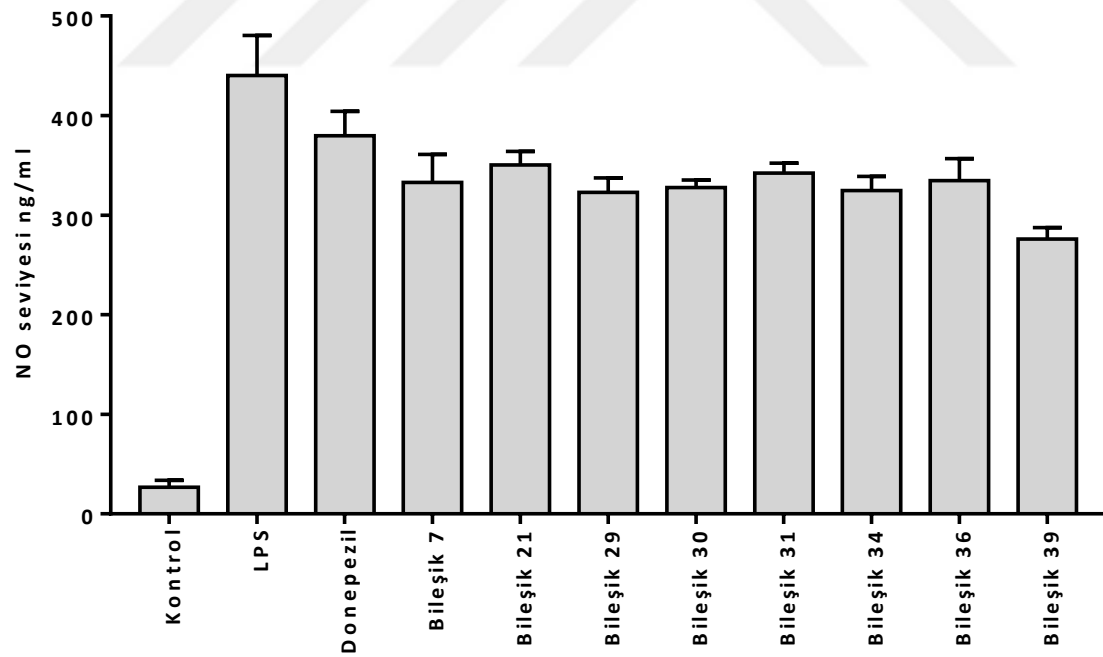
Şekil 4.7. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda İL-1 β seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi



Şekil 4.8. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda İL-6 seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi



Şekil 4.9. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda TNF- α seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi



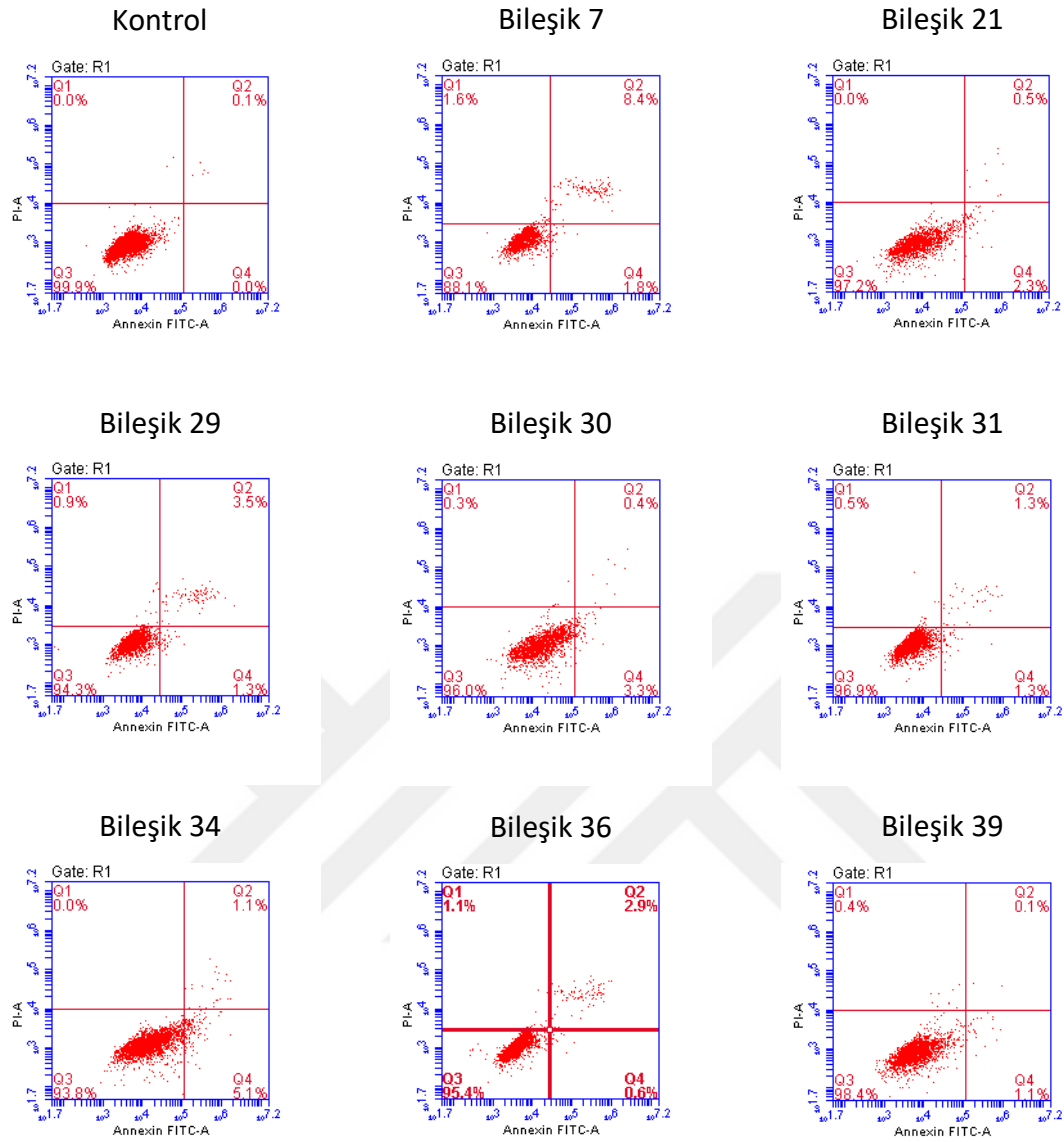
Şekil 4.10. LPS ile indüklenmiş enflamasyonda NO seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi

4.2.3. Apoptozis testi bulguları

En yüksek AKE ve BKE inhibitör aktiviteye sahip sekiz bileşiğin (Bileşik 7, 21, 29, 30, 31, 34, 36, 39) apoptozis üzerine etkileri incelenmiş ve bulgular Çizelge 4.4 ve Şekil 4.11’de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. 10 μ M konsantrasyonda flow sitometri apoptozis testinden alınan % değerler

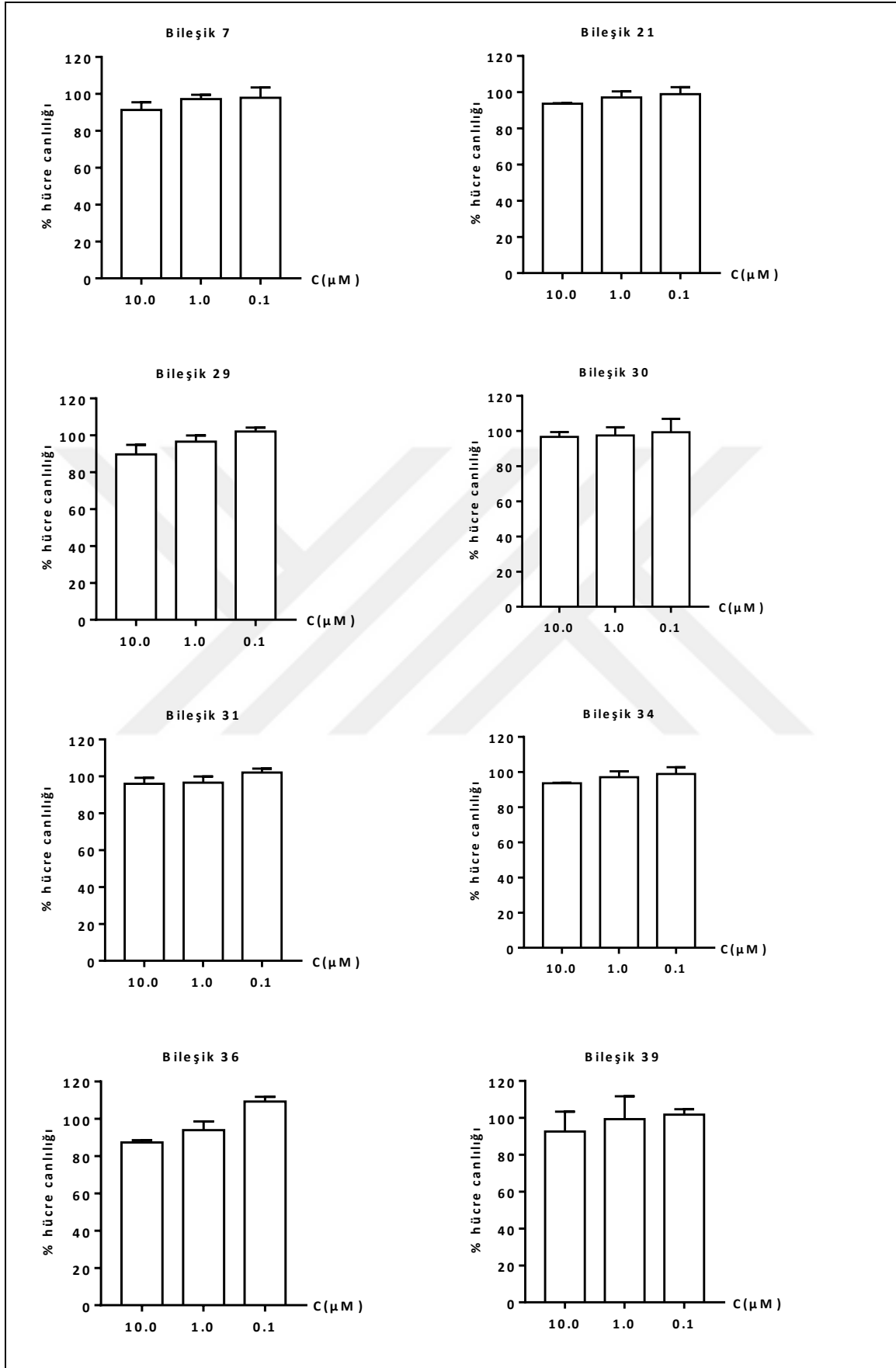
Bileşik	Annexin V-/PI+ (nekrotik-ölü hücreler)	Annexin V+/PI+ (geç apoptotik hücreler)	Annexin V-/PI- (canlı hücreler)	Annexin V+/PI- (erken apoptotik hücreler)
% Ortalama $\pm$ SD				
Kontrol	0	0,13 $\pm$ 0,06	98,83 $\pm$ 1,44	0,97 $\pm$ 1,42
7	1,47 $\pm$ 0,23	7,53 $\pm$ 1,03	89,23 $\pm$ 1,71	1,73 $\pm$ 0,90
21	0,20 $\pm$ 0,00	0,77 $\pm$ 0,21	96,57 $\pm$ 0,67	2,50 $\pm$ 0,46
29	1,20 $\pm$ 0,48	7,00 $\pm$ 4,05	90,73 $\pm$ 4,42	1,08 $\pm$ 0,22
30	0,17 $\pm$ 0,12	0,47 $\pm$ 0,12	95,93 $\pm$ 1,40	3,43 $\pm$ 1,31
31	0,83 $\pm$ 0,32	4,88 $\pm$ 1,26	92,70 $\pm$ 0,99	1,65 $\pm$ 0,61
34	0,23 $\pm$ 0,15	0,33 $\pm$ 0,32	97,70 $\pm$ 1,91	1,73 $\pm$ 1,53
36	1,23 $\pm$ 0,64	4,83 $\pm$ 1,69	93,23 $\pm$ 1,99	0,70 $\pm$ 0,30
39	0,40 $\pm$ 0,10	0,27 $\pm$ 0,21	98,33 $\pm$ 0,21	1,03 $\pm$ 0,40



Şekil 4.11. FITC-Annexin V-PI apoptozis deneyinden elde edilen Dot-plot görüntüleri (Seçilen maddelerin uygulanan fibroblast hücrelerinde 24 saat sonunda apoptotik etkisinin gösterilmesi) Kontrol grubu , madde uygulanmış fibroblast hücrelerinin dot-plot görüntüsü, Annexin V–PI–(Q3) popülasyonu yani canlı popülasyon; Annexin V+PI– (Q4) erken apoptozise giden hücreler ; Annexin V–PI+ (Q1) popülasyonu ölü hücreler ; Annexin V+PI+ (Q2) popülasyonu geç apoptotik ve nekrotik hücreleri göstermektedir.

4.2.4. Sitotoksikite testi bulguları

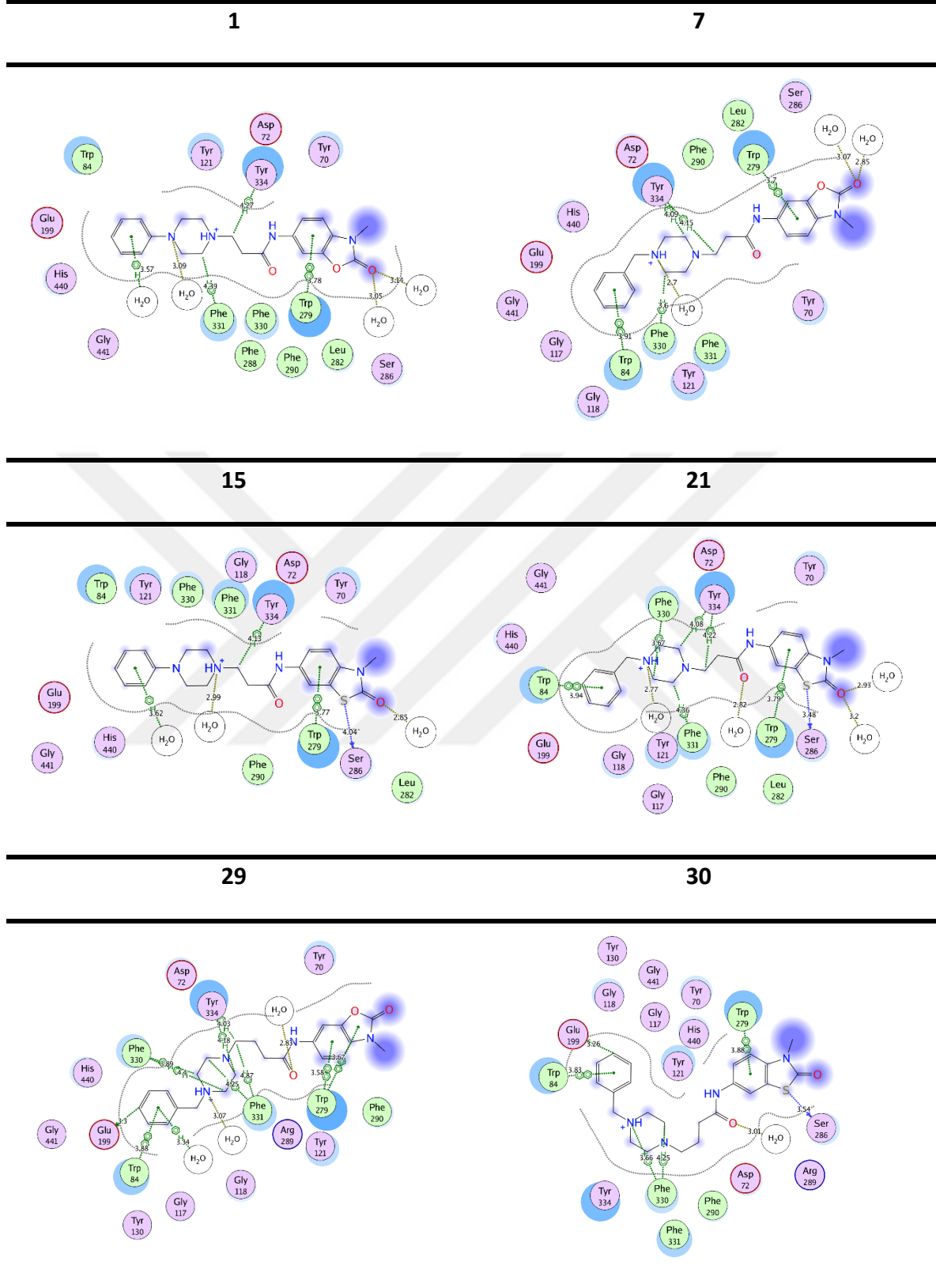
Seçilen sekiz bileşiğe (Bileşik 7, 21, 29, 30, 31, 34, 36, 39) AKE/BKE IC₅₀ değerlerinin altındaki ve üzerindeki konsantrasyonlarda (0,1; 1; 10 µM) sitotoksikite testi uygulanmış ve elde edilen bulgular Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



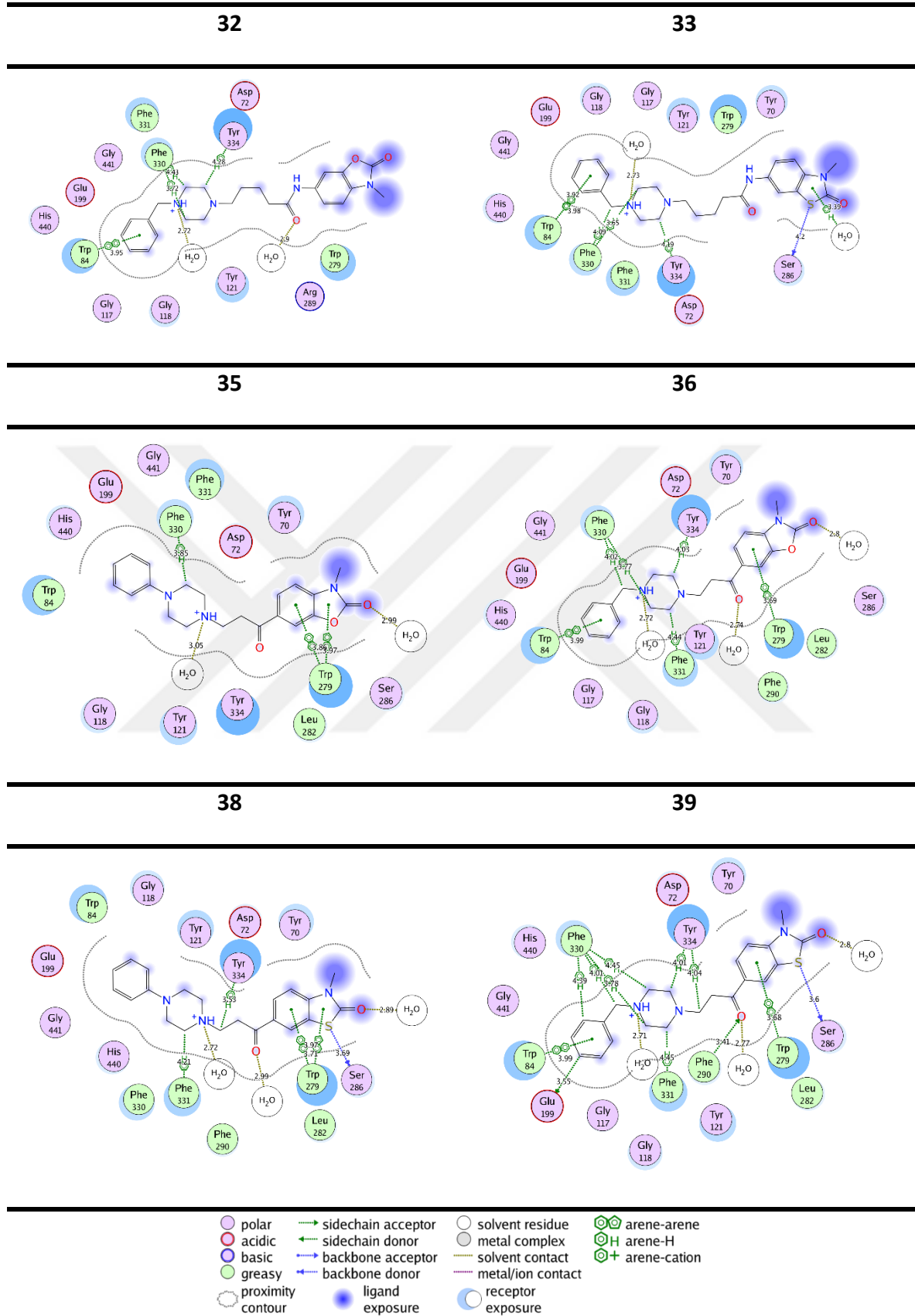
Şekil 4.12. Sitotoksosite testi için seçilen bileşiklerin % hücre canlılığı grafikleri

4.3. Moleküler Docking Bulguları

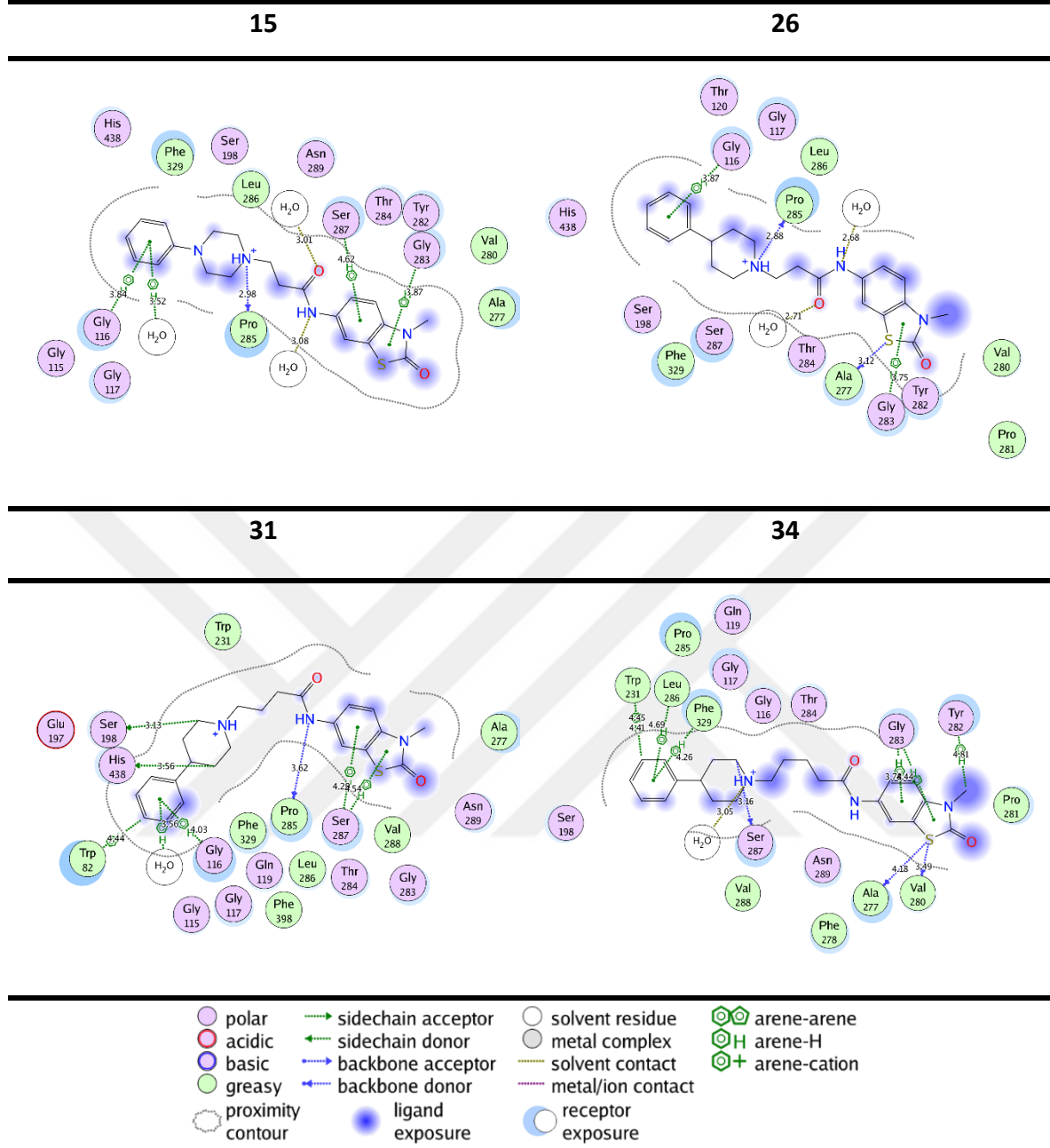
Yapı-etki ilişkilerinin daha iyi çözümlenebilmesi ve bağlanma modlarının incelenebilmesi için moleküler docking çalışmasından faydalanılmıştır. Elde edilen biyolojik aktivite sonuçlarına göre seçilen 8 aktif bileşiğin (Bileşik 7, 21, 29, 30, 32, 33, 36 ve 39) ve 4 aktif olmayan bileşiğin (Bileşik 1, 15, 35 ve 38) AKE enzimi ile moleküler docking çalışması gerçekleştirilmiştir. BKE enzimi ile etkileşimlerin incelenmesi amacıyla ise en iyi BKE inhibitör aktivite gösteren 3 bileşik (Bileşik 26, 31 ve 34) ayrıca BKE inhibitör aktivite göstermeyen bileşik 15 seçilmiş ve moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Docking çalışmalarında kullanılmak üzere moleküllerin iyonize formları Marvin Sketch programı ile hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de sunulmuştur.



Şekil 4.13. Seçilen bileşiklerin AKE kristali ile elde edilen docking sonuçları



Şekil 4.13. (devam) Seçilen bileşiklerin AKE kristali ile elde edilen docking sonuçları



Şekil 4.14. Seçilen bileşiklerin BKE kristali ile elde edilen docking sonuçları

4.4. Fizikokimyasal Parametre Hesaplama Bulguları

Çizelge 4.5. Seçilen bileşiklerin hesaplanmış fizikokimyasal parametre bulguları

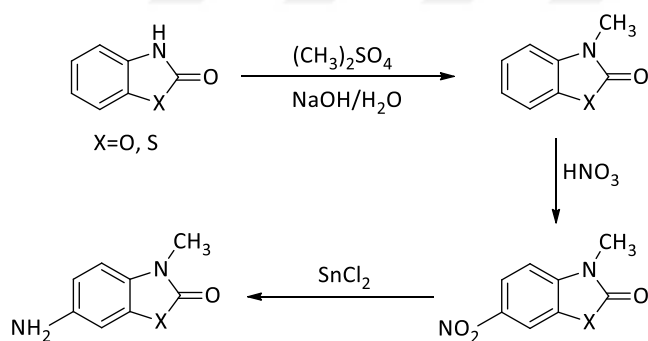
Bileşik	MA	logP	tPSA	HBA	HBD	Moleküler Hacim	KBB	Kural İhlali
7	394,48	1,99	70,72	7	1	365,65	0,9878	0
21	410,54	2,63	57,58	6	1	374,79	0,9919	0
29	408,50	2,26	70,72	7	1	382,45	0,9807	0
30	424,57	2,90	57,58	6	1	391,59	0,9903	0
31	409,56	4,08	54,34	5	1	378,83	0,9908	0
34	438,60	3,41	57,58	6	1	408,39	0,9908	0
36	379,46	2,33	58,69	6	0	353,25	0,9933	0
39	395,53	2,98	45,55	5	0	362,39	0,9939	0

5. TARTIŞMA

5.1. Kimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

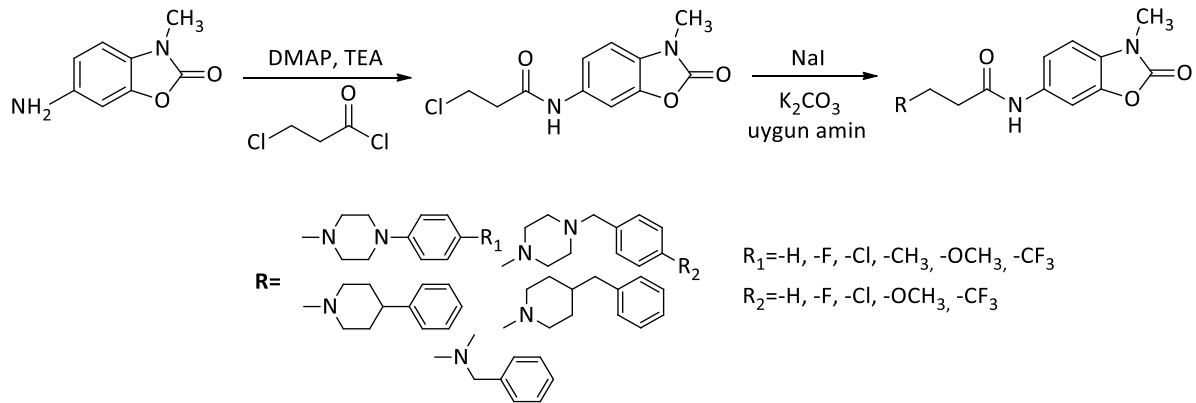
Tez kapsamında, benzoksazolon ve benzotiyazolon halka sistemlerine sahip 40 bileşik ayrıca benzoksazol ve benzotiyazol yapısında 2 türev olmak üzere 42 yeni bileşik sentez edildi ve yapıları $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRMS ve elementel analiz yöntemleriyle aydınlatıldı.

Propanamit, bütanamit ve pentanamit serilerinin sentezinde kullanılan 6-amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on/6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on türevlerinin sentez yöntemi ortaktır. Öncelikle bazik ortamda ticari olarak mevcut olan 1,3-benzoksazolon-2(3H)-on ve 1,3-benzotiyazolon-2(3H)-on halkalarının 3. konumu dimetilsülfat yardımıyla metillendi. Sonrasında nitrik asit varlığında optimum sıcaklık belirlenerek 6. konumdan nitrolama tepkimesi yapıldı. Nitrolanmış türevler, kalay klorür ile asit ortamda redüklenerek üç serinin sentezinde kullanılacak olan amin türevleri elde edildi.



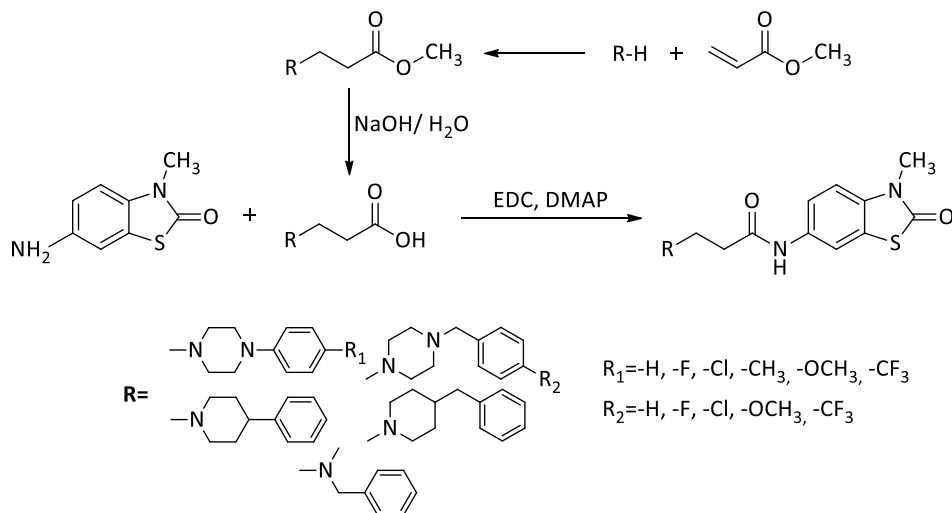
Şekil 5.1. 6-Amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on/6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on sentez şeması

Benzoksazolon halkasının 6. konumunda propanamit yan zinciri taşıyan sonuç ürünlerin sentezinde, öncelikle DMAP ve TEA varlığında kloropropiyonil klorürle yer değiştirme tepkimesi yapıldı. Elde edilen üründen hareketle sodyum iyodür varlığında bazik ortamda aminlerle yer değiştirme tepkimesinden ise ilk 14 bileşik elde edilmiştir.



Şekil 5.2. Benzoksazolon propanamit serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması

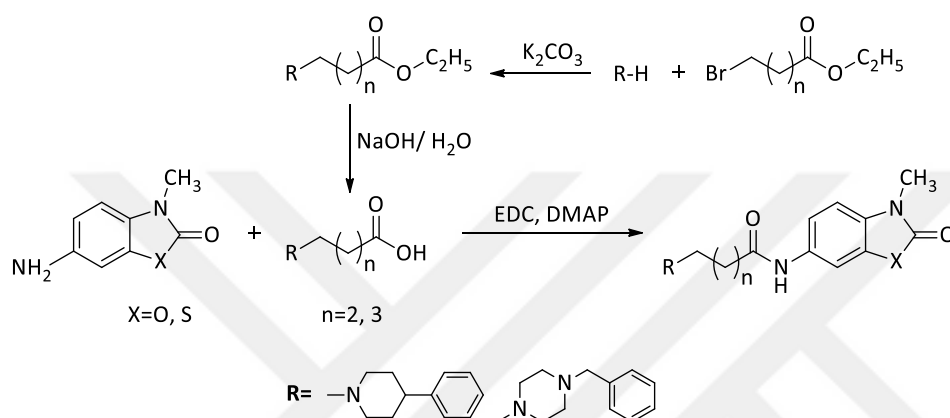
Benzotiyazolon halkasının 6. konumunda propanamit zinciri taşıyan seri için benzoksazolon halkasında kullanılan yöntem denendiğinde sonuç ürünler düşük verimle elde edildi. Bu nedenle bu seri bileşiklerin eldesinde uygun karboksilik asitlerle amitleştirme yapılarak sonuç ürünler elde edildi. Kullanılan karboksilik asitlerin sentezi için öncelikle ester formları hazırlandı. Bunun için metil akrilat ve uygun aminlerin Michael katım tepkimesinden faydalanıldı. Daha sonra elde edilen esterlerin bazik ortamda hidrolizinden karboksilik asitler hazırlandı. Hazırlanan karboksilik asitlerin, EDC ve DMAP ile diklorometan içinde tepkimesinden de 14 sonuç bileşik sentez edildi.



Şekil 5.3. Benzotiyazolon propanamit serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması

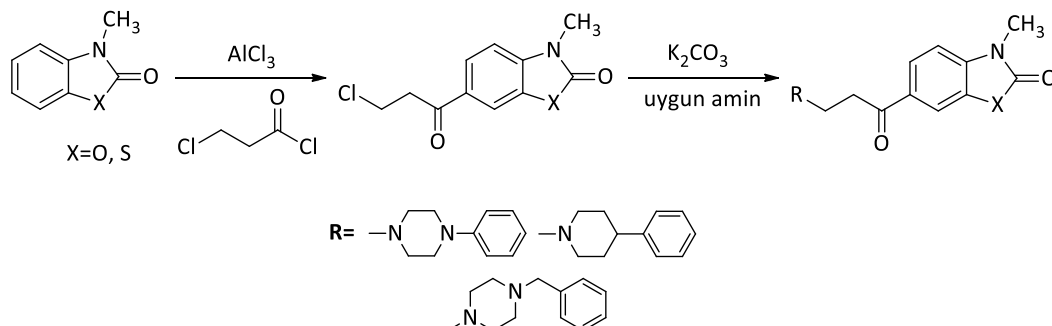
Benzoksazolon ve benzotiyazolon halkasının 6. konumunda bütanamit ve pentanamit taşıyan türevler, benzotiyazolon propanamit serisinde kullanılan amitleştirme yöntemine

göre sentezlendi. Bütanamit türevlerinin sentezi için gerekli olan karboksilik asitler, etil 4-bromobütirat ve uygun amin türevinin potasyum karbonat varlığında yer değiştirmesi sonucu oluşan esterin bazik ortamda hidrolizinden elde edildi. Pentanamit türevi bileşiklerin sentezinde kullanılacak karboksilik asitler ise etil 5-bromovalerat yardımıyla aynı yöntemle sentez edilmiştir. Her iki seride de fenilpiperidin yan zincirine sahip bileşikler yalnızca benzotiyazolon halka sistemi için sentez edilmiştir.



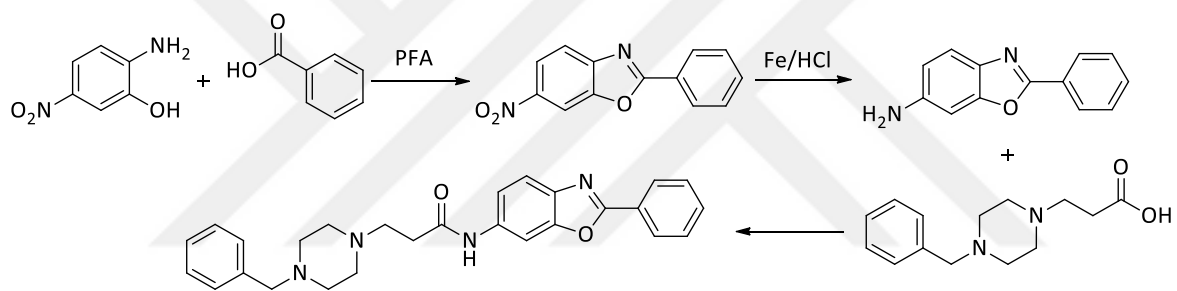
Şekil 5.4. Bütanamit ve pentanamit serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması

Keton türevi sonuç bileşiklerin sentez edilebilmesi için öncelikle amit türevlerinin ilk basamağında olduğu gibi 1,3-benzoksazolon-2(3H)-on ve 1,3-benzotiyazolon-2(3H)-on halkalarının 3. konumu metillendi, ardından alüminyum klorür varlığında kloropropionil klorür ile dimetilformamit içinde açılasyon yapıldı. Elde edilen ürün ile uygun amin türevlerinin yer değiştirme tepkimesinden ise planlanan 6 sonuç bileşik elde edildi.

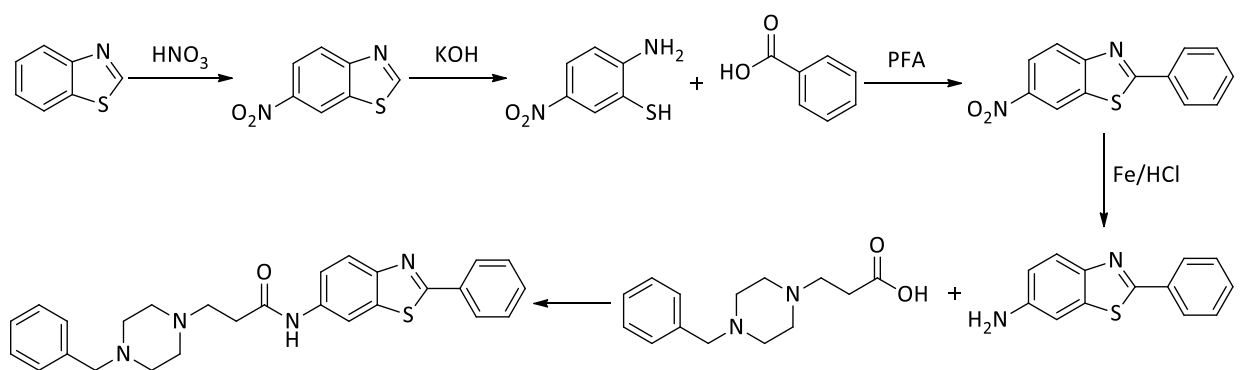


Şekil 5.5. Keton serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması

Son olarak, 2-fenilbenzoksazol/benzotiyazol propanamit yapısındaki 2 bileşiğin sentezinde farklı başlangıç maddelerinden yola çıkılmıştır. 2-Fenilbenzoksazol propanamit yapısına sahip bileşik, ticari olarak mevcut 2-amino-5-nitrofenol ve benzoik asitin polifosforik asit içindeki tepkimesinden elde edilmiştir. Elde edilen nitro türevi, demir ve hidroklorik asit varlığında amin türevine indirgenmiştir. Daha sonra amin türevinin, 3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoik asit ile EDC ve DMAP varlığındaki tepkimesinden sonuç ürün elde edilmiştir. 2-Fenilbenzotiyazol eşleniğinin sentezine ise ticari olarak mevcut benzotiyazol halkası nitrolanarak başlandı. Sonrasında 6-nitrobenzotiyazol'ün sulu potasyum hidroksit çözeltisi içinde parçalanmasıyla elde edilen 2-amino-5-nitrotiyofenol'den hareketle 2-fenilbenzoksazol türevinin eldesindeki sentez yolları kullanılarak sonuç bileşik elde edilmiştir.



Şekil 5.6. Bileşik 41'in sentez şeması



Şekil 5.7. Bileşik 42'nin sentez şeması

Propanamit serisine ait bileşiklerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında amit protonu 10.19-10.05 ppm aralığında gözlenmiştir. Benzoksazolon ve benzotiyazolon halkalarının 3. konumundaki azota bağlı metil protonları 3.37-3.28 ppm aralığında 3H singlet olarak gözlenmiştir. Halkanın 4. konumundaki proton 7.23-7.14 ppm aralığında dublet, 5.

konumundaki proton 7.48-7.26 ppm aralığında dubletin dubleti, 7. konumundaki proton ise 7.98-7.69 ppm aralığında dublet olarak gözlenmiştir.

Bütanamit serisine ait bileşiklerin ^1H -NMR spektrumlarında amit protonu 9.95-9.92 ppm aralığında gözlenmiştir. Benzoksazolon ve benzotiyazolon halkasının 3. konumundaki azota bağlı metil protonları 3.35-3.30 ppm aralığında 3H singlet olarak gözlenmiştir. Halkaların 4. konumundaki proton 7.30-7.07 ppm aralığında dublet, 5. konumundaki proton 7.48-7.20 ppm aralığında dubletin dubleti, 7. konumundaki proton ise 7.99-7.73 ppm aralığında dublet olarak gözlenmiştir.

Pentamit serisine ait bileşiklerin ^1H -NMR spektrumlarında amit protonu 9.96-9.92 ppm aralığında gözlenmiştir. Benzoksazolon ve benzotiyazolon halkasının 3. konumundaki azota bağlı metil protonları 3.37-3.28 ppm aralığında 3H singlet olarak gözlenmiştir. Halkaların 4. konumundaki proton 7.31-7.12 ppm aralığında dublet, 5. konumundaki proton 7.47-7.17 ppm aralığında dubletin dubleti, 7. konumundaki proton ise 7.97-7.70 ppm aralığında dublet olarak gözlenmiştir.

Keton serisine ait bileşiklerin ^1H -NMR spektrumlarında benzoksazolon ve benzotiyazolon halkalarının 3. konumundaki azota bağlı metil protonları 3.45-3.35 ppm aralığında 3H singlet olarak gözlenmiştir. Halkaların 4. konumundaki proton 7.41-7.34 ppm aralığında dublet, 5. konumundaki proton 8.30-7.94 ppm aralığında dubletin dubleti, 7. konumundaki proton ise 8.33-7.89 ppm aralığında dublet olarak gözlenmiştir.

2-Fenilbenzoksazol/benzotiyazol serisine ait bileşiklerin ^1H -NMR spektrumlarında ise amit protonu 10.37-10.36 ppm aralığında gözlenmiştir. Halkaların 4. konumundaki proton 7.95-7.70 ppm aralığında dublet, 5. konumundaki proton 7.54-7.37 ppm aralığında dubletin dubleti, 7. konumundaki proton ise 8.51-8.25 ppm aralığında dublet olarak gözlenmiştir.

Ayrıca sentez edilen tüm bileşiklerin yan zincirdeki protonları ve yan zincire bağlı halka protonları da olması gerektiği gibi gözlenmiş, bulgular kısmında eşleştirmeleri ve açıklamaları yapılmıştır.

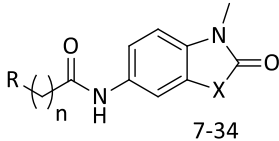
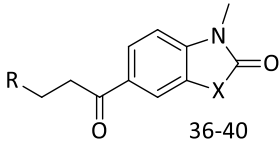
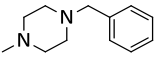
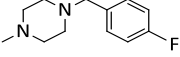
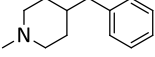
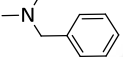
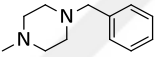
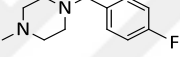
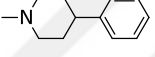
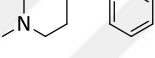
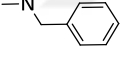
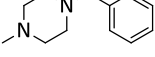
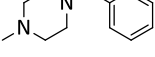
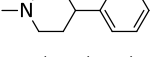
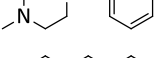
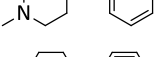
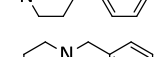
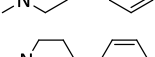
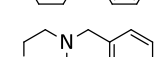
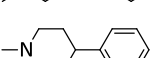
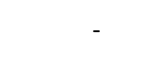
5.2. Biyolojik Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi

5.2.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite bulgularının değerlendirilmesi

Öncelikle sentez edilen 28 propanamit türevi bileşiğin kolinesteraz inhibitör aktiviteleri 100 μM konsantrasyonda değerlendirilmiş ve %50'nin üzerinde AKE (Bileşik 7, 8, 13, 14, 21, 22, 26, 27, 28) ve BKE (Bileşik 22, 26, 27, 28) inhibisyonu gösteren bileşiklerin IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre en yüksek AKE inhibisyonuna sahip bileşik 21 ($\text{IC}_{50} = 2.34 \mu\text{M}$) ve en yüksek BKE inhibisyonuna sahip bileşik 26 ($\text{IC}_{50} = 11.14 \mu\text{M}$) öncü bileşikler olarak belirlenmiş ve bu bileşikler üzerinden yapılan kimyasal düzenlemeler ile diğer seriler sentez edilmiştir.

Kolinesteraz inhibitör aktivite sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, bileşiklerin AKE inhibitör aktivitelerinin, BKE inhibitör aktivitelerine göre daha iyi olduğu görülmüştür. Çizelge 5.1'de görüldüğü gibi test edilen bileşikler arasında 39, 36, 30 ve 21 sırasıyla en yüksek AKE inhibisyonuna (sırasıyla $\text{IC}_{50} = 0.34, 0.89, 1.96, 2.34 \mu\text{M}$) sahip bileşiklerdir. Ayrıca bileşik 34, $2.98 \mu\text{M}$ 'lık IC_{50} değeri ile en yüksek BKE inhibisyonuna sahip bileşiktir.

Çizelge 5.1. Kolinesteraz inhibitör aktivite bulguları

 7-34  36-40						
Bileşik	X	n	R	AKE için IC ₅₀ ± SD (μM)	BKE için IC ₅₀ ± SD (μM)	
7	O	2		6.94 ± 1.06	-	
8	O	2		16.10 ± 0.99	-	
13	O	2		24.60 ± 1.15	-	
14	O	2		52.40 ± 1.21	-	
21	S	2		2.34 ± 0.61	-	
22	S	2		7.09 ± 1.09	37.60 ± 1.84	
26	S	2		60.30 ± 2.24	11.14 ± 1.07	
27	S	2		31.90 ± 1.46	75.38 ± 1.99	
28	S	2		49.50 ± 1.54	41.96 ± 1.12	
29	O	3		6.00 ± 1.13	-	
30	S	3		1.96 ± 0.42	-	
31	S	3		-	9.65 ± 1.13	
32	O	4		30.86 ± 1.08	-	
33	S	4		13.96 ± 1.02	-	
34	S	4		-	2.98 ± 1.02	
36	O	-		0.89 ± 0.14	-	
37	O	-		6.65 ± 1.07	-	
39	S	-		0.34 ± 0.16	-	
40	S	-		4.32 ± 1.18	13.97 ± 1.15	
Donepezil	-	-	-	0.058 ± 0.01	3.70 ± 0.10	

(-): inhibitör aktivite yok anlamına gelmektedir.

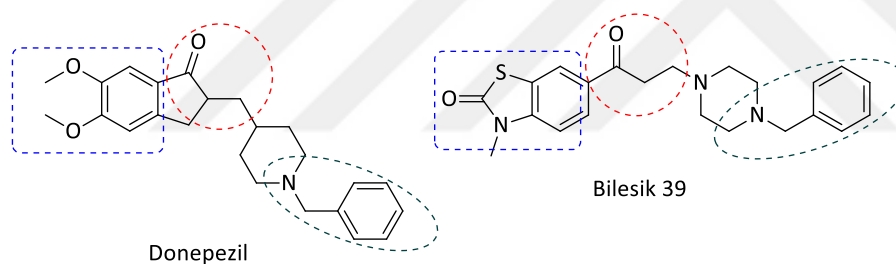
Asetilkolinesteraz enzimi için biyolojik aktivite bulgularının değerlendirilmesi

Bileşiklerin AKE için IC_{50} değerleri 0.34 ile 60.30 μM arasındadır. Yapı etki ilişkileri göz önüne alındığında, genel olarak benzotiyazolon çekirdeğine sahip bileşiklerin, benzoksazolon çekirdeğine sahip bileşiklerden daha aktif olduğu bulunmuştur. Örneğin benzotiyazolon propanamit türevi bileşik 21 ($IC_{50}=2.34 \mu M$), benzoksazolon eşleniği bileşik 7'den ($IC_{50}=6.94 \mu M$) 3 kat daha aktiftir. Bütanamit serisinde de benzotiyazolon yapısındaki bileşik 30'un ($IC_{50}=1.96 \mu M$) benzoksazolon eşleniği bileşik 29'dan ($IC_{50}=6.00 \mu M$) 3 kat daha aktif olduğu belirlenmiştir. Pentanamit serisinde de benzer bir ilişki gösterilmiştir. Bu duruma paralel olarak, benzotiyazolon çekirdeğine sahip keton yapısındaki bileşik 39 ($IC_{50}=0.34 \mu M$) da benzoksazolon eşleniğinden (bileşik 36 $IC_{50}=0.89 \mu M$) 3 kat daha aktiftir.

Sentez edilen propanamit serisi bileşiklerin AKE inhibitör aktiviteleri yan zincirinde taşıdıkları gruplara göre değerlendirildiğinde, benzilpiperazin taşıyan bileşiklerin (bileşik 7 $IC_{50}=6.94$ ve bileşik 21 $IC_{50}=2.34 \mu M$) en aktif olduğu görülmüştür. Bu bileşikler 4-florobenzilpiperazin (bileşik 8 $IC_{50}=16.10$ ve bileşik 22 $IC_{50}=6.71$) taşıyan bileşikler takip etmektedir. Benzilpiperazinin 4. konumunda bulunan sübstitüentlerin aktivite üzerine etkisi değerlendirildiğinde; flor sübstitüentinin aktiviteyi yaklaşık 2.5 kat azalttığı, klor, metoksi ve triflometil sübstitüentlerinin ise inhibitör aktiviteyi tamamen ortadan kaldırdığı görülmektedir. İlave olarak benzilpiperazinle kıyaslandığında yan zincirde fenilpiperidin, benzilpiperidin ve N-metilbenzilamin grubu taşıyan bileşiklerde AKE inhibitör aktivitenin önemli derecede azaldığı, yan zincirde fenilpiperazin ve türevlerini taşıyan bileşiklerde ise AKE inhibitör aktivitenin ortadan kalktığı belirlenmiştir.

Propanamit serilerinde benzilpiperazin yapısının AKE inhibitör aktivite açısından daha iyi olduğu belirlendikten sonra yan zincirdeki karbon sayısının aktiviteye üzerine etkisinin incelenmesine karar verilmiş ve bu bağlamda bütanamit ve pentanamit eşlenikleri hazırlanmıştır. Karbon sayısının bir arttırılmasıyla elde edilen bütanamit türevi bileşik 29 ($IC_{50}=6.00 \mu M$) ve bileşik 30 ($IC_{50}=1.96 \mu M$)'un propanamit serisindeki eşleniklerine göre AKE inhibitör aktiviteyi çok az arttırdıkları bulunmuştur. Fakat pentanamit serisinde karbon sayısının artırılması aktivitede düşüşe neden olmuştur (bileşik 32 $IC_{50}=30.86 \mu M$ ve bileşik 33 $IC_{50}=13.96 \mu M$).

Yan zincirdeki karbon sayılarının değiştirilmesinden sonra amit fonksiyonel grubunun aktivite açısından önemini değerlendirmek amacıyla amit fonksiyonel grubu keton ile değiştirilmiştir. Bu değişim çok güçlü bir AKE inhibitörü olan donepezilden ilham alınarak gerçekleştirilmiştir. Benzoksazolon halkası taşıyan ve amit grubunun keton ile değiştirilmesiyle elde edilen bileşik 36 ($IC_{50}=0.89 \mu M$), propanamit eşleniği bileşik 7'den ($IC_{50}=6.94 \mu M$) 8 kat daha aktif bulunmuştur. Bu fark benzotiyazolon halkası taşıyan bileşik 39 ($IC_{50}=0.34 \mu M$) ve propanamit eşleniği bileşik 21 ($IC_{50}=2.34 \mu M$) arasında da korunmuştur. Dolayısıyla amit fonksiyonel grubu yerine keton grubu getirilmesinin AKE inhibisyonu açısından faydalı olduğu söylenebilir. Bu bulgulardan hareketle, öncü bileşiklerin yapısında bulunmayan fenilpiperazin grubunun kolinesteraz inhibitör aktivite üzerindeki etkisini test etmek amacıyla bu grubu taşıyan bileşikler (bileşik 35 ve 38) sentez edilmiş ancak her iki bileşikte de propanamit serisi eşleniklerinde olduğu gibi (bileşik 1 ve 15) aktivite bulunmamıştır.



Şekil 5.8. Donepezil ve bileşik 39'un kimyasal yapıları

Ayrıca benzoksazolon ve benzotiyazolon halka sistemlerinin 2. konumunda bulunan karbonil grubunun yerine fenil grubunun getirildiği 2-fenilbenzoksazol ve 2-fenilbenzotiyazol yapısında iki bileşik (Bileşik 41 ve 42) sentez edilmiştir. Sentez edilen bileşiklerin her ikisi de AKE inhibitör aktivite göstermemektedir. Buradan yola çıkarak karbonil grubunun enzim ile etkileşimde önemli rol oynadığı düşünülmüştür.

En yüksek AKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 39 ($IC_{50}=0.34 \mu M$) için enzim inhibisyon tipinin belirlenmesi amacıyla enzim kinetiği çalışması yapılmıştır. Bileşik 39'un 4 farklı konsantrasyonu için elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde grafiklerin x ekseninde kesiştikleri görülmüş ve bileşiğin enzimi nonkompetitif tipte inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca bileşik 39'un farklı konsantrasyonlarına karşı Lineweaver-Burk

grafiklerinin eğimi kullanılarak elde edilen grafiğin x eksenini kestiği noktadan K_i değeri hesaplanmış ve bu değer $0.4 \mu\text{M}$ bulunmuştur.

Bütirilkolinesteraz enzimi için biyolojik aktivite bulgularının değerlendirilmesi

Propanamit serisi bileşiklerin BKE inhibitör aktiviteleri incelendiğinde; benzoksazolon halkasına sahip bileşiklerin inhibitör etki göstermediği, BKE inhibitör aktivite gösteren bileşiklerin benzotiyazolon yapısında olduğu belirlenmiştir (bileşik 22, 26, 27, 28). Bileşiklerin BKE için IC_{50} değerleri 2.98 ile $75.38 \mu\text{M}$ arasında bulunmuştur.

BKE inhibitör aktivite açısından yan zincire bağlı tersiyer amin yapıları incelendiğinde; fenilpiperidin sübstitüenti taşıyan bileşik 26'nın $11.14 \mu\text{M}$ 'lık IC_{50} değeri ile propanamit serisi içinde en güçlü BKE inhibitör aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu bileşiği yan zincirde 4-florobenzilpiperazin, N-metilbenzilamin ve benzilpiperidin türevleri takip etmektedir (sırasıyla bileşik 22 $IC_{50} = 37.60 \mu\text{M}$, bileşik 28 $IC_{50} = 41.96$, bileşik 27 $IC_{50} = 75.38 \mu\text{M}$)

Propanamit serisinde benzoksazolon türevi bileşiklerin BKE inhibitör aktivite göstermemeleri nedeniyle, BKE inhibitör aktiviteyi iyileştirmek için yaptığımız yapısal değişiklik çalışmalarına benzoksazolon halkası dahil edilmemiştir. Halka sistemi ve yan zincire bağlı hangi grubun BKE inhibitör aktivite açısından önemli olduğu belirlendikten sonra yan zincirdeki karbon sayısının inhibitör aktiviteyi nasıl değiştirdiği değerlendirilmiştir. Bütanamit serisine ait bileşik 31'in ($IC_{50} = 9.65 \mu\text{M}$) propanamit serisindeki eşleniğinden (bileşik 26 $IC_{50} = 11.14 \mu\text{M}$) daha aktif olduğu bulunmuştur. Ayrıca pentanamit serisine ait bileşik 34'ün ($IC_{50} = 2.98 \mu\text{M}$) de bütanamit serisi eşleniğinden daha aktif olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre BKE inhibitör aktivite açısından yan zincir uzunluğunu artırmanın aktiviteyi olumlu yönde etkilediği söylenebilir.

Amit fonksiyonel grubunun yerine keton fonksiyonel grubunun getirilmesiyle elde edilen bileşik 40'ın ($IC_{50} = 13.37 \mu\text{M}$), propanamit eşleniği olan bileşik 26'dan daha az aktif oluşu, keton fonksiyonel grubunun AKE inhibisyonu üzerindeki olumlu etkisini BKE inhibisyonunda

sürdüremediğini göstermektedir. Dolayısıyla BKE inhibitör aktivite açısından amit fonksiyonel grubu daha avantajlı bulunmuştur.

Enzim kinetiği çalışması en yüksek BKE inhibitör aktiviteye sahip olan bileşik 34 ($IC_{50} = 2.98 \mu M$) için BKE enziminde tekrarlanmış ve bileşik 34'ün karışık tipte inhibitör olduğu ve K_i değerinin $1.21 \mu M$ olduğu belirlenmiştir.

5.2.2. Antienflamatuvar aktivite bulgularının değerlendirilmesi

Genel bilgiler kısmında da paylaşıldığı üzere son yıllarda yapılan pek çok çalışma enflamasyonun AH'nin gelişmesinde ve ilerlemesinde çok önemli olduğunu vurgulamaktadır. Dolayısıyla tezimiz kapsamında sentezlediğimiz bileşiklerin kolinesteraz inhibisyonu yapmalarının yanı sıra antienflamatuvar etkilerinin de değerlendirilmesi planlanmış ve AH tedavisinde kullanılan ilaçlardan olan donepezil üzerine yapılmış antienflamatuvar aktivite testlerinden yola çıkılarak, ileri aktivite çalışmaları kapsamında bileşiklerin enflamasyon üzerindeki etkilerinin test edilmesine karar verilmiştir. Bu bağlamda AKE ve BKE inhibitör aktiviteleri yüksek olan sekiz bileşik (Bileşik 7, 21, 29, 30, 31, 34, 36, 39) seçilerek ileri aktivite taramaları kapsamında enflamatuvar mediyatörlerin (IL-1 β , IL-6, TNF- α ve NO) seviyeleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Seçilen aktif bileşiklerin LPS ile stimüle edilmiş ortamda IL-1 β seviyesine etkileri incelendiğinde, bileşik 39 referans bileşik donepezile göre daha iyi etki göstermekle birlikte istatistiksel olarak aralarında çok büyük bir fark bulunmamıştır.

Bileşiklerin diğer bir enflamasyon belirtici olan IL-6 seviyesine olan etkileri değerlendirildiğinde, bileşik 21, 29, 31, 34 ve 39'un donepezile kıyasla daha iyi etki gösterdiği yani IL-6 seviyesini daha iyi azalttığı fakat istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı görülmüştür.

Seçilen bileşiklerin en önemli enflamasyon belirteçlerinden biri olan TNF- α 'nın seviyesine etkileri incelendiğinde ise tüm bileşiklerin donepezil kadar etki gösterdikleri belirlenmiştir.

Bileşiklerin NO üzerine etkileri ele alındığında, bileşik 29, 34 ve 39'un NO düzeyini donepezilden daha iyi azalttığı belirlenmiş ve bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Antienflamatuvar aktivite çalışmasından elde edilen sonuçlara göre bileşik 39'un IL-1 β , IL-6 ve TNF- α belirteçlerinin seviyelerini donepezil kadar ve NO belirteci seviyesini donepezilden daha iyi düşürdüğü dolayısıyla daha iyi antienflamatuvar katkı yaptığı in vitro olarak belirlenmiştir.

5.2.3. Apoptozis bulgularının değerlendirilmesi

İleri aktivite çalışmaları kapsamında seçilen sekiz bileşik (Bileşik 7, 21, 29, 30, 31, 34, 36, 39) annexin V apoptozis deneyi ile 10 μ M konsantrasyonda test edilmiş ve bileşiklerden hiçbirinin apoptozisi indüklenmediği ve neredeyse hepsinde (bileşik 7 hariç %89) hücrelerin %90'ın üzerinde canlılık gösterdiği belirlenmiştir.

5.2.4. Sitotoksikite testi bulgularının değerlendirilmesi

Seçilen bileşiklerin güvenlik profillerinin belirlenebilmesi amacıyla sitotoksikite testi uygulanmıştır. Bu amaçla bileşikler IC₅₀ değerlerinin altında ve üzerinde (0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonda) test edilmiş ve hiçbirisi sitotoksik etki göstermemiştir. Belirlenen konsantrasyonlarda hücre canlılığı %90'ın üzerindedir. Dolayısıyla bileşiklerden hiçbirinin sitotoksik etki göstermediği in vitro olarak kanıtlanmıştır.

5.3. Moleküler Docking Bulgularının Değerlendirilmesi

Yapı etki ilişkilerinin daha iyi yorumlanması ve bağlanma modlarının belirlenmesi amacıyla moleküler docking çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada AKE enzimi için, *Torpedo californica* türünden elde edilen kristal yapısı (TcAKE) kullanılırken, BKE enzimi için insan BKE enzim kristal yapısı (HuBKE) tercih edilmiştir. AKE'ye yönelik yapı-etki ilişkilerinin değerlendirilmesi için en yüksek inhibitör aktivite gösteren 6 bileşik (Bileşik 7, 21, 29, 30, 36, 39), daha az aktivite gösteren 2 bileşik (Bileşik 32 ve 33) ve inhibitör aktivite

göstermeyen 4 bileşik (Bileşik 1, 15, 35, 38) seçilmiş ve AKE enzimi ile docking çalışması gerçekleştirilmiştir. BKE için ise en yüksek inhibitör aktivite gösteren 3 bileşik (Bileşik 26, 31, 34) ve inhibitör aktivitesi bulunmayan bileşik 15 seçilmiş ve BKE enzimi ile docking çalışması gerçekleştirilmiştir.

5.3.1. Asetilkolinesteraz için docking bulgularının değerlendirilmesi

AKE enziminin aktif bölge cebi periferel anyonik bölge ve katalitik aktif bölge olmak üzere iki temel kısımdan oluşmaktadır. Periferel anyonik bölge etkileşimlerinde Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp289 ve Tyr334 amino asitlerinin, katalitik aktif bölge etkileşiminde ise Ser200, Glu327 ve His440, Trp84, Tyr130, Phe330, Phe331, Gly118, Gly119 ve Ala201 amino asitlerinin önemli olduğu bildirilmiştir. Bu amino asitler ile etkileşimin yanı sıra enzim kristal yapısında gözlenen ve aktif bölgede gömülü halde bulunan su moleküllerinin de ligand ile etkileşimde önemli rolü olduğu ifade edilmiştir [123].

AKE enzimini güçlü şekilde inhibe eden donepezilin AKE enzimi ile etkileşimi incelendiğinde molekülün hem periferel anyonik bölge ile hem de katalitik aktif bölge ile etkileştiği görülmüştür. Periferel anyonik bölge etkileşimleri değerlendirildiğinde, enzim aktif bölgesinin girişinde yer alan Trp279 ile indanon halkasının π - π etkileşimi yaptığı ve bu etkileşime ek olarak indanon halkasındaki dimetoksi gruplarının da su molekülleri aracılığıyla Trp279 karbonili üzerinden etkileştiği görülmüştür. Ayrıca kolin bağlanma bölgesinde yer alan Trp84 ile de molekülün benzil kısmı π - π etkileşimi yapmaktadır. Bunun yanı sıra Phe330 ve Tyr334 ile piperidin azotunun su köprüsü aracılığıyla etkileşerek hidrojen bağı yaptığı bildirilmiştir [4].

Biyolojik aktivite bulgularının değerlendirildiği bölümde belirtildiği gibi, benzoksazon çekirdeği taşıyan ve amit fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerin yan zincirlerinde taşıdıkları karbon sayısına göre optimum aktivitenin bütanamit (bileşik 29) türevinde görüldüğü, bütanamit serisini çok az farkla propanamit (bileşik 7) serisinin takip ettiği ve pentanamit (bileşik 32) serisinde ise aktivitenin düştüğü belirlenmiştir. Bütanamit ve propanamit yapısındaki bileşikler enzim aktif bölgesiyle genel olarak benzer etkileşimler göstermektedir. Her iki bileşik de PAB'da Trp279 ile benzoksazon halkasının fenili

üzerinden π - π etkileşimi yapmaktadır. Ayrıca PAB'da Tyr334'ün de piperazin halkası ve etilen ara zinciri üzerinden aren-hidrojen etkileşimi yaptığı belirlenmiştir. KAB'da ise Phe330 ile piperazin halkası üzerinden aren-hidrojen etkileşimi bulunmaktadır. Yine aynı bölgede gömülü su molekülleri ile piperazin azotu üzerinden hidrojen bağı ve benzil grubunun fenil halkası üzerinden ise Trp84 vasıtasıyla π - π etkileşimleri yaptıkları gözlenmiştir. Görece daha aktif olan bileşik 29'un docking sonuçları incelendiğinde bu etkileşimlere ek olarak benzoksazolon halkasının PAB'da Trp279 ile, KAB'da ise Glu199 ile etkileştiği belirlenmiştir. Buna karşılık bileşik 7 de benzoksazolon halkasının karbonili üzerinden iki su molekülü ile etkileşmektedir. Bu bulgular iki bileşiğin arasında büyük bir aktivite farkı olmaması durumunu doğrulamaktadır. Pentanamit serisine ait olan bileşik 32'nin etkileşimlerine bakıldığında ise Trp279 ve Phe331 ile olan etkileşimin ortadan kalktığı belirlenmiştir. Bu durum da aktivite kaybını açıklamaktadır.

Yan zincirdeki grupların biyolojik aktivite açısından önemini değerlendirmek amacıyla bileşik 1 ve bileşik 7 kıyaslanmıştır. Benzilpiperazin taşıyan bileşik 7'de Trp84 ve Phe330 etkileşimleri görülürken, fenilpiperazin taşıyan bileşik 1'de bu etkileşimlerin tamamen ortadan kalktığı belirlenmiştir.

Amit fonksiyonel grubuna sahip benzoksazolon yapısındaki bileşiklerin biyolojik aktivite sonuçları ile kurulan yapı etki ilişkileri genel hatlarıyla benzotiyazolon yapısındaki bileşikler için de geçerlidir. Benzotiyazolon yapısındaki propanamit (bileşik 21) ve bütanamit (bileşik 30) türevi bileşikler kıyaslandığında her iki bileşiğin de PAB'da Trp279 ile benzotiyazolon halkasının fenili üzerinden π - π etkileşimi ve KAB'da ise Phe330 ile piperazin halkası üzerinden aren-hidrojen etkileşimi yaptıkları görülmektedir. Ayrıca gömülü su molekülleri ile amit karbonili aracılığıyla etkileştikleri ve benzil grubunun fenil halkası üzerinden ise Trp84 vasıtasıyla π - π etkileşimleri yaptıkları gözlenmiştir. Bütanamit türevinin ilave olarak Glu199 ile hidrojen bağı yaptığı bunun yanı sıra Phe330 ile de piperazin halkasının her iki azotundan da etkileştiği belirlenmiştir. Pentanamit serisine ait taşıyan bileşik 33'de ise Trp279 etkileşiminin ortadan kalkması ve amit karbonili üzerinden yapılan hidrojen bağının gözlenmemesi aktivite kaybını açıklamaktadır. Ayrıca yan zincirde bulunan fenilpiperazin (bileşik 15) ve benzilpiperazin grupları kıyaslandığında, fenilpiperazin türevinde Trp84 ve Phe330 etkileşimlerinin görülmemesi aktivite sonuçlarını desteklemektedir.

Keton fonksiyonel grubu taşıyan ve AKE inhibisyonu en yüksek olan sırasıyla benzoksazon ve benzotiyazon yapısındaki bileşik 36 ve bileşik 39'un enzim aktif bölgesiyle yaptığı etkileşimler incelenmiştir. Etkileşimleri kısaca özetlemek gerekirse, iki bileşiğin de halka sistemine ait karbonil grubu ile su molekülü arasında hidrojen bağı, KAB'da Phe330 ve Phe331 ile piperazin halkası üzerinden aren-hidrojen etkileşimi, yine aynı bölgede gömülü su molekülleri ile piperazin azotu üzerinden hidrojen bağı, benzil grubunun fenil halkası üzerinden Trp84 ile π - π etkileşimleri yaptığı belirlenmiştir. PAB'da ise Tyr334 ile piperazin halkası üzerinden aren-hidrojen etkileşimi ve Trp279 ile π - π etkileşimi yaptıkları görülmüştür. Ayrıca keton grubunun karbonili ile de su molekülü arasında hidrojen bağı bulunmaktadır. Bu etkileşimler ek olarak benzotiyazon yapısındaki bileşik 39, Ser286 ile kükürt aracılığıyla hidrojen bağı, alkil yan zinciri ile Tyr334 arasında ek π -H etkileşimi, keton karbonili aracılığıyla Phe290 ile hidrojen bağı ve benzil grubunun fenil halkası aracılığıyla Glu199 ile hidrojen bağı yapmaktadır. AKE inhibitör aktivitesi bulunmayan keton yapısındaki bileşik 35 ve 38'in docking sonuçlarına bakıldığında; halka sistemi ve Trp279 arasındaki π - π etkileşimi dışında bileşik 36 ve 39'daki diğer etkileşimlere rastlanmamıştır. Dolayısıyla yine biyolojik aktivite bulgularıyla docking sonuçlarının uyumlu olduğu söylenebilir.

5.3.2. Bütirilkolinesteraz için docking bulgularının değerlendirilmesi

AKE ve BKE enzimlerinin genel yapıları büyük oranda benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte AKE enzim aktif cebinde bulunan bazı aromatik amino asitler BKE enziminde yerini alifatik amino asitlere bıraktığından BKE enzim aktif cebi 200 Å³ daha geniştir. BKE enzimi ile etkileşimde önemli olduğu düşünülen amino asitler Asp70, Ser79, Trp82, Ser198, Thr120, Trp231, Phe285, Ser287, Phe329, Tyr332, Trp430, His438 ve Tyr440'dır. BKE enzim aktif bölgesinde de AKE'de olduğu gibi gömülü su moleküllerinin bulunduğu ve ligand etkileşimine aracılık ettiği bildirilmiştir [123, 210].

En yüksek BKE inhibitör etkiye sahip bileşik 34'ün docking sonuçları incelendiğinde; fenilpiperidin'in fenil kısmı ile Phe329 ve Trp231 arasında aren-hidrojen etkileşimi, piperidin azotu ile Ser287 arasında hidrojen bağı etkileşimleri belirlenmiştir. Bileşik 34'ün üçte biri kadar aktif bileşik 31'de (IC₅₀= 9.65 µM) ise benzotiyazon halkası Ser287 ile aren-

hidrojen etkileşimi, piperidin halkası Ser198 ve His438 ile hidrojen bağı, fenil kısmı ise Trp82 ile π - π etkileşimi yapmaktadır.

BKE inhibitör aktivitesi bulunmayan bileşik 15'in aktif bölge ile yaptığı etkileşimlere bakıldığında ise Ser287 etkileşimi korunmasına rağmen Phe329 ile etkileşimlerin ortadan kalkmasıyla aktivitenin de ortadan kalktığı görülmektedir. Diğer etkileşimlerin gözlenmemesi biyolojik aktivite testleri ile moleküler docking çalışmalarının uyumunu ortaya koymaktadır.

5.4. Fizikokimyasal Parametre Bulgularının Değerlendirilmesi

Sentez edilen bileşiklerden en aktif olan sekizi (Bileşik 7, 21, 29, 30, 31, 34, 36, 39) seçilerek molekül ağırlığı, logP, topolojik polar yüzey alanı, hidrojen bağı donör sayısı, hidrojen bağı akseptör sayısı ve moleküler hacim gibi bazı fizikokimyasal parametreleri hesaplanmıştır. Hesaplanan fizikokimyasal parametreler moleküllerin ilaç olabilirliklerini değerlendirmek açısından önem taşımaktadır. Bulgular değerlendirildiğinde sekiz bileşiğin de Lipinski kurallarına tamamen uyduğu ve kan beyin bariyerini geçebilecekleri görülmektedir. Bu sonuca göre tez kapsamında elde edilen aktif moleküllerin farmakokinetik açıdan da ilaç olmaya uygun moleküller olabilecekleri düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kolinesteraz inhibitör aktivite bulguları değerlendirildiğinde, benzotiyazolon halkası taşıyan türevlerin benzoksazolon halkası taşıyan türevlere göre daha aktif olduğu bulunmuştur. Fonksiyonel grup açısından incelendiğinde ise AKE inhibitör aktivite için keton grubunun, BKE inhibitör aktivite açısından ise amit grubunun daha uygun olduğu görülmüştür. Ayrıca amit fonksiyonel grubu taşıyan bileşiklerde optimum zincir uzunluğunun, AKE inhibitör aktivite için dört karbon ve BKE inhibitör aktivite için beş karbon olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgilere ek olarak benzoksazolon ve benzotiyazolon halkalarının 2. konumunda yer alan karbonil grubunun aktivite için gerekli olduğu da belirlenmiştir.

En yüksek AKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 39, galantamin ve rivastigmin ile kıyaslanabilir inhibitör etkiye sahiptir. Bununla birlikte bileşik 39'un enflamatuvar mediyatör NO seviyesini donepezilden daha iyi azalttığı diğer enflamatuvar mediyatörlerin (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) seviyeleri üzerine etkisinin de donepezil kadar olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde en yüksek BKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 34'ün de NO belirteci seviyesini donepezilden daha iyi azalttığı ve diğer enflamatuvar mediyatörler (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) üzerine etkisinin de donepezil kadar olduğu bulunmuştur. İlave olarak bileşik 34 ve 39'un sitotoksik olmadığı ve apoptozisi indüklemediği gösterilmiştir. Ayrıca her iki bileşiğin de teorik olarak incelenen fizikokimyasal parametreleri, iki bileşiğin de ilaç olabilecek özellikleri taşıdığını ve kan beyin bariyerini geçebileceğini göstermiştir.

Elde edilen yapı-etki ilişkisi bulguları ışığında, sonraki çalışmalarımızda hastalığın çoklu hedeflerine yönelik yeni bileşiklerin geliştirilmesi planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

1. Alzheimer's, A. (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 12(4), 459-509.
2. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia. *Alzheimer's Disease International*, 1-13.
3. Yiannopoulou, K.G. and Papageorgiou, S.G. (2012). Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(1), 19-33.
4. Zemek, F., Drtinova, L., Nepovimova, E., Sepsova, V., Korabecny, J., Klimes, J., and Kuca, K. (2014). Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opinion on Drug Safety*, 13(6), 759-774.
5. Graham, W.V., Bonito-Oliva, A., and Sakmar, T.P. (2017). Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annual Review of Medicine*, 68(1), 413-430.
6. Agatonovic-Kustrin, S., Kettle, C., and Morton, D.W. (2018). A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 553-565.
7. Kinney, J.W., Bemiller, S.M., Murtishaw, A.S., Leisgang, A.M., Salazar, A.M., and Lamb, B.T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 4, 575-590.
8. Mishra, C.B., Kumari, S., Manral, A., Prakash, A., Saini, V., Lynn, A.M., and Tiwari, M. (2017). Design, synthesis, in-silico and biological evaluation of novel donepezil derivatives as multi-target-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 736-750.
9. Kilic, B., Gulcan, H.O., Aksakal, F., Ercetin, T., Oruklu, N., Umit Bagriacik, E., and Dogruer, D.S. (2018). Design and synthesis of some new carboxamide and propanamide derivatives bearing phenylpyridazine as a core ring and the investigation of their inhibitory potential on in-vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Bioorganic Chemistry*, 79, 235-249.
10. Tang, L., Luo, J.-r., Li, D.-t., Ge, R., Ma, Y.-l., Xu, F., Liang, T.-g., Ban, S.-r., and Li, Q.-s. (2018). Anti-inflammatory effects of 4-o-methyl-benzenesulfonyl benzoxazolone (MBB) in vivo and in vitro as a novel NSAIDs lead compound. *Pharmacological Reports*, 70(3), 558-564.
11. Tariq, S., Kamboj, P., and Amir, M. (2019). Therapeutic advancement of benzothiazole derivatives in the last decennial period. *Archiv der Pharmazie*, 352(1), 1800170.

12. Jacques, P., Pascal, C., and Evelina, C. (2005). 2(3H)-Benzoxazolone and Bioisosters as "Privileged Scaffold" in the Design of Pharmacological Probes. *Current Medicinal Chemistry*, 12(7), 877-885.
13. Doğruer, D.S., Ünlü, S., Yeşilada, E., and Fethi Sahin, M. (1997). N-(2-pyridinyl)-2-[2(3H)-benzazolone-3-yl]acetamides: synthesis, antinociceptive and anti-inflammatory activity. *Farmaco*, 52(12), 745-750.
14. Doğruer, D.S., Ünlü, S., Şahin, M.F., and Yeşilada, E. (1998). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of some (2-benzoxazolone-3-yl and 2-benzothiazolone-3-yl) acetic acid derivatives. *Il Farmaco*, 53(1), 80-84.
15. Önkol, T., Doğruer, D.S., Ito, S., and Sahin, M.F. (2000). Synthesis and Antinociceptive Activity of (5-Chloro-2-benzothiazolinon-3-yl)acetamide Derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 333(10), 337-340.
16. Gulkok, Y., Bicer, T., Onurdağ, F.K., Özgen, S., Sahin, M.F., and Doğruer, D.S. (2012). Synthesis of some new urea and thiourea derivatives and evaluation of their antimicrobial activities. *Turkish Journal of Chemistry*, 36(2), 279-291.
17. Unal, A.S., Onurdağ, F.K., Özgen, S., Doğruer, D., and Onkol, T. (2015). Studies on the synthesis of 3-methyl-6-(substituted-urea/-thiourea)-2(3H)-benzothiazolone derivatives and antimicrobial activities. *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 54(2), 253-259.
18. Çakir, B., Ulucay, A., Doğruer, D.S., Isimer, A., and Sahin, M.F. (1999). Synthesis and antinociceptive activity of some 3-substituted benzothiazolone derivatives. *Il Farmaco*, 54(11), 846-851.
19. Jellinger, K.A. (2010). Should the word 'dementia' be forgotten? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(10), 2415-2416.
20. Castellani, R.J., Rolston, R.K., and Smith, M.A. (2010). Alzheimer disease. *Disease-a-month : DM*, 56(9), 484-546.
21. Maurer, K., Volk, S., and Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet*, 349(9064), 1546-1549.
22. McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack Jr, C.R., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., Mohs, R.C., Morris, J.C., Rossor, M.N., Scheltens, P., Carrillo, M.C., Thies, B., Weintraub, S., and Phelps, C.H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 263-269.
23. Markowitsch, H.J. and Staniloiu, A. (2012). Amnesic disorders. *The Lancet*, 380(9851), 1429-1440.

24. Peters, F., Collette, F., Degueldre, C., Sterpenich, V., Majerus, S., and Salmon, E. (2009). The neural correlates of verbal short-term memory in Alzheimer's disease: an fMRI study. *Brain*, 132(7), 1833-1846.
25. Wagner, M., Wolf, S., Reischies, F.M., Daerr, M., Wolfsgruber, S., Jessen, F., Popp, J., Maier, W., Hüll, M., Frölich, L., Hampel, H., Perneczky, R., Peters, O., Jahn, H., Luckhaus, C., Gertz, H.J., Schröder, J., Pantel, J., Lewczuk, P., Kornhuber, J., and Wiltfang, J. (2012). Biomarker validation of a cued recall memory deficit in prodromal Alzheimer disease. *Neurology*, 78(6), 379.
26. Stokholm, J., Vogel, A., Gade, A., and Waldemar, G. (2006). Heterogeneity in Executive Impairment in Patients with Very Mild Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 22(1), 54-59.
27. Harwood, D.G., Sultzer, D.L., Feil, D., Monserratt, L., Freedman, E., and Mandelkern, M.A. (2005). Frontal Lobe Hypometabolism and Impaired Insight in Alzheimer Disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 13(11), 934-941.
28. Mizrahi, R., Starkstein, S.E., Jorge, R., and Robinson, R.G. (2006). Phenomenology and Clinical Correlates of Delusions in Alzheimer Disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 14(7), 573-581.
29. Parakh, R., Roy, E., Koo, E., and Black, S. (2004). Pantomime and imitation of limb gestures in relation to the severity of Alzheimer's disease. *Brain and Cognition*, 55(2), 272-274.
30. Sarazin, M., Stern, Y., Berr, C., Riba, A., Albert, M., Brandt, J., and Dubois, B. (2005). Neuropsychological predictors of dependency in patients with Alzheimer disease. *Neurology*, 64(6), 1027.
31. Stamps, J.J., Bartoshuk, L.M., and Heilman, K.M. (2013). A brief olfactory test for Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 333(1), 19-24.
32. Bahar-Fuchs, A., Moss, S., Rowe, C., and Savage, G. (2010). Olfactory Performance in AD, aMCI, and Healthy Ageing: A Unirhinal Approach. *Chemical Senses*, 35(9), 855-862.
33. Ju, Y.-E.S., Lucey, B.P., and Holtzman, D.M. (2014). Sleep and Alzheimer disease pathology—a bidirectional relationship. *Nature Reviews Neurology*, 10(2), 115-119.
34. Brown, B.M., Rainey-Smith, S.R., Villemagne, V.L., Weinborn, M., Bucks, R.S., Sohrabi, H.R., Laws, S.M., Taddei, K., Macaulay, S.L., Ames, D., Fowler, C., Maruff, P., Masters, C.L., Rowe, C.C., Martins, R.N., and the, A.R.G. (2016). The Relationship between Sleep Quality and Brain Amyloid Burden. *Sleep*, 39(5), 1063-1068.
35. McAreavey, M.J., Ballinger, B.R., and Fenton, G.W. (1992). Epileptic Seizures in Elderly Patients with Dementia. *Epilepsia*, 33(4), 657-660.

36. Vossel, K.A., Tartaglia, M.C., Nygaard, H.B., Zeman, A.Z., and Miller, B.L. (2017). Epileptic activity in Alzheimer's disease: causes and clinical relevance. *The Lancet Neurology*, 16(4), 311-322.
37. Zarea, A., Charbonnier, C., Rovelet-Lecrux, A., Nicolas, G., Rousseau, S., Borden, A., Pariente, J., Le Ber, I., Pasquier, F., Formaglio, M., Martinaud, O., Rollin-Sillaire, A., Sarazin, M., Croisile, B., Boutoleau-Bretonnière, C., Ceccaldi, M., Gabelle, A., Chamard, L., Blanc, F., Sellal, F., Paquet, C., Campion, D., Hannequin, D., and Wallon, D. (2016). Seizures in dominantly inherited Alzheimer disease. *Neurology*, 87(9), 912.
38. Walsh, J.S., Welch, H.G., and Larson, E.B. (1990). Survival of Outpatients with Alzheimer-type Dementia. *Annals of Internal Medicine*, 113(6), 429-434.
39. Linn, R.T., Wolf, P.A., Bachman, D.L., Knoefel, J.E., Cobb, J.L., Belanger, A.J., Kaplan, E.F., and D'Agostino, R.B. (1995). The 'Preclinical Phase' of Probable Alzheimer's Disease: A 13-Year Prospective Study of the Framingham Cohort. *Archives of Neurology*, 52(5), 485-490.
40. Jost, B.C. and Grossberg, G.T. (1995). The Natural History of Alzheimer's Disease: A Brain Bank Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 43(11), 1248-1255.
41. Förstl, H. and Kurz, A. (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 249(6), 288-290.
42. Burns, A., Jacoby, R., and Levy, R. (1990). Psychiatric Phenomena in Alzheimer's Disease. III: Disorders of Mood. *British Journal of Psychiatry*, 157(1), 81-86.
43. Locascio, J.J., Growdon, J.H., and Corkin, S. (1995). Cognitive Test Performance in Detecting, Staging, and Tracking Alzheimer's Disease. *Archives of Neurology*, 52(11), 1087-1099.
44. Bowen, J.D., Malter, A.D., Sheppard, L., Kukull, W.A., McCormick, W.C., Teri, L., and Larson, E.B. (1996). Predictors of mortality in patients diagnosed with probable Alzheimer's disease. *Neurology*, 47(2), 433.
45. Selekler, K. (2010). Alois Alzheimer ve Alzheimer Hastalığı. *Turkish Journal of Geriatrics*, 13(3), 9-14.
46. Baldwin, S. and Farias, S.T. (2009). Neuropsychological Assessment in the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Current Protocols in Neuroscience*, 49(1), 10.13.11-10.13.18.
47. Kovacs, G.G., Milenkovic, I., Wöhrer, A., Höftberger, R., Gelpi, E., Haberler, C., Hönigschnabl, S., Reiner-Concin, A., Heinzl, H., Jungwirth, S., Krampla, W., Fischer, P., and Budka, H. (2013). Non-Alzheimer neurodegenerative pathologies and their combinations are more frequent than commonly believed in the elderly brain: a community-based autopsy series. *Acta Neuropathologica*, 126(3), 365-384.

48. Salloway, S., Sperling, R., Fox, N.C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Porsteinsson, A.P., Ferris, S., Reichert, M., Ketter, N., Nejadnik, B., Guenzler, V., Miloslavsky, M., Wang, D., Lu, Y., Lull, J., Tudor, I.C., Liu, E., Grundman, M., Yuen, E., Black, R., and Brashear, H.R. (2014). Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 370(4), 322-333.
49. Casaletto, K.B., Elahi, F.M., Bettcher, B.M., Neuhaus, J., Bendlin, B.B., Asthana, S., Johnson, S.C., Yaffe, K., Carlsson, C., Blennow, K., Zetterberg, H., and Kramer, J.H. (2017). Neurogranin, a synaptic protein, is associated with memory independent of Alzheimer biomarkers. *Neurology*, 89(17), 1782.
50. Brinkmalm, A., Brinkmalm, G., Honer, W.G., Frölich, L., Hausner, L., Minthon, L., Hansson, O., Wallin, A., Zetterberg, H., Blennow, K., and Öhrfelt, A. (2014). SNAP-25 is a promising novel cerebrospinal fluid biomarker for synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 9(1), 53.
51. Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M.M.B., de Strooper, B., Frisoni, G.B., Salloway, S., and Van der Flier, W.M. (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 388(10043), 505-517.
52. Herholz, K. and Ebmeier, K. (2011). Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 10(7), 667-670.
53. Zhu, C.W. and Sano, M. (2006). Economic considerations in the management of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging*, 1(2), 143-154.
54. Silva, M.V.F., Loures, C.d.M.G., Alves, L.C.V., de Souza, L.C., Borges, K.B.G., and Carvalho, M.d.G. (2019). Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 33.
55. Reitz, C. and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640-651.
56. Cheung, Z.H., Gong, K., and Ip, N.Y. (2008). Cyclin-Dependent Kinase 5 Supports Neuronal Survival through Phosphorylation of Bcl-2. *The Journal of Neuroscience*, 28(19), 4872.
57. Edwards Iii, G.A., Gamez, N., Escobedo Jr, G., Calderon, O., and Moreno-Gonzalez, I. (2019). Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 146.
58. Staessen Jan, A., Richart, T., and Birkenhäger Willem, H. (2007). Less Atherosclerosis and Lower Blood Pressure for a Meaningful Life Perspective With More Brain. *Hypertension*, 49(3), 389-400.
59. Kimura, N. (2016). Diabetes Mellitus Induces Alzheimer's Disease Pathology: Histopathological Evidence from Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4).

60. Anstey, K.J., Cherbuin, N., Budge, M., and Young, J. (2011). Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obesity Reviews*, 12(5), 426-437.
61. Popp, J., Meichsner, S., Kölsch, H., Lewczuk, P., Maier, W., Kornhuber, J., Jessen, F., and Lütjohann, D. (2013). Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 86(1), 37-42.
62. Ullrich, C., Pirchl, M., and Humpel, C. (2010). Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 45(4), 408-417.
63. Carroll, J.C., Iba, M., Bangasser, D.A., Valentino, R.J., James, M.J., Brunden, K.R., Lee, V.M.Y., and Trojanowski, J.Q. (2011). Chronic Stress Exacerbates Tau Pathology, Neurodegeneration, and Cognitive Performance through a Corticotropin-Releasing Factor Receptor-Dependent Mechanism in a Transgenic Mouse Model of Tauopathy. *The Journal of Neuroscience*, 31(40), 14436.
64. Wu, K.-Y., Lin, K.-J., Chen, C.-H., Chen, C.-S., Liu, C.-Y., Huang, S.-Y., Yen, T.-C., and Hsiao, I.-T. (2018). Diversity of neurodegenerative pathophysiology in nondemented patients with major depressive disorder: Evidence of cerebral amyloidosis and hippocampal atrophy. *Brain and Behavior*, 8(7), 01016.
65. Shi, L., Chen, S.-J., Ma, M.-Y., Bao, Y.-P., Han, Y., Wang, Y.-M., Shi, J., Vitiello, M.V., and Lu, L. (2018). Sleep disturbances increase the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews*, 40, 4-16.
66. Durazzo, T.C., Mattsson, N., and Weiner, M.W. (2014). Smoking and increased Alzheimer's disease risk: A review of potential mechanisms. *Alzheimer's & Dementia*, 10(3, Supplement), 122-145.
67. Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 263-293.
68. Farlow, M.R. (1998). Etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 55, 5-10.
69. Domenico Gambi, M.R. (2009). A Pathophysiological Role for Selective Alteration of the Cytokine–Chemokine Network–Inflammatory Theory in Alzheimer's Disease. *European Neurological Review*, 4(1), 22-24.
70. Ross, C.A. and Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10(7), 10-17.
71. Nhan, H.S., Chiang, K., and Koo, E.H. (2015). The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathologica*, 129(1), 1-19.

72. Zheng, H. and Koo, E.H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration*, 1(1), 5.
73. Thinakaran, G. and Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of biological chemistry*, 283(44), 29615-29619.
74. Cappai, R. (2014). Making sense of the amyloid precursor protein: its tail tells an interesting tale. *Journal of Neurochemistry*, 130(3), 325-327.
75. Zolezzi, J.M., Bastías-Candia, S., Santos, M.J., and Inestrosa, N.C. (2014). Alzheimer's disease: relevant molecular and physiopathological events affecting amyloid- β brain balance and the putative role of PPARs. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 176.
76. Goedert, M. and Spillantini, M.G. (2006). A Century of Alzheimer's Disease. *Science*, 314(5800), 777.
77. Frozza, R.L., Lourenco, M.V., and De Felice, F.G. (2018). Challenges for Alzheimer's Disease Therapy: Insights from Novel Mechanisms Beyond Memory Defects. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 37.
78. Imbimbo, B.P., Lombard, J., and Pomara, N. (2005). Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *Neuroimaging Clinics of North America*, 15(4), 727-753.
79. Shahani, N. and Brandt, R. (2002). Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(10), 1668-1680.
80. Wang, J.-Z., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2007). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *European Journal of Neuroscience*, 25(1), 59-68.
81. Chen, X.-Q. and Mobley, W.C. (2019). Alzheimer Disease Pathogenesis: Insights From Molecular and Cellular Biology Studies of Oligomeric A β and Tau Species. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 659.
82. DeTure, M.A. and Dickson, D.W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 32.
83. Querfurth, H.W. and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344.
84. Castellani, R.J., Moreira, P.I., Zhu, X., and Perry, G., *Alzheimer's Disease: Pathology and Pathogenesis*, in *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014, Elsevier.
85. Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., and Wilcock, G.K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 66(2), 137.

86. Ferreira-Vieira, T.H., Guimaraes, I.M., Silva, F.R., and Ribeiro, F.M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current neuropharmacology*, 14(1), 101-115.
87. Francis, P.T., Ramírez, M.J., and Lai, M.K. (2010). Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 59(4), 221-229.
88. Wang, R. and Reddy, P.H. (2017). Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 57(4), 1041-1048.
89. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., Finch, C.E., Frautschy, S., Griffin, W.S.T., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L.F., Mrak, R., Mackenzie, I.R., McGeer, P.L., O'Banion, M.K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F.L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., and Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 21(3), 383-421.
90. Rubio-Perez, J.M. and Morillas-Ruiz, J.M. (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *TheScientificWorldJournal*, 2012(756357-756357).
91. Marttinen, M., Takalo, M., Natunen, T., Wittrahm, R., Gabbouj, S., Kemppainen, S., Leinonen, V., Tanila, H., Haapasalo, A., and Hiltunen, M. (2018). Molecular Mechanisms of Synaptotoxicity and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 963.
92. Heneka, M.T., Carson, M.J., El Khoury, J., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., and Kummer, M.P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388-405.
93. Hensley, K. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Pathologic Consequences, and Potential for Therapeutic Manipulation. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 21, 1-14.
94. Meraz Rios, M.A., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Villeda-Hernández, J., and Campos-Peña, V. (2013). Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7, 59.
95. Weisman, D., Hakimian, E., and Ho, G.J., *Interleukins, Inflammation, and Mechanisms of Alzheimer's Disease*, in *Vitamins & Hormones*. 2006, Academic Press. p. 505-530.

96. Azizi, G. and Mirshafiey, A. (2012). The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 34(6), 881-895.
97. Dionisio-Santos, D.A., Olschowka, J.A., and O'Banion, M.K. (2019). Exploiting microglial and peripheral immune cell crosstalk to treat Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 74.
98. Fu, W.-Y., Wang, X., and Ip, N.Y. (2019). Targeting Neuroinflammation as a Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease: Mechanisms, Drug Candidates, and New Opportunities. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(2), 872-879.
99. Lee, Y.-J., Han, S.B., Nam, S.-Y., Oh, K.-W., and Hong, J.T. (2010). Inflammation and Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 33(10), 1539-1556.
100. Heneka, M.T., Golenbock, D.T., and Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, 16(3), 229-236.
101. Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.-L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., and Yednock, T. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Medicine*, 6(8), 916-919.
102. Jay, T.R., Miller, C.M., Cheng, P.J., Graham, L.C., Bemiller, S., Broihier, M.L., Xu, G., Margevicius, D., Karlo, J.C., Sousa, G.L., Cotleur, A.C., Butovsky, O., Bekris, L., Staugaitis, S.M., Leverenz, J.B., Pimplikar, S.W., Landreth, G.E., Howell, G.R., Ransohoff, R.M., and Lamb, B.T. (2015). TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *Journal of Experimental Medicine*, 212(3), 287-295.
103. González-Reyes, R.E., Nava-Mesa, M.O., Vargas-Sánchez, K., Ariza-Salamanca, D., and Mora-Muñoz, L. (2017). Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 427-427.
104. Ardura-Fabregat, A., Boddeke, E.W.G.M., Boza-Serrano, A., Brioschi, S., Castro-Gomez, S., Ceyzeriat, K., Dansokho, C., Dierkes, T., Gelders, G., Heneka, M.T., Hoeijmakers, L., Hoffmann, A., Iaccarino, L., Jahnert, S., Kuhbandner, K., Landreth, G., Lonnemann, N., Löschmann, P.A., McManus, R.M., Paulus, A., Reemst, K., Sanchez-Caro, J.M., Tiberi, A., Van der Perren, A., Vautheny, A., Venegas, C., Webers, A., Weydt, P., Wijasa, T.S., Xiang, X., and Yang, Y. (2017). Targeting Neuroinflammation to Treat Alzheimer's Disease. *CNS Drugs*, 31(12), 1057-1082.

105. Heneka, M.T., O'Banion, M.K., Terwel, D., and Kummer, M.P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 117(8), 919-947.
106. Basu, A., Krady, J.K., and Levison, S.W. (2004). Interleukin-1: A master regulator of neuroinflammation. *Journal of Neuroscience Research*, 78(2), 151-156.
107. Singh-Manoux, A., Dugravot, A., Brunner, E., Kumari, M., Shipley, M., Elbaz, A., and Kivimaki, M. (2014). Interleukin-6 and C-reactive protein as predictors of cognitive decline in late midlife. *Neurology*, 83(6), 486.
108. Mathias, C., Nathalie, L., Simon, C., and Denis, V. (2004). Cytokines in Neuroinflammation and Alzheimers Disease. *Current Drug Targets*, 5(6), 529-534.
109. Quintanilla, R.A., Orellana, D.I., González-Billault, C., and Maccioni, R.B. (2004). Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Experimental Cell Research*, 295(1), 245-257.
110. Buchhave, P., Zetterberg, H., Blennow, K., Minthon, L., Janciauskiene, S., and Hansson, O. (2010). Soluble TNF receptors are associated with A β metabolism and conversion to dementia in subjects with mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 31(11), 1877-1884.
111. Chang, R., Yee, K.-L., and Sumbria, R.K. (2017). Tumor necrosis factor α Inhibition for Alzheimer's Disease. *Journal of central nervous system disease*, 9(1179573517709278-1179573517709278).
112. Le Thuc, O., Blondeau, N., Nahon, J.-L., and Rovère, C. (2015). The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1351(1), 127-140.
113. Kiyota, T., Yamamoto, M., Xiong, H., Lambert, M.P., Klein, W.L., Gendelman, H.E., Ransohoff, R.M., and Ikezu, T. (2009). CCL2 Accelerates Microglia-Mediated A β Oligomer Formation and Progression of Neurocognitive Dysfunction. *PLOS ONE*, 4(7), 6197.
114. Brown, G.C. and Bal-Price, A. (2003). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Molecular Neurobiology*, 27(3), 325-355.
115. Kummer, Markus P., Hermes, M., Delekarte, A., Hammerschmidt, T., Kumar, S., Terwel, D., Walter, J., Pape, H.-C., König, S., Roeber, S., Jessen, F., Klockgether, T., Korte, M., and Heneka, Michael T. (2011). Nitration of Tyrosine 10 Critically Enhances Amyloid β Aggregation and Plaque Formation. *Neuron*, 71(5), 833-844.
116. Balez, R. and Ooi, L. (2016). Getting to NO Alzheimer's Disease: Neuroprotection versus Neurotoxicity Mediated by Nitric Oxide. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 3806157-3806157.

117. Yang, Q.-q. and Zhou, J.-w. (2019). Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia*, 67(6), 1017-1035.
118. Kandimalla, R. and Reddy, P.H. (2017). Therapeutics of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57, 1049-1069.
119. Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Pérez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C., and Garrido, J. (1996). Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- β -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron*, 16(4), 881-891.
120. Ringman, J.M. and Cummings, J.L. (2006). Current and emerging pharmacological treatment options for dementia. *Behavioural neurology*, 17(1), 5-16.
121. Silman, I. and Sussman, J.L. (2008). Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chemico-Biological Interactions*, 175(1), 3-10.
122. Greenblatt, H., Dvir, H., Silman, I., and Sussman, J. (2003). Acetylcholinesterase: A Multifaceted Target for Structure-Based Drug Design of Anticholinesterase Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of molecular neuroscience: MN*, 20(369-383).
123. Bajda, M., Wiğckowska, A., Hebda, M., Guzior, N., Sotriffer, C.A., and Malawska, B. (2013). Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5608-5632.
124. Pezzementi, L., Johnson, K., Tsigelny, I., Cotney, J., Manning, E., Barker, A., and Merritt, S. (2003). Amino acids defining the acyl pocket of an invertebrate cholinesterase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(4), 813-832.
125. Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L., and Sussman, J.L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1-3), 10-22.
126. Koellner, G., Kryger, G., Millard, C.B., Silman, I., Sussman, J.L., and Steiner, T. (2000). Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *Journal of Molecular Biology*, 296(2), 713-735.
127. Darvesh, S., Hopkins, D.A., and Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(2), 131-138.
128. Masson, P., Xie, W., Froment, M.-T., Levitsky, V., Fortier, P.-L., Albaret, C., and Lockridge, O. (1999). Interaction between the peripheral site residues of human butyrylcholinesterase, D70 and Y332, in binding and hydrolysis of substrates.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1433(1), 281-293.
129. Fang, L., Pan, Y., Muzyka, J.L., and Zhan, C.-G. (2011). Active Site Gating and Substrate Specificity of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(27), 8797-8805.
 130. Li, Q., Yang, H., Chen, Y., and Sun, H. (2017). Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 132(294-309).
 131. Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., and Monge-Bonilla, C. (2017). Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Annals of neurosciences*, 24(1), 46-54.
 132. Anand, R., Gill, K.D., and Mahdi, A.A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 76, 27-50.
 133. Kumar, A., Singh, A., and Ekavali. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*, 67(2), 195-203.
 134. Dong, Y., Li, X., Cheng, J., and Hou, L. (2019). Drug Development for Alzheimer's Disease: Microglia Induced Neuroinflammation as a Target? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 558.
 135. Cao, J., Hou, J., Ping, J., and Cai, D. (2018). Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1), 64.
 136. Liu, J., Chang, L., Song, Y., Li, H., and Wu, Y. (2019). The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 43.
 137. Calhoun, A., King, C., Khoury, R., and Grossberg, G.T. (2018). An evaluation of memantine ER + donepezil for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(15), 1711-1717.
 138. Calvo-Flores Guzmán, B., Vinnakota, C., Govindpani, K., Waldvogel, H.J., Faull, R.L.M., and Kwakowsky, A. (2018). The GABAergic system as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 146(6), 649-669.
 139. Rychtyk, J., Partyka, A., Gdula-Argasińska, J., Mysłowska, K., Wilczyńska, N., Jastrzębska-Więsek, M., and Wesołowska, A. (2019). 5-HT₆ receptor agonist and antagonist improve memory impairments and hippocampal BDNF signaling alterations induced by MK-801. *Brain Research*, 1722, 146375.
 140. Daniels, M.J.D., Rivers-Auty, J., Schilling, T., Spencer, N.G., Watremez, W., Fasolino, V., Booth, S.J., White, C.S., Baldwin, A.G., Freeman, S., Wong, R., Latta, C., Yu, S., Jackson,

- J., Fischer, N., Koziel, V., Pillot, T., Bagnall, J., Allan, S.M., Paszek, P., Galea, J., Harte, M.K., Eder, C., Lawrence, C.B., and Brough, D. (2016). Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. *Nature Communications*, 7(1), 12504.
141. Elmaleh, D.R., Farlow, M.R., Conti, P.S., Tompkins, R.G., Kundakovic, L., and Tanzi, R.E. (2019). Developing Effective Alzheimer's Disease Therapies: Clinical Experience and Future Directions. *Journal of Alzheimer's Disease*, 71, 715-732.
142. Butchart, J., Brook, L., Hopkins, V., Teeling, J., Püntener, U., Culliford, D., Sharples, R., Sharif, S., McFarlane, B., Raybould, R., Thomas, R., Passmore, P., Perry, V.H., and Holmes, C. (2015). Etanercept in Alzheimer disease. *Neurology*, 84(21), 2161.
143. Gugliandolo, A., Bramanti, P., and Mazzon, E. (2017). Role of Vitamin E in the Treatment of Alzheimer's Disease: Evidence from Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12),
144. de Andrade Teles, R.B., Diniz, T.C., Costa Pinto, T.C., de Oliveira Júnior, R.G., Gama E Silva, M., de Lavor, É.M., Fernandes, A.W.C., de Oliveira, A.P., de Almeida Ribeiro, F.P.R., da Silva, A.A.M., Cavalcante, T.C.F., Quintans Júnior, L.J., and da Silva Almeida, J.R.G. (2018). Flavonoids as Therapeutic Agents in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: A Systematic Review of Preclinical Evidences. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 7043213-7043213.
145. Ahmed, E.A.M. (2015). Oxidant/Antioxidant Imbalance and the Risk of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 12(4), 335-349.
146. Berman, A.Y., Motechin, R.A., Wiesenfeld, M.Y., and Holz, M.K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *npj Precision Oncology*, 1(1), 35.
147. Bartolini, M. and Marco-Contelles, J. (2019). Tacrines as Therapeutic Agents for Alzheimer's Disease. IV. The Tacripyrines and Related Annulated Tacrines. *The Chemical Record*, 19(5), 927-937.
148. Przybyłowska, M., Kowalski, S., Dzierzbicka, K., and Inkielewicz-Stepniak, I. (2019). Therapeutic Potential of Multifunctional Tacrine Analogues. *Current neuropharmacology*, 17(5), 472-490.
149. Kılıç, B. (2017). *Bazı piridazin türevlerinin sentezi, asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz inhibitör etkilerinin in vitro olarak incelenmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 27-33.
150. Samanta, M.K., Wilson, B., Santhi, K., Sampath Kumar, K.P., and Suresh, B. (2006). Alzheimer Disease and Its Management: A Review. *American Journal of Therapeutics*, 13(6), 516-526.

151. Haake, A., Nguyen, K., Friedman, L., Chakkamparambil, B., and Grossberg, G.T. (2020). An update on the utility and safety of cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Safety*, 19(2), 147-157.
152. de los Ríos, C. and Marco-Contelles, J. (2019). Tacrines for Alzheimer's disease therapy. III. The PyridoTacrines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 166, 381-389.
153. Korabecny, J., Zemek, F., Soukup, O., Spilovska, K., Musilek, K., Jun, D., Nepovimova, E., and Kuca, K., *Chapter 1 - Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease: Current State and Future Perspectives*, in *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*, R. Attaur and M.I. Choudhary, Editors. 2014, Elsevier. p. 3-39.
154. Wu, W.-Y., Dai, Y.-C., Li, N.-G., Dong, Z.-X., Gu, T., Shi, Z.-H., Xue, X., Tang, Y.-P., and Duan, J.-A. (2017). Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 572-587.
155. Sameem, B., Saeedi, M., Mahdavi, M., and Shafiee, A. (2017). A review on tacrine-based scaffolds as multi-target drugs (MTDLs) for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 128, 332-345.
156. Tsopelas, N.D. and Marin, D.B., *32 - Cholinergic Treatments of Alzheimer's Disease*, in *Functional Neurobiology of Aging*, P.R. Hof and C.V. Mobbs, Editors. 2001, Academic Press: San Diego. p. 475-486.
157. Lleó, A., Greenberg, S.M., and Growdon, J.H. (2006). Current Pharmacotherapy for Alzheimer's Disease. *Annual Review of Medicine*, 57(1), 513-533.
158. Maria Cecilia Rodrigues, S., Flavia Pereira Dias, V., Marcella Soares, M., Matheus de Freitas, S., Mariana Maximo, R., Patricia Mattos da, R., Máisa Rosa, C., Marcelo Henrique dos, S., Marisi Gomes, S., and Claudio, V. (2014). Donepezil: An Important Prototype to the Design of New Drug Candidates for Alzheimer's Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(1), 2-19.
159. Olsen, C.E., Poulsen, H.D., and Lublin, H.K.F. (2005). Drug therapy of dementia in elderly patients. A review. *Nordic Journal of Psychiatry*, 59(2), 71-77.
160. Eldufani, J. and Blaise, G. (2019). The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 5(1), 175-183.
161. Kandiah, N., Pai, M.-C., Senanarong, V., Looi, I., Ampil, E., Park, K.W., Karanam, A.K., and Christopher, S. (2017). Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clinical interventions in aging*, 12(697-707).

162. Prvulovic, D., Hampel, H., and Pantel, J. (2010). Galantamine for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(3), 345-354.
163. Jennifer, Y.Y.S. and Simon, J.G.L. (2016). Current Treatment Options for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia. *Current neuropharmacology*, 14(4), 326-338.
164. Dembitsky, V.M., Dzhemileva, L., Glorizova, T., and D'yakonov, V. (2020). Natural and synthetic drugs used for the treatment of the dementia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524(3), 772-783.
165. van Marum, R. (2008). Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundamental & clinical pharmacology*, 22, 265-274.
166. Tayeb, H.O., Yang, H.D., Price, B.H., and Tarazi, F.I. (2012). Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(1), 8-25.
167. Alam, S., Lingenfelter, K.S., Bender, A.M., and Lindsley, C.W. (2017). Classics in Chemical Neuroscience: Memantine. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(9), 1823-1829.
168. Atri, A. (2019). Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease. *Semin Neurol*, 39(02), 227-240.
169. Lespagnol, C. and Marcincal, L.A. (1967). Chemotherapeutic study of benzoxazolinone and derivatives. *Chimica Therapeutica*, 2(5), 395-402.
170. Close, W.J., Tiffany, B.D., and Spielman, M.A. (1949). The Analgesic Activity of Some Benzoxazolinone Derivates. *Journal of the American Chemical Society*, 71, 1265-1268.
171. Kalcheva, V.B., Doicheva, B.B., Angelova, V.K., and Simov, D.A. (1973). Proton Stability Constants of Substituted Benzoxazolones. *Doklady Bolgarskoi Akademii Nauk*, 26(11), 1493-1496.
172. Hartley, W.N., Dobie, J.J., and Paliatseas, G. (1900). Absorbtion Spectra of Benzoxazolones in Alchol. *journal of the Chemical Society*, 839.
173. D'amico, J.J., Fuhrhop, R.W., Bollinger, F.G., and Dahl, W.E. (1986). Synthesis of heterocyclic compounds from o-aminobenzenethiol and ammonium thiocarbamate. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 23, 641-645.
174. Hunter, R.F. (1930). The Unsaturation and Tautomeric Mobility of Heterocyclic Compounds. Part I. Benzothiazole and Dihydrobenzothiazole Derivatives. *journal of the Chemical Society*, 125-147.
175. Guenadil, F., Aichaoui, H., Kapanda, C.N., Lambert, D.M., McCurdy, C.R., and Poupaert, J.H. (2011). Design and synthesis of 3-acyl-2(3H)-benzoxazolone and 3-acyl-2(3H)-

- benzothiazolone derivatives. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 142(1), 67-80.
176. Abdelazeem, A.H., Khan, S.I., White, S.W., Sufka, K.J., and McCurdy, C.R. (2015). Design, synthesis and biological evaluation of bivalent benzoxazolone and benzothiazolone ligands as potential anti-inflammatory/analgesic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(13), 3248-3259.
177. Eren, G., Ünlü, S., Nuñez, M.-T., Labeaga, L., Ledo, F., Entrena, A., Banoğlu, E., Costantino, G., and Şahin, M.F. (2010). Synthesis, biological evaluation, and docking studies of novel heterocyclic diaryl compounds as selective COX-2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(17), 6367-6376.
178. Ji Ram, V., Sethi, A., Nath, M., and Pratap, R., *Chapter 5 - Five-Membered Heterocycles*, in *The Chemistry of Heterocycles*, V. Ji Ram, et al., Editors. 2019, Elsevier. p. 149-478.
179. Welsch, M.E., Snyder, S.A., and Stockwell, B.R. (2010). Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(3), 347-361.
180. Sangi, D.P., Meira, Y.G., Moreira, N.M., Lopes, T.A., Leite, M.P., Pereira-Flores, M.E., and Alvarenga, E.S. (2019). Benzoxazoles as novel herbicidal agents. *Pest Management Science*, 75(1), 262-269.
181. Blair, H.A. (2017). Pemafibrate: First Global Approval. *Drugs*, 77(16), 1805-1810.
182. Safakish, M., Hajimahdi, Z., Zabihollahi, R., Aghasadeghi, M.R., Vahabpour, R., and Zarghi, A. (2017). Design, synthesis, and docking studies of new 2-benzoxazolinone derivatives as anti-HIV-1 agents. *Medicinal Chemistry Research*, 26(11), 2718-2726.
183. Gökhan-Kelekçi, N., Köksal, M., Ünüvar, S., Aktay, G., and Erdoğan, H. (2009). Synthesis and characterization of some new 2(3H)-benzoxazolones with analgesic and antiinflammatory activities. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 24(1), 29-37.
184. Kaur, A., Pathak, D.P., Sharma, V., and Wakode, S. (2018). Synthesis, molecular docking, and pharmacological evaluation of N-(2-(3,5-dimethoxyphenyl)benzoxazole-5-yl)benzamide derivatives as selective COX-2 inhibitors and anti-inflammatory agents. *Archiv der Pharmazie*, 351(6), 1800008.
185. Kaur, A., Pathak, D.P., Sharma, V., Narasimhan, B., Sharma, P., Mathur, R., and Wakode, S. (2018). Synthesis, biological evaluation and docking study of N-(2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)benzoxazole-5-yl) benzamide derivatives as selective COX-2 inhibitor and anti-inflammatory agents. *Bioorganic Chemistry*, 81, 191-202.
186. Pizzirani, D., Bach, A., Realini, N., Armirotti, A., Mengatto, L., Bauer, I., Giroto, S., Pagliuca, C., De Vivo, M., Summa, M., Ribeiro, A., and Piomelli, D. (2015). Inside Cover: Benzoxazolone Carboxamides: Potent and Systemically Active Inhibitors of

- Intracellular Acid Ceramidase (Angew. Chem. Int. Ed. 2/2015). *Angewandte Chemie International Edition*, 54(2), 366-366.
187. Gamba, E., Mori, M., Kovalenko, L., Giannini, A., Sasic, A., Saladini, F., Fabris, D., Mély, Y., Gatto, B., and Botta, M. (2018). Identification of novel 2-benzoxazolinone derivatives with specific inhibitory activity against the HIV-1 nucleocapsid protein. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 145, 154-164.
 188. Nicholson, H.E., Alsharif, W.F., Comeau, A.B., Mesangeau, C., Intagliata, S., Mottinelli, M., McCurdy, C.R., and Bowen, W.D. (2019). Divergent Cytotoxic and Metabolically Stimulative Functions of Sigma-2 Receptors: Structure-Activity Relationships of 6-Acetyl-3-(4-(4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl)butyl)benzo[d]oxazol-2(3H)-one (SN79) Derivatives. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 368(2), 272.
 189. Bilginer, S., Gul, H.I., Erdal, F.S., Sakagami, H., Levent, S., Gulcin, I., and Supuran, C.T. (2019). Synthesis, cytotoxicities, and carbonic anhydrase inhibition potential of 6-(3-aryl-2-propenoyl)-2(3H)-benzoxazolones. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1), 1722-1729.
 190. Srivastava, P., Tripathi, P.N., Sharma, P., Rai, S.N., Singh, S.P., Srivastava, R.K., Shankar, S., and Shrivastava, S.K. (2019). Design and development of some phenyl benzoxazole derivatives as a potent acetylcholinesterase inhibitor with antioxidant property to enhance learning and memory. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 163, 116-135.
 191. Gutti, G., Kakarla, R., Kumar, D., Beohar, M., Ganeshpurkar, A., Kumar, A., Krishnamurthy, S., and Singh, S.K. (2019). Discovery of novel series of 2-substituted benzo[d]oxazol-5-amine derivatives as multi-target directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 182, 111613.
 192. Gill, R.K., Rawal, R.K., and Bariwal, J. (2015). Recent Advances in the Chemistry and Biology of Benzothiazoles. *Archiv der Pharmazie*, 348(3), 155-178.
 193. Ali, R. and Siddiqui, N. (2013). Biological Aspects of Emerging Benzothiazoles: A Short Review. *Journal of Chemistry*, 2013, 12.
 194. Larchanche, P.-E., Ultré, V., Le Broc, D., Ballandone, C., Furman, C., Dallemagne, P., Melnyk, P., and Carato, P. (2015). 6-Sulfonylbenzothiazolones as potential scaffolds for the design of 5-HT₆ ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92, 807-817.
 195. Salerno, L., Pittalà, V., Modica, M.N., Siracusa, M.A., Intagliata, S., Cagnotto, A., Salmona, M., Kurczab, R., Bojarski, A.J., and Romeo, G. (2014). Structure–activity relationships and molecular modeling studies of novel arylpiperazinylalkyl 2-benzoxazolones and 2-benzothiazolones as 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptor ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85, 716-726.

196. Osmaniye, D., Levent, S., Karaduman, B.A., Ilgin, S., Özkay, Y., and Kaplancıklı, A.Z. (2018). Synthesis of New Benzothiazole Acylhydrazones as Anticancer Agents. *Molecules*, 23(5), 1054.
197. Ma, H., Zhuang, C., Xu, X., Li, J., Wang, J., Min, X., Zhang, W., Zhang, H., and Miao, Z. (2017). Discovery of benzothiazole derivatives as novel non-sulfamide NEDD8 activating enzyme inhibitors by target-based virtual screening. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 133, 174-183.
198. Tariq, S., Kamboj, P., Alam, O., and Amir, M. (2018). 1,2,4-Triazole-based benzothiazole/benzoxazole derivatives: Design, synthesis, p38 α MAP kinase inhibition, anti-inflammatory activity and molecular docking studies. *Bioorganic Chemistry*, 81, 630-641.
199. Ugwu, D.I., Okoro, U.C., Ukoha, P.O., Gupta, A., and Okafor, S.N. (2018). Novel anti-inflammatory and analgesic agents: synthesis, molecular docking and in vivo studies. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 33(1), 405-415.
200. Singh, M.K., Tilak, R., Nath, G., Awasthi, S.K., and Agarwal, A. (2013). Design, synthesis and antimicrobial activity of novel benzothiazole analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63, 635-644.
201. Siddiqui, N., Alam, M.S., Sahu, M., Naim, M.J., Yar, M.S., and Alam, O. (2017). Design, synthesis, anticonvulsant evaluation and docking study of 2-[(6-substituted benzo[d]thiazol-2-ylcarbamoyl)methyl]-1-(4-substituted phenyl)isothioureas. *Bioorganic Chemistry*, 71, 230-243.
202. Thakkar, S.S., Thakor, P., Ray, A., Doshi, H., and Thakkar, V.R. (2017). Benzothiazole analogues: Synthesis, characterization, MO calculations with PM6 and DFT, in silico studies and in vitro antimalarial as DHFR inhibitors and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(20), 5396-5406.
203. Demir Özkay, Ü., Can, Ö.D., Sağlık, B.N., Acar Çevik, U., Levent, S., Özkay, Y., Ilgin, S., and Atli, Ö. (2016). Design, synthesis, and AChE inhibitory activity of new benzothiazole-piperazines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(22), 5387-5394.
204. Lespagnol, C. (1955). The structure of benzoxazolones. *Bulletin de la Societe de Pharmacie de Lille*, 1, 71-81.
205. Wei, C.-X., Wu, D., Sun, Z.-G., Chai, K.-Y., and Quan, Z.-S. (2010). Synthesis of 6-(3-substituted-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-2-phenylbenzo[d]oxazoles as potential anticonvulsant agents. *Medicinal Chemistry Research*, 19(8), 925-935.
206. Hrobárik, P., Hrobáriková, V., Sigmundová, I., Zahradník, P., Fakis, M., Polyzos, I., and Persephonis, P. (2011). Benzothiazoles with Tunable Electron-Withdrawing Strength

- and Reverse Polarity: A Route to Triphenylamine-Based Chromophores with Enhanced Two-Photon Absorption. *The Journal of Organic Chemistry*, 76(21), 8726-8736.
207. Kryger, G., Silman, I., and Sussman, J.L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 7(3), 297-307.
208. Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J.C., and Nachon, F. (2003). Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *The Journal of biological chemistry*, 278(42), 41141-41147.
209. Molecular Operating Environment (MOE), C.C.G.I., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2014.
210. Nachon, F., Carletti, E., Ronco, C., Trovaslet, M., Nicolet, Y., Jean, L., and Renard, P.-Y. (2013). Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyrylcholinesterase. *Biochemical Journal*, 453(3), 393-399.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ERDOĞAN, Merve

Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi	2015
Lise	Ankara Alparslan Anadolu Lisesi	2010

Yabancı Dili İngilizce

Yayınlar

SCI, SCI-EXP, SSCI, AHCI Tarafından Taranan Makaleler

Burcu Kılıç, Merve Erdoğan, Hayrettin O. Gülcan, Fatma Aksakal, Nihan Oruklu, E. Ümit Bağrıaçık, Deniz S. Doğruer (2019). Design, Synthesis and Investigation of New Diphenyl Substituted Pyridazinone Derivatives as Both Cholinesterase and A β -Aggregation Inhibitors. Medicinal Chemistry, 15(1), 59-76.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Merve Erdoğan, Burcu Kılıç and Deniz S. Doğruer. Synthesis of Some New 5,6-Diphenyl Pyridazinone Derivatives And Investigation of Their Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase Inhibitory Activities. 6-8 Temmuz Caen, Fransa, 52nd International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2016).

2. Deniz S. Doğruer, Merve Erdoğan and Burcu Kılıç. Design And Synthesis Of Some New Benzoxazolone Derivatives For Cholinesterase Inhibition. 6-8 Temmuz Caen, Fransa, 52nd International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2016).
3. Merve Erdoğan, Burcu Kılıç and Deniz S. Doğruer. Synthesis of Some New Benzoxazolone Derivatives and Evaluation of Their Cholinesterase Inhibitor Activities. 25-28 Haziran Dubrovnik, Hırvatistan, 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry 2017 (JMMC 2017).
4. Deniz S. Doğruer, Merve Erdoğan and Burcu Kılıç. Synthesis of Some New Benzothiazolone Derivatives and Investigation of Their Cholinesterase Inhibitor Activities. 25-28 Haziran Dubrovnik, Hırvatistan, 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry 2017 (JMMC 2017).
5. Merve Erdoğan, Burcu Kılıç, Deniz Songül Doğruer. Synthesis of New Benzothiazolone Derivatives And Evaluation of Their Effects on Cholinesterase Enzymes. 11-13 Ekim Ankara Türkiye, 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS 2017).
6. Merve Erdoğan, Burcu Kılıç, H. Ozan Gülcan, Fatma Aksakal, Deniz S. Doğruer. Design, Synthesis and Investigation of New Diphenyl Substituted Pyridazinone Derivatives as Both Cholinesterase and A β -Aggregation Inhibitors. 4-6 Temmuz Strasbourg, Fransa, 54nd International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2018).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..