



**4-AMİNOTETRAHİDROKİNOLİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ ve
ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Hazırlayan: Ercan OĞUZ

Yüksek Lisans Tezi

BİYOMÜHENDİSLİK ve BİLİMLERİ

1.Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fikret TÜRKAN

2. Danışman Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Zahritin KAZANCIOĞLU

İĞDIR/2020

Her hakkı saklıdır

T.C
IĞDIR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

4-AMİNOTETRAHİDROKİNOLİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ ve
ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hazırlayan
Ercan OĞUZ

1.Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fikret TÜRKAN
2. Danışman Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Zahrittin KAZANCIOĞLU

BİYOMÜHENDİSLİK ve BİLİMLERİ

Iğdır/2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAY FORMU

Dr. Öğr. Üyesi Fikret TÜRKAN danışmanlığında Ercan OĞUZ tarafından hazırlanan bu çalışmatarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Biyomühendislik Bilimleri Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:..... İmza:

Üye: İmza:

Üye: İmza:

Lisansüstü Enstitüsü Yönetim kurulunun / /2020 tarih ve 2020/sayılı kararı ile onaylanmıştır.

(İmza)

.....

Prof. Dr. Murat KARAVELİOĞLU

Enstitü Müdürü

TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ercan OĞUZ



ÖZET

4-AMİNOTETRAHİDROKİNOLİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ ve ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

OĞUZ, Ercan

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

1. Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fikret TÜRKAN
2. Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Zahrettin KAZANCIOĞLU

Ekim 2020,79 sayfa

Bu tez çalışmasında 4-aminotetrahidrokinolin türevleri Povarov reaksiyon yöntemi kullanılarak sentezlendi. Sentezlenen moleküllerin karakterizasyonları ^1H , ^{13}C NMR, IR ve LC-MS-MS de yapıldı. Sonraki aşamada bu moleküllerin asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Standart inhibitör olarak 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride hydrate (Takrin) kullanıldı. Yapılan çalışma sonucunda bilinen (4) ve ilk kez sentezi yapılan (4), 8 farklı 4-aminotetrahidrokinolin türevinin IC_{50} değerleri hesaplandı. Elde edilen değerlerin $0,22\ \mu\text{M}$ - $0,36\ \mu\text{M}$ aralığında olduğu bulundu. Moleküller için Lineweaver-burk grafikleri çizilerek sırasıyla ortalama K_i sabiti hesaplandı ve elde edilen verilerin $0,50\ \mu\text{M}$ ile $1,13\ \mu\text{M}$ aralığında olduğu görüldü. Çalışmanın son basamağında Takrin molekülünün IC_{50} değeri $0.770\ \mu\text{M}$ ve K_i değeri ise $0.880\ \mu\text{M}$ olarak hesaplandı. Ayrıca DTNB ve AChI substratları için V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla $0,106\ \text{EÜ/ml}$, $0,096\ \text{EÜ/ml}$ ve $1.637\ \mu\text{M}$, $1.021\ \mu\text{M}$ olarak hesaplandı. Veriler değerlendirildiğinde çalışılan organik moleküllerin tamamının standart inhibitöre benzer ölçüde inhibisyon etkisi gösterdiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, Alzheimer, Takrin, 4-aminotetrahidrokinolin, inhibisyon

ABSTRACT

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF 4-AMINOTETRAHYDROKINOLINE DERIVATIVES ON INHIBITION EFFECTS OF ACETYLCHOLINESTERASE ENZYME.

OGUZ, Ercan

Master Thesis, Department of Bioengineering

1. Thesis Advisor: Assis. Prof.Dr. Fikret TÜRKAN

2. Thesis Advisor: Assist Prof. Dr. Mustafa Zahrettin KAZANCIOĞLU

October 2020, 79 Pages

In this thesis, 4-aminotetrahydroquinoline derivatives were synthesized by using the Povarov reaction method. Characterization of synthesized molecules was done in ^1H , ^{13}C NMR, IR, and LC-MS-MS. In the next step, the inhibition effect of these molecules on the acetylcholinesterase enzyme was investigated. 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride hydrate (Tacrin) was used as a standard inhibitor. As a result of the study, IC₅₀ values of 8 different 4-amino-tetrahydro quinoline derivatives, known (4) and synthesized for the first time (4), were calculated. It was found that obtained values were between the 0.22 μM and 0.36 μM . The average KI constant was calculated by drawing Lineweaver-burk graphs for the molecules and it was seen that the obtained data ranged from 0.50 μM to 1.13 μM . In the last step of the study, the IC₅₀ value of the Tacrine molecule was calculated 0.770 μM , and the KI value was calculated 0.880 μM . Besides, V_{max} and K_M values for DTNB and AChI substrates were respectively calculated 0.106 EU / ml, 0.096 EU/ ml and 1.637 μM , 1.021 μM . When the data were evaluated, it was observed that all of the studied organic molecules had an inhibitory effect similar to the standard inhibitor.

Keywords: Acetylcholinesterase, Alzheimer, Tacrine, 4-aminotetrahydroquinoline, Inhibition

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımda bana araştırma ve kendimi geliştirme olanağı sağlayan, çalışmam süresince yakın ilgi ve önerileriyle bana yol gösterip beni yönlendiren tez danışmanlarım Sayın **Dr. Öğr. Üyesi Fikret TÜRKAN** ve sayın **Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Zahrittin KAZANCIOĞLU'na**, teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Yine çalışmalarım boyunca benden yardımını ve desteğini esirgemeyen her türlü sorularıma güler yüzle cevaplayan ve gelişmeye yardımcı olan sayın **Dr. Öğr. Üyesi Zeynep SÖNMEZ** ve sayın **Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Nuri ATALAR'a**, Labaratuvarda çalışmam esnasında benden her türlü desteğini esirgemeyen Iğdır Üniversitesi ALUM Personellerine saygı teşekkürlerimi sunarbugüne kadar attığım her adımda hem maddi hem manevi olarak beni her zaman destekleyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

SHY0320Y02 numaralı projemize sağladığı destekten dolayı Iğdır Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri Kordinasyon Birimlerine teşekkür ederim.

Ercan OĞUZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	I
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	2
1.1.2. Enzim Aktivite Birimleri	4
1.1.2.1. Enzim Aktivitesi	4
1.1.2.2. Enzim Ünitesi (EÜ).....	4
1.1.2.3. Katal	4
1.1.2.4. Spesifik Aktivite	4
1.1.3. Enzim İnhibisyonu.....	5
1.1.3.1. Geriye Dönüşümlü (reversibl) İnhibisyonlar	7
1.1.3.1.1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon	7
1.1.3.1.2. Yarışmasız (nonkompetitif) İnhibisyon	7
1.1.3.1.3. Yarı Yarışmalı (unkompetitif) İnhibisyon.....	8
1.1.4. Enzimlerin Hızını Etkileyen Faktörleri	8
1.1.4.1. Enzim Derişim	8
1.1.4.2. Substrat Derişimi	8
1.1.4.3. Sıcaklık	9
1.1.4.4. pH.....	9

1.1.4.5. Ürün Değişimi	10
1.1.5. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE)	10
1.1.5.1. Asetilkolinesteraz Enzimin Yapısı.....	10
1.1.5.2. AChE'nin ACh Hidrolizindeki Görevi	11
1.1.5.3. Asetilkolinesteraz Enziminin Fonksiyonlar	12
1.1.5.4. Asetilkolinesteraz Enziminin Biyolojik Önemi	12
1.1.6. Asetilkolin.....	13
1.1.6.1. Asetilkolin Sentezi	13
1.1.7. Alzheimer Hastalığı	13
1.1.7.1. Alzheimer Hastalığının Belirtileri.....	15
1.1.7.2. Alzheimer Hastalığının Kolinergik Sistemle İlişkisi	15
1.1.8. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri (AChEI)	16
1.1.8.1. Alzheimer Hastalığında Kullanılan Kolinesteraz İnhibitör İlaçlar	16
1.1.8.1.1. Takrin	17
1.1.8.1.2. Donepezil	17
1.1.8.1.3. Fizostigmin.....	18
1.1.8.1.4. Rivastigmin Tetrat.....	18
1.1.9. Organik Bileşiklerin Özellikleri	18
1.1.9.1. Kinolin	18
1.1.9.2. Tetrahidrokinolinler	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3 MATERYAL VE METOT	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kullanılan kimyasallar.....	25
3.1.2. Kullanılan enzim.....	25

3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar	25
3.1.4. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	26
3.1.5. İnhibitör Çözeltilerin hazırlanması	26
3.2.1.1. 4-Aminotetrahidrokinolin Türevlerinin Sentezi	27
3.2.2. AChE Enziminin Aktivite Ölçümü.....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	31
4.1. Asetilkolinesteraz Enziminin AChI ve DTNB Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Tayin Etmesine Ait Çalışmasının Sonuçları	31
4.2. 4-Aminotetrahidrokinolin Türevlerinin Asetilkolinesteraz Enzimin Üzerindeki İnhibitör Etkisini Gösteren IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi ve Çalışmanın Sonuçları	32
4.3. 4-Aminotetrahidrokinolin Türevlerinin Asetilkolinesteraz Enzimin Üzerindeki İnhibitör Etkisini Gösteren K_i Değerlerinin Belirlenmesi ve Çalışmanın Sonuçları	42
4.4. Deneysel	58
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	69
KAYNAKÇA	71
ÖZGEÇMİŞ.....	79

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%.....	Yüzde
G.....	Gram
°C	Santigrat Derece
Kg.....	Kilogram
pH.....	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
µl.....	Mikrolitre
mg	Miligram
µM	Mikromolar
M.....	Molar

Kısaltmalar

AChE	Asetilkolinesteraz enzimi
AChI	Asetiltiyokoliniyodat
BChE.....	Asetiltiyokoliniyodat
DTNB.....	: 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
E.....	Enzim
E.C.	Enzim kod numarası
EDTA.....	Etilendiamin tetraasetik asit
EÜ	Enzim ünitesi
I.....	İnhibitör
Tris	Trihidroksimetil aminometan
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Anahtar kilit modeli	4
Şekil 1.2. Dönüşümsüz inhibisyonun reaksiyon şeması	6
Şekil 1.3. Dönüşümlü inhibisyonun reaksiyon şeması	7
Şekil 1.4. Michael Menten grafiği (Anonim, 2015).....	9
Şekil 1.5. Asetilkolinesteraz Enzimin Üç Boyutlu Yapısı.....	11
Şekil 1.6. Takrin: [1,2,3,4-Tetrahidroakridin-9-amin].....	17
Şekil 1.7. Kinolin ve İzokinolin Yapısı	19
Şekil 3.1. Povarov reaksiyonu	27
Şekil 3.2. N-vinilkarbamat 8 bileşiğinin sentezi.....	27
Şekil 3.3. Farklı fonksiyonel grubu taşıyan 4-aminotetrahidrokinolin 10 ve 12 türevlerinin sentezi	28
Şekil 4. 1. Asetilkolinesteraz enzimi ile sabit AChI konsantrasyonunda DTNB için K_M ve V_{max} değerlerinin tayını grafiği	32
Şekil 4. 2. Asetilkolinesteraz enzimi ile sabit DTNB konsantrasyonunda AChI için K_M ve V_{max} değerlerinin tayını grafiği	32
Şekil 4. 3. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-3 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-3] grafiği	33
Şekil 4. 4. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-4 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-4] grafiği	34
Şekil 4. 5. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-5 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-5] grafiği	35
Şekil 4. 6. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-6 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-6] grafiği	36

Şekil 4. 7. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-42 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-42] grafiği	37
Şekil. 4. 8. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-43-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[MK-43-2] grafiği	38
Şekil.4.9. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-44-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-44-2] grafiği	39
Şekil.4. 10. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-45-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-45-2] grafiği	40
Şekil.4.11. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine Takrin molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[Takrin] grafiği	42
Şekil.4.12. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-3 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği	45
Şekil.4.13. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-4 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği	46
Şekil 4. 14. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-5 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği	48
Şekil 4. 15 Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-6 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği	49
Şekil 4. 16. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-42 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği	51
Şekil 4. 17. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-43-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği	52
Şekil 4. 18. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-44-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği	54

Şekil 4. 19. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-45-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği	55
Şekil 4. 20. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroakridin) molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği	57
Şekil 4. 21. 5 numaralı bileşiğin sentezi	58
Şekil 4. 22. mk-3'ün ^1H NMR spektrumu	59
Şekil 4. 23. mk-4'ün ^1H NMR spektrumu	60
Şekil 4. 24. mk-5'in ^1H NMR spektrumu	60
Şekil 4. 25. mk-6'nin ^1H NMR spektrumu	61
Şekil 4. 26. mk-42'nin ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumu	62
Şekil 4. 27. mk-43-2'nin ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumu	63
Şekil 4. 28. mk-44-2'nin ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumu	64
Şekil 4. 29. mk-45-2'nin ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumu	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3. 1. AChE enziminin aktivite ölçümü için gereken kimyasal ve miktarları.....	30
Çizelge 4. 1. Asetilkolinesteraz enzimi için DTNB ve AChI substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin tayınına ait çalışmanın sonuçları.....	32
Çizelge 4. 2. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-3 molekülünün IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	33
Çizelge 4. 3. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-4 molekülünün IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	34
Çizelge 4. 4. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-5 molekülünün IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	35
Çizelge 4. 5. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-6 molekülünün IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	36
Çizelge 4. 6. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-42 molekülünün IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	37
Çizelge 4. 7. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-43-2 molekülünün IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	38
Çizelge 4. 8. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-44-2 molekülünün IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	39

Çizelge 4. 9. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-45-2 molekülünün IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	40
Çizelge 4. 10. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine Takrin molekülünün IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	41
Çizelge 4. 11. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-3 molekülünün Ki değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	44
Çizelge 4. 12. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-4 molekülünün Ki değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	45
Çizelge 4. 13. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-5 molekülünün Ki değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	46
Çizelge 4. 14. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-6 molekülünün Ki değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	48
Çizelge 4. 15. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-42 molekülünün Ki değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	50
Çizelge 4. 16. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-43-2 molekülünün K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	51
Çizelge 4. 17. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-44-2 molekülünün Ki değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	53

Çizelge 4. 18. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-45-2 molekülünün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	54
Çizelge 4. 19. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine Takrin molekülünün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları	56
Çizelge 4. 20. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyonu araştırılan yeni sentezlenen organik bileşiklerin IC_{50} , K_i ve inhibisyon tipi.....	57



1.GİRİŞ

Günümüz toplumunda refah seviyesinin yükselmesi, eğitim seviyesinin artması ve teknolojiadaki ilerlemeler sayesinde özellikle tıp ve sağlık alanlarında yeni uygulamaların önü açılmış tanı ve tedavilerde kullanılmak üzere farklı, yenilikçi hizmetler uygulamaya konulmuştur. Bilim dünyasındaki gelişmelerle birlikte insan ömrü uzamaya başlamış ve böylece yaşlı nüfus oranı artmıştır. Bu artışla birlikte yaşlı popülasyonda demansın bir türü olarak ortaya çıkan Alzheimer hastalığının görülme sıklığında artış olmuştur (Sugimoto et al.,2002).

Demans, bir insanın günlük aktivitelerini gerçekleştirebilme becerisini etkileyen; problem çözme, dil becerisi, hafıza ve düşünme becerilerindeki azalma ile karakterize olan durumlar için kullanılan genel bir ifadedir (Francis *et al.*,1999). Demans vakalarının yarısından fazlasını Alzheimer hastalığı (AH) oluşturmaktadır (Sadashiva ve ark.,2006). Günümüzde dünya çapında yaklaşık 35 milyon insanda Alzheimer hastalığı görülmekte ve bu hastalığın ileriki zamanlarda artış göstererek 2050 yılında 150 milyon insanda görüleceği tahmin edilmektedir (Singh et al.,2013). Gelişmiş ülkelerde yaşlı nüfusun ölümüne yol açan Alzheimer hastalığının dördüncü sırada yer alması bu hastalığın tedavisinin önem kazanacağını göstermektedir (Anand *et al.*,2014).

Kolinerjik sistemin bozulması, buna bağlı kolinerjik nöronların kaybı ile meydana gelen nörofibrillerin düğümlenmesi ve amiloidlerin ortaya çıkması Alzheimer hastalığına sebep olmaktadır (Nordberg and Svensson,1998).

Alzheimer hastalığının erken teşhisi oldukça zordur çünkü bu hastalığın belirtileri olan hafıza kaybı, bunama, moral bozukluğu gibi belirtilerin genellikle yaşlılıkla birlikte ortaya çıkığı düşünülmektedir. Alzheimer Hastalığı (AH) görülen beyinlerde korteks ve hipokampuste, asetilkolinesteraz enzimi (AChE)'nin aktivitesinin arttığı, buna bağlı olarak ACh seviyesinin ve aktivasyonunun düştüğü bildirilmiştir (Mann, 1989).

Günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan en belirgin yöntem asetilkolinesteraz inhibitörleridir (AChEi). Bu ilaçların çoğunu bitkisel kökenli maddeler oluşturur. Fakat şimdiye kadar AChE inhibitörü ilaçları kullanılarak klinik çalışmalarda ve pratikte istenilen başarı tam olarak elde edilememiştir. Bundan dolayı,

Alzheimer hastalığının tedavisine yönelik klinik, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda alternatif ilaçların ve tedavi yöntemlerinin önemi vurgulanmaktadır (Francis et al.,1999).

Son yıllarda Alzheimer hastalığının tedavisi ile ilgili yapılan çalışmalar, daha etkin ve yan etkisi daha az olan tedavi edici özelliği bulunan, yeni ilaç uygulamalarında koruyucu özelliklere sahip yeni AChEi'lerinin keşfi ve geliştirilmesini hedef alan stratejilere göre planlanmaktadır. Sunulan çalışmada yeni inhibitörlerin keşfedilmesi amaçlanarak yeni 4-Aminotetrahidrokinolin türevleri sentezlenip ve daha önce sentezlenmiş bazı 4-Aminotetrahidrokinolin türevlerinin asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi.

1.1. Enzimler

Enzimler, Biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran, protein yapısında olan ve brekasiyonları katalizleyen biyolojik katalizörlerdir. Canlıların yaşamlarını daha kolay devam ebilmeler için son derece önemli bir yere sahipler(İnce, 2006).

Enzim çalışmaları yalnızca biyoloji alanında çalışanlarla sınırlı kalmamış, proses tasarımcıları ve mühendisleri, kimya mühendisleri ve diğer bilim alanlarında çalışan araştırmacıların da ilgi alanına girmişlerdir (Sargın, 2003).

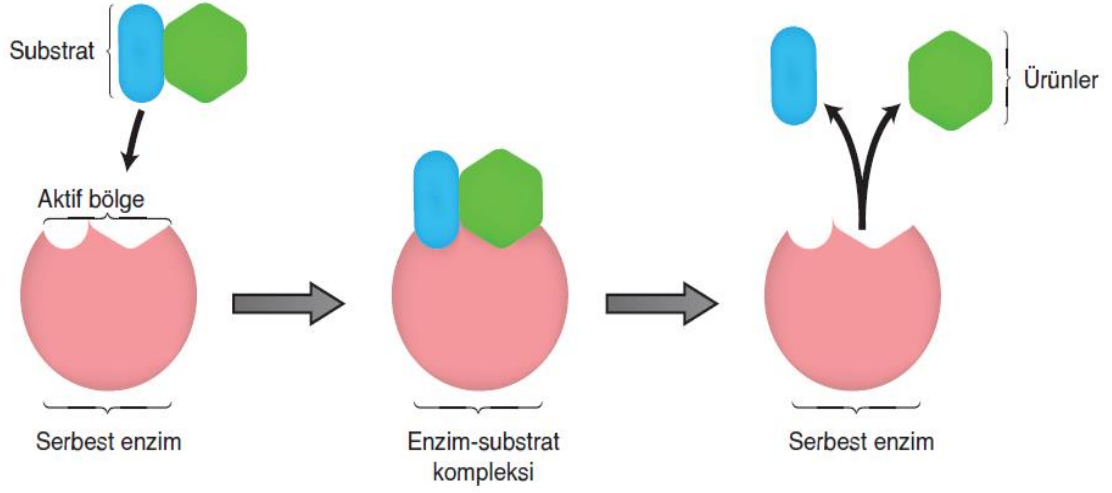
İnsanların enzimlerden yararlanması çok eskiye dayanmaktadır. İnsanlar farkında olmadan enzimlerden peynir, bira, şarap vb. maddelerin yapımında yararlanmış ve ilaç olarak kullanmışlardır. Enzimlerin hücre dışı aktivitelerinin olduğu ilk kez 1783 yılında Spallanzi tarafından atmacanın mide suyunun eti eritebildiği gösterilerek kanıtlanmıştır.

Daha sonra 1811 yılında Kirchoff, buğday nişastasının zamanla şekere dönüştüğünü saptamıştır (Aygan, 2008). Enzimlerin varlığı 1700'lerde konuşulmaya başlanmıştır. Nişastanın parçalanması bitkilerde ve tükruk bezinde elde edilen salgılarla, etin parçalanma çalışmaları ise 1800'lü yıllarında mide öz sıvısı kullanılarak çalışılmıştır. Şekerin alkole fermente edilmesi sonucunda bu reaksiyonun bazı moleküller tarafından gerçekleştirildiği saptanmıştır. Frederick W. Kühne tarafında bu moleküller 1878 yılında, biyolojik reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörler olarak tanımlanmış ve "hücrede bulunan" anlamına gelen "enzim" deyimini ilk kez kullanmıştır (Nelson and Cox,2005).

Endüstri alanının tamamına yakın alanlarında kullanılan enzimler bitkilerden mikroorganizmalardan, hayvanlardan ve mantarlardan sağlanmaktadır. Günümüzde endüstriyel katalizörler olarak enzimlerin kullanım alanlarının artışı ile birlikte kullanımları da artmaktadır . Son yıllarda 3000.den fazla enzim bulunmuş ve bulunan enzimlerin yarısından fazlası endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar vasıtası ile tanımlanmıştır. Bu kadar çok enzimin bulunmasına rağmen Endüstriyel taleplerinin yeterince karşılanmamıştır (Patel ve et ol. 2005). Enzimler günümüzde gıda ve yem teknolojisinde, deterjanlarda, tekstil endüstrisinde, hastalıkların teşhisinde ve daha birçok alanda kullanım alanına sahiptir. Enzim teknolojisi ekonomi, verim ve ekolojik dengenin korunabilmesi gibi ihtiyaçlar sayesinde hızla gelişmekte ve sürekli olarak eski uygulama alanlarından farklı yeni endüstriyel sektörler içerisinde yerini almaktadır (Sargın,2003).

Enzimler, hücrelerde meydana gelen reaksiyonları hızlandıran, canlı metabolizmasını düzenleyen küçük molekülerdir. RNA'nın bazı katalitik molekülleri hariç bütün enzimler protein yapılı kimyasal katalizörlerdir. Katalitik etkiye sahip enzimlerin katalitik aktiviteleri, enzim yapısında bulunan doğal proteinlerin konformasyon sağlamlığına bağlıdır. Protein konformasyonu ne kadar sağlam ise enzim katalitik aktivitesi o kadar kuvvetli olur (Türkan, 2015).

Enzimler cep ya da özel bir boşluğa sahipler bu özel boşluklar enzim moleküllerinde farklılık gösterir. Enzim moleküllerin aktif bölgesi substratın üç boyutlu yapısına uyumlu yapıdadır.



Şekil 1. 1. Anahtar kilit modeli (Anonim, 2020)

1.1.2. Enzim Aktivite Birimleri

Enzimler çok az bir miktarla biyolojik ortamlarda reaksiyonları gerçekleştirebilirler. Enzim miktarlarının az olmasından dolayı miktar ölçümü yerine aktivite ölçümü yapılmaktadır (Türkan,2009).

1.1.2.1. Enzim Aktivitesi

Bir tepkimenin hızı enzim aktivitesiyle ilişkilidir. Belirli bir sürede, optimum koşullarda, enzim etkisiyle substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

1.1.2.2. Enzim Ünitesi (EÜ)

25 °C’de, optimum koşullarda, bir dakikada 1 μ M substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.

1.1.2.3. Katal

Bir mol substratı bir sanyede reaksiyona sokan enzim miktarıdır. Katal, çok büyük bir biktarı temsil eden bir birimdir. Uluslararası enzim komisyonu tarafından belirlenmiştir.

1.1.2.4. Spesifik Aktivite

Bir miligram (mg) protein başına düşen enzim aktivitesine spesifik aktivite denmektedir. Enzim ünitesi(EÜ)/mg protein şeklinde elde edilmektedir. Spesfik aktivite aynı zamanda enzimin saflık derecesini göstermektedir.

1.1.2.5. Turnover Sayısı (molar aktivite)

Birim zamanda bir tek enzim tarafından ürüne dönüşen substratın molekül sayısına denir. 'kcat' sembolü ile gösterilir. Biyokimyasal reaksiyonların geneli enzimler tarafından gerçekleşir. Aynı zamanda canlılar tarafında sentezlen enzimler matabolik tepkimeleri hızlandırarak tepkime sonunda yapılarında bir değişiklik olmadan %100 verimle çalışmaktadırlar (Berg ve ark *at ol.*2014).

Enzimler spesifik molekülerdir. Etki ettikleri reaksiyon çeşitlerinde kullanılan substrata karşı önemli derecede spesifik katalizörlerdir. Bu sebepten dolayı katalizörler hücre içi tepkimelerde yan ürün oluşturmada etkilerini gösterirler. Hücre içi gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlarda enzim saniyeler içinde reaksiyonun gerçekleşmesini sağlıyor. Enzimsiz gerçekleşen bir reaksiyon için çok uzun bir süreye ihtiyaç olmasına karşı enzim kullanılan aynı reaksiyon saniyeler içinde substratın ürüne dönüşmesini sağlayarak reaksiyon tamamlanır (Sönmez,2016).

Enzimler ya aynı fonksiyonel gruba etki eder ya da bir enzim sadece bir substrata etki etmektedir. Enzimler spesifik olduğu kadar çok yüksek seçiciliğe de sahiptirler. Bu seçiciliği proteinleri oluşturan aminoasit sayısı, çeşidi, dizilim sırası, molekül yapısı gibi etkenlerden kaynaklanmaktadır. Enzimler protein yapılıdır fakat protein olmayan kısmı da mevcuttur. Protein olan kısmına apoenzim protein olmayan kısmına ise kofaktör veya koenzim denilmektedir. Protein kısmına eklenen organik moleküllere (koenzim A, NAD⁺, FAD) koenzim veya protein kısma eklenen metal iyonlarına (Zn⁺², Fe⁺² vd.) kofaktör denilmektedir. Enzimlerin kofaktör ve koenzim kısımların tümünü içererek oluşan katalitik aktif haline ise haloenzim denilmektedir. Bazı enzimlerin protein kısmı hem kofaktör hem de koenzim gruplarına birlikte ihtiyaç duyar. Yani enzimin aktivite gösterebilmesi için koenzim ve kofaktörün de olması gerekmektedir (Türkan 2015). Enzimler tek başlarına aktivite göstermezken ya bir koenzim ile aktivite gösterir ya da bir kofaktör ile birlikte aktivite gösterirler (Yıldırımoglu, 2009; Fennema, 1985).

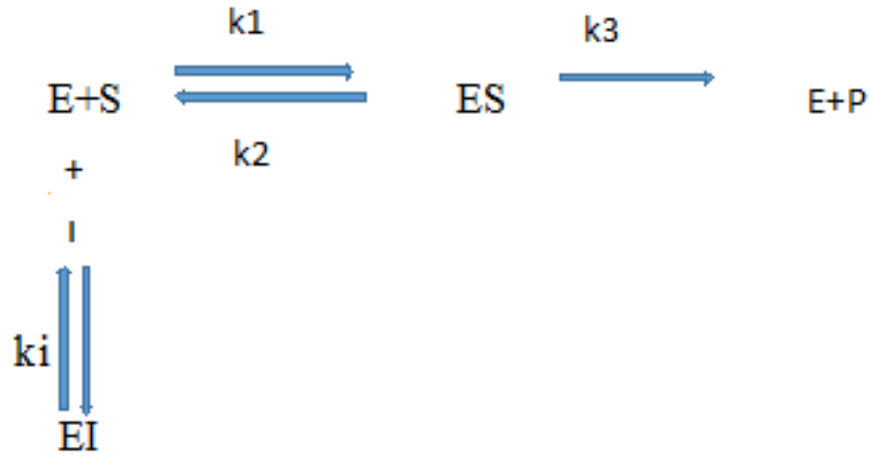
1.1.3. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin hücre içi ve hücre dışı aktivitelerini düşürülmesine hatta durdurmasına neden olan bazı bileşikler mevcuttur. Enzim aktivitesini değiştiren bu bileşiklere inhibitör ve gerçekleşen bu olaya ise inhibisyon denilmektedir (Türkan

2015). Biyolojik katalizörleri kontrol eden ve bazı durumlarda canlı sistem için yararlı bazı durumlarda ise zararı olan küçük moleküllerdir. Geri dönüşümlü (reversibl) ve geri dönüşümsüz (İrreversibl) olmak üzere iki çeşit enzim inhibisyonu vardır. Geri dönüşümsüz enzim inhibisyonunda enzim inhibitörden ayrıldığı zaman tekrar eski aktifliğini kazanır fakat geri dönüşümsüz enzim inhibisyonunda inhibitör enzimden ayrıldığı halde enzim inaktif halde kalmaya devam etmektedir (Türkoğlu ve Çamaş,1996).

Enzim ile inhibitör bağlanması genelde kovalent bağla birbirlerine bağlanırlar veya ayrışması zor olan kompleks oluştururlar. Nöronlar arasında uyarıların iletiminde görev alan bir nörotransmitter olan asetilkolin ara maddesini katalizleyen asetilkolinesteraz enzimin inhibisyonuna sebep olmaktadır.

Geri dönüşümsüz enzim inhibisyonunda maksimum hız (V_{max}) azalırken Michaelis-Menten sabiti olan K_M değeri sabit kalır (Türkoğlu ve Çamaş, 1996).

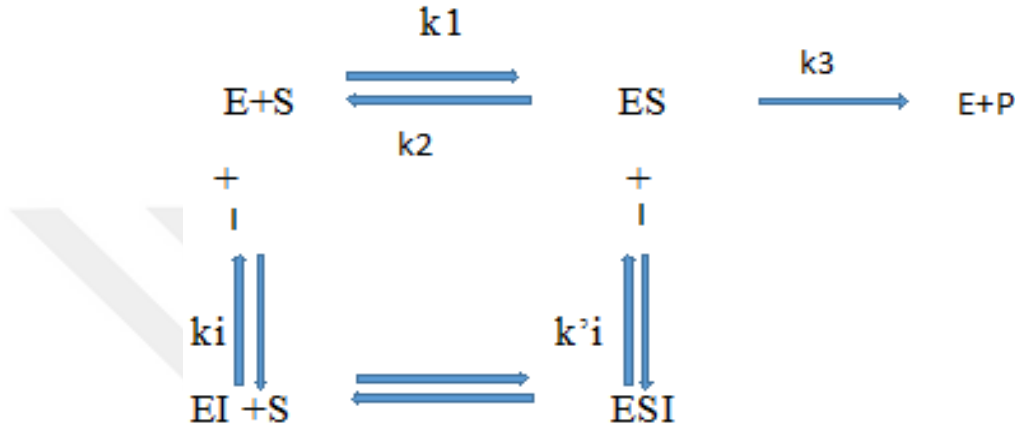


Şekil 1. 2. Dönüşümsüz inhibisyonun reaksiyon şeması

Dönüşümlü inhibisyonunda hücre içi reaksiyonlarda bir denge hali söz konusudur. Enzim-inhibitör kompleksi çok hızlı ayrışabilir. Geri dönüşümlü inhibisyonuna verilebilecek en belirgin örnek yarışmalı (kompetitif) inhibisyonudur.

1.1.3.1. Geriye Dönüşümlü (reversibl) İnhibisyonlar

Geriye dönüşümlü (reversibl) inhibisyonlarda inhibitörlerin enzimlere bağlanma şekline göre yarışmasız (nonkompetitif) İnhibisyon, yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon olarak bulunmaktadır.



Şekil 1. 3. Dönüşümlü inhibisyonun reaksiyon şeması

1.1.3.1.1. Yarışmalı (kompetitif) İnhibisyon

İnhibitör, enzimin aktif bölgesine substratla yarışarak bağlanır. İnhibitör molekülü ile substrat yapıları birbirlerine benzedikleri için enzim ile inhibitör kolay bir şekilde birbirlerine bağlanırlar, ancak ürün oluşmamaktadır. Bu tür inhibitörler enzimin substrata bağlanmasını engelleyen maddelerdir. Yarışmalı inhibisyonda maksimum hıza (V_{max}) ulaşmak için daha fazla substrata ihtiyaç vardır. Ortamdaki substrat miktarının artmasıyla birlikte enzimin inhibitöre olan ilgisi azalır ve böylece inhibisyon ortadan kalkmış olur. İnhibitör varlığında enzimin substrata olan ilgisi azalır, böylece K_M değeri artar V_{max} değeri ise değişmez.

1.1.3.1.2. Yarışmasız (nonkompetitif) İnhibisyon

Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ile substrat molekülü yapı olarak birbirlerine benzemez substratla inhibitör enzime farklı bölgelerde bağlanırlar. Yarışmasız inhibitör, ya ES kompleksine ya da serbest enzime bağlanarak tepkimenin hızını düşürürler. Bu tip inhibitörler substrat molekülün miktarının artması inhibisyonu ortadan kaldırmaz.

1.1.3.1.3. Yarı Yarışmalı (unkompetitif) İnhibisyon

Yarı Yarışmalı(unkompetitif) inhibisyon durularında İnhibitör direk ES kompleksine bağlanır. İnhibitörün bağlanmasıyla ürün oluşumu sonlanır.

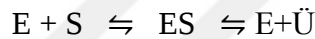
1.1.4. Enzimlerin Hızını Etkileyen Faktörleri

Enzim aktivitesini etkileyen birçok faktör var fakat en önemli faktörler; pH, sıcaklık, enzim derişimi, substrat derişimi, ürün derişim

1.1.4.1. Enzim Derişim

Reaksiyonun oluşmasını ve hızını etkileyen faktörlerden biri de enzim derişimidir. Substrat derişimi yeterli düzeyde ise enzim derişimi artıkça tepkimenin hızı artar. Enzim substrat doygunluğu sağlandığında tepkimenin hızı sabit kalır belli bir süre sonra ortamın substrat düzeyi azaldıktan sonra tepkimenin hızı da yavaş yavaş azalmaya başlar ve belli bir değere gelip sabit kalır.

1.1.4.2. Substrat Derişimi

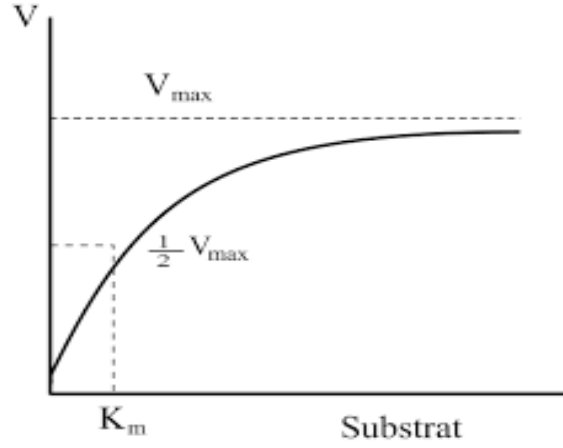


Tepkimedeki E: enzimi, S: substartı, ES: enzim substrat kompleksini, Ü ise ürünü temsil etmektedir. Bu denklem 1913 yılında L. Michaelis ve M. Menten tarafından önerilmektedir. Tepkimeye göre sabit enzim derişiminde substrat derişiminin artması tepkime hızını da artırır. ES etkileşimi tamamlandıktan sonra enzim aktif bölgesi doygunluğa ulaşır. Enzim derişiminde olduğu gibi tepkimenin hızı yavaş yavaş azalarak belli bir sabitliğe yaklaşır (Yavuz,2005).



$$\text{Tepkime hızı: } V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Eşitliği elde edilir; bu eşitlikteki Vmax, maksimum hızı, K_M ise Michaelis-Menten sabiti olarak adlandırılır.



Şekil 1. 4. Michael Menten grafiği (Anonim, 2015)

V_{max} değeri enzim substrat kompleksi maksimum değere ulaşınca V_{max} değeri bulunur, K_M değeri ise V_{max} 'ın yarısı kadar substrat konsantrasyon değerine denk gelen kısımdır.

$V_{max}/2 = K_M$ olur.

K_M değeri enzim substrat ilişkisi ile değerlendirilir. K_M değeri enzim substrat ilgisi ile ters orantılıdır. Yani K_M değeri küçük ise enzimin substrata olan ilgisi büyük K_M değeri büyükse enzim substrat ilgisi azdır (Michaelis and Menten, 1913).

1.1.4.3. Sıcaklık

Enzimler belli bir sıcaklık değeri aralığında çalışırlar. Sıcaklığın artışıyla birlikte tepkimenin hızı da artar belli bir sıcaklık değerinden maksimum hız değerine ulaşır. Sonra tepkime hızı giderek azalır ve enzimin üç boyutlu yapısında denatürasyon olmaya başlar. Sıcaklıkların çok düşük olması durumunda enzim bozulmadan inaktif olarak kalır çalışmaz. Denatürasyon sebebiyle enzim aktifliği azalmaya başlar. Sıcaklığın artışıyla azalan enzim aktifliği olayı termal denatürasyon olarak adlandırılır. Sıcaklıkların değişiminden dolayı V_{mak} ve K_M değerleri de değişmektedir.

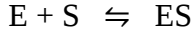
1.1.4.4. pH

Her enzimin aktiflik gösterdiği bir pH değer aralığı vardır. Bazı enzimler pH değerinin düşük olduğu asidik ortamda aktivite gösterirler, bazı enzim çeşitleri ise pH değerinin yüksek olduğu yani bazik ortamda daha iyi aktivite gösterirler. Dolayısıyla enzim aktif bölgesinde iyonik bir bölge bulunmaktadır. Ortamın değişmesi durumunda

aktif bölgedeki iyonik bölgede değişir ve enzim aktivitesinde bir değişme meydana gelerek enzimin çalışma hızı düşer enzim inaktif forma dönüşür.

1.1.4.5. Ürün Derişimi

Enzimin aktif olduğu şartlar sağlandıktan sonra enzim sustrat kompleksi meydana gelir.



Enzim substrat kompleksinden sonra ürün meydana gelir.

Reaksiyon sonunda enzimler değişmeden çıkarlar yani en son basamakta ürün ve enzim yer alır.



Biyokimyasal reaksiyonlar devam eder ve bir tepkimenin ürünü başka bir tepkimenin substratı olabilir. Ürün oluşumu artıka enzim aktivitesi azalır. Böylece ürün enzimi kontrol altında tutar. İyonik şiddet, kofaktör konsantrasyonu, zaman ve inhibitör ve aktivatör konsantrasyonu gibi diğer etkenlerinde enzim hızı üzerinde önemli derecede etkileri bulunmaktadır.

1.1.5. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE)

Sistematik ismi asetilkolin asetilhidrolaz [EC.3.1.1.7] olan ve hidrolaz sınıfında yer alan bir enzimdir. Genel olarak asetilkolinesteraz olarak bilinen bir enzimdir. Bilim dünyasında kullanılan diğer isimleri; gerçek kolinesteraz, kolinesterazı ve eritrosit kolinesterazıdır.

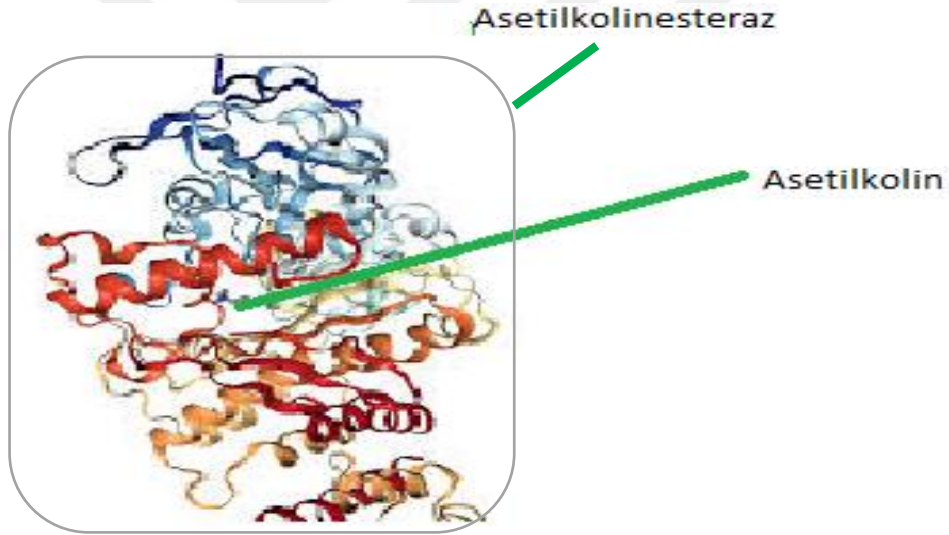
İnsanlarda 7. kromozom ile kodlanan asetilkolinesterazın farmakolojik önemi başta Alzheimer olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için kullanılan ilaçların ve zirai ilaç olarak kullanılan pestisitlerin hedefinde bulunmasından kaynaklanır (Akgün ve ark. ,2004; shen et al. 2002).

1.1.5.1. Asetilkolinesteraz Enzimin Yapısı

Asetilkolinesteraz enzimi, 537 amino asit uzunluğunda olan ve 1 saniyede 250,000 asetilkolin molekülünü katalizleyen bir katalizördür. İlk olarak 1991 yılında Sussman tarafından X ışını kullanılarak AChE enzimin yapısı belirlenmiştir (Sussman et al.,1988).

Asetilkolinesteraz enziminin katalitik mekanizması ve inhibitörlerinin etki tarzının bilinmesi AChE enzimin üç boyutlu yapısının incelenmesi ile anlaşılmaktadır. Bu enzim 1988'de kristalize edilmiştir. AChE'nin moleküler yapısı 14 alfa sarmal ile çevrili 12 beta kırılmalı levhadan meydana gelmektedir (Nogady and Weaver, 2005).

Biyolojik bir ester olan asetilkolin merkezi sinir sisteminde çok bulunan bir nörotransmitterdir. Kolinerjik ve nonkolinerjik sinirlerde yer alan postsinaptik membranlar yüzeyinde bulunan önemli bir maddedir. Asetilkolin, tükürük ve salgı bezlerindeki ayrışmanın uyarılmasına, solunum yollarının kasılmasına, kalp kasılmalarının inhibisyonuna, kan damarlarındaki düz kasların gevşemesine, sinir uyarısının devamlılığına yol açmakta ve ekstrapiramidal sistemin dengeli çalışmasını sağlamaktadır (Wilson and Nachmansohn, 1954).



Şekil 1. 5. Asetilkolinesteraz Enzimin Üç Boyutlu Yapısı

1.1.5.2. AChE'nin ACh Hidrolizindeki Görevi

Asetilkolinesteraz enzimin en önemli biyolojik rolü; asetilkolin molekülünün sinaptik boşlukta serbest kalması ile oluşan sinirsel impulsu hemen ortadan kaldırmaktır. Asetilkolinesteraz enzimi, ACh'nin asetat ve koline hidrolizini katalizleyerek sinaptik boşluktan asetilkolin molekülünü kaldırmaktadır.

Asetilkolin (ACh) en yaygın bulunan ve aynı zamanda ilk olarak keşfedilen nörotransmitter maddelerdendir ve solunum ara ürünü olarak koenzim A'dan yine lipid metabolizmasındaki etkili rolüyle bilinen kolinden meydana gelmektedir (Bear *et al.*

2001). ACh, presinaptik noronların özel bir vezikülünde depolandıktan sonra Ca^{+2} iyonuna bağlı bir şekilde ekzositoz işlemiyle sinaptik boşluğa salınır daha sonra ACh reseptörlerine (AChR) bağlanır, hücreler arasında iletişim sağlandıktan sonra asetilkolin reseptörden tekrar ayrılır. Sinaptik boşluğunda ya da kavşak aralığında birikenreseptörlerden ayrılan nörotransmitter olan ACh molekülleri, ACh molekülüne özgü olan AChE enzimi ile parçalanarak asetilkolini kavşak aralığında vesinaptik boşluğunda kaldırılır, hidroliz sonucunda açığa çıkan asetat ve kolin tekrar kullanılarak, Transporter moleküllerle asetilkolin sentezlenmek üzere presinaptik nörona gönderilir (Serdaroğlu, 2011; Thacker, 2003; Pillay, 2003).

1.1.5.3. Asetilkolinesteraz Enziminin Fonksiyonlar

Birçok in vivo ve in vitro çalışmasında AChE enziminin morfolometrik süreçlerde sinir sistemindeki hücre farklılaşması ve sinaptojenezde hücre adezyonunda ve hücre göçünde apoptotik yollarda etkili olduğu gösterilmiştir. AChE'nin ilk biyolojik rolü AChE'nin sinaptik boşlukta serbest kaldığı zaman oluşan sinirsel implusu hızla sonlandırmaktır. AChE'nini asetat ve koline hidrolizini katalize ederek sinaptik boşluklarda ACh'yi ortadan kaldırır. AChE 'nin tümör baskılanmasındaki görevi AChE inhibitörlerinin zirai alanlardaki kullanımının çeşitli tümörleri indüklediği bilinmektedir. Hem in vitro hem in vivo çalışmalar, AChE düzeylerinin apoptotik hücrelerde arttığı tespit edilmektedir. Örneğin sıçan böbrek hücrelerinde (NRK) apoptoz sırasında yüksek oranda AChE olduğu göstermektedir (Şahin, 2002).

1.1.5.4. Asetilkolinesteraz Enziminin Biyolojik Önemi

Alkaloid sınıfında yer alan asetilkolin, tanımlanan ilk ve en çok bilinen nörotransmitterdir (sinirsel uyarı ileticisi). Kapalı formülü; $CH_3COOCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ olan asetilkolin, kolinasetiltransferaz enzimi tarafından gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda oluşan asetik asit ile kolinin birleşiminden elde edilir. 1914 yılında İngiliz bilim adamı Henry Hallet Dale tarafından tanımlanmış, 1921 yılında ise Avustralyalı bilim adamı Otto Lewi tarafından, kurbağa kalpleri üzerinde yapılan deneyler sonucunda, bir nörotransmitter olduğu kanıtlanmıştır. Bu buluş bilim adamlarına 1936'da Nobel Ödülü kazandırmıştır. Asetilkolin, günümüzde Parkinson hastalıklarında ve AH tedavisinde kullanılmıştır (Kent, 2000).

Kolinerjik sinir uçlarında kolinasetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından kolinin asetil-CoA ile enzimatik asetilasyonundan sentezlenmektedir. Sinir uclarındaki mitokondrilerde sentezlenen asetilkoenzimA asetilin kaynağıdır. Kolin kaynakları ise genel olarak; snaps boşluğunda asetilkolin yıkımı, vücutta fosfolipid (fosfatidilkolin) yıkımıyla açığa çıkan ve beslenmeyle alınan kolindir. Kolin sinir ucuna sinaps veya kavşak aralığından aktif transportla alınmaktadır. Kolinin asetillenmesi ise sitoplazmada gerçekleşmektedir (Anonim, 2016)

1.1.6. Asetilkolin

Astilkolin (Ach), Henry Hallett Dale tarafından kalp dokusunda keşfedilmiş, daha sonra Otto Loewi tarafından bir nörotransmitter olduğu gösterilmiştir. Asetilkolin otonomik ve somatik sinir sisteminde major nörotransmitterdir. ACh, sinir impulslarının nöromusküler kavşaklarda kimyasal yol ile iletilmesinde görev alır ve kasları aktive etmektedir. Asetilkolin, birçok organizmanın parasempatik sinir sisteminde bulunan biyolojik bir esterdir. Merkezi sinir sisteminde yer alan asetilkolin, kimyasal bir transmitter olup aynı zamanda tanımlanan ilk nörotransmitterdir. Merkezi Post sinaptik hücre yüzeyindeki kendine has reseptörlere bağlanıp hücre zarına geçen asetilkolin, sinaptik veziküllerde yer alan özel bir vezikülde depolanır ve Ca^{2+} iyonuna bağlı bir şekilde ekzositoz işlemiyle sinaptik boşluklara salınır (Perry et al.,1999).

1.1.6.1. Asetilkolin Sentezi

Asetilkolin, organizmada Kolin ile, Asetil-Co-enzim-A' dan asetil transferaz yardımıyla bir açıl grubunun transfer edilmesiyle sentezlenir. Asetilkolin sentezi, sinaps aralığında serbest kalan kolin, besinlerden alınan ekzojen kolin ve vücutta yıkılan fosfolipitlerden açığa çıkan kolin ile asetilkoenzim A'nın kolinasetil transferaz enzimi yardımıyla katalizlenmesi sonucu gerçekleşmekte ve presinaptik uçta veziküllerde depolanmış bir şekilde bulunmaktadır (Akgün ve ark., 2004; perry,1999).

1.1.7. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, genel olarak yaşlılıkla ortaya çıkan ve unutkanlık olmak üzere çeşitli zihinsel ve davranışsal bozukluklara neden olan geri dönüşü olmayan ilerleyici bir beyin hastalığıdır (Francis et al., 1999; Mann, 1989. Alzheimer hastalığı ilk olarak, 1906 yılında Alois Alzheimer isimli Alman psikiyatrist tarafından tanımlanmıştır (Förstl and Kurz, 1999). Alzheimer hastalığı, genellikle 65 yaş üstü

popölasyonu etkilemekle birlikte (Anonim,2016), düşük seviyede de olsa Alzheimer hastalığının erken onsetsi genç yaşlarda da görölebilmektedir. 65 yaş üstü insanların yaklaşık %10; 85 yaş üstü insanlarda ise ortalama her iki kişiden birinde yani dünya nüsunun %50'lik bir kısımda Alzheimer hastalığına rastlamak mümkündür 2009 Eylül ayı itibariyle dünya üzerinde 35 milyona yakın Alzheimer hastasının bulunduğu, bu oranın 2050 yılında 115 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir (Förstl and Kurz, 1999).

Amerika'da her 67 saniyede bir kişinin Alzheimer hastalığına yakalandığı, 2050 yıllarında ise her 33 saniyede bir kişinin Alzheimer hastalığına yakalanacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise Yapılan araştırmalara göre ortalama 300 bin Alzheimer hastası olduğu ve genç nüfusun giderek yaşlanacağı bir ölke olarak bu oranın daha da artacağı beklenmektedir (Förstl and Kurz, 1999).

Yaşlanmayla birlikte Alzheimer hastalığının görölme olasılığı artmakta ancak Alzheimer hastalığı normal yaşlanmanın kaçınılmaz bir sonucu olarak görölmemelidir (Förstl and Kurz, 1999).

Halk arasında "bunama" olarak bilinen demans; dil, hafıza bozukluğu, kavrama, duygusal davranışlar ya da kişilik ve öğrenme becerileri (hesap yapma, soyut düşünme ve yargılama) dahil mental fonksiyonda çeşitli problemlerle ortaya çıkmakta ve kişinin günlük yaşantısını etkilemektedir. Demansın çoğu çeşidi, geri dönüşümsüzdür (dejeneratiftir) (Singh et al., 2013).

Bilinen bazı hastalıklarla ortaya çıkan, beyin işlevlerindeki kaybı tanımlanan demansın temel nedeni Alzheimer hastalığı olarak bilinmektedir. Her Alzheimer hastası demanslı bir hastadır, ama her demans hastası Alzheimer hastası değildir. Çünkü Alzheimer hastalığından başka; Down sendromu, frontotemporal lobar dejenerasyonu, vasküler demans, Lewy cisimcikli demans, Huntington hastalığı, karma demans, Parkinson hastalığında görölen demans, Creutzfeldt-Jakob hastalığı ve normal basınç hidrocefalisi da demansa neden olabilmektedir (Şahin,2002).

1.1.7.1. Alzheimer Hastalığının Belirtileri

Erken teşhisle belirti ve bulguları fark etmek genellikle zordur. Fakat belirtiler genelde genetik yapı özellikleri, yaşam tarzı, kültürel birikim ve yaşam tecrübelerine göre kişiden kişiye farklılık göstermektedir (Korolev,1017).

Alzheimer hastalığının belirtileri genel olarak şu şekilde sıralanır (Anonim, 2014,2017).

- Karar verme güçlüğü
- Günlük yaşam aktivitelerini etkileyen hafıza kaybı
- Var olan becerilerin kaybı, İletişim bozukluğu
- Oryantasyon bozuklukları, Unutkanlık
- Soyut düşünme
- Davranış bozukluğu
- Kişilik değişikliği

Alzheimer hastalığının en güçlü belirtilerinin başında unutkanlık gelmektedir. Alzheimer hastalığına yakalanan insanlar genellikle günlük yaşantısında öğrendiği bilgileri hatırlayamama ve yeni bilgiler öğrenmede güçlük çekme, konuşma bozukluğu, karar verme güçlüğü, tanıdığı kişileri tanıyamama, yolunu kaybetme gibi zihinsel bozuklukların yanı sıra, depresyon, saldırganlık, huzursuzluk, hayaller görme, uyku bozuklukları ya da amaçsızca dolaşma gibi ruhsal bozukluklar da görülebilmektedir (Anonim, 2016).

1.1.7.2. Alzheimer Hastalığının Kolinergik Sistemle İlişkisi

Kolinergik sistem, Nöron ucu ile kontrol edilen nöroefektör kavşak iletimi sağlayan kimyasal aracı asetilkolin olan duysal, bilişsel ve motor görevlerini düzenli yürütmesini sağlayan önemli bir nöromedyatör sistemdir. Alzheimer hastalığının önemli bir belirtisi olan bilişsel bozukluklarla ilgili yapılan çalışmalarda kolinergik disfonksiyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bymaster at al., 2002; Dean et al., 1996). Kolinergik sistem Alzheimerli beyinlerde önemli bir etkiye sahiptir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde yapılan çalışmalar sonucunda asetilkolin reseptörleri olan muskarinik ve nikotinik reseptörlerin seviyesinde bir düşüş olduğu görülmüştür (Scarr and Dean, 2008).

1.1.8. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri (AChEI)

Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlara asetilkolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesterazlar denilmektedir. Asetilkolin'i yıkımını inhibe eden Asetilkolinesteraz inhibitörleri santral ve periferik kolinerjik işlevini güçlendirmektedirler. Sadece reversibl kolinesteraz inhibitörleri II. Dünya Savaşı'ndan önce bilinirken savaş sırasında uzun süre etkili ve aşırı derece toksik bileşikler olan irreversibl bileşikler geliştirilmeye başlanmıştır. Klinik çalışmalarında, kolinesteraz inhibitörleri başta Alzheimer hastalığı olmak üzere myastenia gravis ve glokom gibi hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Jeger, 2013).

AChE enziminin esterik özelliğe sahip ajanlar irreversibl, anyonik özelliğe sahip ajanlar ise reversibl inhibisyona uğrarlar. AChE enziminin substratı olan kolin ve asetik asit, reversibl inhibisyona uğradığı fizostigmin ve irreversibl inhibisyona uğradığı diizopropil florofosfat ile olan reaksiyonları gösterilmektedir (Nordberg and Svensson, 1998; Akgün ve ark.,2004).

1.1.8.1. Alzheimer Hastalığında Kullanılan Kolinesteraz İnhibitör İlaçlar

Alzheimer hastalığının temelini oluşturan kolinerjik varsayım, Alzheimer hastalığında tedavi için kullanılan ilk ilaçların temelini oluşturmaktadır. Alzheimer hastalığında görülen kolinerjik eksikliğin, Alzheimer hastalığının sebebini oluşturmaktan daha çok Alzheimer hastalığının sonucu olarak ortaya çıktığı anlaşılsa da günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların etki mekanizması bu varsayıma dayanmaktadır (Singh et al.,2013)

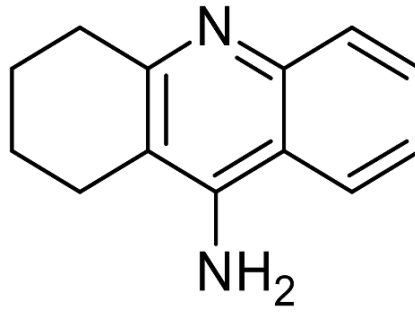
Geçici olarak tedavilerde kullanılan ilk AChE inhibitörü ilaç, 1992 yılında aminoakridin türevlerinde olan bileşik takrin (Cognex®) kullanıma sunulmuştur. Sürekli olarak tedavilerde kullanılan asetilkolin ve butirilkolinesteraz enzim inhibitörü takrinin, butirilkolinesteraz inhibisyonu asetilkolinesteraza göre daha fazladır. Hafif ve orta derece Alzheimer hastalığında kullanılmaya başlanan takrin, günümüzde potansiyel karaciğer toksisitesi ve serum aminotransferaz seviyelerinin düzenli holter tabi aletin gerektirmesi nedeniyle seyrek olarak kullanılmaktadır (Kayaalp, 2002)

1.1.8.1.1. Takrin

Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroakridin), 1960 yıllarında çizgili kas felci için kullanan bir ilaçtır. Bu ilacın plazmada eliminasyon bozunma süresi 3 saat olmasına rağmen beyinde Takrin'in bozunumu 3 saatten daha fazladır.

Takrin, kan-beyin bariyerini aşabilen tersiyer amin yapıda olan bir ilaçtır. Merkez sinir sistemine geçerek etkisini beyindeki muskarinik reseptörlerden birini aktif hale getirerek gösterir.

Alzheimer tedavisinde kullanılan Takrin, Asetilkolinesteraz ve bütilkolinesteraz enzimlerine kompetatif bağlanarak inhibe eder. Yapılan deneysel çalışmalarda dopamin, serotonin ve nöradrenalin salgılanmasını artırarak Alzhemir hastalarında %15-30 arası bir düzelme olduğu gözlemlenmiştir. Alzheimer hastalığı ilerleyen hastalarda fazla etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Bazı yan etkilerinden (ilaç-besin, ilaç-ilaç etkileşimi) dolayı kullanımı pek fazla yaygın olmadığı, yerine yeni inhibitörler geliştirilmiştir (Sirvio,1999).



Şekil 1. 6. Takrin: [1,2,3,4-Tetrahidroakridin-9-amin]

1.1.8.1.2. Donepezil

Donepezil, Demans hastalığının bir çeşidi olan Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan geri dönüşümü olan bir inhibitördür. Eliminasyon yarı ömrü 70 saat olmasına rağmen yaşlılarda bu süre 100 saate kadar devam edebilir. Karaciğer hücrelerine zararlı (hepatotoksik olmaması) olmaması, günlük kullanımın tek doz olması ve asetilkolin esteraz inhibitörlerin arasında en az yan etkiye sahip olması gibi avantajları bu ilacı diğer inhibitörlere göre Alzheimer tedavisinde çok önemli bir yere getirmektedir.

(Wilkinson and Murray, 2001). Bu ilaç hafif ve orta derece Alzheimer hastalığında etkisi görülürken ileri evre alzheimer hastalığında tercih edilen bir ilaç değildir. Paleopmamalian beyinde olan etkilerinden dolayı davranış bozuklukları üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Bulantı, kusma, yorgunluk hissi, uykusuzluk gibi nadir görülen yan etkisi vardır (Burns,1999).

1.1.8.1.3. Fizostigmin

Kolinerjik sinir sisteminde geri dönüşümlü olan bir antikolinesteraz inhibitörüdür. Santral ve beraberinde periferik antikolinerjik toksisite varlığında fizostigmin tercih edilir. Sulu solüsyonların ömrü oldukça kısadır. Mukozaların tamamında emilimi hızlı olmasından dolayı vücuttaki inaktivasyon süresi çok kısadır. Santral sinir sistemine kolaylıkla geçebilen lipofilik bir yapıdadır. Fizostigmin, asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek asetilkolinin muskarinik reseptörlere bağlanmasını kolaylaştırır (Breteler et al, 1991). Hızlı verilmesi takiben brankospazm, bradikardi, bulantı, kusma ve diyare gibi yan etkileri vardır. Kolinerjik kriz sırasında atropin ile tedavi edilmelidir (Yavuz, 2005).

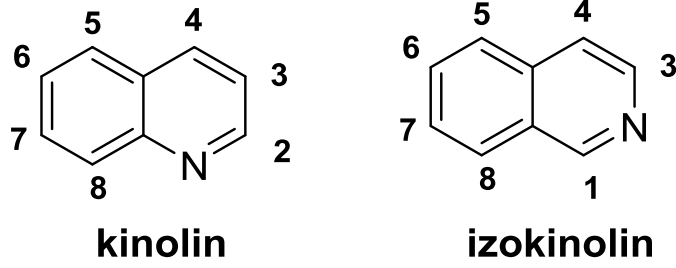
1.1.8.1.4. Rivastigmin Tetrat

Alzheimer, Parkinson hastalıklarının tedavisinde hafif ve orta derece şiddette sahip hastalıkta tercih edilir. İleri evre hastalıkta tercih edilen bir ilaç değildir. Alzheimer hastalığı enzimlerin aktifliğiyle orantılı olarak artar. Böylece alzhemir hastalığın şiddetini azaltmak için bu ilaç terih edilir. Bu ilaç hem asetilkolinestraz enzimini hem de bütilkolinesteraz enzmini birlikte etki eder. İlaç oral ya da transdermal olarak verilebilir. Transdermal yolla verilmesi kusma, bulanma gibi yan etkilerinin prevalansını azaltır. Yan etileri arasında; kusma-bulanma halisünsyon, uyku problemleri, huzursuzluk gibi davranış bozukluklara yol açan etkilere sahiptir.

1.1.9. Organik Bileşiklerin Özellikleri

1.1.9.1. Kinolin

1984 yılında Ferdinand Runge tarafında kömür katranında elde edilmiştir. Heterosiklik, aromatik ve organik bir bileşik olan kinolin, renksiz, nem çekici ve keskin kokuya sahip bir maddedir. C_9H_7N formülüne sahip olan Kinolinin molekül ağırlığı 129.16 g, kaynama sıcaklığı ise 239 °C dir. Bu molekül, 1-azanaftalin, benzo(b) pridin veya 1-benzazin gibi farklı isimler ile de bilinir (Dingil, 2008).



Şekil 1. 7. Kinolin ve İzokinolin Yapısı

Kinolin yapısının biyolojik sistemlerde ve ilaç yapımındaki kullanımı, ilaç şirketlerinin ve araştırmacıların ilgisini çekerek kinolin için uygun sentez yöntemleri sürekli gündemde yerini korumuştur. Antibakteriyel, anti inflamatuvarlar, antifungal, antitüberküler, HIV inhibitörü ve anti tümör gibi farmakolojik ve çeşitli fizyolojik aktiviteler göstermesinden dolayı kinolin ve türevlerine olan yoğun incelemeler ve ilgi gittikçe artmaktadır (Ökten ve ark. 2015).

Günümüzde, metoksi ve hidroksi gruplarını bünyesinde barındıran kinolin halkasının C-8 bölgesindeki kinolin türevlerinin sentezlenmesiyle, insan rahim ağzı kanseri (HeLa), sıçan glioblastoma (C6), insan adenokarsinomuna (HT29), hücrelerine karşı kuvvetli sitotoksik etkileri bulunmuştur. 8- süstitüe kinolin türevlerinin bazı türlerinin arasında, 7-bromo-8- hidroksi, 7-siyano-8-hidroksi-, 5,7-dibromo-8-hidroksikinolin, 5,7-disiyano-8-hidroksikinolinler C6, HT29 ve HeLa hatlarını kar hücre ölümünü (apoptoz) indükleyerek rekombinant DNA enzimi olan topoizomera I enzimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Ökten ve ark., 2017). Ökten ve grubu tarafında yapılan araştırmalara göre N-oksit, metoksi, nitro, siyano ve fenil gruplarının, kanser hücre hatlarında antiproliferatif aktivite gösteren yeni bileşikler sentezlenmiştir.

1.1.9.2. Tetrahidrokinolinler

Tetrahidrokinolinler, doğada yaygın olarak bulunan oldukça önemli bileşiklerdir. Bu bileşiklerin çoğu biyolojik ve ilaç aktivitesine sahip bileşiklerdir. Bu bileşiklerin arasında antibakteriyel etkiyi Martinella alkaloidleri gösterirken, Gephyrotoxin bileşiği nörolojik aktivite gösterir. Torcetrapib bileşiği ise kolesterol esterlerin transfer protein inhibitörüdür. Ayrıca L-689,560 bileşiği N-metil-D-aspartat reseptörlerin antagonistidir.

Farmasötik öneme sahip olan mitomycin C, gephyrotoxin ve xylopinine bileşikleri birçok doğal ürünlerin temelini oluşturan bu bileşikler trisiklik anilin türevlerinden meydana gelmektedir. Mitomycin C antikanser olarak aktivite gösterirken, gephyrotoxin bileşiği ise nörolojik etkiye sahip bir bileşik olarak sentetik kimyacıların dikkatini üzerine çekmiştir.

Doğal bir antitümör antibiyotik olan dinemisin, tetrahidrokinolin sistemi üzerine inşa edilmiş karmaşık bir yapıya sahiptir. 1,2,3,4-tetrahidrokinolinlere olan en büyük ilgi biyolojik aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. Bu bileşiklerin birkaçı doğal olarak oluşur.

Povarov reaksiyonu yöntemi kullanarak 4-Aminotetrahidrokinolinin sentezi; aromatik ya da alifatik aldehit, elektronca zengin olefinler (N-vinilkarbamat) ve anilin'in Brønsted asit veya Lewis asit katalize reaksiyonu sonucu gerçekleşmektedir. Povarov reaksiyonu yöntemiyle 4-Aminotetrahidrokinolin bileşiklerinin sentezi tek kademede yüksek verimlerle olmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Taslimi ve ark.(2020), tarafından asetilkolinesteraz, α -glikosidaz ve glutatyon S-transferaz enzimleri üzerine benzensülfonamid türevlerinin inhibitör etkilerinin ve biyolojik değerdendirmelerinin molekül kilitlenmesi yöntemi ile araştırılması yapılmış çalışmada bileşiklerin birçoğunun enzim üzerinde inhibitör etkisinin olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, amin sülfonamid (1i-11i) türevleri, metanol içinde NaBH₄ ile indirgenmiş imin bileşikleri (1-11) ile hazırlanmıştır. Sentezlenen benzensülfonamid türevleri asetilkolinesteraz, glutatyon S-transferaz (GST) ve α -glikosidaz (α -GLY) enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenerek. AChE ve α -GLY için Ki değeri sırasıyla $2,26 \pm 0,45$ – $3,57 \pm 0,97$ ve $95,73 \pm 13,67$ – $102,45 \pm 11,72$ mM aralığında, GST için Ki değeri 22.76 ± 1.23 – 49.29 ± 4.49 aralığında bulunmuş, Sülfonamid türevlerinin geniş bir biyolojik aktivite sergilediği ve bir ilacın geliştirilmesinde potansiyel tıbbi moleküller olarak işlev görebileceği sonucuna varılmıştır.

Türkan ve ark. (2020), tarafından asetilkolinesteraz, butirilkolinsteraz ve alfa-glikozidaz enzimleri üzerine inhibitör etkisi gösteren bazı metabolik maddelerin antikanser özelliklerinin belirlenmesi ve molekül kilitlenmesi ile ilgili yapılmış çalışmada Ki değeri 3.77 ± 0.58 olan kobalt kompleksinin karşı α -glikosidaz enzimi üzerinde en iyi inhibisyon etkiyi gösterdiği bildirilmiş, aynı şekilde asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimleri üzerinde inhibitör etkisi gösteren SM-Co kompleksi ile aktiviteleri incelenerek Ki değeri sırasıyla $74,23 \pm 5,02$ mM ve $101,21 \pm 12,84$ mM olarak elde edilmiştir.

Taslimi et al. (2020), Kardiyovasküler sistemlerde yaygın kullanılan piridazin çekirdeklerinden türevlenmiş Pirazol [3,4-d] piridazin türevleri: Moleküler yerleştirme ve antikolinerjik potansiyeller olarak asetilkolinesteraz ve karbonik anhidraz enzimleri üzerine inhibitör etkilerinin Kütle spektro analizi, NMR ve FT-IR teknikleri kullanılarak incelenmiş olduğu çalışmada Pirazol [3,4-d] piridazin bileşiklerinin karbonik anhidraz (hCA I ve II) izoenzimleri ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimleri üzerinde çok iyi inhibitör etki gösterdiği, Ki değeri hCA I için, 9.03 ± 3.81 – 55.42 ± 14.77 nM, hCA II: 18.04 ± 4.55 – 66.24 ± 19.21 nM ve AChE değeri 394.77 ± 68.13 – 952.93 ± 182.72 nM olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, hCA I, hCA II ve AChE enzimleri tüm

Pirazol [3,4-d] piridazin bileşikler tarafından H bağları, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle inhibe edildiği bildirilmiştir.

Turhan ve ark.(2020) 3,4- dihydro- 12- aryl- 1H- benzo[b]xanthene- 1,6,11- (2H,12H) trione bileşiklerinin aromatik aldehytler, 2-hidroksi-1,4-naftokinonun ve dimedonun alt birimlerinin yeşil ve yeniden kullanılabilir Bi (OTf) 3 varlığında tek kapta yoğunlaştırılmasıyla elde edilmiş kimyasal bileşiklerin karakterizasyonunun ve butirilkolinesteraz (BChE), asetilkolinesteraz (AChE) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzimleri üzerine inhibitör etkilerinin araştırılmış olduğu çalışmada; benzo[b]ksantin türevlerinin AChE, BChE, ve GST enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri milimolar düzeyde ölçülmüş, en iyi inhibitörlerin GST enzimi için 4a (31.18 ± 6.13 mM) bileşiği, AChE 4d (28.16 ± 3.46 mM) ve BChE için 4f (36.24 ± 3.19 mM) bulunmuştur. Sonuç olarak yeniden sentezlenmiş bu bileşiklerin çalışmada kullanılmış enzimler üzerinde iyi bir inhibitör etkileri olduğu ortaya konmuştur.

Akdeniz (2019), tarafından bakteriler, virüsler ve çeşitli haşerelerin insanlar, çevre ya da gıdalarına olan zararlı etkilerini yok etmek amacıyla kullanılan kimyasalların (Propoksür, oksamil, karbofuran, metomil, simazin ve karbaril) AChE ve BChE enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda enzimlerin aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren bu maddeler için IC50 değerleri 0,544 ile 11,270 μ M arasında olduğu tespit etmiştir.

Nunez ve ark.(2019) tarafından Potansiyel kolinesteraz inhibitörleri olarak tetrahidrokinolin-izoksazol / izoksazolin hibrit bileşiklerinin sentezi, enzim inhibisyon denemeleri ve moleküler modelleme denemeleri yapmış oldukları çalışmalarında 44 farklı Tetrahidrokinolin-İzoksazol/İzoksazolin Hibrit bileşikleri katyonik Povarov rekasyonu yöntemi ile 1,3-dipolar siklo (1,3-DC) N-alil / propargil THQ'lardan sentezlenmiş ve sentezlenen 44 farklı bileşik arasında acetylcholinesterase (AChE) ve butyrylcholinesterase (BChE) enzimleri üzerinde özellikle 5n hibrid bileşiğinin AChE (4.24 μ M) üzerinde önemli derecede inhibisyon etkisi gösterirken BChE üzerinde seçicilik indeksinin kabul edilebilir ölçüde olduğu (SI: 5.19), 6aa kompozisyonunun ise BChE (3.97 μ M) üzerinde önemli derecede inhibitör aktivitesi görüldüğü AChE enzimi için kabul edilebilir ölçüde (SI: 0.04) seleksiyon indeksine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Karmaz (2018), tarafından Imidan fosmet ve Vantex pestisitlerinin tespit edilmesinde AChE immobilize nanopartiküllerin kullanılabilirliğinin araştırılmış olduğu çalışmada (2AEPS-SalBr) ve (2AEPS- SalBr-Pd) kodlu nanopartiküller sentezlenmiştir. Tris(2-aminoetil) amin polimeri ile 5-brom-2-hidroksi benzaldehitin kondenzasyonu sonucunda (2AEPS-SalBr) kodlu nanopartikül, kalıp metodu kullanılarak da (2AEPS-SalBr-Pd) kodlu nanopartikül sentezlenmiştir. Sentezlenmiş nanopartiküllerin yapıları FT-IR, GPC, SEM/EDX ve element analiz yöntemleri ile belirlenmiştir. Km ve Vmax değerleri; (2AEPS-SalBr)-AChE için (pH:8, 50°C'de) 1,443 mM; 0,251 mM/dk, (2AEPS-SalBr-Pd)-AChE için (pH:8, 70°C'de) 0,680 mM; 0,157 mM/dak olarak bulunmuştur.

Yalçın (2018), in silico ortamda Discovery Studio Client 3.5 (DSC) paket programı kullanılarak Glikojen Sentaz Kinaz 3 β (GSK-3 β) ve Asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile farmakofor analiz çalışmaları ve HipHop, 3D QSAR Farmakofor olmak üzere iki farklı yöntem kullanmış oldukları çalışmalarında, her iki metodla elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak incelenmiştir. Seçilen tüm hipotezler ile ligand farmakofor çıkartma yöntemi kullanılarak test serisi ile uyumuna bakılmıştır. Aynı zamanda, GSK-3 β enzim inhibitörleri üzerinden 3D QSAR Farmakofor Geliştirme Yöntemi ile geliştirilmiş bulguların bir tanesi DSC içerisinde bulunan DrugLikeDiverse veritabanı ile taranmış ve ilaç benzeri moleküllerin uyumu kontrol edilmiştir. Tüm sonuçları göz önünde bulundurarak ENA99104 bileşiği çoklu hedefe yönelik yeni ilaç adayı molekül olarak seçilmiş. sonra ENA99104 bileşiği moleküler doking ve moleküler dinamik simülasyonuna bırakılmış, ENA99104'ün Asetilkolinesteraz ve GSK-3 β enzimleri üzerindeki inhibe edici özelliği sebebiyle Alzheimer Hastalığı için yeni bir bileşik olabileceği önerisinde bulunulmuştur.

Gutierrez et al. (2015), Asetilkolinesteraz inhibitörü olarak Povarov rekasiyonu kullanılarak Tetrahidrokinolin bileşiğinin sentez ve karakterizasyonunun yapılmış olduğu çalışmada alkenin aldehytler ve anilinlerin üçlü bileşenleri kullanılmıştır. Sonuç olarak en aktif bileşiklerin IC50 değeri 193 ug/mL'olarak belirlenmiş ve sentetik heterosiklik tetrahidrokinolinlerin antikolinesterazik etkilere sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.

Aynacı (2014), takrinin (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroakridin) farklı aldehitler ile (5-florsalisilaldehit, 5-bromsalisilaldehit ve 2-hidroksi-5-metilbenzalaldehit) meydana getirdiği yeni Schiff maddesinin türevlerini sentezlemiş oldukları çalışmalarında bu türevlerin ¹³C-NMR, ¹H-NMR, IR yöntemler kullanılarak karakterizasyonu yapılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. İnhibisyon çalışması sonrasında sentezlenen bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin %10-%90 arasında değişim gösterdiği bildirilmiştir. Yapılmış olan çalışmada yeni sentezlenen bileşiklerin AChE enzimini tersinir olarak inhibe ettiği, AH tedavisinde kullanılan takrin ile karşılaştırıldığında sentezlenen bileşiklerin AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Özcan (2014), Asetilkolinesteraz enzimi insan eritrositlerinden CNBr ile aktive edilen Sepharose 4B-L-Tirozin-Takrin afinite kromatografisi ile 658 kat, %23,5 verimle saflaştırılmış, enzim saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiş ve tek bant elde etmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda AChI ve DTNB substratları için KM ve Vmax değerleri sırasıyla 0,11 mM, 0,031 mM ve 0,082 EÜ/ml, 0,16 EÜ/ml olarak bulunmuştur. AChE enzim aktivitesi üzerine vankomisin HCl, amikasin sülfat, pantoprazol, sefuroksim, diltizem HCl, tenoksikam antibiyotikleri, essitalopram, mirtazapin, fluoksetin, trazodon HCl, sodyum valproat, risperidon antidepresanları, BHA ve BHT sentetik antioksidanları, 2,6-diizopropilfenol(propofol), 2,6-dimetilfenol, 2,6-ditertbutilfenol, lidokain, bupivakain anesteziikleri, etil alkol, aseton ve DMSO organik çözücüler gibi farklı maddeler ile inhibisyon etkileri incelenmiştir. In vitro inhibisyon etkisi gösteren maddeler essitalopram okzalot, mirtazapin, risperidon, fluoksetin, pantoprazol, 2,6-diizopropilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-ditertbutilfenol, lidokain, bupivakain, BHA, BHT, etanol, aseton, dimetilsülfoksit için IC₅₀ değerleri sırasıyla 1,06 mM, 0,019 mM, 0,428 mM, 1,62 mM, 1,97 mM, 5,94 µM, 6,96 µM, 36,3 µM, 260 µM, 5 µM, 32,85 µM, 36,3 µM, 2,24 M, 0,51 M, 0,51 M olarak bulunmuştur. Çalışmanın devamında aynı maddeler için sırasıyla ortalama Ki sabiti 1,30 mM, 0,012 mM, 0,23 mM, 1,48 mM, 1,26 mM, 3,93 µM, 2,06 µM, 18,9 µM, 14 µM, 13µ , 30,9 µM, 17,35 µM, 1,28 M, 0,19 M, 0,37 M olarak hesaplanmıştır.

Kıvanç (2010), tarafından insan plazma ve eritrosit asetilkolinesteraz enzimi üzerine bazı antibiyotik ve ağrı kesicilerin in vitro etkisi araştırılmıştır. Çalışmada

İveral, Voltaren, Clin, Genta, Ampisina, Cefamezin, Andolor ve Kanovet olmak üzere 8 farklı ilaçın insan eritrosit ve plazma asetilkolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine etkileri araştırılmış ve bu ilaçlardan İveral, Voltaren, Clin, Genta, Ampisinin insan plazma AChE inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu inhibitörlerin Lineweaver-Burk grafiklerinden Ki değerleri hesaplanmış ve Ki değerlerini sırayla $1,475 \cdot 10^{-8}$ M, $1,364 \cdot 10^{-8}$ M, $0,804 \cdot 10^{-5}$ M, $2,156 \cdot 10^{-8}$ M, $1,558 \cdot 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur. Aynı şekilde bu inhibitörlerin 3 farklı konsantrasyonuna karşı % aktivite grafikler çizerek IC50 değerleri hesaplanmış ve IC50 değerleri sırayla $1,89 \cdot 10^{-8}$ M, $1,78 \cdot 10^{-8}$ M, $0,5 \cdot 10^{-6}$ M, $3,6 \cdot 10^{-8}$ M, $1,4 \cdot 10^{-6}$ M şeklinde hesaplanmıştır. İnsan plazma AChE enzimi aktive eden grubun; Cefamezin, Kanovit ve Andolor olduğu insan eritrosit AChE inhibe eden grubun ise; İveral, Voltaren, Clin, Genta ve Kanovit ilaçları olduğu bildirilmiştir. Bu inhibitörlere ait Lineweaver-Burk grafiklerinden Ki değerleri hesaplanmış ve Ki değerleri; $1,613 \cdot 10^{-8}$ M, $0,99 \cdot 10^{-8}$ M, $3,74 \cdot 10^{-8}$ M, $1,16 \cdot 10^{-8}$ M, $0,87 \cdot 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur. Bu inhibitörlerin 3 farklı konsantrasyonuna karşı % aktivite grafiklerinden IC50 değerleri hesaplanmış ve IC50 değerleri; $1,78 \cdot 10^{-8}$ M, $1,39 \cdot 10^{-8}$ M, $3,31 \cdot 10^{-8}$ M, $8,50 \cdot 10^{-9}$ M ve $1,65 \cdot 10^{-8}$ M olarak elde edilmiştir.

3 MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Moleküllerin sentezlenmesi ve enzim inhibisyon çalışmaları için gereken tüm sarf malzemeler Sigma Aldrich Company'den temin edildi.

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Çalışma boyunca laboratuvarında kullanılan kimyasallar; 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoik asit (DTNB), astilkolin iyodat (AChI), trihidroksimetilaminometan (Thris), hidroklorik asit (HCl), Takrin, sodyum fosfat, EDTA, sodyum sitrat

3.1.2. Kullanılan enzim

Asetilkolinesteraz enzimi (AChE)

3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar

Spektrofotometre:

Cary 60 UV- Vis

pH metre:

Mettler Toledo

Karıştırıcı (Vortex):	Wizelmix vm-10
Hassas terazi:	Radwag
Kronometre:	Hanhard, Electronische Digital-Stoppuhr
Otomatik pipetler:	Eppendorf
Saf su cihazı:	RiOs™ 8
Saf su tankı:	Millipore
Buzdolapları:	Arçelik
Manyetik karıştırıcı:	Wise Stir-MSH-20A

3.1.4. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. 1M Tris-HCl 5mM EDTA pH=8 (enzimin aktivite tayini için kullanıldı): 30,27 g Tris tartıldı, 5 mM'lık 0,370 g EDTA 200 ml destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak 1N HCl ile pH=8'e olana kadar HCl ve daha sonra toplam hacim destile suyla 250ml'ye tamamlandı
2. 10mM'lık 0.290g 50 ml asetiltiyokolin iyodat (enzimin aktivite tayini için kullanıldı): 0,145gram asetil tiyokolin iyodat alınarak destile su ile 50 ml tamamlandı.
3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)) Çözeltisi: 0.2 g DTNB ve 1 g sodyum sitrat alındı önce bir miktar asetonda çözüldü sonra destile su ile 100 mL tamamlandı. DTNB (enzimin aktivite tayini için kullanıldı).

3.1.5. İnhibitör Çözeltilerin hazırlanması

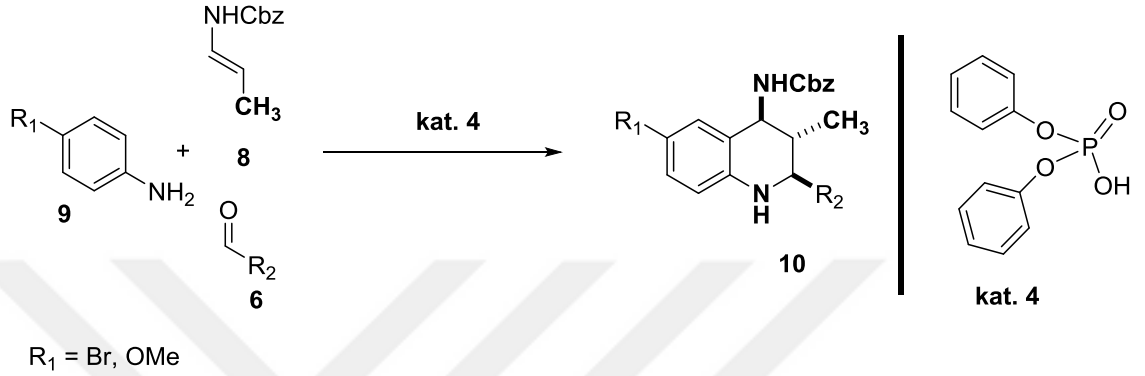
Çalışmada kullanılan inhibitörlerin tamamı (mk-3, mk-4, mk-5, mk-6, mk-42, mk-43-2, mk-44-2, mk-45-2) için 1mg tartıldı ve 1ml etanolde çözülerek stok çözeltiler hazırlandı. Daha sonra her bir inhibitör için 100µl alınarak distile su ile 1000µl'ye tamamlandı.

3.2. Metot

3.2.1. Organik Moleküllerin Sentezi

3.2.1.1. 4-Aminotetrahidrokinolin Türevlerinin Sentezi

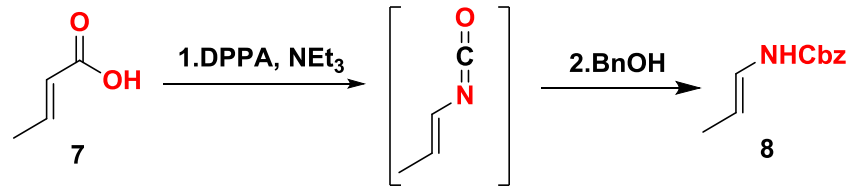
Bu çalışma kapsamında N-vinilkarbamat **8**, aldehit **6**, anilin **9** ve organo-katalizör **4** varlığında çeşitli diastroselektif 4-aminotetrahidrokinolin türevlerinin sentezi Povarov reaksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. (Şekil.3.1)



Şekil 3. 1. Povarov reaksiyonu

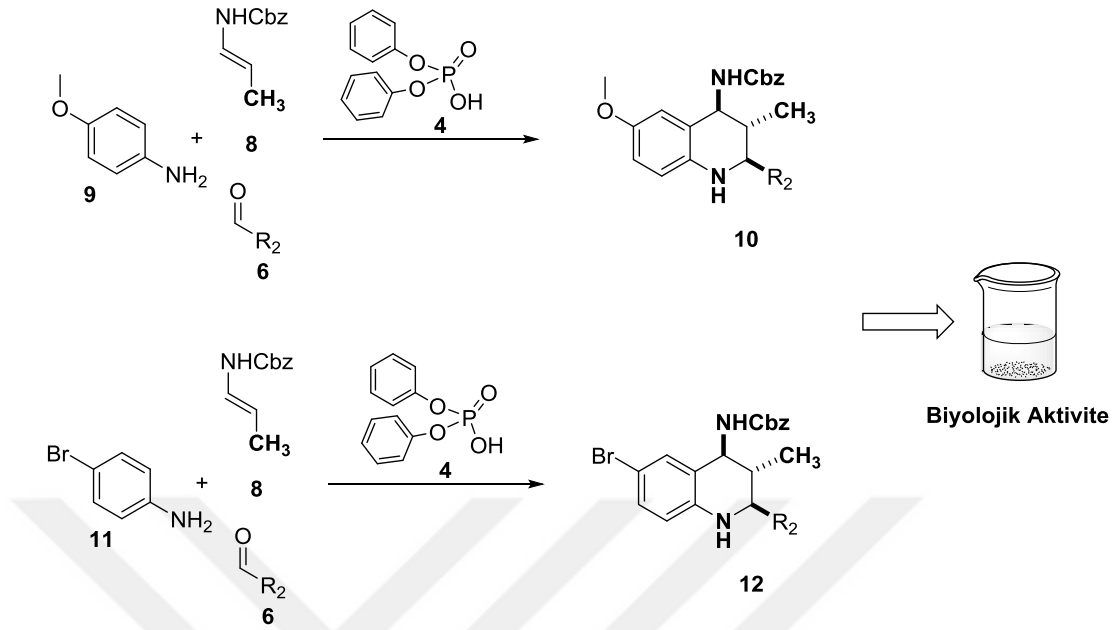
Çalışmada öncelikli olarak çıkış bileşiği N-vinilkarbamat **8**'in sentezi gerçekleştirildi, aldehit **6** ve organo-katalizör **4** bileşikleri ticari olarak elde edildikten sonra Povarov reaksiyonu kullanılarak ilgili 4-aminotetrahidrokinolin türevleri elde edildi (Dagousset *et al.* 2011; Liu *et al.*, 2009).

N-vinilkarbamat **8**'in sentezi için (E)-bütanoik asit **7**'in DPPA (difenilfosforilazit) ile muamelesi sonucu izosiyanat türevi oluşturuldu ve benzil alkol ilavesiyle de N-vinilkarbamat **8** elde edildi (Şekil3.2). (Kazancıoğlu *et al.*, 2019)



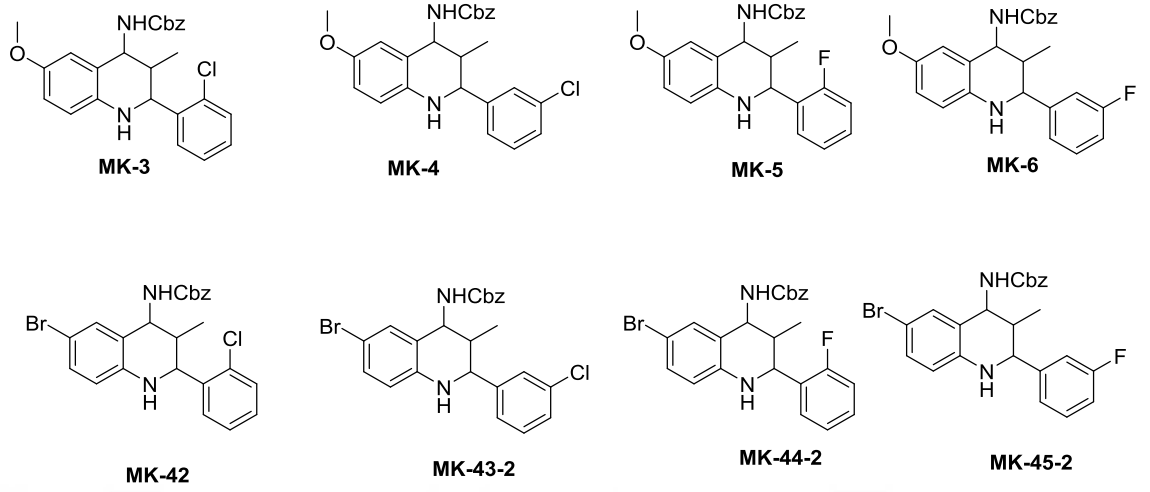
Şekil 3. 2. N-vinilkarbamat **8** bileşiğinin sentezi

4-aminotetrahidrokinolin türevi **10**; anilin **9**, N-vinilkarbamat **8** ve aldehit **6**'ın Brønsted asit **4** katalize Povarov reaksiyonu ile sentezlendi. Burada Farklı aldehit ve anilin türevleri kullanılarak 8 farklı 4-aminotetrahidrokinolin türevi sentezi gerçekleştirildi.



Şekil 3. 3. Farklı fonksiyonel grubu taşıyan 4-aminotetrahidrokinolin **10** ve **12** iskelet yapılarını sentez yolu.

İki farklı anilin türevinden çıkılarak 8 farklı 4-aminotetrahidrokinolin türevleri sentezlendi. Bu 4-aminotetrahidrokinolin türevlerinden literatürde bilinen **mk-3**, **mk-4**, **mk-5** ve **mk-6** bileşikleri 4-metoksianilinden çıkılarak %90'a yakın verimlerle sentezlendi (Kazancıoğlu, 2020). Yeni türevlerimiz olan **mk-42**, **mk-43-2**, **mk-44-2** ve **mk-45-2** bileşikleride 4-bromoanilin den çıkılarak %80'e yakın verimlerle elde edildi. Her iki anilin türevlerinde de aynı aldehit türleri kullanıldı. (Şekil 3.3)

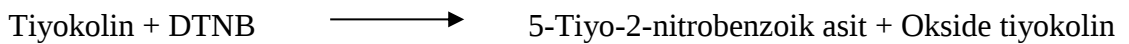
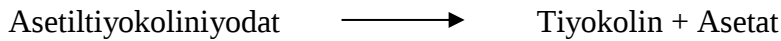


Şekil 3. 4. Farklı fonksiyonel grubu taşıyan 4-aminotetrahidrokinolin **mk-3**, **mk-4**, **mk-5**, **mk-6**, **mk-42**, **mk-43-2**, **mk-44-2** ve **mk-45-2** türevlerinin sentezi

3.2.2. AChE Enziminin Aktivite Ölçümü

AChE enziminin aktivite tayini, etkili antikolinesteraz aktivitesi olan böcek öldürücülerin neden olduğu akut ve kronik zehirlenme olaylarında tedaviye yanıt için klinik olarak önemlidir. Eritrosit ve serum kolinesteraz aktivite değerleri çeşitli patolojik durumlarda anlamlı klinik veriler olarak kabul edilir.

Asetilkolinesteraz enzimi asetilkolinin (ACh) tiyokoline hidrolizini katalizlemektedir. Tiyokolinin oluşum oranı, 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin oluşumundan kaynaklanan bir sarı rengi üreten 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile tiyokolinin reaksiyonunun takibi ile Sarı renkli anyonun oluşum oranı 412 nm'de ölçümler yapıldı (Ellman et al. 1961).



Aktivite ölçümleri genel olarak aşağıdaki formül kullanılarak enzim ünitesi hesaplanmaktadır (Asetiltiyokoliniyodat için molar Absorbtivite kat sayısı 13,6).

$$E\ddot{U}/mL = \Delta OD / 13,6 \times VC / VE \times SF$$

$$E\ddot{U} = mL \text{ başına enzim ünitesi}$$

$\Delta OD = 412 \text{ nm}$ 'de optik dansitenin dk. başına değışimi

VC = Küvet hacmi

VE = Küvetteki saf enzim çözeltisi hacmi

f = Seyreltme faktörü

13.6 = 412 nm'de ve 37°C de 3m Masetiltiyokoliniyodür'ün indirgenmesi sonucu okunan OD, sabit değeridir (Porcelli *et al.*,1999)

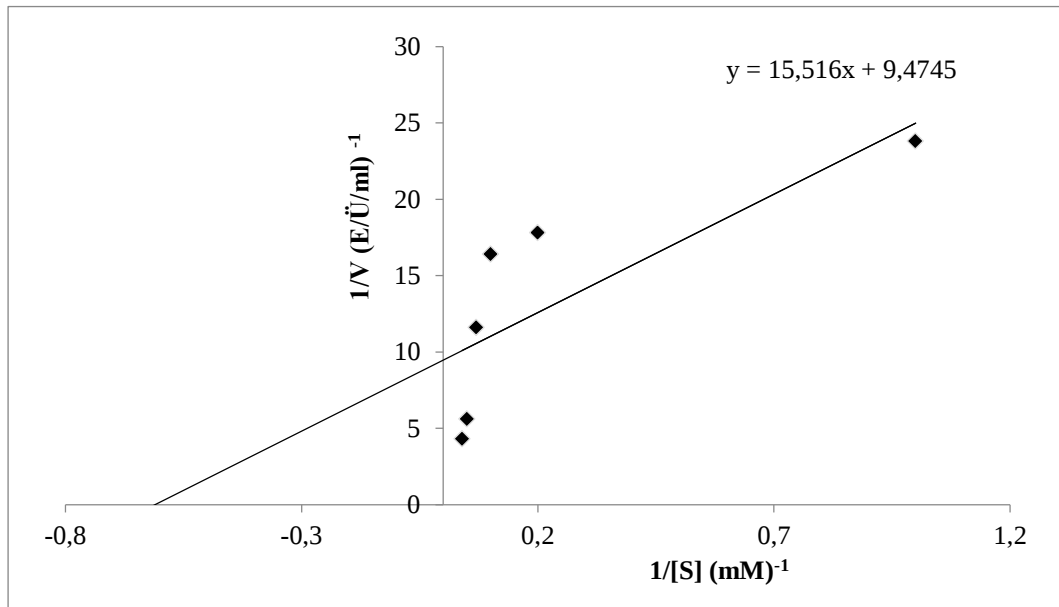
Çizelge 3. 1. AChE enziminin aktivite ölçümü için gereken kimyasal ve miktarları

Kullanılan Çözeltiler	Kontrol Tüpü (µl)	Numune Tüpü (µl)
Tris-HCl	100	100
DTNB	50	50
AChI (Asetilkolintiyoiyodür)	50	50
Saf su	770	760
Örnek	-	10(değişken)
Enzim çözeltisi	30	30

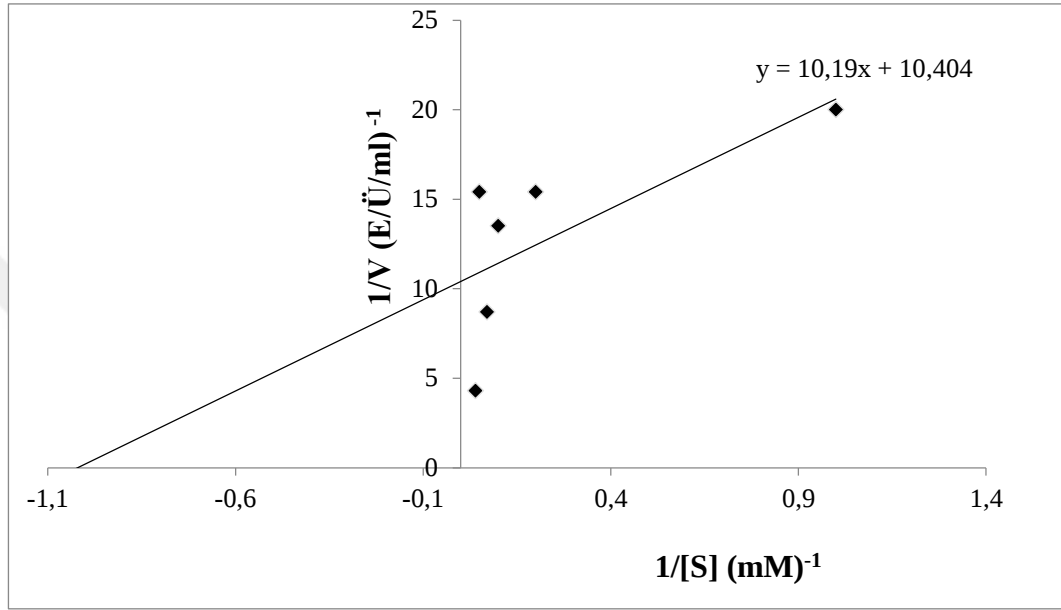
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Asetilkolinesteraz Enziminin AChI ve DTNB Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Tayin Etmesine Ait Çalışmasının Sonuçları

Asetilkolinesteraz enziminin substratı olan DTNB için K_M ve V_{max} değerlerini tayin etmek için AChI konsantrasyonu sabit tutularak 5 farklı konsantrasyonlarda DTNB substratı ile AChE'nın aktivite ölçümleri gerçekleştirilerek elde edilen değerler ile $1/[DTNB]-1/V$ grafiği çizildi. Çizilen grafiğin denklemiyle K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.1-4.2 ve Çizelge 4.1). Asetilkolinesteraz enzimin diğer bir substratı olan AChI için K_M ve V_{max} değerlerin belirlenmesinde DTNB konsantrasyonu sabit tutularak AChI'nın 5 farklı konsantrasyonlarda aktivite ölçümü yapılarak $1/[AChI]-1/V$ grafiği oluşturuldu ve grafik denklemi kullanılarak K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.1- 4.2 ve Çizelge 4.1, Lineweaver and Burk, 1934).



Şekil 4. 1. Asetilkolinesteraz enzimi ile sabit AChI konsantrasyonunda DTNB için K_M ve V_{max} değerlerinin tayını grafiği



Şekil 4. 2. Asetilkolinesteraz enzimi ile sabit DTNB konsantrasyonunda AChI için K_M ve V_{max} değerlerinin tayını grafiği

Çizelge 4. 1. Asetilkolinesteraz enzimi için DTNB ve AChI substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin tayınına ait çalışmanın sonuçları

Enzim	Substrat	K_M	V_{max}
AChE	DTNB	1,637	0,106
	AChI	1,021	0,096

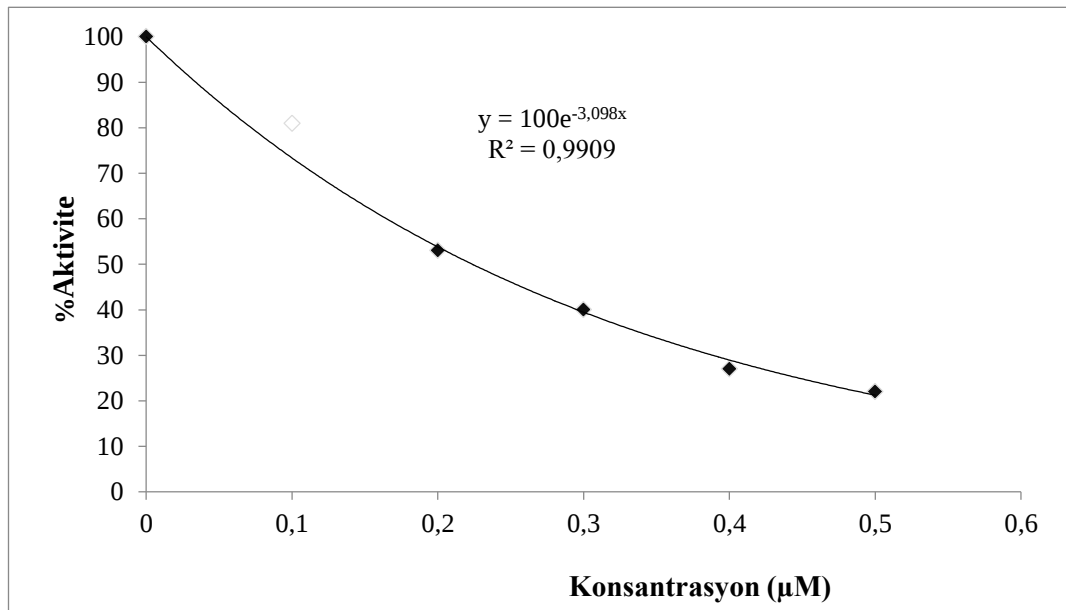
4.2. 4-Aminotetrahidrokinolin Türevlerinin Asetilkolinesteraz Enzimin Üzerindeki İnhibitör Etkisini Gösteren IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi ve Çalışmanın Sonuçları

Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) aktivitesi üzerine 8 farklı molekül ile standart inhibitör olan Takrin bileşiğinin inhibisyon etkisi incelendi. AChE'nin aktivitesini inhibe eden mk-3, mk-4, mk-5, mk-6, mk-42, mk-43-2, mk-44-2, mk-45-2 molekülleri ile sabit substrat konsantrasyonlarda ve her molekül için 5 farklı konsantrasyonu

kullanarak IC₅₀ (enzim aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu) değeri ile % aktivite grafikleri çizerek (Şekil 4.3-4.11 ve Çizelgeler 4.2-4.10) oluşturarak verildi.

Çizelge 4. 2. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-3 molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

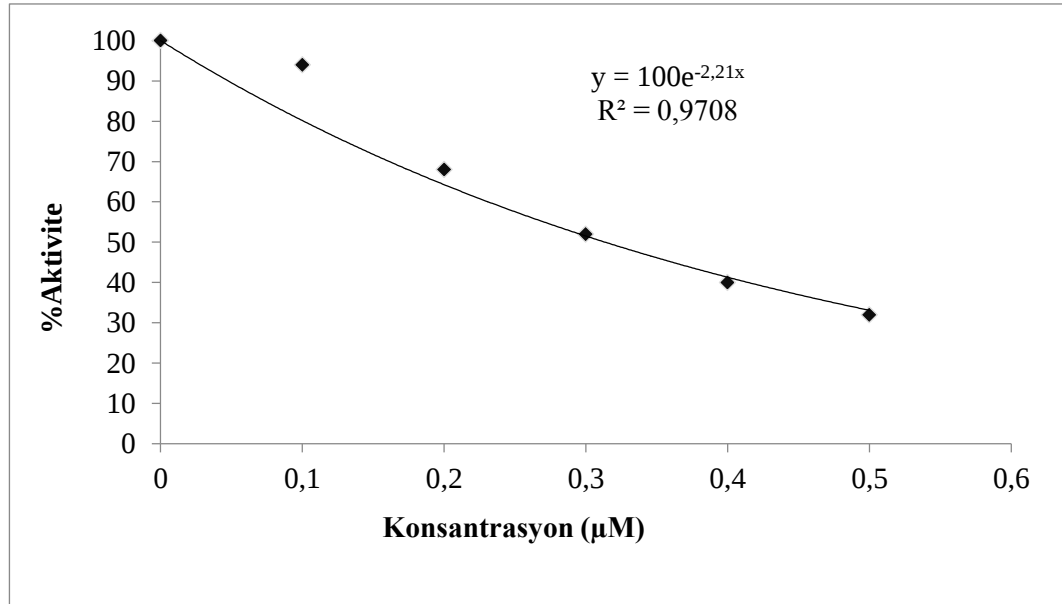
Tris-HCl (µl)	100	100	100	100	100	100
AChI (µl)	50	50	50	50	50	50
DTNB (µl)	50	50	50	50	50	50
Enzim (AChE) (µl)	30	30	30	30	30	30
Saf su (µl)	770	765	760	755	750	745
İnhibitör (µl)	–	5	10	15	20	25
Toplam hacim (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki substrat kons. (µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Küvetteki inhibitör kons. (µM)	–	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
%Aktivite	100	81	53	40	27	22



Şekil 4. 3. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-3 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-3] grafiği

Çizelge 4. 3. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-4 molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

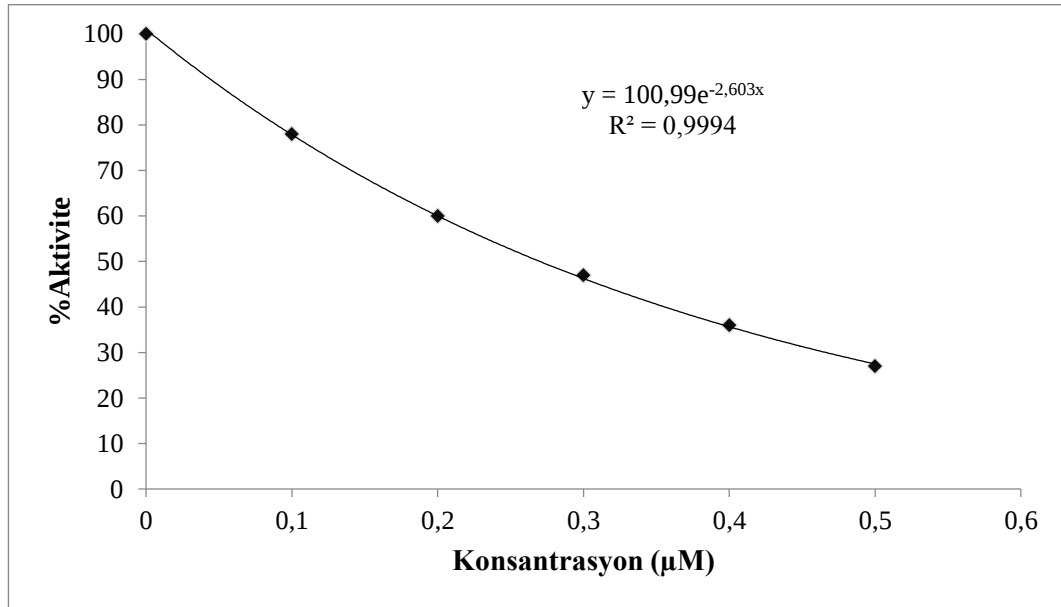
Tris-HCl (µl)	100	100	100	100	100	100
AChI (µl)	50	50	50	50	50	50
DTNB (µl)	50	50	50	50	50	50
Enzim (AChE) (µl)	30	30	30	30	30	30
Saf su (µl)	770	765	760	755	750	745
İnhibitör (µl)	–	5	10	15	20	25
Toplam hacim (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki substrat kons. (µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Küvetteki inhibitör kons. (µM)	–	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
%Aktivite	100	94	68	52	40	32



Şekil 4. 4. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-4 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-4] grafiği

Çizelge 4. 4. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-5 molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

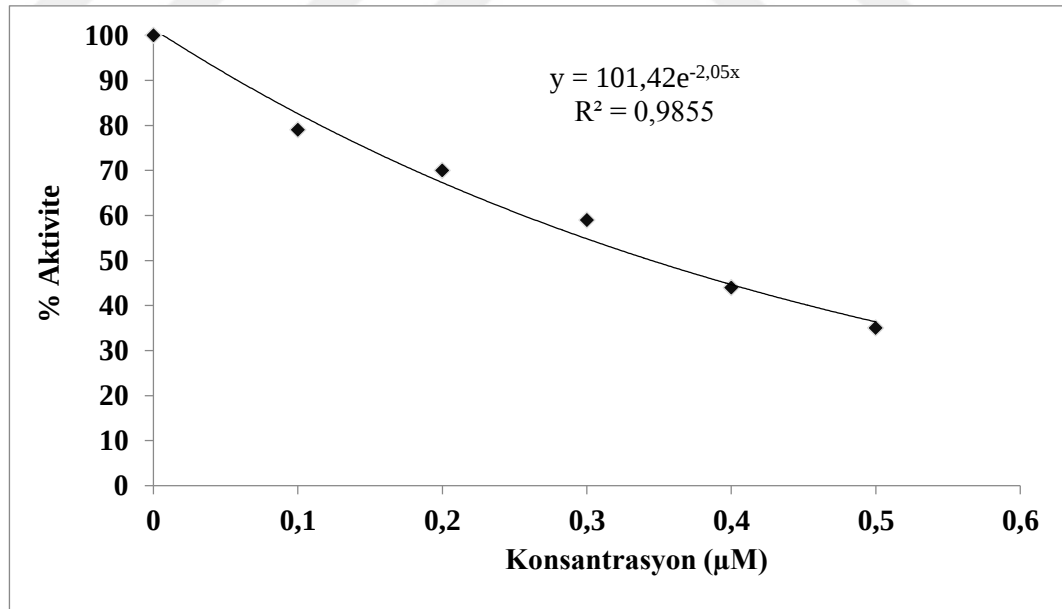
Tris-HCl (µl)	100	100	100	100	100	100
AChI (µl)	50	50	50	50	50	50
DTNB (µl)	50	50	50	50	50	50
Enzim (AChE) (µl)	30	30	30	30	30	30
Saf su (µl)	770	765	760	755	750	745
İnhibitör (µl)	–	5	10	15	20	25
Toplam hacim (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki substrat kons. (µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Küvetteki inhibitör kons. (µM)	–	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
%Aktivite	100	78	60	47	36	27



Şekil 4. 5. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-5 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-5] grafiği

Çizelge 4. 5. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-6 molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

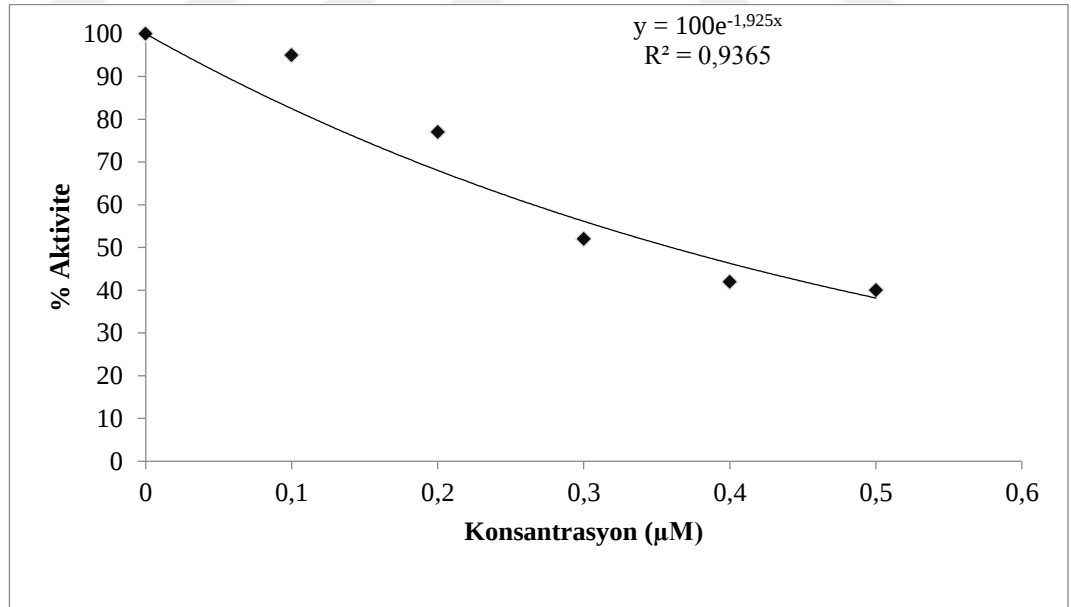
Tris-HCl (µl)	100	100	100	100	100	100
AChI (µl)	50	50	50	50	50	50
DTNB (µl)	50	50	50	50	50	50
Enzim (AChE) (µl)	30	30	30	30	30	30
Saf su (µl)	770	765	760	755	750	745
İnhibitör (µl)	–	5	10	15	20	25
Toplam hacim (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki substrat kons. (µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Küvetteki inhibitör kons. (µM)	–	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
%Aktivite	100	79	70	59	44	35



Şekil 4. 6. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-6 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-6] grafiği

Çizelge 4. 6. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-42 molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

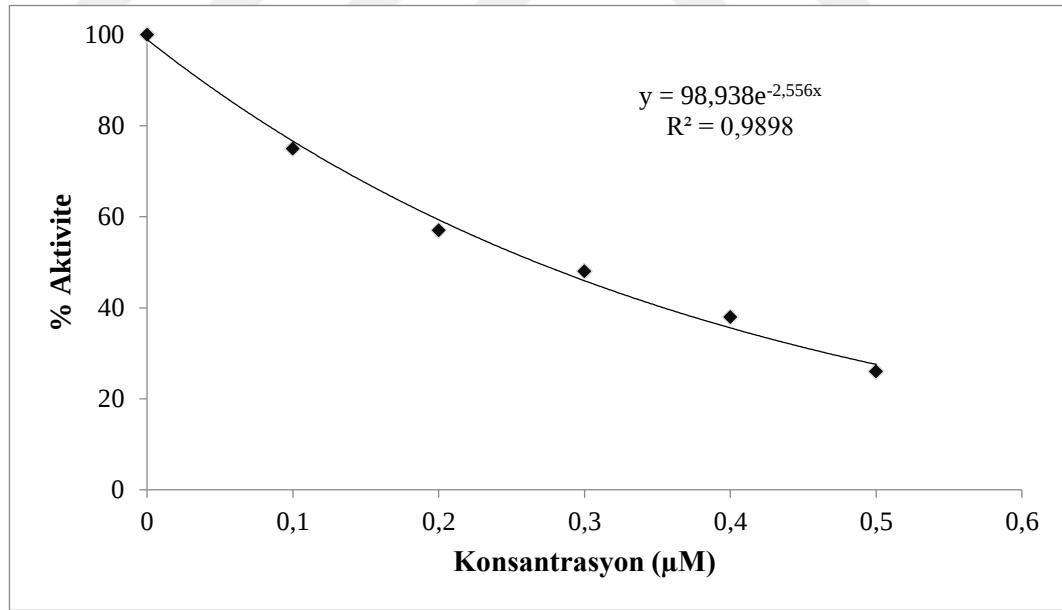
Tris-HCl (µl)	100	100	100	100	100	100
AChI (µl)	50	50	50	50	50	50
DTNB (µl)	50	50	50	50	50	50
Enzim (AChE) (µl)	30	30	30	30	30	30
Saf su (µl)	770	765	760	755	750	745
İnhibitör (µl)	–	5	10	15	20	25
Toplam hacim (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki substrat kons. (µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Küvetteki inhibitör kons. (µM)	–	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
%Aktivite	100	95	77	52	42	40



Şekil 4. 7. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-42 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-42] grafiği

Çizelge 4. 7. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-43-2 molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

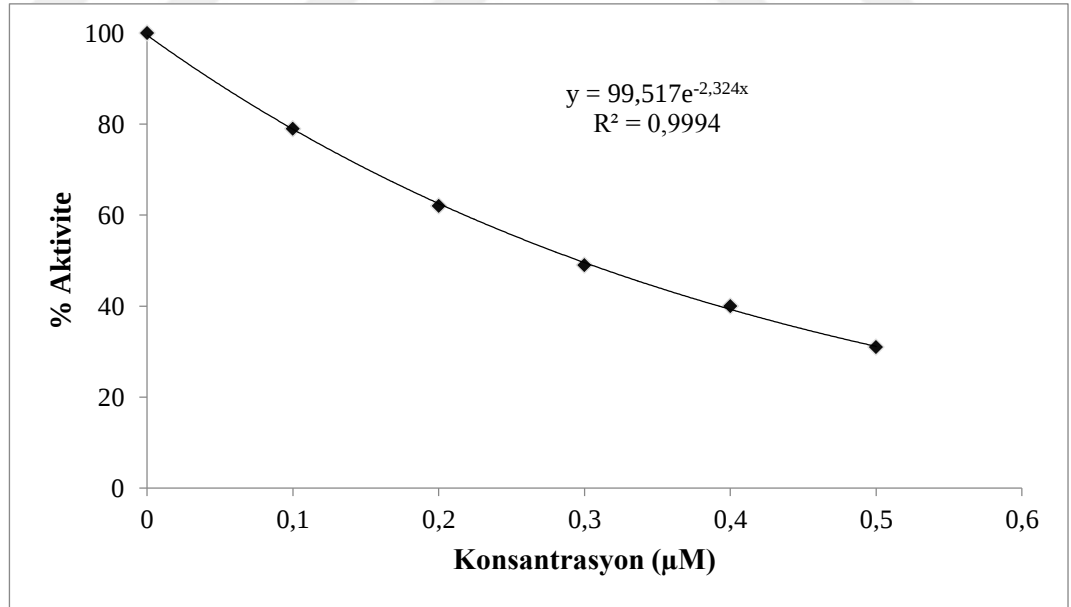
Tris-HCl (µl)	100	100	100	100	100	100
AChI (µl)	50	50	50	50	50	50
DTNB (µl)	50	50	50	50	50	50
Enzim (AChE) (µl)	30	30	30	30	30	30
Saf su (µl)	770	765	760	755	750	745
İnhibitör (µl)	–	5	10	15	20	25
Toplam hacim (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki substrat kons. (µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Küvetteki inhibitör kons. (µM)	–	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
%Aktivite	100	75	57	48	38	21



Şekil. 4. 8. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-43-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[MK-43-2] grafiği

Çizelge 4. 8. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-44-2 molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

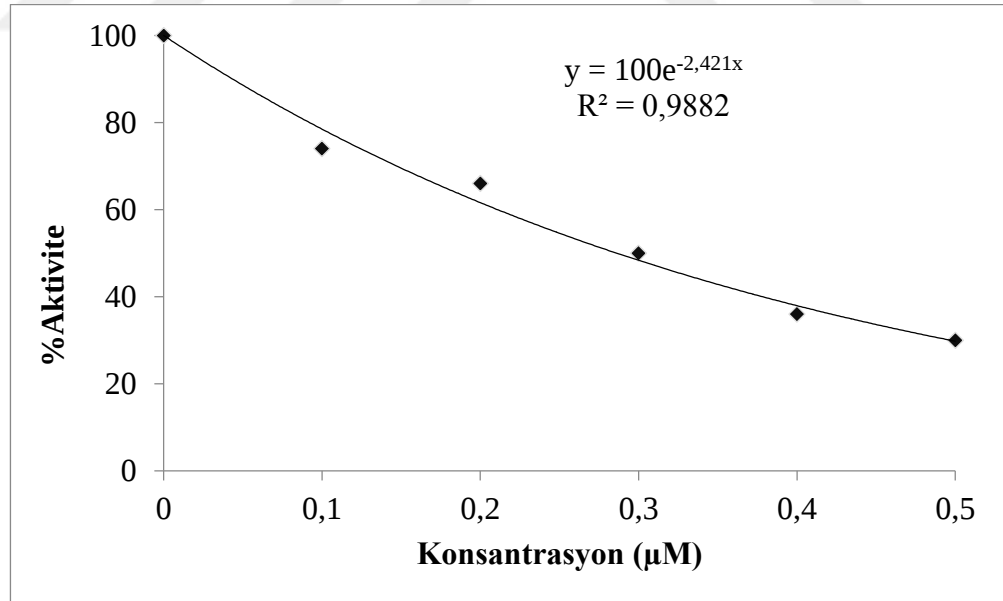
Tris-HCl (µl)	100	100	100	100	100	100
AChI (µl)	50	50	50	50	50	50
DTNB (µl)	50	50	50	50	50	50
Enzim (AChE) (µl)	30	30	30	30	30	30
Saf su (µl)	770	765	760	755	750	745
İnhibitör (µl)	–	5	10	15	20	25
Toplam hacim (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki substrat kons. (µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Küvetteki inhibitör kons. (µM)	–	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
%Aktivite	100	79	62	49	40	31



Şekil.4.9. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-44-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-44-2] grafiği

Çizelge 4. 9. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-45-2 molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

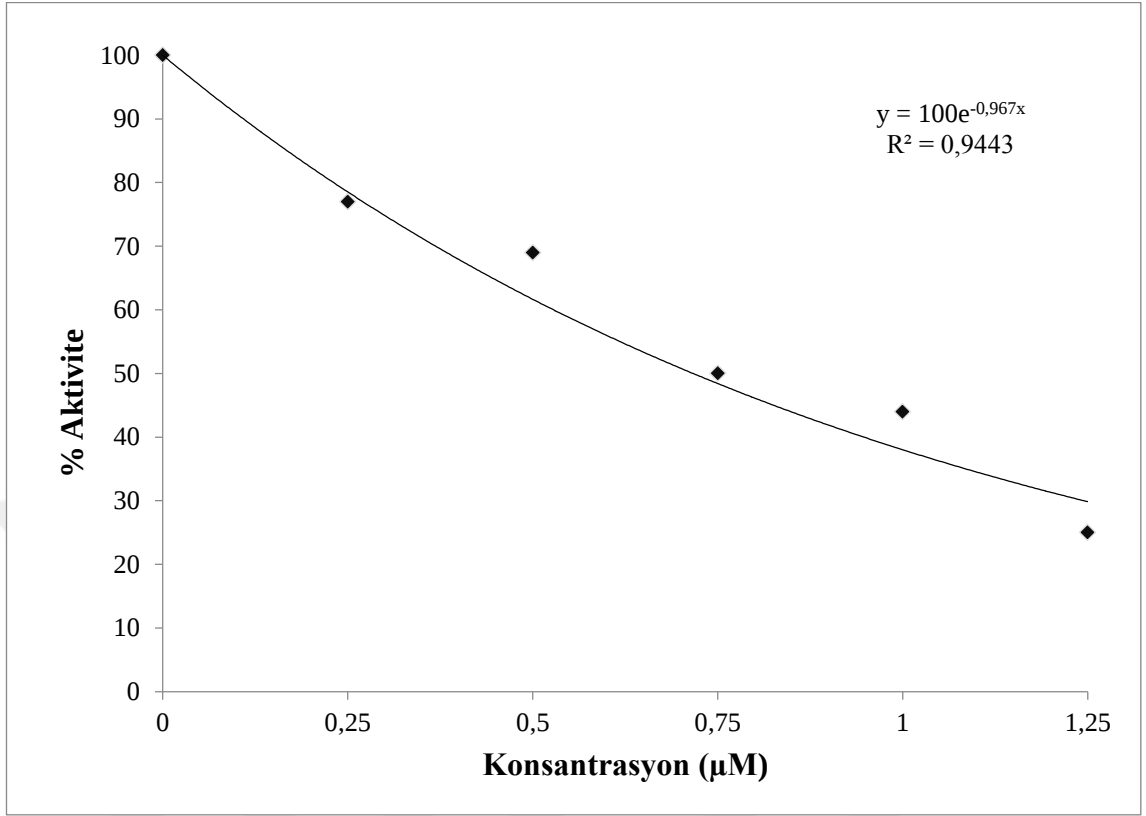
Tris-HCl (µl)	100	100	100	100	100	100
AChI (µl)	50	50	50	50	50	50
DTNB (µl)	50	50	50	50	50	50
Enzim (AChE) (µl)	30	30	30	30	30	30
Saf su (µl)	770	765	760	755	750	745
İnhibitör (µl)	–	5	10	15	20	25
Toplam hacim (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki substrat kons. (µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Küvetteki inhibitör kons. (µM)	–	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
%Aktivite	100	74	66	50	36	30



Şekil.4. 10. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-45-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[mk-45-2] grafiği

Çizelge 4. 10. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine Takrin molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Tris-HCl (µl)	100	100	100	100	100	100
AChI (µl)	50	50	50	50	50	50
DTNB (µl)	50	50	50	50	50	50
Enzim (AChE) (µl)	30	30	30	30	30	30
Saf su (µl)	770	765	760	755	750	745
İnhibitör (µl)	–	5	10	15	20	25
Toplam hacim (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki substrat kons. (µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Küvetteki inhibitör kons. (µM)	–	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
%Aktivite	100	77	69	50	44	25



Şekil.4.11. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine Takrin molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite-[Takrin] grafiği

4.3. 4-Aminotetrahidrokinolin Türevlerinin Asetilkolinesteraz Enzimin Üzerindeki İnhibitör Etkisini Gösteren Ki Değerlerinin Belirlenmesi ve Çalışmanın Sonuçları

İnhibisyon çalışmasında Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) aktivitesi üzerinde mk-3, mk-4, mk-5, mk-6, mk-42, mk-43-2, mk-44-2, mk-45-2 molekülleri ile standart inhibitör olan Takrin bileşiği kullanıldı. Bu çalışmada stok substrat çözeltisi hazırlandı ve stok çözeltileri uygun seyreltme işlemi uygulayarak beş farklı konsantrasyonlarda substrat elde edildi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için IC50 çalışmasında elde edilen en uygun üç farklı konsantrasyonda inhibitör kullanarak bir ön çalışma basamağı elde edildi. Asetilkolinesteraz enzimi için Kİ belirlemede kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör moleküllerin konsantrasyonları ile çizelgeler oluşturularak Çizelge 4.11-4.19' de verildi. Daha sonra Asetilkolinesteraz enzimi için üç farklı konsantrasyonlarda 8 farklı inhibitör molekülleri kullanarak 1/V ve 1/[S] değerleri belirlendi ve bu değerlerle Lineweaver-Burk grafiği

izilerek Şekil 4.12-4.20 Grafikleri elde edildi. Elde edilen grafiklerin denklemleri kullanarak K_I değerleri ve inhibisyon tipi belirlendi.

Asetilkolinesteraz enzimi için kullanılan bütün inhibitör molekülleri için inhibisyon tipleri (yarışmalı inhibitör, yarı yarışmalı inhibitör, yarışmasız inhibitör) elde edilen Lineweaver-Burk grafiklerine göre belirlenerek K_I değerleri aşağıdaki formüllerle hesaplandı.

Yarışmasız ve yarı yarışmalı için:

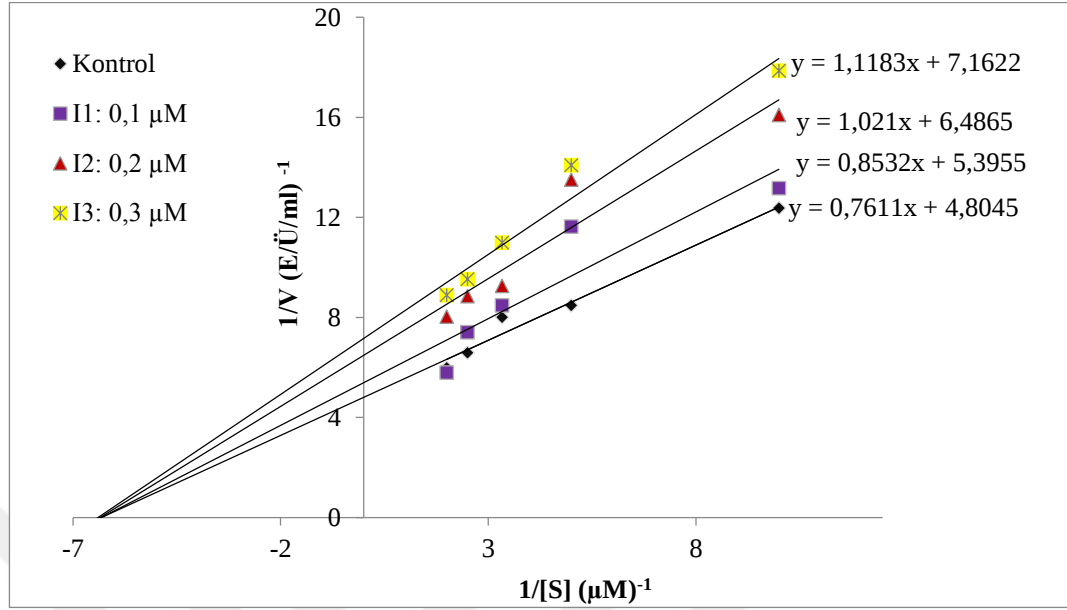
$$V_{maxI} = V_{max} \div (1 + [I] \div K_I)$$

Yarışmalı için:

$$K_{mI} = K_m \div (1 + [I] \div K_I)$$

Çizelge 4. 11. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-3 molekülünün Ki değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Tris-HCl (µl)	AChI (µl)	DTNB (µl)	Enzim (AChE) (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Küvetteki subs. kons. (µM)	Küvetteki inhibitör kons. (µM)	Toplam Hacim (µl)
100	50	10	30	810	—	0,1	—	1000
100	50	20	30	800	—	0,2	—	1000
100	50	30	30	790	—	0,3	—	1000
100	50	40	30	780	—	0,4	—	1000
100	50	50	30	770	—	0,5	—	1000
100	50	10	30	800	10	0,1	0,1	1000
100	50	20	30	800	10	0,2	0,1	1000
100	50	30	30	790	10	0,3	0,1	1000
100	50	40	30	780	10	0,4	0,1	1000
100	50	50	30	770	10	0,5	0,1	1000
100	50	10	30	810	15	0,1	0,2	1000
100	50	20	30	800	15	0,2	0,2	1000
100	50	30	30	790	15	0,3	0,2	1000
100	50	40	30	780	15	0,4	0,2	1000
100	50	50	30	770	15	0,5	0,2	1000
100	50	10	30	810	20	0,1	0,3	1000
100	50	20	30	800	20	0,2	0,3	1000
100	50	30	30	790	20	0,3	0,3	1000
100	50	40	30	780	20	0,4	0,3	1000
100	50	50	30	770	20	0,5	0,3	1000

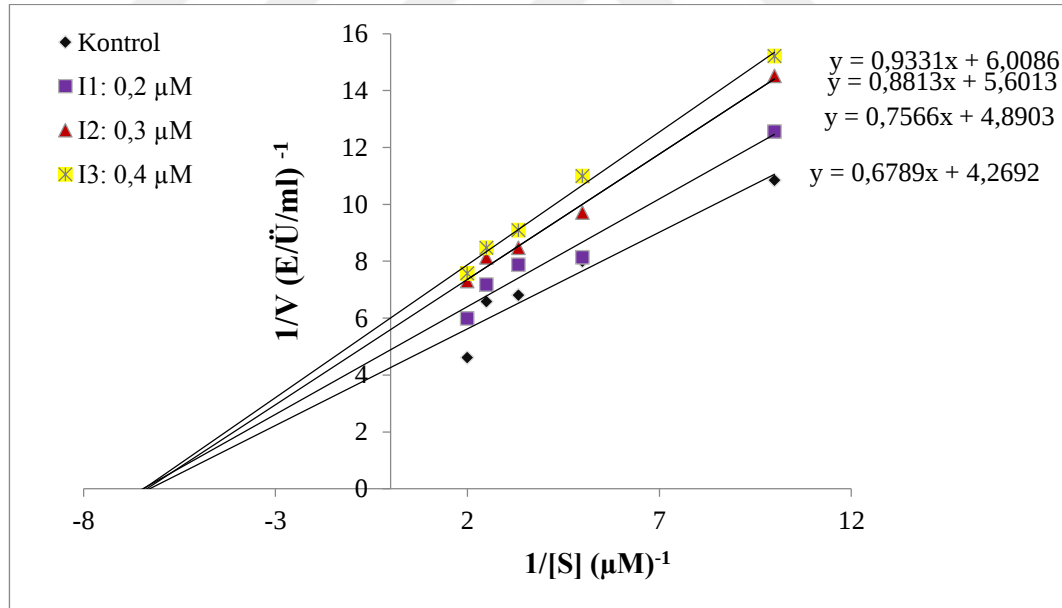


Şekil.4.12. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-3 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 12. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-4 molekülünün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Tris-HCl (µl)	AChI (µl)	DTNB (µl)	Enzim (AChE) (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Küvetteki substrat kons. (µM)	Küvetteki inhibitör kons. (µM)	Toplam hacim (µl)
100	50	10	30	810	—	0,1	—	1000
100	50	20	30	800	—	0,2	—	1000
100	50	30	30	790	—	0,3	—	1000
100	50	40	30	780	—	0,4	—	1000
100	50	50	30	770	—	0,5	—	1000
100	50	10	30	800	10	0,1	0,1	1000
100	50	20	30	800	10	0,2	0,1	1000
100	50	30	30	790	10	0,3	0,1	1000
100	50	40	30	780	10	0,4	0,1	1000
100	50	50	30	770	10	0,5	0,1	1000

100	50	10	30	810	15	0,1	0,2	1000
100	50	20	30	800	15	0,2	0,2	1000
100	50	30	30	790	15	0,3	0,2	1000
100	50	40	30	780	15	0,4	0,2	1000
100	50	50	30	770	15	0,5	0,2	1000
100	50	10	30	810	20	0,1	0,3	1000
100	50	20	30	800	20	0,2	0,3	1000
100	50	30	30	790	20	0,3	0,3	1000
100	50	40	30	780	20	0,4	0,3	1000
100	50	50	30	770	20	0,5	0,3	1000

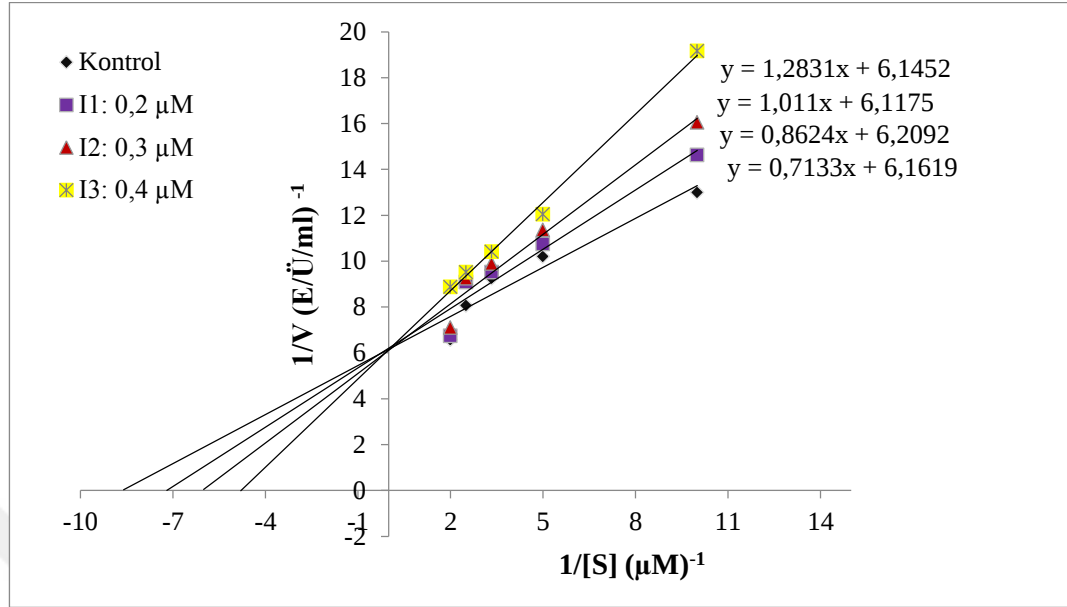


Şekil.4.13. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-4 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 13. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-5 molekülünün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Tris-HCl (µl)	AChI (µl)	DTNB (µl)	Enzim (AChE)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Küvetteki substrat	Küvetteki inhibitör	Toplam hacim (µl)
------------------	--------------	--------------	-----------------	----------------	-------------------	-----------------------	------------------------	----------------------

					kons. (μM)		kons. (μM)	
(μl)								
100	50	10	30	810	–	0,1	–	1000
100	50	20	30	800	–	0,2	–	1000
100	50	30	30	790	–	0,3	–	1000
100	50	40	30	780	–	0,4	–	1000
100	50	50	30	770	–	0,5	–	1000
100	50	10	30	800	10	0,1	0,1	1000
100	50	20	30	800	10	0,2	0,1	1000
100	50	30	30	790	10	0,3	0,1	1000
100	50	40	30	780	10	0,4	0,1	1000
100	50	50	30	770	10	0,5	0,1	1000
100	50	10	30	810	15	0,1	0,2	1000
100	50	20	30	800	15	0,2	0,2	1000
100	50	30	30	790	15	0,3	0,2	1000
100	50	40	30	780	15	0,4	0,2	1000
100	50	50	30	770	15	0,5	0,2	1000
100	50	10	30	810	20	0,1	0,3	1000
100	50	20	30	800	20	0,2	0,3	1000
100	50	30	30	790	20	0,3	0,3	1000
100	50	40	30	780	20	0,4	0,3	1000
100	50	50	30	770	20	0,5	0,3	1000

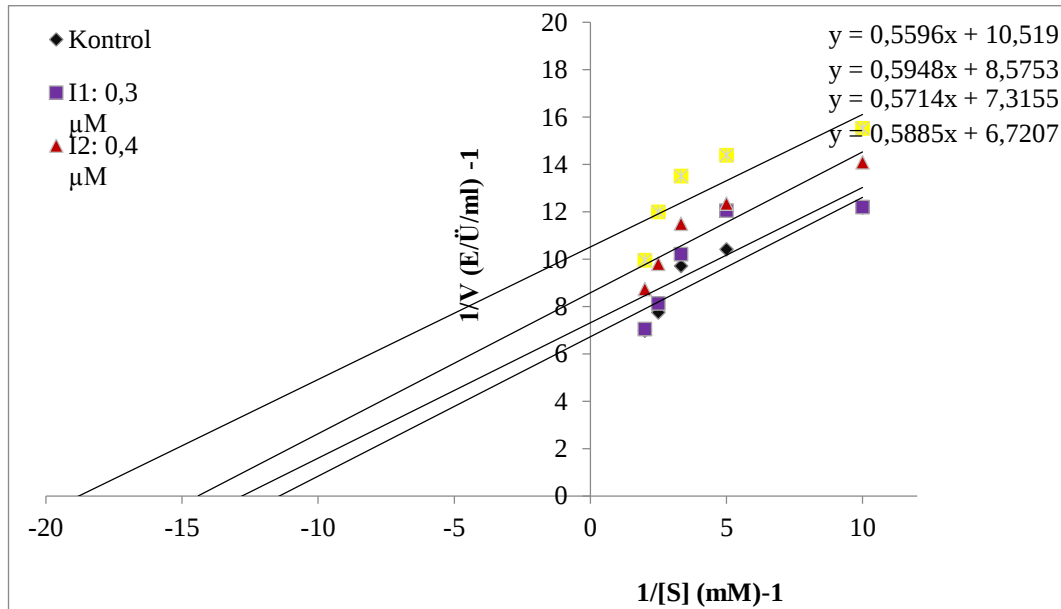


Şekil 4. 14. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-5 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 14. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-6 molekülünün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Tris-HCl (µl)	AChI (µl)	DTNB (µl)	Enzim (AChE) (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Küvetteki substrat kons. (µM)	Küvetteki inhibitör kons. (µM)	Toplam hacim (µl)
100	50	10	30	810	—	0,1	—	1000
100	50	20	30	800	—	0,2	—	1000
100	50	30	30	790	—	0,3	—	1000
100	50	40	30	780	—	0,4	—	1000
100	50	50	30	770	—	0,5	—	1000
100	50	10	30	800	10	0,1	0,1	1000

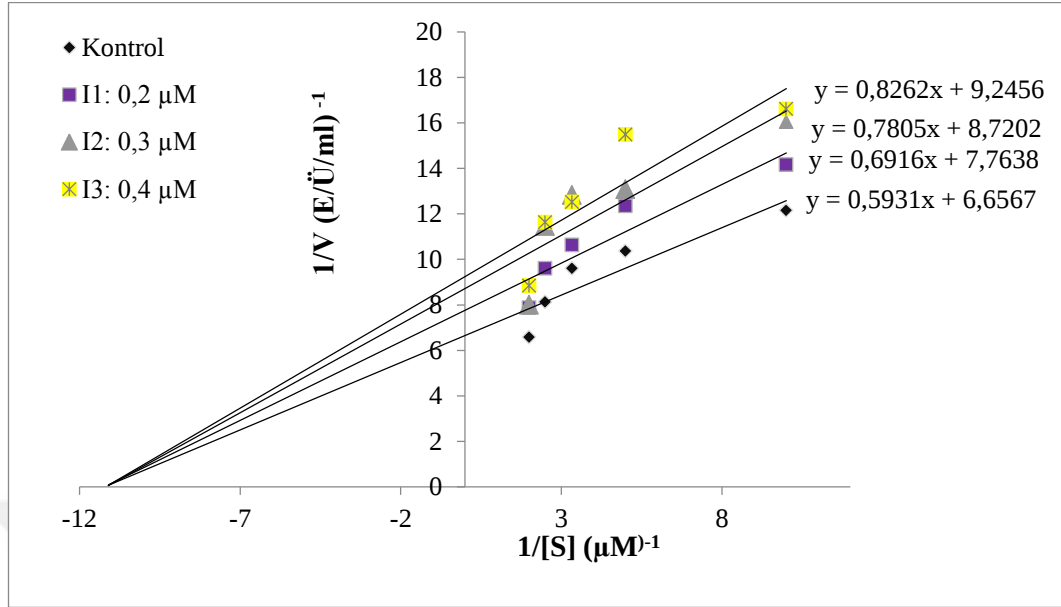
100	50	20	30	800	10	0,2	0,1	1000
100	50	30	30	790	10	0,3	0,1	1000
100	50	40	30	780	10	0,4	0,1	1000
100	50	50	30	770	10	0,5	0,1	1000
100	50	10	30	810	15	0,1	0,2	1000
100	50	20	30	800	15	0,2	0,2	1000
100	50	30	30	790	15	0,3	0,2	1000
100	50	40	30	780	15	0,4	0,2	1000
100	50	50	30	770	15	0,5	0,2	1000
100	50	10	30	810	20	0,1	0,3	1000
100	50	20	30	800	20	0,2	0,3	1000
100	50	30	30	790	20	0,3	0,3	1000
100	50	40	30	780	20	0,4	0,3	1000
100	50	50	30	770	20	0,5	0,3	1000



Şekil 4. 15 Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-6 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 15. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-42 molekülünün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Tris-HCl (μ l)	AChI (μ l)	DTNB (μ l)	Enzim (AChE) (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (μ M)	Küvetteki inhibitör kons. (μ M)	Toplam hacim (μ l)
100	50	10	30	810	—	0,1	—	1000
100	50	20	30	800	—	0,2	—	1000
100	50	30	30	790	—	0,3	—	1000
100	50	40	30	780	—	0,4	—	1000
100	50	50	30	770	—	0,5	—	1000
100	50	10	30	800	10	0,1	0,1	1000
100	50	20	30	800	10	0,1	0,1	1000
100	50	30	30	790	10	0,2	0,1	1000
100	50	40	30	780	10	0,3	0,1	1000
100	50	50	30	770	10	0,4	0,1	1000
100	50	10	30	810	15	0,5	0,1	1000
100	50	20	30	800	15	0,1	0,2	1000
100	50	30	30	790	15	0,2	0,2	1000
100	50	40	30	780	15	0,3	0,2	1000
100	50	50	30	770	15	0,4	0,2	1000
100	50	10	30	810	20	0,5	0,2	1000
100	50	20	30	800	20	0,1	0,3	1000
100	50	30	30	790	20	0,2	0,3	1000
100	50	40	30	780	20	0,3	0,3	1000
100	50	50	30	770	20	0,4	0,3	1000
100	50	10	30	810	20	0,5	0,3	1000

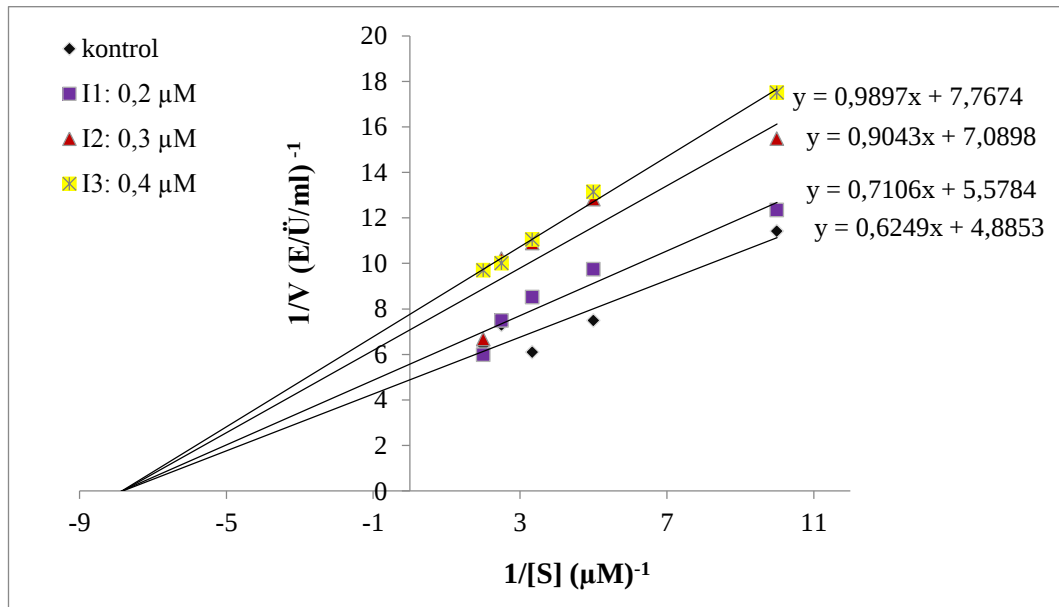


Şekil 4. 16. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-42 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 16. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-43-2 molekülünün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Tris-HCl (µl)	AChI (µl)	DTNB (µl)	Enzim (AChE) (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Küvetteki substrat kons. (µM)	Küvetteki inhibitör kons. (µM)	Toplam hacim (µl)
100	50	10	30	810	—	0,1	—	1000
100	50	20	30	800	—	0,2	—	1000
100	50	30	30	790	—	0,3	—	1000
100	50	40	30	780	—	0,4	—	1000
100	50	50	30	770	—	0,5	—	1000
100	50	10	30	800	10	0,1	0,1	1000
100	50	20	30	800	10	0,2	0,1	1000

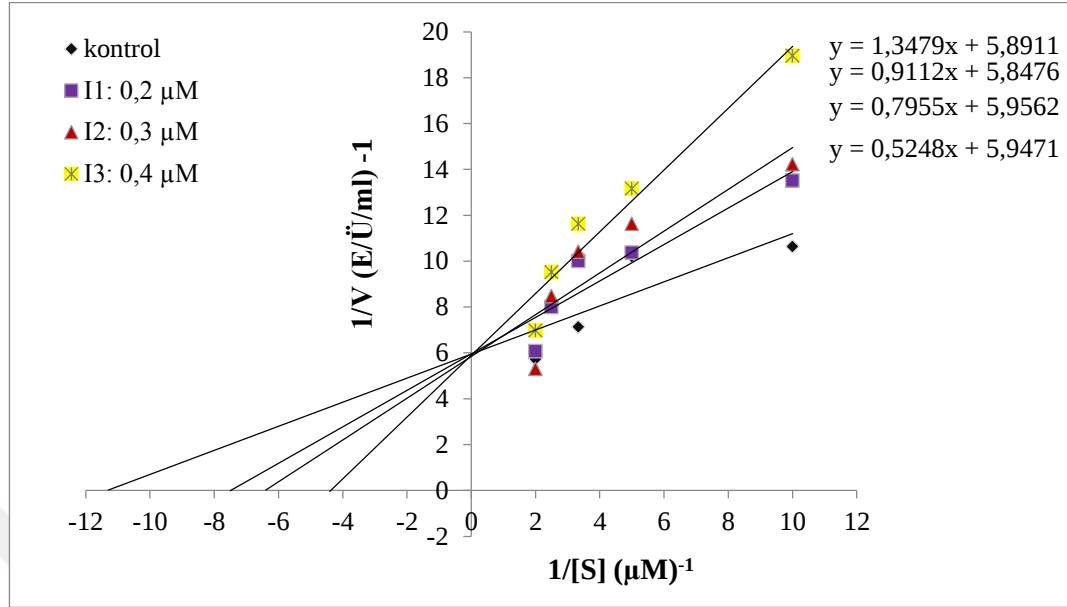
100	50	30	30	790	10	0,3	0,1	1000
100	50	40	30	780	10	0,4	0,1	1000
100	50	50	30	770	10	0,5	0,1	1000
100	50	10	30	810	15	0,1	0,2	1000
100	50	20	30	800	15	0,2	0,2	1000
100	50	30	30	790	15	0,3	0,2	1000
100	50	40	30	780	15	0,4	0,2	1000
100	50	50	30	770	15	0,5	0,2	1000
100	50	10	30	810	20	0,1	0,3	1000
100	50	20	30	800	20	0,2	0,3	1000
100	50	30	30	790	20	0,3	0,3	1000
100	50	40	30	780	20	0,4	0,3	1000
100	50	50	30	770	20	0,5	0,3	1000



Şekil 4. 17. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-43-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 17. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-44-2 molekülünün Ki değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Tris-HCl (µl)	AChI (µl)	DTNB (µl)	Enzim (AChE) (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Küvetteki substrat kons. (µM)	Küvetteki inhibitör kons. (µM)	Toplam hacim (µl)
100	50	10	30	810	—	0,1	—	1000
100	50	20	30	800	—	0,2	—	1000
100	50	30	30	790	—	0,3	—	1000
100	50	40	30	780	—	0,4	—	1000
100	50	50	30	770	—	0,5	—	1000
100	50	10	30	800	10	0,1	0,1	1000
100	50	20	30	800	10	0,2	0,1	1000
100	50	30	30	790	10	0,3	0,1	1000
100	50	40	30	780	10	0,4	0,1	1000
100	50	50	30	770	10	0,5	0,1	1000
100	50	10	30	810	15	0,1	0,2	1000
100	50	20	30	800	15	0,2	0,2	1000
100	50	30	30	790	15	0,3	0,2	1000
100	50	40	30	780	15	0,4	0,2	1000
100	50	50	30	770	15	0,5	0,2	1000
100	50	10	30	810	20	0,1	0,3	1000
100	50	20	30	800	20	0,2	0,3	1000
100	50	30	30	790	20	0,3	0,3	1000
100	50	40	30	780	20	0,4	0,3	1000
100	50	50	30	770	20	0,5	0,3	1000

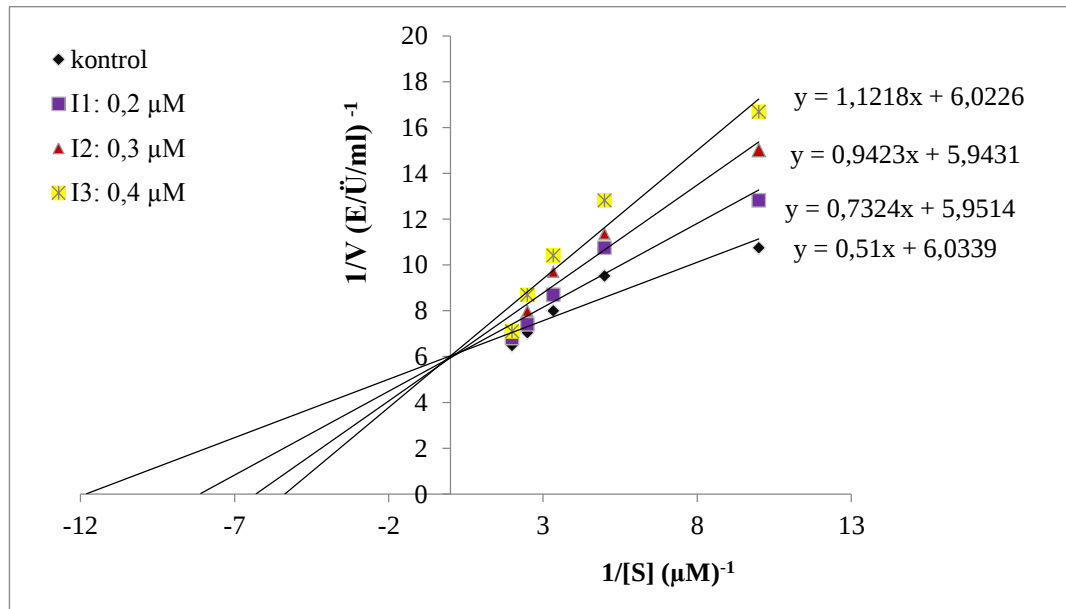


Şekil 4. 18. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-44-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 18. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine mk-45-2 molekülünün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Tris-HCl (µl)	AChI (µl)	DTNB (µl)	Enzim (AChE) (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör (µl)	Küvetteki substrat kons. (µM)	Küvetteki inhibitör kons. (µM)	Toplam hacim (µl)
100	50	10	30	810	—	0,1	—	1000
100	50	20	30	800	—	0,2	—	1000
100	50	30	30	790	—	0,3	—	1000
100	50	40	30	780	—	0,4	—	1000
100	50	50	30	770	—	0,5	—	1000
100	50	10	30	800	10	0,1	0,1	1000
100	50	20	30	800	10	0,1 0,2	0,1	1000

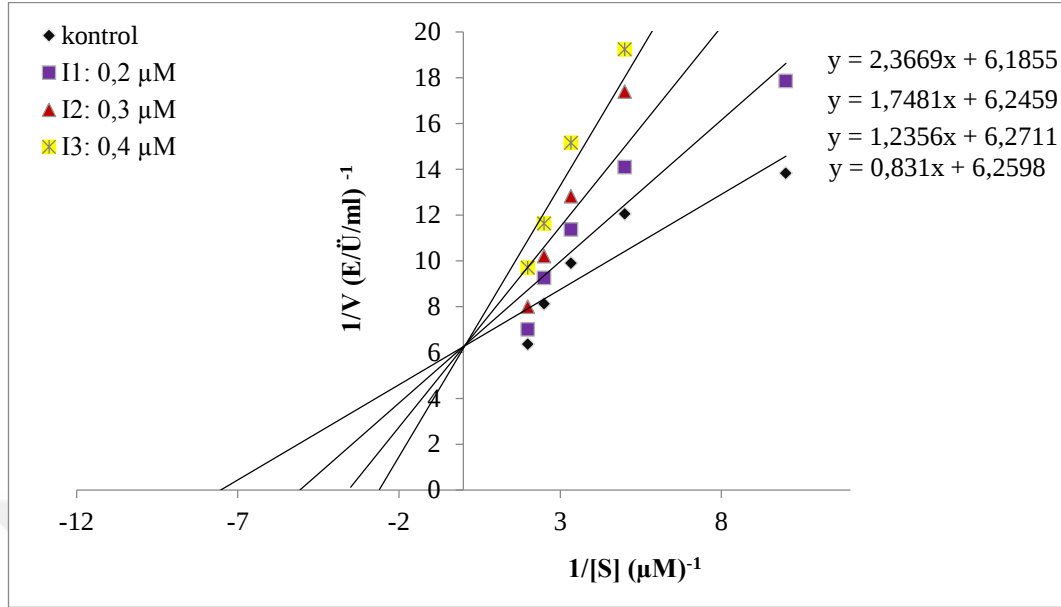
100	50	30	30	790	10	0,3	0,1	1000
100	50	40	30	780	10	0,4	0,1	1000
100	50	50	30	770	10	0,5	0,1	1000
100	50	10	30	810	15	0,1	0,2	1000
100	50	20	30	800	15	0,2	0,2	1000
100	50	30	30	790	15	0,3	0,2	1000
100	50	40	30	780	15	0,4	0,2	1000
100	50	50	30	770	15	0,5	0,2	1000
100	50	10	30	810	20	0,1	0,3	1000
100	50	20	30	800	20	0,2	0,3	1000
100	50	30	30	790	20	0,3	0,3	1000
100	50	40	30	780	20	0,4	0,3	1000
100	50	50	30	770	20	0,5	0,3	1000



Şekil 4. 19. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine mk-45-2 molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 19. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine Takrin molekülünün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan inhibitör ve substrat konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Tris-HCl (μ l)	AChI (μ l)	DTNB (μ l)	Enzim (AChE) (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör (μ l)	Küvetteki substrat kons. (μ M)	Küvetteki inhibitör kons. (μ M)	Toplam hacim (μ l)
100	50	10	30	810	—	0,1	—	1000
100	50	20	30	800	—	0,2	—	1000
100	50	30	30	790	—	0,3	—	1000
100	50	40	30	780	—	0,4	—	1000
100	50	50	30	770	—	0,5	—	1000
100	50	10	30	800	10	0,1	0,1	1000
100	50	20	30	800	10	0,2	0,1	1000
100	50	30	30	790	10	0,3	0,1	1000
100	50	40	30	780	10	0,4	0,1	1000
100	50	50	30	770	10	0,5	0,1	1000
100	50	10	30	810	15	0,1	0,2	1000
100	50	20	30	800	15	0,2	0,2	1000
100	50	30	30	790	15	0,3	0,2	1000
100	50	40	30	780	15	0,4	0,2	1000
100	50	50	30	770	15	0,5	0,2	1000
100	50	10	30	810	20	0,1	0,3	1000
100	50	20	30	800	20	0,2	0,3	1000
100	50	30	30	790	20	0,3	0,3	1000
100	50	40	30	780	20	0,4	0,3	1000
100	50	50	30	770	20	0,5	0,3	1000

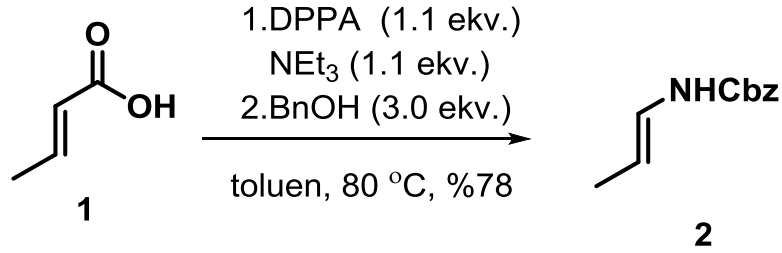


Şekil 4. 20. Asetilkolinesteraz enzimi aktivitesi üzerine Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroakridin) molekülünün farklı inhibitör konsantrasyonlarla çizilen Lineweaver-Burk grafiği

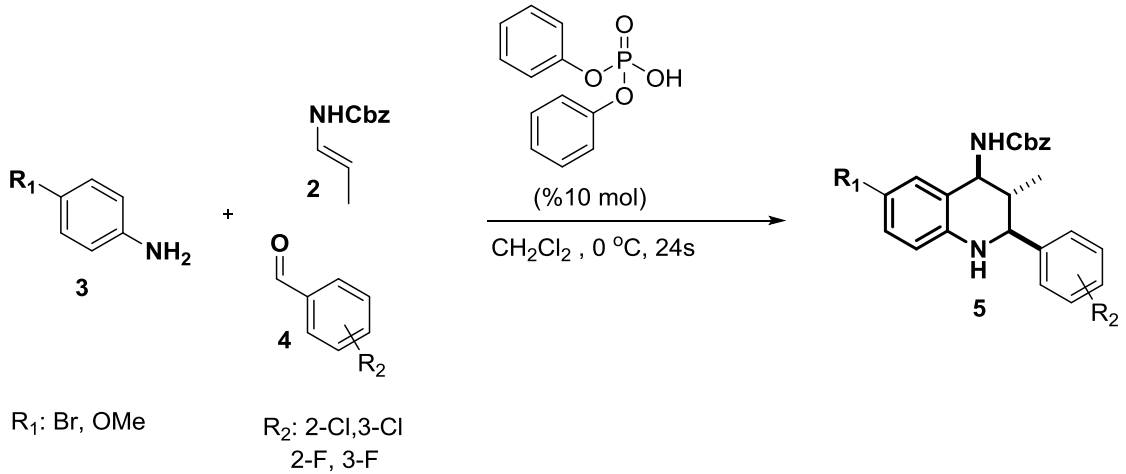
Çizelge 4. 20. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyonu araştırılan yeni sentezlenen organik bileşiklerin IC_{50} , K_i ve inhibisyon tipi

İnhibitör maddeler	IC_{50} (µM)	K_i (µM)	İnhibisyon Tipi
mk-3	0,22	0,70±0,126	Yarışmasız
mk-4	0,31	0,66±0,485	Yarışmasız
mk-5	0,27	0,74±0,257	Yarışmalı
mk-6	0,34	1,30±0,715	Yarı Yarışmalı
mk-42	0,36	1,081±0,129	Yarışmasız
mk43-2	0,24	1,080±0,551	Yarışmasız
mk-44-2	0,24	0,370±0,330	Yarışmalı
mk-45-2	0,30	0,50±0,110	Yarışmalı
Takrin	0,77	0,880±0,093	Yarışmalı

4.4. Deneysel



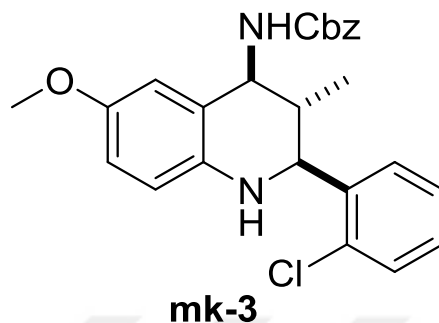
80 mL toluen içerisinde çözünmüş (E)-butenoik asit (krotonik asit, 2.0 g, 22.8 mmol) çözeltisine difenilfosforil azit (DPPA) (5.58 mL, 25.0 mmol) ve NEt₃ (3.52 mL, 25.0 mmol) ilave edildi. Reaksiyon karışımı azot gazı çıkışı bitene kadar 80 °C’de ısıtıldı (yaklaşık 3.5 saat). Karışım daha sonra oda sıcaklığına soğutulduktan sonra benzil alkol (7.10 mL, 68.3 mmol) ilave edildi. Reaksiyon 36 saat karıştırıldıktan sonra su ile sonlandırıldı. Toluene uzaklaştırıldıktan sonra su fazı hekzan ile ekstrakte edildi. Organik faz doygun tuz çözeltisiyle yıkandı. Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu, süzüldü ve çözücü düşük basınçta (10°C, 15 torr) uzaklaştırıldı. Ham karışım silika jel kolondan hekzan-etil asetat (95:5) ile yürütülerek **2** %78 verimle beyaz katı olarak elde edildi. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (brs, 5H), 6.48 (t, J = 11.85 Hz, 1H), 6.34 (brs, 1H), 5.14 (s, 2H), 5.01 (dt, J = 6.7, 13.4 Hz, 1H), 1.65 (d, J = 7.5 Hz, 3H). R_f = 0.33 (1:9 EtOAc/hexanes).



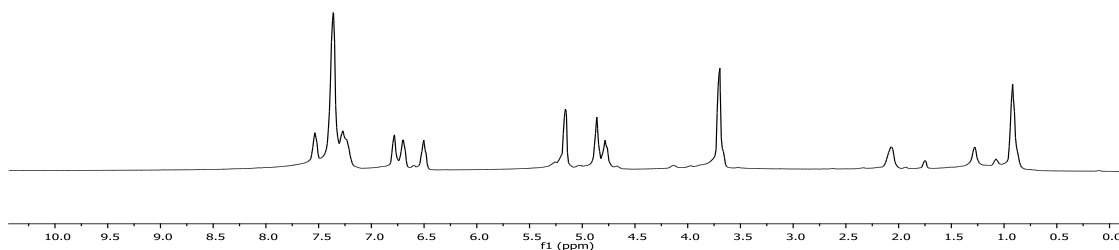
Şekil 4. 21. 5 numaralı bileşiğin sentezi

Genel Prosedür: Oda sıcaklığında kuru diklorometan içerisinde çözünmüş anilin (1 mmol) çözeltisine ilgili aldehit (1 mmol) ilave edildi. 30 dakika karıştırıldıktan sonra, reaksiyon karışımı 0 °C’ye soğutuldu. Reaksiyon karışımına diklorometanda

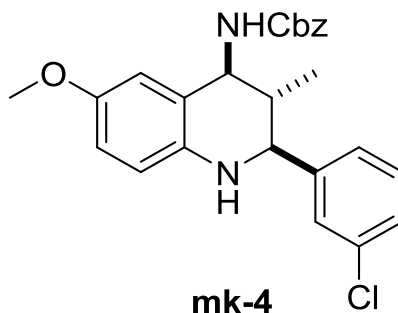
çözünmüş difenilfosfat katalizörü (0.1 mmol) ve N-vinilkarbamat (1.1 mmol) ilave edildi. Karışım argon atmosferinde 0 °C’de 24 saat karıştırıldı. Ham karışım silika jel kolona yüklendi ve hekzan-etil asetat (95:5) ile yürütüldü.



Açık sarı katı; %96 verim; E.N: 110-111 °C; Rf:0.35 (Hekzan:EtOAc:% 4:1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90-7.10 (m, 9H), 6.90-6.66 (m, 2H), 6.50 (brs, 1H), 5.40-5.10 (m, 2H), 5.00-5.10 (m, 2H), 3.7 (s, 3H), 2.2-2.0 (m, 1H), 0.9 (s, 3H).

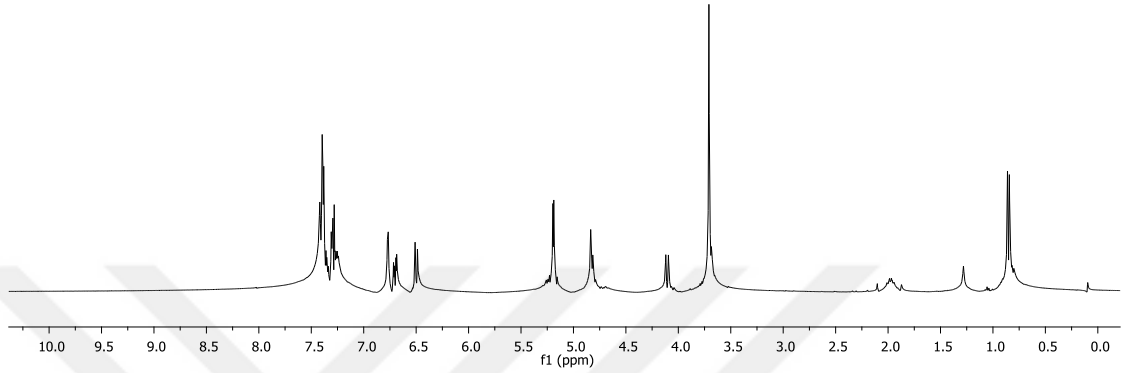


Şekil 4. 22. mk-3’ün ¹H NMR spektrumu

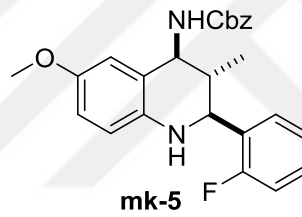


Açık sarı katı; %85 verim; E.N: 140-142 °C; Rf:0.35 (Hekzan:EtOAc:% 4:1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.33 (m, 6H), 7.34 – 7.19 (m, 3H), 6.77 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 6.70 (dd, J = 8.9, 3.1 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 5.19 (d, J = 3.4 Hz, 1H),

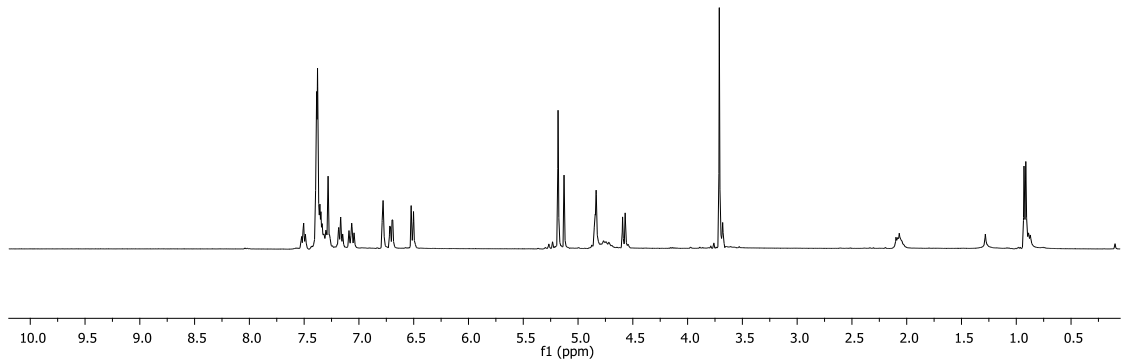
4.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.11 (d, $J = 10.0$ Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.27 – 1.71 (m, 1H), 0.85 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H).



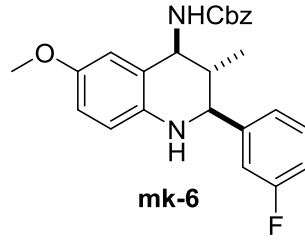
Şekil 4. 23. mk-4'ün ^1H NMR spektrumu



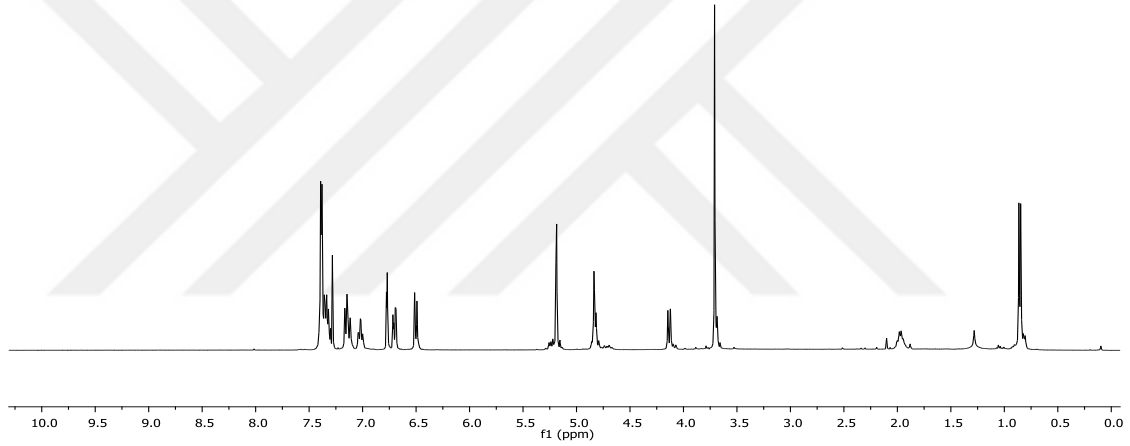
Açık sarı katı; %90 verim; E.N: 141-143 °C; Rf:0.4 (Hekzan:EtOAc:% 4:1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.51 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 7.42 – 7.24 (m, 6H), 7.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.07 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.82 – 6.73 (m, 1H), 6.71 (dd, $J = 8.6, 2.7$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 5.20-5.11 (m, 2H), 4.91 – 4.66 (m, 2H), 4.58 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.14 – 1.99 (m, 1H), 0.92 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H).



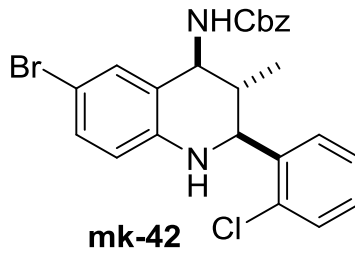
Şekil 4. 24. mk-5'in ^1H NMR spektrumu



Açık sarı katı; %86 verim; E.N: 129-131 °C; Rf:0.5 (Hekzan:EtOAc:%4:1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45 – 7.29 (m, 6H), 7.14 (t, J = 10.2 Hz, 2H), 7.02 (td, J = 8.4, 1.9 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.70 (dd, J = 8.6, 2.8 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.31 – 5.12 (m, 2H), 4.91 – 4.61 (m, 2H), 4.13 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.10 – 1.85 (m, 1H), 0.86 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

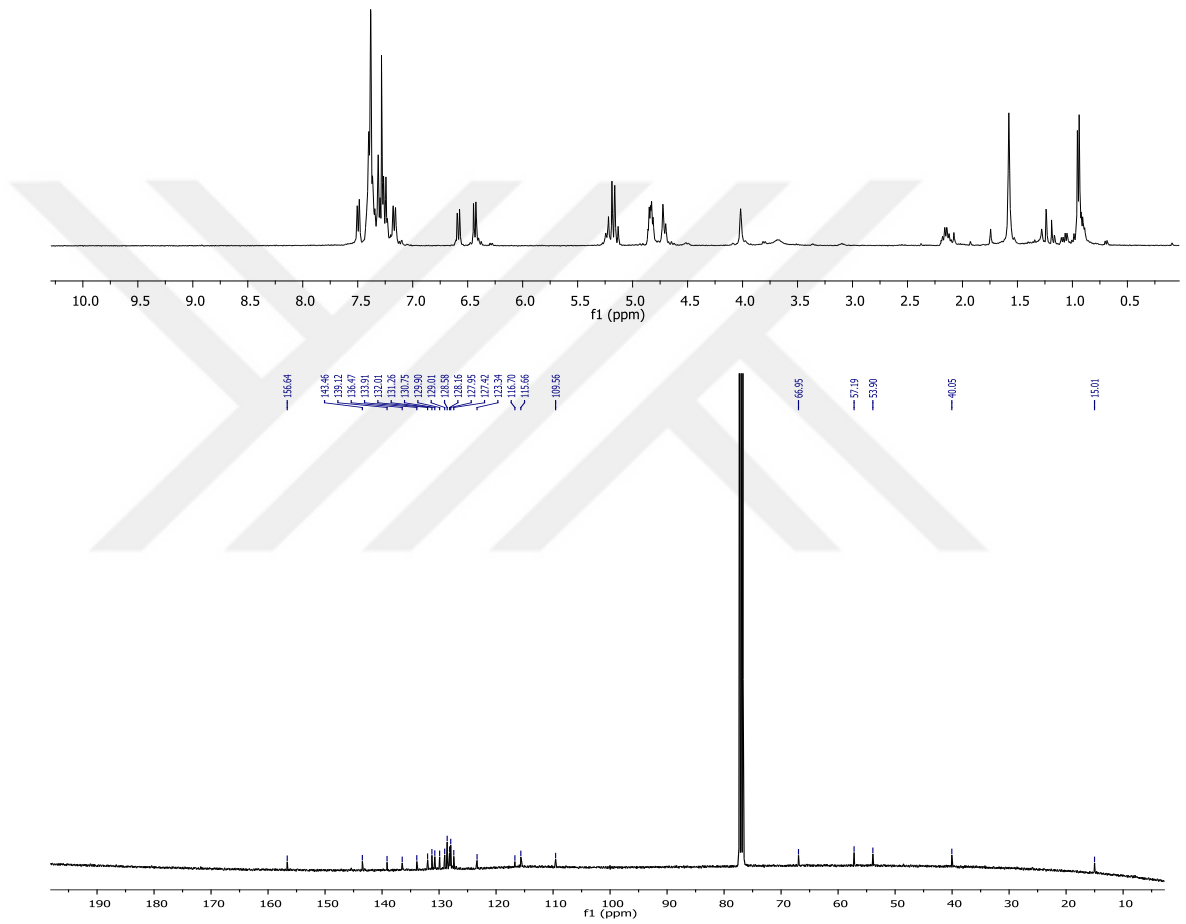


Şekil 4. 25. mk-6'nin ¹H NMR spektrumu

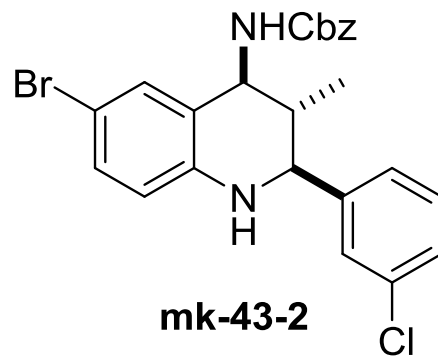


Açık sarı sıvı; %65 verim; Rf:0.6 (Hekzan:EtOAc:%4:1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.50 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.45 – 7.21 (m, 8H), 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.31 – 5.08 (m, 2H), 4.89 – 4.79 (m, 1H), 4.71 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.02 (s, 1H), 2.25 – 2.05 (m, 1H), 0.95 (d, J = 6.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 156.6, 143.5, 139.1, 136.5, 133.9, 132.0, 131.3, 130.7,

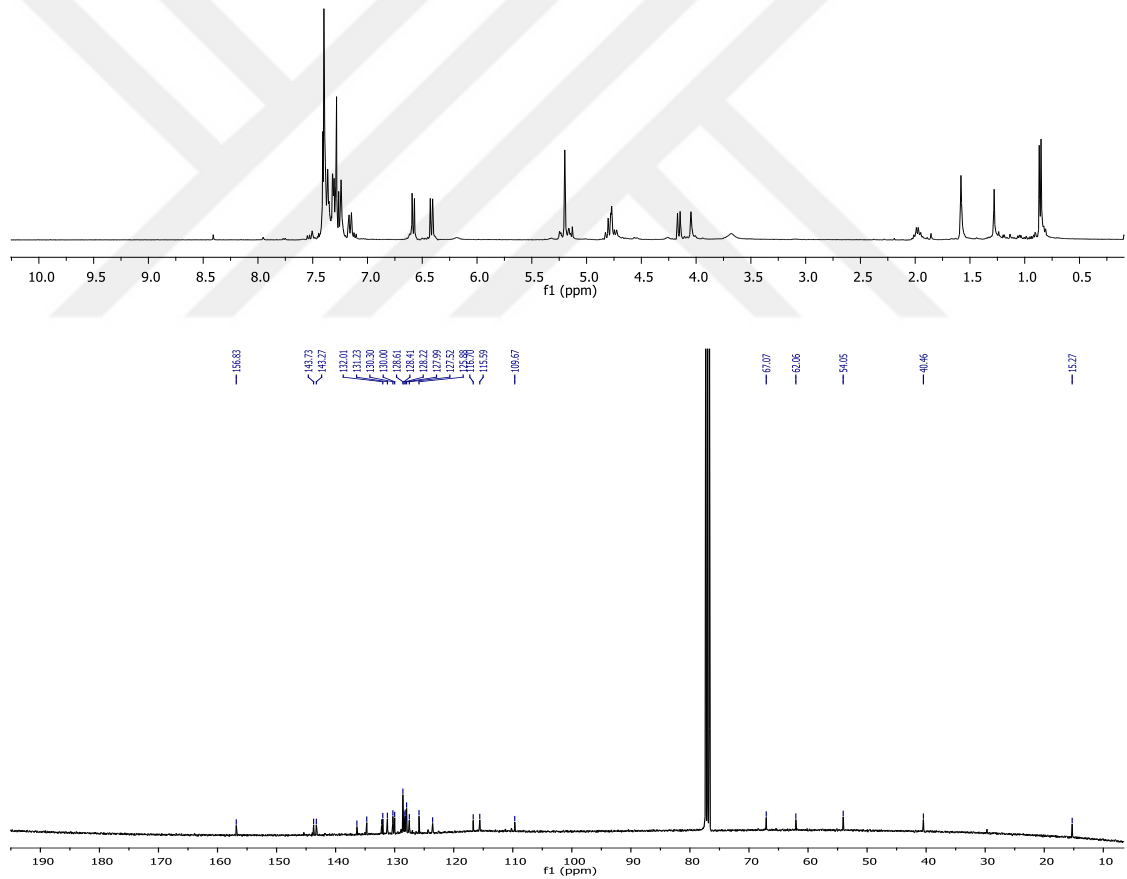
129.9, 129.0, 128.6, 128.2, 127.9, 127.4, 123.3, 116.7, 115.7, 109.6, 66.9, 57.2, 53.9, 40.0, 15.0; IR (neat, cm⁻¹) 3310, 2900, 2890, 2798, 1704, 1531, 1191, 783; LCMS (ES⁺) m/z hesaplanan C₂₄H₂₂BrClN₂O₂ ([M+Na]⁺) 507.0 bulunan 507.8.



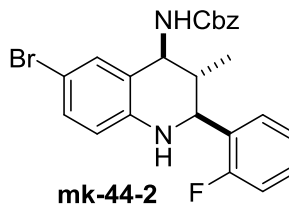
Şekil 4. 26. mk-42'nin ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrumu



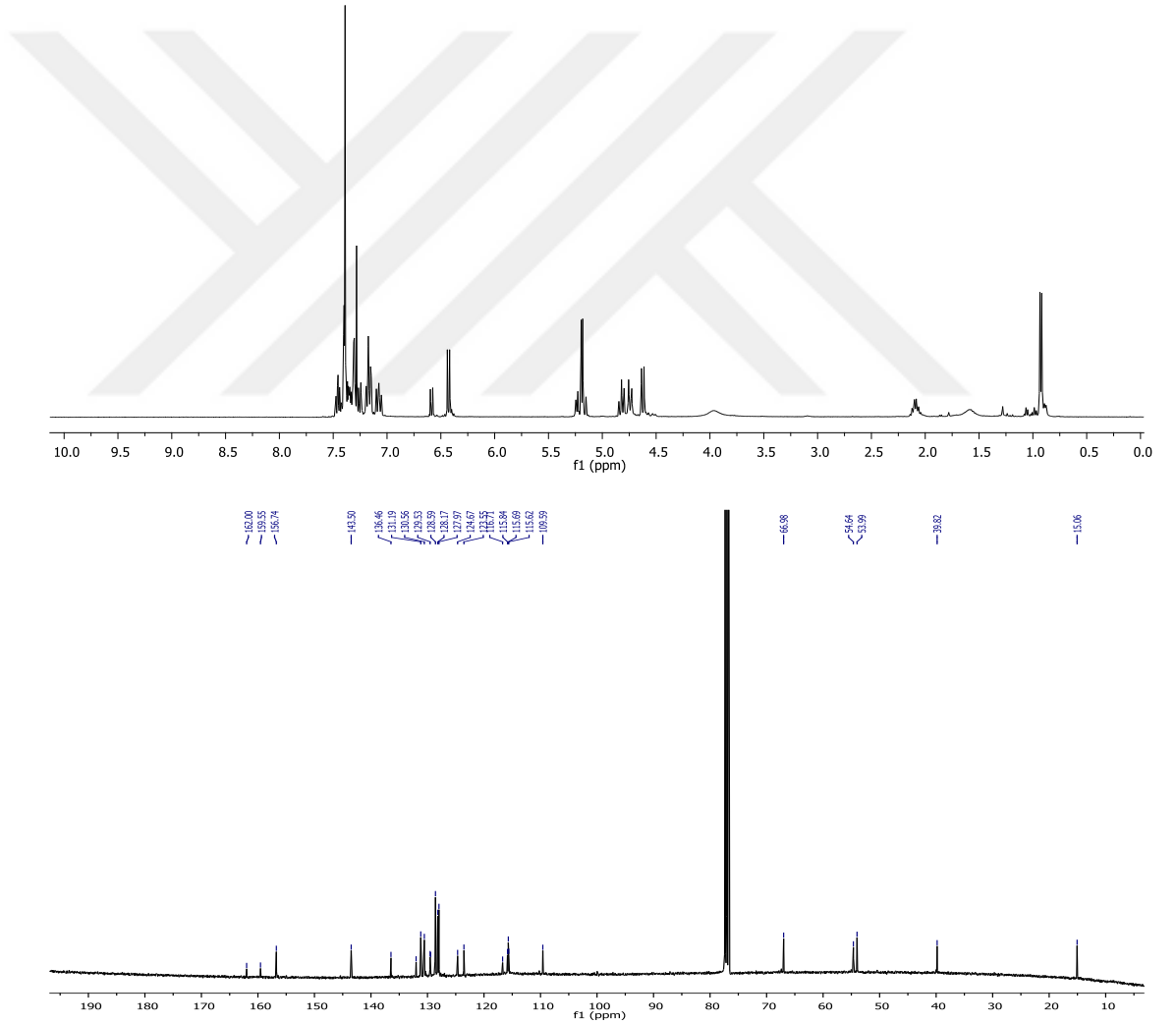
Kahverengi katı; %72 verim; E.N: 130-131 °C; Rf:0.6 (Hekzan:EtOAc:%4:1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.44 – 7.21 (m, 9H), 7.16 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.42 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.28 – 5.10 (m, 2H), 4.90 – 4.65 (m, 1H), 4.16 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 4.05 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 2.09 – 1.87 (m, 1H), 0.86 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 156.8, 143.7, 143.3, 136.4, 134.7, 132.2, 132.0, 131.2, 130.3, 130.0, 128.6, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.5, 125.9, 123.6, 116.7, 115.6, 109.7, 67.1, 62.1, 54.0, 40.5, 15.3.; IR (neat, cm⁻¹) 3310, 2900, 2890, 2798, 1704, 1531, 1191, 783; LCMS (ES⁺) m/z hesaplanan C₂₄H₂₂BrClN₂O₂ ([M+Na]⁺) 507.0 bulunan 507.8.



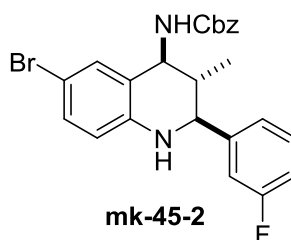
Şekil 4. 27. mk-43-2'nin ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrumu



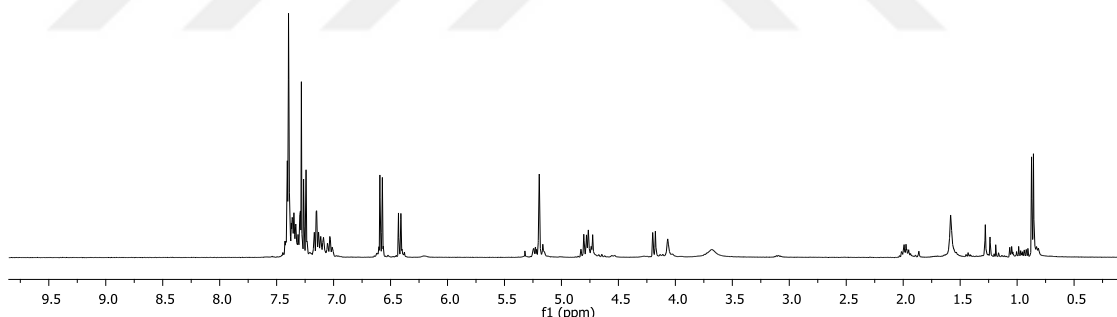
Açık sarı sıvı; %80 verim; Rf:0.6 (Hekzan:EtOAc:%4:1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.51 – 7.22 (m, 7H), 7.21 – 7.13 (m, 2H), 7.12 – 7.03 (m, 1H), 6.59 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.43 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.30 – 5.11 (m, 2H), 4.82 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.74 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.62 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 2.16 – 2.03 (m, 1H), 0.93 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 162.0, 159.5, 156.7, 143.5, 136.5, 132.0, 131.2, 130.6, 129.5, 129.4, 128.6, 128.2, 128.0, 124.7, 123.5, 116.7, 115.8, 115.7, 115.6, 109.6, 67.0, 54.6, 54.0, 39.8, 15.1; IR (neat, cm^{-1}) 3305, 2920, 2913, 2798, 1710, 1533, 1192, 781; LCMS (ES+) m/z hesaplanan $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{BrFN}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 491.1 bulunan 491.2.

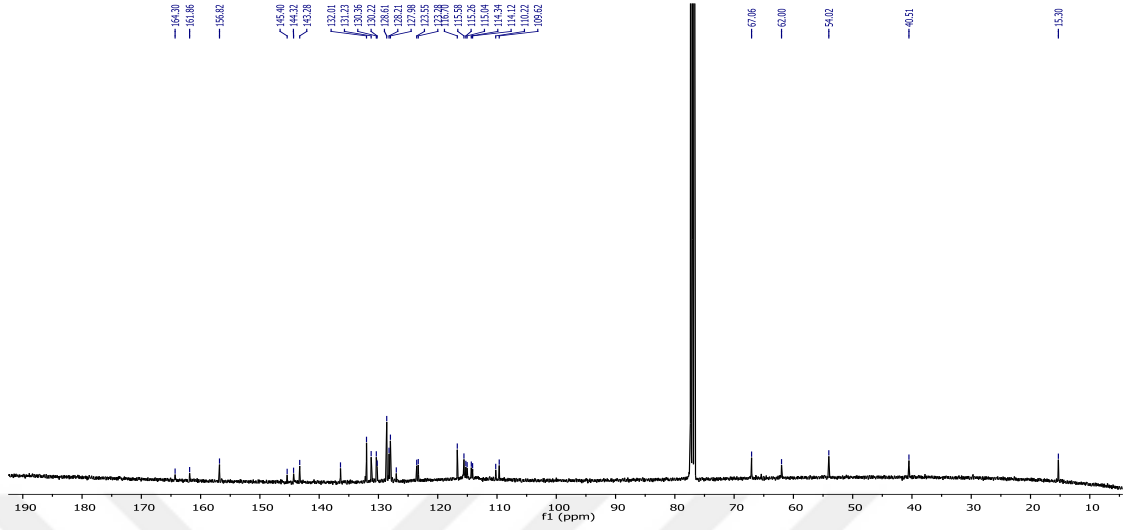


Şekil 4. 28. mk-44-2'nin ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumu



Açık sarı sıvı; %74 verim; Rf:0.6 (Hekzan:EtOAc:%4:1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45 – 7.21 (m, 5H), 7.14 (ddd, J = 17.5, 10.4, 6.0 Hz, 3H), 7.03 (td, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.42 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.43 – 5.07 (m, 2H), 4.91 – 4.59 (m, 2H), 4.19 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 2.07 – 1.81 (m, 1H), 0.87 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 164.3, 161.9, 156.8, 145.4, 144.3, 143.3, 136.4, 132.0, 131.2, 130.4, 130.2, 128.6, 128.2, 128.0, 127.0, 123.5, 123.3, 116.7, 115.6, 115.3, 115.0, 114.3, 114.1, 110.2, 109.6, 67.0, 62.0, 54.0, 40.5, 15.3; IR (neat, cm^{-1}) 3305, 2920, 2913, 781; LCMS (ES+) m/z hesaplanan $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{BrFN}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 491.1 bulunan 491.2.





Şekil 4. 29. mk-45-2'nin ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumu

Asetilkolinesteraz enzimin (AChE) substratı olan asetilkolin miktarında meydana gelen değişikliklerden dolayı çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. AChE 'nın fazla salgılaması ACh miktarının azalmasına neden olur. Asetilkolin (ACh) maddesinin azalması sonucunda ortaya çıkan en önemli hastalık, Alzheimer hastalığıdır. Bu hastalığın tedavisi için AChE'in fazla salgılanmasını dengelemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların en önemlisi ve en etkilisi olan AChE' nin inhibisyonuna neden olan moleküller aranmıştır. AChE'nin inhibitörleri olarak en çok kumarin türevleri üzerinde durulmuş ve çalışılmıştır (Jeger, 2013).

Bu çalışmada, asetilkolinesteraz enzimin substratlarına (DTNB, AChI) olan ilgisini belirlemek amacıyla farklı konsantarsiyonda (en az beş farklı konsantrasyon) her iki substrat için enzim aktivite değerleri belirlenmiştir. Elde edilen $1/V$ ve $1/S$ değerler yardımıyla Lineweaver –Burk grafikleri çizilerek K_M ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır (şekil 4.1-4.2). Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı sabit tutularak DTNB substratı için $V_{max} = 0.106 \text{ EÜ/ml}$, $K_M = 1,637 \mu\text{M}$ ve asetilkolinyodat için $V_{max} = 0.096 \text{ EÜ/ml}$, $K_M = 1.021 \mu\text{M}$ olarak tespit edildi.

Yapılan çalışmada inhibisyon olayının önemi göz önünde bulundurarak tarafımızda yeni sentezlenen organik moleküllerin farklı konsantarsiyonlarını kullanarak asetilkolinesteraz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi *invitro* şartlarda incelenmiştir. Çalışmamızda daha önce sentezlenen fakat asetilkolinesteraz enzimi üzerinde

inhibisyon etkisi incelenmeyen 4 farklı organik molekül ve tarafımızda sentezlenen 4 farklı molekül inhibitör olarak kullanılarak K_i ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Yine aynı şekilde Takrin bileşiği standart inhibitör olarak kullanılarak K_i ve IC_{50} değerleri hesaplanıp asetilkolinesteraz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi incelenmiştir. Çalışmanın hassaslığından dolayı asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren organik bileşikler için K_i sabitinin ve inhibisyon çeşidinin belirleme işleminde her molekül için 5 farklı sabit inhibitör konsantrasyonu kullanılarak ve $1/V$ ve $1/S$ değerleri elde edilmiştir. Bulunan değerler yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizerek K_i değerleri ve inhibisyon çeşitleri tespit edilmiştir.

Asetilkolinesteraz enziminin aktivitesinin azalması insan sağlığı üzerinde risk teşkil edebilir. Hastalık risk grubunda olan insanlarda enzim aktivite değişkenliği önemli derecede dikkat edilmesi gereken bir konudur. Bundan dolayı enzim inhibisyonunda etkili olan maddelerin araştırılması son derece önemlidir.

Özcan (2014), tarafında yapılan bir çalışmada insan eritrositlerinden saflaştırılarak karakterize edilen asetilkolinesteraz enzimi üzerinde inhibitor etkisini gösteren bazı kimyasal maddelerin IC_{50} , K_i ve inhibisyon çeşidini aşağıdaki gibi bulmuştur.

Mirtazapin: $IC_{50} = 0,428$ mM, $K_i = 0,23 \pm 0,051$ mM yarışmalı inhibisyon olarak, Fluoksetin: $IC_{50} = 1,62$ mM, $K_i = 1,48 \pm 0,66$ mM yarışmalı inhibisyon, Risperidon: $IC_{50} = 0,019$ mM, $K_i = 0,012 \pm 0,0018$ mM yarışmalı inhibisyon, Antibiyotik Pantaprazol: $IC_{50} = 1,97$ mM, $K_i = 1,26 \pm$ mM yarışmalı inhibisyon, Etanol: $IC_{50} = 2,24$ M, $K_i = 1,28 \pm 0,52$ mM yarışmalı inhibisyon, Lidokain: $IC_{50} = 260$ μ M, $K_i = 14,3 \pm 4,6$ μ M yarışmasız inhibisyon, Bupivakain: $IC_{50} = 5$ μ M, $K_i = 13,4 \pm 3,6$ μ M yarışmasız inhibisyon olarak elde etmiştir.

Asetilkolinyodat substratı için $K_M = 0,11$ mM ve $V_{max} = 0,082$ EÜ/ml, DTNB substratı için $K_M = 0,031$ mM ve $V_{max} = 0,16$ EÜ/ml olarak tespit etmiştir.

Çalışmamızda asetilkolinesteraz enzimi üzerinde inhibitör etkisini gösteren organik bileşiklerin tamamının IC_{50} , K_i değerlerini ve inhibisyon çeşitlerinin sonuçları özet olarak Çizelge 4.26 verilmiştir.

Yukarda yapılan çalışmaya göre Çizelge 4.26'da verilen K_i ve IC_{50} değerlerimizle karşılaştırıldığımızda bizim moleküllerimizin mikromolar düzeyde ve daha etkin inhibitör özelliği göstergi görülmektedir.

Çalışmamızda İnhibitör olarak kullanılan organik bileşiklere standart olarak kullanılan takrin molekülün $IC_{50}=0.77$ ve μM , $K_i=0.88 \mu M$ olarak hesaplandı. inhibisyon çeşidi ise yarışmalı inhibisyon olarak belirlendi. Kullandığımız inhibitörlerden mk-42 molekülün IC_{50} ve K_i değerleri Takrin molekülün değerine daha yakındır. Standartın değerini diğer inhibitör molekülerin (mk-3, mk-4, mk-5, mk-6, mk-43-2, mk-44-2, mk-45-2) değerleri ile karşılaştırdığımızda standarda göre inhibisyon etkisi daha yüksek sonuçlar elde etti.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Asetilkolinestraz inhibitörleri AChE enzimini inhibisyona uğratarak asetilkolinin yıkımını da engellemiş olmaktadır. Bunun sonucunda asetilkolinin konsantrasyonu ve işlevselliği devam etmektedir. AChE enzim inhibitörleri geri dönüşümlü, dönüşümsüz ve yarı geri dönüşümlü olarak etki göstermektedirler. Yarışmalı ve yarışmasız geri dönüşümlü inhibitörler genellikle tedavi maksadıyla tercih edilmektedir. Karbamatlar, donepezil, takrin, piperidinler, demekaryum, tetrahidroaminokidrin, galantamin, kafein, fizostigmin, rivastigmin önemli inhibitörlere örnek olarak verilebilir.

AChE inhibitörlerinin günümüzde önemi Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabiliyor olmasından kaynaklanmaktadır. Bu maksatla 4-aminotetrahidrokinolin türevi moleküllerin inhibitör olarak davranıp davranmadığını araştırdık. Çalışma bulguları aşağıda sıralanmıştır.

- Çalışmada 4 tanesi ilk defa sentezlenen olmak üzere toplamda 8 tane 4-aminotetrahidrokinolin türevi molekül inhibitör olarak çalışıldı.
- Sentezlenen moleküller %65-90 arasında yüksek verimlerle sentezlendi.
- Sentez moleküllerin ¹HNMR, ¹³CNMR, IR, erime noktası ve LC-MS/MS de yapı karakterizasyonları yapıldı.
- İnhibitörlerin etkinliğini standart inhibitör olarak kullanılan Takrin molekülünü de çalışarak kıyasladık.
- İnhibisyon çalışması olarak IC₅₀ ve Ki değerlerini spektrofotometrik yöntemle çalışıldı. Sonuçlar mikromolar düzeyde literatüre uyumlu olarak bulundu
- mk-3, mk-4, mk-42, mk-43-2, yarışmasız, mk-6 yarı yarışmalı, diğer moleküllerde yarışmalı inhibisyon tipi gösterdiği görüldü.
- İnhibisyon tipleri, inhibisyon düzeyleri ve standart inhibitörle karşılaştırıldığında bu moleküllerin iyi birer inhibitör olduğu görülmektedir. Bu moleküllerinin çoğunun standart inhibitörden daha etkin olduğu, bir kısmının ise standart inhibitöre yakın inhibisyon etki gösterdiği görülmektedir.
- Çalışmanın *in vitro* koşullarda elde edilen sonuçlarına bakılarak bu moleküllerin Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

- Çalışma verilerinin ayrıntılı olarak *in vivo* koşullarda deney hayvanları üzerinde denenmesiyle ve gerekli faz çalışmalarından sonra ilaç olarak piyasaya sürülebileceğini önermekteyiz.



KAYNAKÇA

- Akdeniz, Ö., (2019). *Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz Enzimleri Üzerinde Bazı Pestisitlerin Etkilerinin İncelenmesi*, Yüksek lisans Tezi, Ağrı İbrahim Çeçen üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağrı. 46.
- Akgün, H., Balkan, A., Bilgin, A. A., Çalış, Ü., Gökhan N., Dalkara, S., Erdoğan, H., Erol, D. D., Ertan, M., Özkanlı, F., Palaska, E., Saraç, S., Şafak, C., Tozkoparan, B, 2004. *Farmasötik Kimya Kitabı (2. Baskı)*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.490500
- Anand, R., Gill, K.D., and Mahdi A.A., 2014. *Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future*. Neuropharmacology,76:27–50.
- Anonim: <http://www.noroloji.org.tr/menu/94/alzheimer-hastaligi> (24.04.2019)
- Anonim: <http://www.medicalpark.com.tr/alzheimer-nedir> (22.04.2020).
- Anonim: <http://www.turkgeriatri.org/halksagligi?id=5> (15.09.2020).
- Anonim: <https://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholinesterase> (23.09.2020).
- Anonim:<http://www.pfizer.com.tr/sagliginizicin/alzheimerhastal%C4%B1%C4%9F%C4%B1-nedir>. (20.04.2020).
- Aygan, A., Arıkan B., 2008. *Amilaz Selüloz ve Ksilanaz Üretebilen Orta Düzeyde Halofil Bacillus Sp. İzolasyonu Ve Optimum Üreme Ve Enzim Sentezlerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 137.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L., 2014. *Biochemistry, 7.Baskıdan çeviri* (Çeviri editörü: Denizli, A., Özden, A. K.), Palme Yayıncılık.
- Beskan, U., (2011). *Glukoz Tayini İçin Polianilin-Polivinilsülfonat Filme Glukoz Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu İle Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 16-32.
- Breteler, M.M., van Duijn, C.M., Chandra, V., Fratiglioni, L., Graves, A.B., Heyman, A., Jorm, A.F., Kokmen, E., Kondo, K., Mortimer, J.A., et al.,1991. *Medical history and the risk of Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of*

- case-control studies. (Eurodem Risk Factors Research Group).* International Journal of Epidemiology, 20 Suppl 2: 36-42.
- Burns, A., Rossor, M., Hecker, J., Gauthier, S., Petit, H., Moller, H.J., Rogers, S.L., Friedhoff, L.T., 1999. *The effects of donepezil in Alzheimer's disease-results from a multinational trial.* Dementia and Geriatric Cognitive Disorders,10: 237244.
- Bymaster, F.P., Felder, C., Ahmed, S., McKinzie, D., 2002. *Muscarinic receptors as a target for drugs treating shizophrenia.* Curr Drug Targets CNS Neurol Disorders. 1(2): 163181.
- Dagousset, G., Zhu, J., Masson, G., 2011. *Chiral Phosphoric Acid-Catalyzed Enantioselective Three-Component Povarov Reaction Using Enecarbamates as Dienophiles: Highly Diastereo- and Enantioselective Synthesis of Substituted 4-Aminotetrahydroquinolines.* American Chemical Society, 133, 37, 14804–14813.
- Dean, B., Crook, J.M., Opekin, K., Hill, C., Keks, N., Copolov, D.L., 1996. *The density of muscarinic M1 receptors is decreased in the caudate-putamen of subjects with schizophrenia.* Mol Psychiatry. 1(1): 54-58.
- Dingil, A., (2008). *Bazı 2,4 Diaril -5,6,7,8- Tetrahidrokinolin Türevlerin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi,* Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Tokat, 1-2.
- Aynacı, E., (2015). *Asetilkolin Biyosensörünün Hazırlanması, Alzheimer Tedavisi İçin Yeni Asetilkolinesteraz İnhibitörlerinin Sentezi, Spektrofotometrik Ve Elektrokimyasal Yöntemlerle İnhibisyon Özelliklerinin İncelenmesi,* Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.169.
- Fennema, O.R., (1985). *Food Chemistry (İkinci Baskı).* New York: Macel Dekker Inc., 994.
- Förstl, H., Kurz, A.,1999. *Clinical features of Alzheimer's disease.* European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, 249, 288-290.

- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K., 1999. ***The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress.*** Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 66: 137-147
- Gutiérrez M., Arevalo B., Martínez G., Valdés F., Vallejos G., Carmona U. and San Martine A., 2015. ***Synthesis and Characterization of Tetrahydroquinolines as acetylcholinesterase inhibitors.*** J. Chem. Pharm. Res., 7(3):351-358, ISSN : 0975-7384
- İnce, E., (2006). ***Ksilanaz Üreten Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin İzolasyonları ve Enzimlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi,*** Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Jeger, R.V., (2013). European Heart Journal 34 2580-2581.
- Karmaz, E., (2018). ***Asetilkolinesteraz (Ache) Enziminin Yeni Sentezlenen Nanopartiküllere İmmobilizasyonu ve Bazı Pestisitlerin Belirlenmesi,*** Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.81
- Katritzky, A. R., Rachwal, S., Rachwal, B., 1996. Tetrahedron, 52, 15031.
- Kayaalp, S.O., (2002). ***Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*** (10. Baskı). Türkiye: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., 1075-1092.
- Kazancıoğlu, M.Z., (2020). ***4-Amino-Tetrahidrokinolin Türevlerinin Organokatalizör Varlığında Sententezi ve Karakterizasyonu.*** Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(1): 368-377.
- Kazancıoğlu, M.Z., Kalay, E., Kazancıoğlu, E.A., Peshkov, V.A., 2019. ***Enantioselective Assembly of Tricyclic Tetrahydroquinoline Derivatives,*** ChemistrySelect, 4: 8797-8799.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2008. ***Biyokimya, Aktif Yayınevi,*** Sirkeci/İstanbul.
- Kent, M., (2000). ***Advanced Biology,*** Oxford University Press, England.

- Korolev, I.O., (2014). *Alzheimer's disease: Aclinical and basic science review*. Medical Student Research Journal, 4, 24-33.
- Kıvanç, M., (2010). *İnsan Plazma Ve Eritrosit Hemolizati Asetilkolinesteraz (Ache, Ec.3.1.1.7) Enzimi Üzerdne Bazı Antibiyotik ve Ağrı Kesici İlaçların İn Vitro Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek lisans Tezi, Van yüzüncü yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van. 81.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. *The determination of enzyme dissocation constants*. J. Am. Chem. Soc. 57, 685.
- Mann, D.M., (1989). *The pathogenesis and progression of the pathological changes of Alzheimer's disease*, Ann Med, 21, 133–136.
- Michaelis, L. and Menten, M.L. 1913. *Die Kinetik der Invertinwirkung*. Biochemische Zeitschrift, 49, 333–369.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (Üçüncü Baskıdan çeviri, Çeviri Editörü: Kılıç, N.), Türkiye: Palme Yayıncılık, 444.
- Nogady, T. and Weaver, D.F., 2005. *Medicinal Chemistry : A Molecular and Biochemical Approach*, Third Edition, Deited, Oxford University Press
- Nordberg, A., Svensson, A.L., 1998. *Drug Safety*, 19,465-480.
- Nunez, Y.A.R., Gutierrez M., Morales, J.A., Carreno, F.A., Güiza F.M., Bernal C.C., Bohorquez, A.R.R., 2019. *Tetrahydroquinoline-Isoxazole/Isoxazoline Hybrid Compounds as Potential Cholinesterases Inhibitors: Synthesis, Enzyme Inhibition Assays, and Molecular Modeling Studies*. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 5; doi:10.3390/ijms21010005
- Ökten, S., (2009). *Yeni Bir Yaklaşımla Bromokinolinlerin Seçici Sentezi ve Yeni Kinolin Türevlerinin Eldesi*, Doktora Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Ökten, S., Çakmak, O., Tekin, Ş., Köprülü, T.K., 2017, A SAR Study: *Evaluation of bromo derivatives of 8-substituted quinolines as novel anticancer agents*. Lett Drug Des Discov, 14:1415.

- Ökten, S., Eyigün, D., Çakmak, O., 2015, **Synthesis of brominated quinolines**, journal of engineering and natural sciences. Mühendislik ve Fen Bilimler Dergisi, 8(15), 7-8.
- Özabacıgil, F., (2005). **İnsan Eritrosit 6-fosfoglukonat Dehidrojenaz Enziminin Saflaştırılması, Bazı İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerine İn Vitro ve Tavşanlarda İn Vivo Etkisinin İncelenmesi**, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 6-9.
- Özcan, B., (2014). **İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkilerinin İncelenmesi**, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 169.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., Perry, R., 1999. **Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness**. Trends Neurosci. 22, 273-80.
- Sadashiva, C. T., Narendra Sharath Chandra, J.N., Ponnappa, K.C., Veerabasappa Gowda, T., Rangappa, K.S., 2006. **Synthesis and Efficacy of 1-[Bis(4-fluorophenyl)-methyl]piperazine Derivatives for Acetylcholinesterase Inhibition, as a Stimulant of Central Cholinergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease**, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 16, 3932-3936.
- Sargin, S., (2003). **Katı Kültür Fermantasyonu İle Ksilanaz Enzim Üretiminin Optimum Koşullarının Belirlenmesi**, Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir.
- Scarr, E., Dean, B., 2008. **Muscarinic receptors: do they have a role in the pathology and treatment of schizophrenia?** J Neurochem. 107(5): 1188-1195.
- Senturk, M., (2017). **Enzyme Inhibitors and Activators**, Edited by Murat Senturk. Publisher: IN-TECH. ISBN 978-953-51-3058-1
- Shen, T., Tai, K., Henchman, R.H. and Mccammon, J.A., 2002. **Molecular dynamics of acetylcholinesterase**. Accounts of Chemical Research, 35, 332-340.

- Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., and Silakari, O., 2013. ***Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection***, European Journal of Medicinal Chemistry, 70, 165-188.
- Sirvio J., (1999). ***Strategies that support declining cholinergic neurotransmission in Alzheimer's disease patients***. Gerontology, 45 Suppl 1: 3-14.
- Solomon, V.R. and Lee, H., 2011. ***Quinoline as a Privileged Scaffold in Cancer Drug Discovery***, Current Medicinal Chemistry, 18(10): 1488-1508
- Sönmez, Z.,(2016). ***Ebişke (Clitocybe GEOTROPA) Mantarından Saflaştırılıp Karakterize Edilen Endo-Beta 1,4-Mannanaz Enziminin, Magnetik Kitosan Nanopartiküller Üzerine İmmobilize Edilmesi ve Meyve Sularının Durultma İşleminde Kullanılması***, Yüksek lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 160.
- Sugimoto, H., Ogura, H., Arai, Y., Iimura, Y. and Yamanishi, Y., 2002. ***Research and Development of Donapezil Hydrochloride, A New Type of Acetylcholinesterase Inhibitor***: New Drug and Recent Technique Review, Japanese Journal Pharmacol., 89, 7-20.
- Sussman, J.L., Hare, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I., 1991. ***Science*** 253: 872–9.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Varon, L., Toker, L., Futerman, A.H., Silman, I., 1988. ***C. J. Mol. Biol.*** 203, 821-823
- Şahin, H.A., (2002). ***Asetilkolin, Kolinesterazlar ve Alzheimer Hastalığı***, Demans Dergisi, 2, 69-73
- Taslimi, P., Işık, M., Türkan, F., Durgun, M.,Türkeş, C , Gülçin, İ., et al., 2020. ***Benzenesulfonamide derivatives as potent acetylcholinesterase, α -glycosidase, and glutathione S-transferase inhibitors: biological evaluation and molecular docking studies***. ISSN: Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/tbsd20>

- Taslimi, P., Türkan, F., Cetin, A., Burhan, H., Karaman, M., Bildirici, I., et al., 2019. *Pyrazole[3,4-d]pyridazine derivatives: Molecular docking and explore of acetylcholinesterase and carbonic anhydrase enzymes inhibitors as anticholinergics potentials.* Bioorganic Chemistry 92 103213, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103213>
- Turhan, K., Pektaş, B., Türkan, F., Tuğcu, F. T., Turgut, Z., Taslimi, P., et al., 2020. *Novel benzo[b]xanthene derivatives: Bismuth(III) triflate-catalyzed one-pot synthesis, characterization, and acetylcholinesterase, glutathione S-transferase, and butyrylcholinesterase inhibitory properties.* Arch Pharm. 2020;353:e2000030, <https://doi.org/10.1002/ardp.202000030>
- Türkan, F., (2009). *Elmasından Polifenoloksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek lisans Tezi, Van yüzüncü yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van. 76.
- Türkan, F., (2015). *Karayemiş Meyvesinden (Prunus Laurocerasus L.) Glutasyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 130.
- Türkan, F., Taslimi, P., Mübarak Abdalrazaq, S., Aras, A., Erden, Y., Ufuk Celebioglu, H., et al., 2020. *Determination of anticancer properties and inhibitory effects of some metabolic enzymes including acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, alpha-glycosidase of some compounds with molecular docking study.* ISSN: 0739-1102 1538-0254 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/tbsd20>
- Türkoğlu, V., Çamaş, H., 1996. *Sığır Serum ve Eritrositlerinden Saflaştırılan Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Bazı Pestisitlerin İnhibisyon Kinetiklerinin Araştırılması.* Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniv. Sağlık Bilimleri Enst., Van.
- Wilkinson, D, Murray, J., 2001. *Galantamine: a randomized, double-blind, dose comparison in patients with Alzheimer's disease.* International Journal of Geriatric Psychiatry, 16: 852-857.

Wilson, I.B., Nachmansohn, D., 1954 . ***In Ion Transport Across Membranes.***
Academic Press Inc., New York. 35s. Web

Yalçın, G., (2018). Alzheimer Hastalığının Tedavisine Yönelik Yeni Önder Bileşiklerin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.204.

Yavuz, A.G., (2005). ***Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Gelistirilmesi,*** Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 12-15.

Yıldırımoglu, F., (2009). ***Kolesterol Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması,*** Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-22.

ÖZGEÇMİŞ

15.06.1986 tarihinde Iğdır'da doğdu, ilk, orta ve lise öğrenimini Iğdır'da tamamladı. 2012 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik bölümünde 2017 yılında mezun oldu. 2018 yılında Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ve Bilimleri bilim dalında Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır.

