



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SUDA ÇÖZÜNEBİLİR FTALOSİYANİN
BİLEŞİKLERİNİN ASETİLKOLİNESTERAZ VE
BÜTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR
ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nuri Mert DODO

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Arzu ÖZEL

TRABZON – 2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Nuri Mert DODO

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, tüm aile bireylerime ve kıymet verdiğim dostlarıma ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimde ilk olarak akademik tecrübelerini ve desteğini esirgemeyen, bana hep iyilikle yaklaşan hem akademik hem de hayat yolculuğumda zorlandığım noktalarda yardımını esirgemeyen çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ÖZEL'e;

Tezimin ilerleyişinde ve akademik hayatımın gelişiminde desteklerini esirgemeyen bu hayatta kardeş anlamında abim olarak tanımlayabileceğim saygıdeğer hocam olan Sayın Doç. Dr. Burak BARUT'a;

Lisansüstü eğitim dönemimde ve mesleki yaşantımda emeği geçen Biyokimya Ana Bilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma;

Bu tez kapsamında çalışma imkânı bulduğum Prof. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU, Doç. Dr. Suat SARI'ya;

Deneysel çalışmalarımda bana yardımcı olan kıymetli hocam Arş. Gör. Didem AKKAYA'ya,

Yürüdüğüm bu yolda desteklerini esirgemeyen, hayallerimin peşinden giderken bir kere bile şüphe duymayan canım aileme şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmamı, TYL-2025-16427 numaralı BAP06 projesi kapsamında maddi açıdan destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne desteklerinden dolayı teşekkür ediyorum.

Nuri Mert DODO

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

ix

ŞEKİLLER DİZİNİ

x

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xiii

ÖZET

xviii

ABSTRACT

xix

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

3

2.2. Başlıca Nörodejeneratif Hastalıklar

4

2.3. Alzheimer Hastalığı

5

2.3.1. Tanımı, Nozolojisi ve Tarihçesi

5

2.3.2. Alzheimer Hastalığı'nın Alt Tipleri ve Klinik Fenotipleri

5

2.3.3. Alzheimer Hastalığı'nın Epidemiyolojisi ve Küresel Yüğü

5

2.3.4. Alzheimer Hastalığı'nın Yaş, Genetik ve Diğer Değiştirilemez Risk Etmenleri

6

2.3.5. Alzheimer Hastalığı'nın Değiştirilebilir (Modifiye Edilebilir) Risk ve Koruyucu Etmenleri

6

2.3.6. Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Özellikleri ve Seyri

6

2.3.7. Alzheimer Hastalığı'nda Tanısal Yaklaşım: Klinik, Nöropsikoloji, Görüntüleme ve Biyobelirteçler

7

2.3.8. Alzheimer Hastalığı'nda Ayırıcı Tanı

8

2.3.9. Alzheimer Hastalığı'nda Prognoz, Yaşam Süresi ve Bakımı

8

2.4. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi

8

2.4.1. Genel Çerçevesi

8

2.4.2. Amiloid- β (A β) Hipotezi ve Mekanizmaları	9
2.4.3. Tau Hipotezi ve Nörofibriller Yığılıkları	9
2.4.4. Oksidatif/Nitrozatif Stres	9
2.4.5. Kolinergik Hipotez ve Kolinesterazlar	9
2.4.6. Nöroinflamasyon: Mikroglia, Astrositler ve Kompleman	10
2.4.7. Mitokondriyal Disfonksiyon ve Enerji Metabolizması	10
2.4.8. Proteostaz, Endolizozomal–Otofaji Aksi ve Vesiküler Trafik	11
2.4.9. Nörovasküler Ünite, Kan–Beyin Bariyeri (BBB) ve Damar Katkısı	11
2.4.10. Glifatik Sistem ve İnterstisyel Temizlenme	11
2.4.11. Sinaptik İşlev, Devre Fizyolojisi ve Ağ Düzeyi Değişimler	12
2.4.12. Metal Homeostazı, Kalsiyum Sinyali ve Diğer Modüller	12
2.5. Kolinesteraz Enzimleri (AChE ve BuChE)	12
2.5.1. Asetilkolinesteraz (AChE)	13
2.5.2. Bütilkolinesteraz (BuChE)	14
2.5.3. Farmakolojik Hedef Olarak Kolinesterazlar	14
2.6. Ftalosiyanınlar ve Metal Kompleksleri	14
2.6.1. Kimyasal Yapı ve Özellikler	15
2.6.2. Biyolojik Aktivite ve Farmakolojik Potansiyel	15
2.6.3. Kolinesteraz Enzimleri ile Etkileşim Olasılığı	16
2.7. Moleküler Modelleme ve Kenetleme Yöntemleri	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Araştırmada Kullanılan Ekipmanlar ve Malzemeler	19
3.1.1. Faydalanılan Cihazlar	19
3.1.2. Kimyevi Malzemeler	20
3.1.3. Araştırmada Kullanılan Bileşikler	21
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Solüsyon ve İçerikleri	23
3.2. İzlenilen Metot	25
3.2.1. Kolinesteraz Enzimlerinin Moleküler Kenetleme Modellemeleri	25
3.2.2. Kolinesteraz Enzimlerinin İnhibisyonu	26
3.2.3. Kolinesteraz Enzimlerinin Kinetik İncelemesinin Yapılması	27
3.2.4. Ftalosiyanın Bileşiklerinin DNA Nükleaz İncelemeleri	28
3.2.4.1. Ftalosiyanın Bileşiklerinin Hidrolitik Nükleaz Aktivitelerinin İncelenmesi	28
3.2.4.2. Ftalosiyanın Bileşiklerinin Bileşiklerin Fotonükleaz Aktivitesi	28

3.2.4.3. Ftalosiyanin Bileşiklerinin Oksidatif Nükleaz Aktivitelerinin İncelenmesi	29
3.2.4.4. Ftalosiyanin Bileşiklerinin Oksidatif Nükleaz Aktivitelerinin İncelenmesi	29
4. BULGULAR	30
4.1. Moleküler Kenetleme Analizlerinin İncelenmesi	30
4.2. Kolinesteraz Enzimlerinin İnhibisyonları	36
4.3. Enzim Kinetiğinin İncelenmesi	36
4.4. Ftalosiyanin Bileşiklerinin DNA Nükleaz Aktivitesinin İncelenmesi	44
4.4.1. Ftalosiyanin Bileşiklerinin Hidrolitik DNA Nükleaz Aktivitesinin İncelenmesi	44
4.4.2. Ftalosiyanin Bileşiklerinin Hidrolitik DNA Fotonükleaz Aktivitesinin İncelenmesi	45
4.4.3. Ftalosiyanin Bileşiklerinin Oksidatif DNA Nükleaz Aktivitesinin İncelenmesi	47
4.4.4. Ftalosiyanin Bileşiklerinin Oksidatif DNA Fotonükleaz Aktivitesinin İncelenmesi	48
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
6. KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	64

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Ekipman listesi	19
Tablo 2. Kullanılan kimyasallar	20
Tablo 3. Bileşikler	21
Tablo 4. 3PY.H ₂ O bileşiğinin asetilkolinesteraz (PDB ID: 1XLW) ile yapmış olduğu optimum (No:1) ve diğer varyasyonlarının bağlanma enerjileri ile RMSD alt ve üst sınır verileri	31
Tablo 5. 3PY.H ₂ O bileşiğinin bütirilkolinesteraz (PDB ID: 1XLW) ile yapmış olduğu optimum (No:1) ve diğer varyasyonlarının bağlanma enerjileri ile RMSD alt ve üst sınır verileri	34
Tablo 6. Ftalosiyenin bileşiklerinin AchE ve BuChE enzimlerine karşı IC ₅₀ değerleri	36
Tablo 7. Bileşiklerin AchE ve BuChE için kinetik parametreleri	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa	
Şekil 1.	2020 – 2050 yılları arasında Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nun 2024 yılındaki yaptığı çalışmaya göre Alzheimer ve Parkinson Hastalıklarının gelecek yıllarda öngörülen artış grafiği (Ali’den, (4))	1
Şekil 2.	Asetilkolinesteraz (sağda) ve Bütirilkolinesteraz (solda) enzimlerinin PDB (https://www.rcsb.org/)’den alınan şematize hali	13
Şekil 3.	Genel ftalosiyanin halka sisteminin yapısı	15
Şekil 4.	3PY.H ₂ Q bileşiğinin moleküler yapısı	21
Şekil 5.	3PY.NiQ bileşiğinin moleküler yapısı	22
Şekil 6.	3PY.CoQ bileşiğinin moleküler yapısı	22
Şekil 7.	3PY.H ₂ O bileşiğinin (sarı renkli) asetilkolinesteraz (PDB ID: 6NTO) ile yapmış olduğu optimum (No:1) molekülünün A zinciriyle yapmış olduğu moleküler kenetleme görüntüsü	31
Şekil 8.	3PY.H ₂ O bileşiğinin asetilkolinesteraz (PDB ID: 6NTO) ile yapmış olduğu optimum (No:1) molekülünün A zinciriyle yapmış olduğu aromatik etkileşimleri (A), hidrojen bağlarının gösterimi (B), hidrofobik etkileşimlerinin gösterimi (C) ve 2D olarak proteindeki aminoasitlerle etkileşim diyagramı (D)	32
Şekil 9.	3PY.H ₂ O bileşiğinin (sarı renkli) bütirilkolinesteraz (PDB ID: 1XLW) ile yapmış olduğu optimum (No:1) molekülünün zincirle yapmış olduğu moleküler kenetleme görüntüsü	34
Şekil 10.	3PY.H ₂ O bileşiğinin bütirilkolinesteraz (PDB ID: 1XLW) ile yapmış olduğu optimum (No:1) molekülünün A zinciriyle yapmış olduğu aromatik etkileşimleri (A), hidrojen bağlarının gösterimi (B), hidrofobik etkileşimlerinin gösterimi (C) ve 2D olarak proteindeki aminoasitlerle etkileşim diyagramı (D)	35
Şekil 11.	3PY.H ₂ O bileşiğinin AChE için Lineweaver-Burk Grafiği	37
Şekil 12.	3PY.H ₂ O bileşiğinin AChE için Dixon Grafiği	38

Şekil 13.	3PY.H ₂ O bileşiğinin BuChE için Lineweaver-Burk Grafiği	38
Şekil 14.	3PY.H ₂ O bileşiğinin BuChE için Dixon Grafiği	39
Şekil 15.	3PY.NiQ bileşiğinin AChE için Lineweaver-Burk Grafiği	40
Şekil 16.	3PY.NiQ bileşiğinin AChE için Dixon Grafiği	40
Şekil 17.	3PY.NiQ bileşiğinin BuChE için Lineweaver-Burk Grafiği	41
Şekil 18.	3PY.NiQ bileşiğinin BuChE için Dixon Grafiği	41
Şekil 19.	3PY.CoQ bileşiğinin AChE için Lineweaver-Burk Grafiği	42
Şekil 20.	3PY.CoQ bileşiğinin AChE için Dixon Grafiği	42
Şekil 21.	3PY.CoQ bileşiğinin BuChE için Lineweaver-Burk Grafiği	43
Şekil 22.	3PY.CoQ bileşiğinin BuChE için Dixon Grafiği	43
Şekil 23.	Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi (30 dakika 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2–4: DNA+ 3PY-H ₂ O (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 5–7: DNA + 3PY.NiQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 8–10: DNA + 3PY.CoQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 11–13: DNA + metilen mavisi (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon	45
Şekil 24.	Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA fotonükleaz aktivitesi (30 dakika beyaz ışık, 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2–4: DNA+ 3PY-H ₂ O (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 5–7: DNA + 3PY.NiQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 8–10: DNA + 3PY.CoQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 11–13: DNA + metilen mavisi (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon	46
Şekil 25.	Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA fotonükleaz aktivitesi (60 dakika beyaz ışık, 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2–4: DNA+ 3PY-H ₂ O (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 5–7: DNA + 3PY.NiQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 8–10: DNA + 3PY.CoQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 11–13: DNA + metilen mavisi (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon	47

μM) + Tampon; bant 11–13: DNA + metilen mavisi ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$) + Tampon

Şekil 26. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA oksidatif nükleaz aktivitesi (30 dakika beyaz ışık, 37°C). Bant 1: DNA kontrol ($1\ \mu\text{L}$ DNA + $9\ \mu\text{L}$ Tampon); bant 2: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon; bant 3–5: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + 3PY- H_2O ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$); bant 6–8: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + 3PY.NiQ ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$); bant 9–11: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + 3PY.CoQ ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$); bant 12–14: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + Metilen Mavisi ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$)

48

Şekil 27. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA foto-oksidatif nükleaz aktivitesi (30 dakika beyaz ışık, 37°C). Bant 1: DNA kontrol ($1\ \mu\text{L}$ DNA + $9\ \mu\text{L}$ Tampon); bant 2: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon; bant 3–5: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + 3PY- H_2O ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$); bant 6–8: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + 3PY.NiQ ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$); bant 9–11: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + 3PY.CoQ ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$); bant 12–14: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + Metilen Mavisi ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$)

49

Şekil 28. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA foto-oksidatif nükleaz aktivitesi (60 dakika beyaz ışık, 37°C). Bant 1: DNA kontrol ($1\ \mu\text{L}$ DNA + $9\ \mu\text{L}$ Tampon); bant 2: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon; bant 3–5: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + 3PY- H_2O ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$); bant 6–8: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + 3PY.NiQ ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$); bant 9–11: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + 3PY.CoQ ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$); bant 12–14: DNA + $\%2\ \text{H}_2\text{O}_2$ ve $1\ \text{mM}\ \text{FeSO}_4$ + Tampon + Metilen Mavisi ($10\ \mu\text{M}$ – $50\ \mu\text{M}$ – $100\ \mu\text{M}$).

50

KISALTMALAR, SİMGELER VE FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

A/T/N Sınıflandırması	A: amiloid; T: tau; N: nörodejenerasyon
AChE	Asetilkolinesteraz Enzimi
AH	Alzheimer Disease/Alzheimer Hastalığı
AICD	Amiloid Öncü Proteini Hücre İçi Alanı
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
AMPK	AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz
APOE ε4	Alfalipoprotein ε4 Aleli
APP	Amiloid Öncü Proteini
APPsα	Çözünür Amiloid Öncü Protein Alfa
APPsβ	Çözünür Amiloid Öncü Protein Beta
ATP	Adenozin Trifosfat
Aβ	Amiloid β Proteini
BBB	Kan Beyin Bariyeri
BuChE	Bütirilkolinesteraz Enzimi
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CAA	Serebral Amiloid Anjiyopati
CAG	Sitozin – Adenin – Guanin Trinükleotid
CDK-5	Sikline Bağımlı Kinaz-5
CDR	Klinik Demans Değerlendirme Ölçeği
CNS	Central Nervous System/Merkezi Sinir Sistemi
DASH	Hipertansiyonu Durdurmak İçin Beslenme Yaklaşımları
DLB	Lewy Cisimcikli Demans
DMSO	Dimetil Sülfoksit

DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit)
EB	Etidyum Bromür
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FDA	Amerika Birleřik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FDG – PET	Florodeoksiglukoz – Pozitron Emisyon Tomografisi
FTD	Frontotemporal Demans
GB	Gigabayt
GDS	Küresel Bozulma �l�eęi
GSK-3�	Glikojen Sentaz Kinaz-3�
HD	Huntington Disease/Huntington Disease
LTP	Uzun Süreli Potansiyasyon
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MCI	Hafif Bilişsel Bozukluk
MMSE	Mini Mental Durum Sınavı
MoCA	Demans İçin Montreal Bilişsel Değerlendirme
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
PAS	Periferel Anyonik Bölge
PBS	Fosfat Tampon Sistemi
PD	Parkinson Disease/Parkinson Hastalığı
PDB	Protein Data Bank
PKA	Protein Kinaz-A
PSEN1	Presenilin-1
PSEN2	Presenilin-2
ROS	Reaktif Oksijen Türleri

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD1	Süperoksit Dismutaz
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TBS	Tris-HCl Tamponu
TDP-43	Transaktif Yanıt DNA Bağlama Proteini
UV-Vis	Ultraviyole Visible
WHO	World Health Organization/Dünya Sağlık Örgütü
αCTF	α -Sekretaz ile Parçalanmış APP C-Terminal Ürünü
βCTF	β -Sekretaz ile Parçalanmış APP C-Terminal Ürünü

Simgeler Dizini

Å	Ångström
Co	Kobalt
Cu	Bakır
g	Gram
Glu	Glutamik Asit Aminoasidi
His	Histidin Aminoasidi
IC₅₀	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
kcal	Kilokalori
K_i	İnhibisyon Sabiti
K_m	Michaelis Sabiti
L	Doğrusal
M	Molar
mg	Miligram
mg	Miligram

mL	Mililitre
mM	Milimolar
Ni	Nikel
OC	Açık Dairesel
Phe:	Fenilalanin Aminoasidi
SC	Süper Sarmal
Ser	Serin Aminoasidi
TE	Tris-EDTA
Trp	Triptofan Aminoasidi
Tyr	Tirozin Aminoasidi
V₀	İlk hız
V_{max}	Maksimal Hız
Zn	Çinko
α	Alfa Sembolü
β	Beta Sembolü
γ	Gama
ΔG	Gibs Serbest Enerjisi
κ	Kappa
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
π	Pi Sembolü/Sayısı

Formüller Dizini

$^1\text{O}_2$	Singlet Oksijen
Co	Kobalt
Cu	Bakır
E.C.3.1.1.7	Asetilkolinesteraz enziminin sistematik isimlendirmesi
E.C.3.1.1.8	Bütirilkolinesteraz enziminin sistematik isimlendirmesi
Fe	Demir
H_2O	Su
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
Ni	Nikel
NiCl_2	Nikel (II) Klorür
O_2	Oksijen
O^{2-}	Süperoksit Anyonu
OH^-	Hidroksil İyonu
Zn	Çinko
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	Çinko (II) Asetat

ÖZET

Suda Çözünabilir Ftalosiyanin Bileşiklerinin Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibitör Etkinliklerinin Araştırılması

Nörodejeneratif hastalıklar, merkezi sinir sisteminin (CNS) ilerleyici hastalıklarıdır ve bu gruptaki hastalıkların en yaygın türü Alzheimer hastalığı (AH)'dır. Bu hastalar demans, bilişsel bozukluk ve kişilik değişikliği belirtileri gösterirler. Günümüzde tedaviler semptomatik terapilerle sınırlıdır ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmazlar. Bu nedenle, hastalığın patogeneziyle ilişkili yeni terapötik hedefleri belirlemek zorunludur.

Bu çalışmada, ftalosiyanin türevleri, moleküler kenetleme yöntemi kullanılarak *in silico* olarak AChE (Asetilkolinesteraz) ve BuChE (Bütirilkolinesteraz) enzimlerine karşı taranmıştır. Elde edilen serbest bağlanma enerjisi değerleri oldukça anlamlı ve enzimlerin aktif bölgelerindeki aminoasitlerle etkileşim gösterdiği, böylece yarışmalı inhibitör potansiyeli sunduğu belirlenmiştir. 3PY.H₂O bileşiğinin AChE ile -8.5 kcal/mol ve BuChE ile de -10.7 kcal/mol kuvvetli affinite bağlanma enerjisi göstermiştir. Bileşikler için enzim inhibisyon potansiyeli değerlendirilmiş, AChE için IC₅₀ değerleri 3PY.H₂O, 3PY.NiQ ve 3PY.CoQ için sırasıyla 6.17 ± 1.73 , 8.67 ± 0.97 ve 8.61 ± 0.88 µM olarak bulunmuştur. Kinetik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre üç ftalosiyaninin de yarışmalı inhibisyon yaptığı, en iyi yarışmalı inhibitör etkinliği 3PY.NiQ bileşiğine ait olup inhibitör etkinliklerinin 3PY.NiQ>3PY.CoQ>3PY.H₂O şeklinde olduğu görülmüştür. Bileşiklerin elektroforetik olarak incelenen DNA hidroliz, oksidatif ve fotonükleaz aktivitelerinde önemli ölçüde DNA hasarı gözlemlenmemiştir.

Elde edilen bulgular neticesinde bahsi geçen ftalosiyanin türevlerinin Alzheimer tedavisinde potansiyel ilaç adayları olabilecekleri görülmüştür. Sonraki yapılacak *in vivo* ve *in vitro* doğrulama yöntemleriyle güçlü bir olanak vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, DNA Nükleaz, Ftalosiyanin

ABSTRACT

Investigation of the Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Activities of Water-Soluble Phthalocyanine Compounds

Neurodegenerative diseases are defined as progressive diseases of the central nervous system (CNS). Alzheimer's disease (AD) is the most common type of disease in this group. The aforementioned patients manifest symptoms of dementia, cognitive impairment, and personality changes. At present, therapeutic interventions are confined to the administration of symptomatic therapies, with no efficacious strategies available to retard the progression of the disease. Consequently, there is an urgent need to identify new therapeutic targets associated with the pathogenesis of the disease.

In this study, phthalocyanine derivatives were screened *in silico* against AChE (Acetylcholinesterase) and BuChE (butyrylcholinesterase) enzymes using a molecular docking method. The binding energy values obtained were found to be of considerable significance, indicating an interaction with amino acids in the active sites of the enzymes. This suggests the potential for competitive inhibition. The compound 3PY.H₂O demonstrated strong binding affinities of -8.5 kcal/mol with AChE and -10.7 kcal/mol with BuChE. The enzyme inhibition potential of the compounds was evaluated, and the IC₅₀ values for AChE were found to be 6.17 ± 1.73 , 8.67 ± 0.97 , and 8.61 ± 0.88 μ M for 3PY.H₂O, 3PY.NiQ, and 3PY.CoQ, respectively. The results of the kinetic studies demonstrated that all three phthalocyanines exhibited competitive inhibition, with the 3PY.NiQ compound exhibiting the most effective competitive inhibitor activity. The inhibitor activities of the compounds were observed to be 3PY.NiQ > 3PY.CoQ > 3PY.H₂O. No significant DNA damage was observed in the electroforetically examined DNA hydrolysis, oxidative, and photonuclease activities of the compounds.

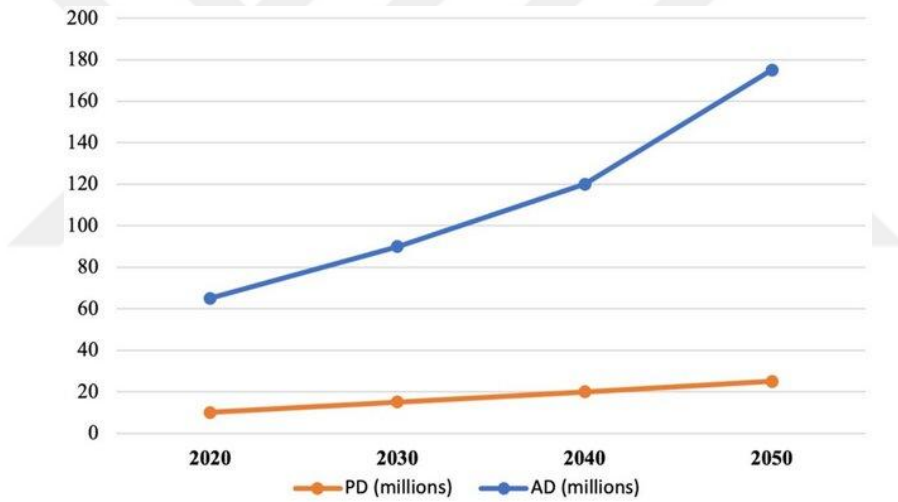
The findings suggest that the phthalocyanine derivatives previously referenced may have potential as drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. This finding offers a strong possibility for subsequent validation methods in both *in vivo* and *in vitro* contexts.

Keywords: Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, DNA Nuclease, Phthalocyanine

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nörodejeneratif bozukluklar, beyinde veya omurgada bulunan nöronların yapısını veya işlevini aşamalı olarak kaybettiği, semptomların genellikle ileri yaşta ortaya çıktığı ve bulaşıcı hastalıklar gibi denilebilecek kadar bir halk sağlığı sorunu teşkil eden bir bozukluk grubu olmuştur (1).

Bu bozukluklar arasında Alzheimer hastalığı (AH) en sık görülen olmuştur. Alzheimer hastalığı, bellek, düşünce, kavrama ve karar verme gibi bilişsel yetilerdeki bozulmalara yol açarak insanların yaşam kalitesine de büyük bir etki yapmaktadır (2). Küresel olarak, yaşlanma ile birlikte Alzheimer ve diğer nörodejeneratif hastalık vakalarında belirgin bir artış eğilimi bulunmaktadır. Bu durum, bireyler ve toplum arasında büyük bir sosyoekonomik yüke yol açmaktadır (3).



Şekil 1. 2020 – 2050 yılları arasında Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun 2024 yılındaki yaptığı çalışmaya göre Alzheimer ve Parkinson Hastalıklarının gelecek yıllarda öngörülen artış grafiği (Ali'den, 4)

AH'nin çok yönlü patofizyolojisine rağmen, kolinerjik etkinin AH'nin temel özelliklerinden biri olduğu iyi belgelenmiştir. Bazı kolinesterazların (AChE ve BuChE) sinaptik aralıktaki asetilkolin seviyelerini düşürerek bilişsel fonksiyonlarda düşüşe neden olduğunu bildirilmiştir. Bu nedenle, bu enzimlerin inaktivasyonu, hastalığın semptomlarını azaltmak için mevcut tedavi stratejilerinin ana odaklarından biri olmuştur (5).

Son yıllarda, biyolojik bir sistemde metal kompleksli bileşiklerin fizyolojik etkisi ilgi konusu olmuştur ve ftalosiyanın türevleri bu bakımdan önemli bir araştırma alanı

oluşturmuştur. Kanıtlanmış konjuge sistemler, stabilite ve metal kompleksleri oluşturabilme kabiliyeti nedeniyle, ftalosiyanimler biyolojik hedeflerle etkileşimde bulunabildiği bilinmektedir (6). Özellikle birkaç metal kompleksli ftalosiyanimin asetilkolinesteraz (E.C.3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (E.C.3.1.1.8) üzerindeki inhibitör kapasitesi incelemeye tabi tutulmuştur ve yeni bir jenerasyon kolinesteraz inhibitörlerinin alternatif temsilcileri olarak görülebilmektedir (7).

Bu çalışmada ise, bazı ftalosiyanim türevlerinin, farklı metal iyonları ile kompleks formlarında, AChE ve BuChE enzimlerine karşı olası inhibitör kapasitesini araştırmaya odaklanılmıştır. Bu bağlamda, bu bileşiklerin enzimlerin aktif bölgelerine bağlanma modları, moleküler yerleştirme çalışmaları tarafından açıklanmıştır. Ortaya çıkan veriler, bu bileşiklerin ileri düzeydeki inhibitörler olarak geliştirilebileceğine dair bir fikir verecektir. Çalışmanın amacı, ilaç keşfinde yararlı olabilecek potansiyel molekülleri bulmak ve bunların daha ileri biyolojik çalışmalarla doğrulanabilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar, CNS veya periferik sinir sisteminde zamanla yapısal ve işlevsel gerileme ile ayırt edilen kronik ve ilerleyici hastalıklar grubudur (8). Bu patoloji grubu, sinaptik iletişimin zarar görmesine, nöron kaybına ve bilişsel, motor ve davranışsal bozukluklara neden olmaktadır. Çoğu zaman kalıcı oldukları için, birey ve sağlık sistemi üzerinde önemli bir yük oluşturduğu bilinmektedir.

Bu hastalıkların patogeneğinde bir dizi moleküler ve hücresel mekanizma rol oynadığı görülmüştür. Proteinlerin yanlış katlanması ve birikimi, mitokondriyal hasar, oksidatif stres, hücre içi kalsiyum dengesizliği ve sürekli nöroinflamasyon, bu süreçte tanımlanan en yaygın patolojik değişikliklerdir (9). Bu mekanizmalar ayrıca AH'de β -amiloid ve tau, Parkinson hastalığında (PD) α -sinüklein ve Lewy cisimcikleri ve Huntington hastalığında huntingtin gibi bireysel hastalıklara özgü proteinlerin birikimiyle ilişkili olduğu görülmüştür (10).

Hastalık ilerledikçe, genellikle beynin belirli bölgelerinde sınırlı kalmaktadır. AH'de hipokampus ve serebral korteks, PD'de substantia nigra, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS)'de motor korteks ve omurilik gibi yapılar etkilenmektedir (11). Bu seçici duyarlılık, klinik semptomların dağılım paternini vurgulamaktadır.

Epidemiyolojik açıdan, nörodejeneratif hastalıkların insidansı küresel ölçekte giderek artmakta olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalıklar, yaşlanan nüfusun ortaya çıkmasıyla birlikte oldukça yüksek seyrettiği görülmüştür. Vaka oranının %60-70'ini oluşturan AH, hâlâ demansın en yaygın nedeni olmaya devam etmektedir. PD ise demansla ilişkili olmayan ikinci en yaygın nörodejeneratif bozukluk olduğu görülmüştür (12). Bu hastalıklar sadece kişisel düzeyde yaşam kalitesini düşürmekle kalmaz, aynı zamanda sağlık bakımı maliyetleri ve bakıcı yükü şeklinde nüfus düzeyinde önemli bir ekonomik yük oluşturduğu bilinmektedir (12).

Son araştırmalar, sadece genetik faktörlerin dışında; aynı zamanda çevresel toksinler, yaşam tarzı, inflamasyon ve yaşlanma sürecinin de bu hastalıkların patogeneğine anlamlı katkıda bulunduğunu göstermiştir (13). Ancak etiyoloji esas olarak çok faktörlü olmakla birlikte, şu ana kadar herhangi bir kesinlik bilinmemektedir. Sonuç olarak, bu hastalıkların

erken teşhisi ve önlenmesi ve yeni terapötik hedeflerin keşfi öncelikli araştırma alanlarına vesile olmuştur.

2.2. Başlıca Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıkların klinik ve patolojik özellikleri birbirinden farklıdır; ancak hücrel mekanizmalar bu hastalıklar arasında sıklıkla ortaklık söz konusu olmaktadır. Bunlar, sinir sisteminde bölgesel nöronal kayıp ve proteinli inklüzyonlar ile karakterize edilmektedir. Klinik belirtiler, hastalık tarafından hangi nöronal yapının etkilendiğine bağlı olduğu görülmüştür. Bazıları ağırlıklı olarak bilişsel işlevleri etkilerken, diğerleri motor anormalliklere neden olduğu bilinmektedir.

Bu bozukluklar arasında en tanınabilir olanları Alzheimer Hastalığı (AH), Parkinson Hastalığı (PD), Huntington Hastalığı (HD), Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Lewy Cisimciği Demansı'dır. Bu hastalıkların bazıları oldukça soyut denilebilecek vakalar olarak kendini gösterirken, bir kısmı kalıtsal mutasyonlar nedeniyle oluşmaktadır. Örneğin, HD'de, genetik faktörler tek başına hastalık patogenezi oluştururken, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında genetik yatkınlık ve çevresel etkilerin bir kombinasyonu olduğu düşünülmektedir (14).

Patolojik açıdan, belirli yanlış katlanmış proteinlerin birikimi, bu hastalıkların çoğunda baskın bir özellik olduğu görülmüştür. AH'de, β -amiloid plaklar ve hiperfosforile tau proteinleri görülürken, PD'de α -sinüklein lezyonları sıklaşmış; HD'de ise bu mutasyona uğramış huntingtin kalıntıları ve ALS'de ya TDP-43 ya da SOD1 kalıntıları biriktiği sonucuna ulaşılmıştır (10). Bu kümeler sinaptik iletimi bozarak nöral disfonksiyona neden olduğu bilinmektedir.

Oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, eksitotoksisite ve nöroenflamasyonun etkisi de bu hastalıkların evrimine yol açabilecek klasik mekanizmalardır (15). Klinik fenotip hastalığın türüne göre değişkendir; ancak çoğu hasta ilerleyici bir hastalığa sahiptir ve bu durum hastaların tek başına işlev görme yeteneğinde yıkıcı bir bozulmaya yol açtığı görülmüştür. Bu nedenle, her bir hastalığın inceliklerine ilişkin doğru bilgi, teşhis ve tedavi açısından oldukça önem arz etmektedir.

2.3. Alzheimer Hastalığı

2.3.1. Tanımı, Nozolojisi ve Tarihçesi

AH oldukça agresif seyirli, geri döndürülemez nitelikte nöronal kayıp ve sinaptik disfonksiyon olarak tanımlanan demansın en yaygın nedeni olmuştur (15). Klinik tablo tipik olarak episodik hafıza bozukluğu ile başlamakta ve zamanla yürütücü işlevler, dil, görsel-uzamsal beceriler ve davranış alanlarında çok alanlı bozulmalara yönelim göstermiştir (16). Hastalık 1906'da Alois Alzheimer'ın 51 yaşındaki Auguste Deter vakasını, nöritik plaklar ve nörofibriller yumaklar ile tarif etmesiyle literatüre kazanılmıştır (17). Güncel yaklaşım AH'yi, prelinik dönemden hafif bilişsel bozukluğa (MCI) daha sonra ise demans sürekliliği seyiri ile devam eden değerlendiren bir biyolojik hastalık çerçevesinde değerlendirilmektedir (11, 18). Bu çerçevede A/T/N biyobelirteç sınıflaması (A: amiloid; T: tau; N: nörodejenerasyon) hastalığın biyolojik tanımlanmasına imkan sağlamaktadır (11).

2.3.2. Alzheimer Hastalığı'nın Alt Tipleri ve Klinik Fenotipleri

Klasik formun yanı sıra atipik fenotipler de tanımlanmıştır: Posterior kortikal atrofi; görsel-uzamsal ve görsel algısal bozulmaların yer aldığı görülmüştür (16). Logopenik primer progresif afazi; akıcı konuşma sürse de sözcük bulmanın ve tekrar edilmesinin bozulması olarak tanımlanmaktadır (16). Davranışsal/yürütücü baskın varyant; frontal baskın bozulma ile seyrettiği görülmüştür (16).

Ayrıca erken başlangıçlı (≤ 65 yaş) otozomal dominant formlar Amiloid öncü proteini (APP), Presenilin-1 (PSEN1), Presenilin-2 (PSEN2) mutasyonları ile ilişkisi olmuş; başlangıç yaşı daha erken görüldüğü ve seyir genellikle hızlı bir şekilde ilerlediği saptanmıştır (16). Down sendromu (trizomi 21) olan bireylerde A β üretimi artışı nedeniyle yaşam boyu AH riski belirgin olarak yüksek olduğu görülmüştür (16).

2.3.3. Alzheimer Hastalığı'nın Epidemiyolojisi ve Küresel Yüğü

Dünya genelinde demans ile yaşayan kişi sayısı on milyonlar düzeyindedir ve olguların %60–70'i Alzheimer'dan kaynaklandığı bilinmektedir. (19). Artan yaşam süresi ve yaşlı nüfusun büyümesi nedeniyle önümüzdeki on yıllarda prevalans ve insidans artışının sürmesi öngörülmektedir (19). ABD'de 65 yaş ve üzeri milyonlarca kişi AH ile yaşamaktadır; demografik yaşlanma yükü sağlık ve bakım sistemleri üzerinde belirgin mali ve sosyal sonuçlar ortaya çıkarmıştır (15). Avrupa için bildirilen yaygınlık 65 yaş üstünde yaklaşık %7–9 bandında tespit edilirken; kadın cinsiyet daha yüksek prevalans ve daha uzun

yaşam süresiyle bağlantılı olduğu görülmüştür (20). Türkiye özelinde geniş örneklemli epidemiyolojik veriler sınırlı olmakla birlikte, yaşlı nüfus artışına paralel olarak olgu sayılarında belirgin yükseliş öngörülmektedir (21). Demans yükü; bakım maliyetleri, üretkenlik kaybı ve bakım veren yükü üzerinden toplum ölçeğinde önemli bir halk sağlığı problemi olmuştur (15, 20, 22).

2.3.4. Alzheimer Hastalığı'nın Yaş, Genetik ve Diğer Değiştirilemez Risk Etmenleri

İleri yaş en güçlü risk etmeni olmuştur; 65 yaşından sonra her 5 yılda risk yaklaşık iki katına çıktığı tespit edilmiştir (19, 20). Aile öyküsü ve Apolipoprotein – E (APOE ε4) aleli varlığı riski ifade eder ve genellikle daha erken başlangıcı betimlemektedir (23, 24). APOE ε4 doz-yanıt ilişkisi gösterir (tek/çift alel) (23). Ayrıca erkek-kadın farklılıkları (hormonel, yaşam süresi ve olası biyolojik etkiler) ve etnik farklılıklar rapor edilmiştir (23, 25). Genetik, monogenik formlar (APP/PSEN1/PSEN2) dışında geç başlangıçlı olguların çoğu polisentrik ve çevresel etmenlerle etkileşim içinde olduğu görülmüştür (24, 25).

2.3.5. Alzheimer Hastalığı'nın Değiştirilebilir (Modifiye Edilebilir) Risk ve Koruyucu Etmenleri

Vasküler risk kümeleri (hipertansiyon, diyabet, dislipidemi, obezite, sigara), kalitesiz eğitim görmek, işitme kaybı, fiziksel inaktivite, sosyal izolasyon, depresyon, uyku bozuklukları, hava kirliliği ve travmatik beyin hasarı gibi etmenler AH riskinde artışla bağdaştırılmıştır (25, 26). Kan basıncı kontrolü (özellikle orta yaşta) bilişsel gerileme riskini azaltabilmiş; yoğun tansiyon kontrolünün bilişsel sonuçlara olumlu etkisine dair randomize kanıtlar bulunmaktadır (27). Yaşam tarzı müdahaleleri (aerobik egzersiz, Akdeniz/Hipertansiyonu Durdurmak İçin Beslenme Yaklaşımları (DASH) benzeri beslenme, zihinsel-sosyal aktivite) için gözlemsel ve bazı müdahale çalışmalarından destek bulunmaktadır (26). Eğitim ve bilişsel rezerv kavramı, beyin patolojisi ile klinik belirti arasındaki uyumsuzluğu (klinik sessizlik) açıklamada önemli bir katkı sağlamıştır (26).

2.3.6. Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Özellikleri ve Seyiri

Erken evrede yakın dönem bellek bozukluğu (yeni öğrenmede güçlük, tekrarlayan soru sorma), planlama ve dikkat sorunları oldukça kendini göstermektedir (16, 28). Orta evrede dil (afazi), praksi ve agnozi bozuklukları, davranışsal belirtiler (apati, irritabilite, ajitasyon), uyku-ritim bozuklukları ve psikiyatrik komorbiditeler (depresyon, anksiyete) bunlara dahil olabilmektedir (28, 29). İleri evrede mobilite ve öz bakım kaybı, disfaji,

inkontinans ve enfeksiyonlara yatkınlık kaydedilmiş; mortalite genellikle enfeksiyon ve beslenme komplikasyonlarıyla bağlantılı olduğu görülmüştür (16, 30). Klinik seyir heterojen olabilmekte; erken başlangıçlı olgularda ilerleme daha hızlı olmaktadır (31). Fonksiyonel ve evrelemeye yönelik ölçekler arasında Klinik Demans Derecelendirme (CDR) ve Küresel Bozulma Ölçeği (GDS) yaygın kullanılmaktadır (32).

MCI, günlük yaşam aktiviteleri büyük ölçüde korunurken episodik bellek kusurunun gösterildiği geçiş evresini yansıtmakta olup, bir alt grubunda yıllık Alzheimer'a dönüşüm oranı arttığı gözlemlenmiştir (33). MCI tanısında nöropsikolojik testlerle objektif bozulmanın kanıtlanması ve işlevsellikte belirgin yıkımın olmaması esas olduğu bilinmektedir (33).

2.3.7. Alzheimer Hastalığı'nda Tanısal Yaklaşım: Klinik, Nöropsikoloji, Görüntüleme ve Biyobelirteçler

Klinik değerlendirme ayrıntılı anamnez, sistemik ya da nörolojik muayene ve bilişsel tarama testleri (Mini Mental Durum Sınavı; MMSE, Demans İçin Montreal Bilişsel Değerlendirme; MoCA) ile yapılabilmektedir (34, 35). Laboratuvar dataları (B12, tiroid fonksiyonları, enfeksiyon/metabolik taramalar) ve yapısal görüntüleme (Manyetik Rezonans Görüntüleme; MRI) ayırıcı tanıda rutin olarak tavsiye edilmektedir; MRI'da medial temporal atrofi ve parietal atrofi oldukça çok görülmüştür (18). Florodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografi (FDG-PET)'te posterior singulat-parietotemporal hipometabolizma, amiloid PET ve tau PET ise patolojiye özgü görüntüleme sağladığı görülmüştür (11, 16, 18).

BOS biyobelirteçleri: A β 42 düşüklüğü, toplam tau (T-tau) ve fosfo tau (P-tau) yüksekliği tipik biyokimyasal biyobelirteçler arasında olmuştur (18). Kan bazlı biyobelirteçler (plazma p-tau217, p-tau181, A β 42/40 oranı) tanısal doğruluğu yüksek görüldüğü ve klinik pratiğe yaklaşmakta olduğu saptanmıştır (36, 37). A/T/N çerçevesi, biyobelirteçlerle biyolojik AH tanımlamasını mümkün kılmakta birlikte; klinik sendromdan bağımsız olarak hastalığın evrenlenmesini desteklediği görülmüştür (11).

Tanı kriterleri: Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Bozukluklar ve İnme Enstitüsü ve Alzheimer Hastalığı ve İlgili Bozukluklar Derneği (NINCDS-AHRDA, 1984) temelleri üzerine inşa edilen Ulusal Yaşlanma Enstitüsü ve Alzheimer Derneği (NIA-AA, 2011) klinik kriterleri, olası/olası olmayan AH ayrımlarını ve biyobelirteçlerin destekleyici rolünü belirtmişlerdir (18). International Working Group 2 (IWG-2, 2014) ise amiloid/tau biyobelirteçleri ile epizodik bellek bozukluğu birlikteliğini baz almıştır (12). A/T/N (2018)

biyolojik sınıflama, araştırma ve artan ölçüde klinik kullanım için bir ortak dil olarak pekiştirilmiştir (11).

2.3.8. Alzheimer Hastalığı'nda Ayırıcı Tanı

Ayırıcı tanıda vasküler demans (çoklu infarkt/beyaz cevher hastalığı), Lewy cisimcikli demans (fluktuasyon, görsel halüsinasyonlar, Rapid Eye Movement, REM, uykusu davranış bozukluğu; dopaminerjik duyarlılık) ve frontotemporal demans (erken davranış/dil bozukluğu) belirlemede öncü olan konu başlıklarıdır (16, 28–30). Hipotiroidi, B12 eksikliği, ilaç yan etkileri, major depresyon gibi geri döndürülebilir nedenler mutlaka dışlanmalıdır (16, 18). Lewy cisimcikli demans (DLB) için 2017 konsensus kriterleri, VaD için modern tanı çerçeveleri ve Frontotemporal demans (FTD) için davranışsal/dil varyantlarına özgül ölçütler hastalığı belirlemede ışık tutan araçlar olmuştur (28, 30).

2.3.9. Alzheimer Hastalığı'nda Prognoz, Yaşam Süresi ve Bakımı

Tanı sonrası ortalama yaşam süresi 3–12 yıl arasında değişmekle birlikte, başlangıç yaşı, komorbiditeler ve fenotipe bağlı farklılıklar saptanmıştır (27). Bakım veren yükü (fiziksel, duygusal ve ekonomik) belirgin olmakla beraber; aile ve profesyonel bakım modelleri üzerindeki etkiler literatürde ayrıntılı gösterilmiştir (22). Çok disiplinli yaklaşım; hasta ve bakım veren eğitimi, güvenlik, beslenme, eşlik eden psikiyatrik semptomların yönetimi ve ileri bakım planlaması unsurlarını barındırmaktadır (15, 16).

2.4. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi

2.4.1. Genel Çerçevesi

AH; amiloid- β ($A\beta$) birikimi, tau patolojisi, sinaptik işlev bozukluğu, nöroinflamasyon, oksidatif stres ve nörovasküler ünite bozulması gibi çoklu eksenlerin zaman içinde etkileşimiyle şekillenen bir kapsama dahildir (38, 39). Nöropatolojik olarak nöritik plaklar ($A\beta$), nörofibriller yumaklar (tau) ve belirgin sinaptik/nöronal kayıp temel yaklaşımlar olmuştur (38, 40). Klinik patolojik korelasyon açısından tau yükü bilişsel yıkımla $A\beta$ 'den daha güçlü ilişki gösterirken, $A\beta$ birikiminin sürece başlatıcı/kolaylaştırıcı etkisine dair genetik ve biyobelirteç kanıtları oldukça sağlam temelli olduğu bilinmektedir (41–43).

2.4.2. Amiloid- β (A β) Hipotezi ve Mekanizmaları

A β , APP'in β -sekretaz (BACE1) ve γ -sekretaz ile ardışık kesimleri sonucu oluşur; A β 42 daha hidrofobik olup agregasyona daha elverişlidir (41). APP gen ikililikleri ve PSEN1/PSEN2 mutasyonları üretimi artırarak erken başlangıçlı ailesel formlara neden olmaktadır (41, 42). Özellikle oligomerik A β , Uzun süreli potansiyasyon (LTP)'yi baskılar, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionat reseptörü (AMPA)/N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) trafiğini bozduğu, kalsiyum dengesini alt-üst ettiği ve dendritik spine kaybını tetiklediği görülmüştür (38, 44). A β -PET ve Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) A β 42 düşüklüğü biyolojik tanıda "A" bileşenini ifade etmiştir (11, 18). Serebral amiloid anjiyopati (CAA) bağlamında damar duvarında A β birikimi perivasküler temizliği ve mikrovasküler bütünlüğü bozduğu bilinmektedir (45–47).

2.4.3. Tau Hipotezi ve Nörofibriller Yığınları

Mikrotübül bağlayıcı tau'nun hiperfosforilasyonu mikrotübül stabilitesini ortadan kaldırmakta; tau'nun somato-dendritik yer değiştirmesi sinaptik/dendritik işlevi sekteye uğrattığı görülmüştür (48). Braak evreleri entorinal-hipokampal başlangıçtan neokortekse yayılımı olarak ifade edilmektedir ve bilişsel çöküşle yakından bağdaştırılmıştır (40). Glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β), Sikline bağımlı kinaz 5 (CDK5) vb. kinaz aktivitesi artışı ile fosfataz etkinliğinde azalma fosforilasyon yükünü arttırmakta; tau tohumlarının bağlantısal yollar boyunca prion-benzeri yayılımı deneysel olarak gösterilmiştir (49, 50). Tau-PET topografik yayılım ve evrelemeyi daima göstermiştir.

2.4.4. Oksidatif/Nitrozatif Stres

Reaktif oksijen/azot türleri artışı; lipid peroksidasyonu, protein karbonilasyonu ve DNA/mtDNA hasarı eşleşmiştir (51). A β -metal (Cu, Zn, Fe) etkileşimi redoks döngülerini tetikleyerek Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) üretimini ve agregasyonu yükseltebildiği için "metal hipotezi" bu bağlamda geliştirilmiştir (52). Oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve A β /tau patobiyolojisi arasında çift yönlü bir kısır döngü olmaktadır (51).

2.4.5. Kolinergic Hipotez ve Kolinesterazlar

Nucleus basalis Meynert; kolinergic nöronlarında kayıp, kortikal kolinergic innervasyonda azalma ve kolin asetiltransferaz aktivitesinde bir düşüş gösterilmiştir (53, 54). Bu eksen, dikkat-öğrenme-bellek işlevlerindeki bozulmalarla erken dönemde birbirine bağlantılı olmakta ve kolinesteraz inhibitörlerinin semptomatik yararıyla klinikte

hedeflenebilir hale gelmiştir (23, 53). AChE ve BuChE aktivitelerindeki evresel farklılaşma inhibitör seçimini etkileyip, AChE-A β etkileşimi A β fibrillogenenezini kolaylaştırabilmektedir (23, 38).

2.4.6. Nöroinflamasyon: Mikroglia, Astrositler ve Kompleman

Nöroinflamasyon, seyri belirleyen dinamik bir eksendir. Mikroglia erken dönemde A β temizliği ve doku homeostazı için koruyucu yanıtlar üretir; ancak kronik uyarılma altında fenotip, proinflamatuvar ve sinaptotoksik bir profile evrilebilir (55). Miyeloid hücrelerde ifade edilen tetikleyici reseptör 2 (TREM2) varyantları mikrogliyal lipid metabolizması ve fagositoz programlarını bozarak riski artırır; “Hastalıkla İlişkili Mikroglia (DAM)” fenotipi bu bağlamda tanımlanmıştır (56, 57). NOD benzeri reseptör Pirin 3 (NLRP3) inflamasyonu ile İnterlökin 1 β (IL-1 β) gibi sitokinlerin kalıcı yükselmesi, sinaptik plastisiteyi zayıflatır ve tau patolojisini arttırdığı saptanmıştır (55).

Astrositlerin A1 nörotoksik fenotipe kayması glutamat homeostazını bozarak oksidatif stresi ve sinaptik yıkımını yükselttiği görülmüştür (58). Kompleman sistemi (C1q–C3) aracılı anormal sinaptik budama, deneysel modellerde erken sinaps kaybının başlıca sürücülerinden biri olarak doğrulanmıştır (31). A β birikimi mikrogliyal aktivasyonu tetiklerken, mikrogliyal/astrositik ürünler hem A β agregasyonunu hem tau hiperfosforilasyonunu basitleştirmektedir (48, 55).

2.4.7. Mitokondriyal Disfonksiyon ve Enerji Metabolizması

Oksidatif fosforilasyon verimliliğinin azalması, kompleks I/IV kusurları, mtDNA hasarı, kalsiyum homeostazı bozukluğu ve membran potansiyeli kırılabilirliği, nöronal enerji talebi-arz dengesini alt üst etmektedir (46, 51). Mitokondri-ER temaslarında kalsiyum aşırı yüklenmesi ve lipid alışverişindeki dengesizlik, A β üretimi ve tau fosforilasyonu üzerinde aşırı bir baskı oluşturmaktadır (59). İnsan çalışmalarında beyin insülin direnci ve IRS-1 serin fosforilasyonu artışı, glukoz kullanımında azalma ve FDG-PET’te hipometabolizma ile eş olduğu görülmüştür (51).

Füzyon/fizyon dengesinin fizyon lehine kayması (Drp1), aksonal taşıma ve sinaptik enerji desteğini bozar; mitofaji (PINK1/Parkin) akışındaki yavaşlama hasarlı organellerin birikimini fazlalaştırmaktadır (59–61). Bu kalite kontrol kusurları, oksidatif stres ve A β /tau toksisitesi arasında kendi kendini besleyen bir döngü oluşturduğu görülmüştür (46).

2.4.8. Proteostaz, Endolizozomal–Otofaji Aksi ve Vesiküler Trafik

AH beyninde erken endozom genişlemesi, Rab5 aktivasyon artışı ve APP/BACE1 trafiğinde bozulma, A β üretimini artıran bir mikroçevre oluşturur (62). Retromer (VPS35) yetmezliği endozomal geri taşıma sekteye uğratmakta; bu kusur hem A β metabolizması hem sinaptik reseptör döngüsü üzerinde derin etkilerin oluşturduğu bulunmuştur (39). Lizosomal asitlenme defektleri ve otofaji akışındaki tıkanma, A β /tau temizliğini zayıflatır; presenilin-1'in lizosomal pH düzenlenmesindeki rolü monogenik formlardaki lizosomal fenotipleri açıklamakta faydalı olmuştur (63, 64).

Stres altında Transkripsiyon faktörü EB (TFEB) aracılı lizosomal biyogenez ve otofaji programları rol oynamaktadır; ancak kronik yükte bu adaptasyon o kadar etkili olmadığı görülmüştür (65). Proteostatik ağırlık çoklu düğümlerindeki zayıflama, yalnız A β /tau agregasyonunu hızlandırmakla kalmaz; sinaptik protein çevrimi ve dendritik spine bütünlüğünü de bozmaktadır (46, 64).

2.4.9. Nörovasküler Ünite, Kan–Beyin Bariyeri (BBB) ve Damar Katkısı

Nörovasküler ünite (nöron-astrosit-endotel-perisit) bütünlüğü, kan akımı eşleşmesi, metabolik destek ve atık temizliği için oldukça önem arz etmiştir. AH'de BBB geçirgenliği artışı, perisit kaybı ve endotelyal disfonksiyon hem LRP1-aracılı A β dışı taşımasını zayıflatır hem RAGE üzerinden A β girişini basitleştirmektedir (22, 47, 66). CAA eşlik ettiğinde mikrovasküler kırılabilirlik ve mikrohemorajiler artmakta; bu durum kognitif düşüşü hızlandırabilmektedir (45, 46).

İnsan çalışmalarında BBB yıkımı, erken kognitif bozulmanın biyobelirteci olarak gösterilmiştir; APOE ϵ 4 bağlamında perisit/PDGFR β sinyalleme özel bir duyarlılık söz konusu olmuştur (67, 68). Nörovasküler bütünlüğün zayıflaması yalnız oksijen-glukoz arzını değil, glifatik/perivasküler temizleme yollarını da hasara yol açmaktadır (47, 69).

2.4.10. Glifatik Sistem ve İnterstisyel Temizlenme

Perivasküler (glifatik) akış, Aquaporin-4 (AQP4) kanalları aracılığıyla BOS'un arterlere komşu giriş-venüllere komşu çıkış yönlü hareketini sağlayarak A β ve metabolitlerin uzaklaştırılmasına fayda sağlamıştır (70). Uyku sırasında arteriyel pulsasyonlar ve ekstrasellüler boşluk hacmindeki değişim bu akışı oldukça fazlaca artırmakta; yaşlanma ve AQP4 kutuplaşma kaybı akış verimini azaltmaktadır (69).

Glifatik işlevin bozulması yalnız A β birikimini değil, tau taşınım/birikim dinamiklerini de etkileyebilir. Klinik çeviride uyku mimarisi ve vasküler sağlık hedefleri, glifatik akışın optimize edilmesi yoluyla patoloji yükünü azaltmaya dönük tamamlayıcı stratejiler olarak tartışılmaktadır (69, 71).

2.4.11. Sinaptik İşlev, Devre Fizyolojisi ve Ağ Düzeyi Değişimler

Sinaptik kayıp, bilişsel yıkımla en güçlü patolojik eşleşmeyi betimlemiştir (72). A β oligomerleri LTP'yi baskılar, AMPAR/NMDAR trafiğini bozar; interneuron (özellikle PV-pozitif) devre disfonksiyonu ve ağ hipereksitabilitesi ile son bulmaktadır (44, 73). Klinik olarak epileptiform etkinlik ve sessiz nöbetlere eğilim bildirilmiştir; ağ dengesizliği bilişsel belirtileri baskın kılmaktadır (74).

Tau'nun somato-dendritik yer değiştirmesi, mikrotübül-aktin etkileşimini, postsinaptik yoğunluk ve vezikül salınım mekaniklerini zedeler; böylece A β -kaynaklı sinaptotoksisite ile sinergik bir yıkım görülmektedir (44, 48). Varsayılan mod ağı bağlantı kayıpları ve hipokampal-neokortikal ileti bozuklukları, bilişsel rezerv ile etkileşerek klinik seyrine yön vermektedir (73).

2.4.12. Metal Homeostazı, Kalsiyum Sinyali ve Diğer Modüller

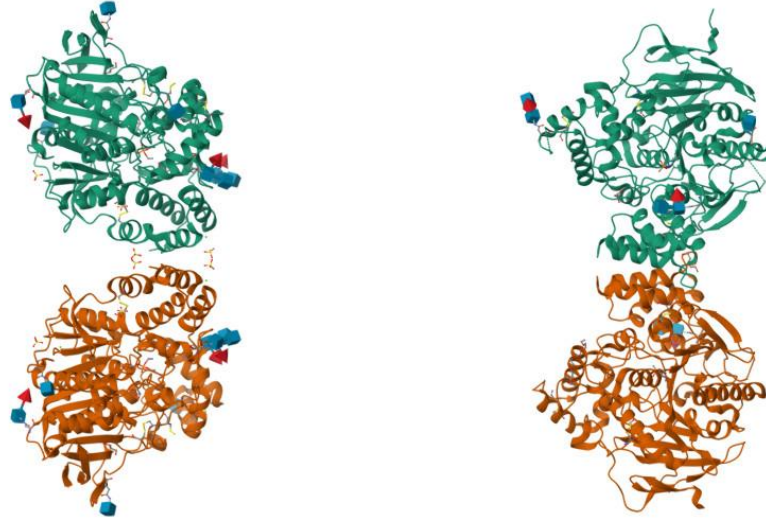
Cu, Zn, Fe dengesizlikleri A β ile metal-peptid etkileşimleri üzerinden agregasyonu ve ROS üretimini artırabildiği için, "metal hipotezi" bu bağlamda önem kazanmıştır (52, 75). Şelasyon/modülasyon yaklaşımları biyobelirteçlerde kısa dönem sinyaller üretse de geniş ölçekli etkinlik ve güvenilirlik soruları sürmektedir (76). Demir birikimi ve ferroptoz olası mekanistik ara yüzler olarak öne çıkmaktadır (75).

Kalsiyum sinyalleme, ER-mitokondri temas bölgelerinde akışın artmasıyla Adenozin trifosfat (ATP) üretimini zayıflatır, apoptoz/nekroptoz programlarını basitleştirdiği görülmüştür (59). Mikrobiyota-beyin eksenini ve sistemik inflamasyonla ilişkili fazla ilgi görse de nedensellik ve klinik çeviri başlıkları araştırma aşamasındadır (46, 59).

2.5. Kolinesteraz Enzimleri (AChE ve BuChE)

Kolinesterazlar, kolin esterlerini hidrolize eden serin proteaz grubuna ait enzimlerdir. Bu enzimler sinir sistemi, kas dokusu, karaciğer ve plazma gibi birçok dokuda bulunarak sinaptik iletimin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Kolinesteraz ailesinin en bilinen iki üyesi Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütirilkolinesteraz (BuChE) enzimleridir (77) (Şekil 2). AChE, esas olarak sinaptik boşluklarda yer alarak asetilkolinin hızlı bir şekilde

hidrolizini gerçekleştirmektedir. BuChE ise daha yaygın doku dağılımına sahip olup, asetilkolin ve diğer kolin esterlerini hidrolize etme kapasitesiyle dikkat çekmektedir.



Şekil 2. Asetilkolinesteraz (sağda) ve Bütirilkolinesteraz (solda) enzimlerinin PDB (<https://www.rcsb.org/>)’den alınan şematize hali

2.5.1. Asetilkolinesteraz (AChE)

AChE, sinaptik iletimin sonlandırılmasında görev alan yüksek özgülüğe sahip bir enzim olduğu bilinmektedir. Enzim, asetilkolini kolin ve asetik asit olmak üzere iki bileşene ayırmaktadır. Yapısal olarak, esteratik merkezinde bir katalitik triyad (Ser203-His447-Glu334) barındırmakta; bu triyad serin proteazlara özgü mekanizmanın temelini oluşturmaktadır (66). Enzim ayrıca anyonik bölge ve periferik anyonik bölge (PAS) olmak üzere bağlanmayı düzenleyen iki önemli alt bölgeye sahip olduğu görülmüştür. PAS, yalnızca substrat bağlanmasını değil, aynı zamanda Alzheimer hastalığında görülen β -amiloid agregasyonunun düzenlenmesini de etkileyebilecek potansiyele sahip olduğu görülmüştür (78).

Evrimsel açıdan bakıldığında, AChE antik bir proteindir ve sinir sistemi gelişmeden önce bile ilkel organizmalarda bulunmuştur. *Torpedo californica* ve *Electrophorus electricus* gibi türlerden izole edilen AChE izoenzimleri, kristal yapı analizleri için model sistemler olarak kullanılmıştır. İnsan AChE’si, bu evrimsel temelin kompleksleşmiş hâli olmakta ve farmakolojik olarak hedeflenmesi oldukça hassas mekanizmalar içerdiği bilinmektedir.

2.5.2. Bütirilkolinesteraz (BuChE)

BuChE, substrat özgülüğü daha düşük ancak katalitik cebinde daha geniş hacim barındıran bir enzim olduğu bilinmektedir. Karaciğer, plazma, böbrek ve glia hücrelerinde yaygın şekilde bulunmaktadır. AChE gibi asetilkolini hidrolize edebilse de, tercih ettiği substratlar arasında bütirilkolin, propiyonilkolin ve benzeri büyük esterler yer aldığı görülmüştür (79). BuChE'nin biyolojik rolü tam olarak net olmamakla birlikte, toksik kolin esterlerinin eliminasyonu ve nörotransmitter düzeylerinin düzenlenmesinde tamamlayıcı işlev gördüğü düşünülmektedir (80).

Alzheimer hastalığının ileri evrelerinde AChE aktivitesi azalırken, BuChE aktivitesi belirgin biçimde artışı saptanmıştır (81). Bu durum, farmakolojik açıdan BuChE'nin de hedef enzim olarak değerlendirilmesini gündeme getirmesini önemli kılmıştır. Bu bağlamda, hem AChE'yi hem de BuChE'yi inhibe edebilen dual inhibitörlerin geliştirilmesi, tedavi etkinliğini artırmak için araştırılmaktadır (29).

2.5.3. Farmakolojik Hedef Olarak Kolinesterazlar

AChE, günümüzde Alzheimer hastalığında onaylı ilaçların doğrudan hedefi olan bir enzim olduğu bilinmektedir. Donepezil, galantamin ve rivastigmin gibi ajanlar, kolinesteraz aktivitesini baskılayarak sinaptik boşluktaki asetilkolin düzeyini artırır ve böylece bilişsel fonksiyonları iyileştirmeyi amaçlamaktadır (29, 82). Bununla birlikte, bu ilaçlar hastalığın patofizyolojisine doğrudan müdahale edemediğinden, etki yalnızca semptomatik düzeyde sınırlı kalmaktadır.

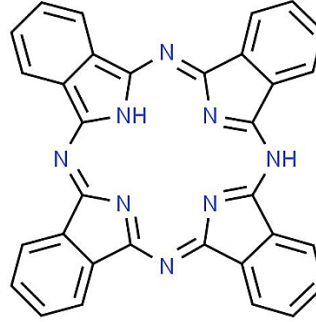
Kolinesterazların inhibitörlerle hedeflenmesi sadece nörodejeneratif hastalıklarla sınırlı olmadığı görülmüştür. Aynı zamanda organofosfat zehirlenmelerinde, anestezi sonrası sinir-kas blokajının çözülmesinde ve miyastenia gravis gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde de kolinesteraz inhibitörlerinden yararlanılmaktadır (83).

Bu nedenlerle, kolinesterazlar hem fizyolojik hem de farmakolojik açıdan kritik enzimler olup, biyokimya ile farmasötik bilimler arasında önemli bir köprü oluşturduğu görülmüştür.

2.6. Ftalosiyeninler ve Metal Kompleksleri

Ftalosiyeninler, porfirinlere benzer yapıya sahip, geniş konjuge aromatik sistem içeren makrosiklik bileşiklerdir (Şekil 3). Dört izoindol biriminin azometin köprüleriyle bağlanması sonucu oluşan düzlemsel yapıları sayesinde fotofiziksel ve kimyasal olarak

oldukça kararlı bir yapı oluşmuştur (84). Bu yapılar hem doğal pigmentlere hem de çeşitli biyolojik moleküllere yapısal benzerlik göstermekte; bu da onları biyolojik sistemlerde potansiyel etkileşim adayı hâline getirmektedir.



Şekil 3. Genel ftalosiyanin halka sisteminin yapısı

2.6.1. Kimyasal Yapı ve Özellikler

Temel ftalosiyanin iskeleti, π -elektron sistemleriyle zenginleşmiş aromatik bir halkaya sahiptir. Merkezinde dört azot atomu içeren iç boşluk, bir metal iyonu ile koordine olabilmektedir. Bu merkezi boşluk sayesinde çeşitli geçiş metallerini bağlayarak metal kompleksli ftalosiyaninler oluşturmaktadır (85). Bu kompleksler, koordinasyon geometrisine ve metal türüne bağlı olarak farklı elektronik, manyetik ve biyolojik özellikler sergilediği görülmüştür.

Ftalosiyaninler hem hidrojen bağları kurabilir hem de yüzey etkileşimleri (π - π stacking, Van der Waals vb.) ile biyomoleküllerle etkileşime girebilmektedir. Metal iyonu içeren kompleksler, yapının redoks özelliklerini, çözünürlüğünü ve bağlanma davranışlarını önemli ölçüde değiştirebilmektedir (86).

2.6.2. Biyolojik Aktivite ve Farmakolojik Potansiyel

Metal kompleksli ftalosiyaninlerin antioksidan, antibakteriyel, antikanser, antiviral ve enzim inhibitörü gibi çok sayıda biyolojik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (87). Özellikle biyokimyasal sistemlerde serbest radikal süpürücü etkileri, metal iyonları ile oluşturdukları redoks dengesizlikleri ve membranlarla etkileşim potansiyelleri araştırılmaktadır.

Eczacılıkta ftalosiyaninler özellikle fotodinamik tedavi (PDT) alanında kullanılmakta olup, ışıkla aktive edilebilen özellikleri sayesinde hedef hücrelerde sitotoksik

etkiler yaratabilmektedirler. Bunun dışında, kolinesteraz enzimleri gibi nörolojik hedeflerle etkileşim kurabilme kapasiteleri, bu bileşikler Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar açısından da potansiyel inhibitör adayları hâline getirmiştir (7).

2.6.3. Kolinesteraz Enzimleri ile Etkileşim Olasılığı

Aromatik yapıları sayesinde ftalosiyanın türevleri, kolinesteraz enzimlerinin anyonik ve periferik bağlanma bölgeleri ile π - π etkileşimler kurabilme potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Bu yapıların merkezi metal iyonları, enzimlerin aktif bölgesindeki amino asitlerle koordinasyon etkileşimleri oluşturabilmektedir (88). Bu sayede hem hidrojen bağı hem de metal-amin koordinasyonu ile enzim inhibitörü özellik kazanabildiği saptanmıştır.

Özellikle Zn(II), Cu(II), Co(II) ve Ni(II) gibi iyonlarla komplekslenmiş ftalosiyanınlerin asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BuChE) üzerindeki etkileri çeşitli *in vitro* çalışmalarla incelenmiştir. Bazı çalışmalarda bu komplekslerin enzim aktivitesini anlamlı düzeyde baskıladığı ve inhibitör olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir (89).

Bu yönüyle ftalosiyanınler, hem kimyasal çeşitlilikleri hem de biyolojik hedeflerle çok yönlü etkileşim kapasiteleri nedeniyle eczacılıkta yeni nesil inhibitör adayları arasında yer alma potansiyeline önemli ölçüde sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılarının sentetik olarak modifiye edilebilmesi, ilaç tasarımı açısından büyük bir avantaj sunmaktadır.

2.7. Moleküler Modelleme ve Kenetleme Yöntemleri

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı süreçlerinde, hedef protein ile potansiyel inhibitör molekül arasındaki etkileşimleri sanal ortamda analiz etmek amacıyla moleküler modelleme ve özellikle moleküler kenetleme teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler, deneysel çalışmalara başlamadan önce yapısal uygunluğu yüksek, etkinliği güçlü molekülleri önceden belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (90). Özellikle farmasötik biyokimya alanında, protein-ligand etkileşimlerinin enerji düzeyleri, bağlanma pozisyonları ve aktif bölge etkileşimleri üzerinden yorumlanması önemli olduğu bilinmektedir.

Moleküler kenetleme, ligandın bir hedef proteine nasıl ve ne şekilde bağlandığını öngören hesaplamalı bir simülasyon tekniği olarak tanımlanabilmektedir. Bu bağlanma sırasında oluşabilecek hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik bölgeler, π - π stacking gibi moleküller arası kuvvetler dikkate alınarak, bağlanma afinitesi ve uygunluğu

değerlendirilmektedir (91). Kolinesteraz enzimleri gibi hedeflerde yapılan bu çalışmalar, inhibitör adaylarının değerlendirilmesinde yaygın ve güvenilir bir yaklaşım olmaktadır.

Bu tez çalışmasında AutoDock 4.2 ve AutoDock Vina yazılımları kullanılmıştır. AutoDock 4.2, Lamarckian Genetic Algorithm ile en iyi bağlanma pozisyonlarını tahmin ederken; AutoDock Vina, gelişmiş skorlama fonksiyonu ve hızlı hesaplama kabiliyeti sayesinde çoklu ligand taramalarında oldukça etkili bir yöntem olmuştur (92).

AutoDock, özellikle akademik çevrelerde yaygın olarak tercih edilmektedir çünkü ücretsiz, açık kaynaklı ve güçlü bir validasyona sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, çinko-fitalosiyanın türevlerinin AChE ve BuChE üzerine etkileri, AutoDock kullanılarak değerlendirilmiş; bu bileşiklerin aktif bölge içindeki Trp86, Ser203 ve His447 kalıntılarıyla stabil bağlanmalar gösterdiği rapor edilmiştir (7).

Kenetleme çalışmalarında kullanılan diğer önemli programlar arasında:

MOE (Molecular Operating Environment): Kullanıcı dostu arayüzü ve farmakofor modelleme kabiliyetiyle bilinmektedir.

Schrödinger Glide: Yüksek doğruluklu skorlama fonksiyonu sayesinde FDA onaylı ilaçlara en yakın sonuçları veren sistemlerden biri olduğu bilinmektedir.

GOLD: Genetik algoritma temelli bir diğer güçlü platformdur, özellikle metalloproteinler için tercih edilmektedir.

SwissDock: Web tabanlı ve erişimi kolaydır, başlangıç seviyesindeki kenetleme uygulamaları için ideal olduğu görülmüştür.

FlexX: Fragment tabanlı kenetleme yaklaşımıyla özellikle yapı temelli molekül türetmelerinde kullanılmaktadır (93).

Örneğin Durmuş ve Ahsen (2010), tarafından yapılan bir çalışmada, metaloftalosiyanın bileşiklerinin kolinesterazlara karşı gösterdiği bağlanma profili değerlendirilmiş ve Cu(II)-komplekslerinin yüksek bağlanma skorlarına sahip olduğu gösterilmiştir (88). Benzer şekilde Arslan vd. (2020) tarafından yapılan bir başka çalışmada, ftalosiyanın türevleri GOLD ve AutoDock programlarıyla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir ve bağlanma modlarının büyük oranda örtüştüğünü bildirmiştir (89).

Bu veriler, moleküler kenetleme yazılımlarının ilaç keşfi sürecinde ne derecede önemli bir belirleyici olabileceğini göstermektedir. Kullanılan yazılımın seçimi, araştırmanın derinliği, hedef proteinin yapısı ve ligandların esnekliği gibi birçok faktöre

bağlı olmaktadır. Bu alışmada AutoDock ve Vina'nın tercih edilmesi, hem literatür desteği hem de yapı-temelli ligand tasarımına uygunluğu açısından bilimsel olarak temellendirilmiştir.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan Ekipmanlar ve Malzemeler

3.1.1 Faydanılan Cihazlar

Araştırmada kullanılan ekipman listesi Tablo 1’de ele alınmış olup listelenmiştir.

Tablo 1. Ekipman listesi

Ekipman Adı	Ticari Adı/Markası
Buzdolabı (2 – 8 °C)	Arçelik
Derin Dondurucu (-20°C)	Arçelik
Elektroforez Güç Kaynağı	BioRad Power Pac™ Basic
Hassas Analitik Terazî	Ohaus PA 2140
Isıtıcı	Wisd Hotplate MSH-20A
Jel görüntüleme sistemi	Bio Rad Universal Hood Imager Gel
Magnetik karıştırıcı	Dragon MS-H-Pro
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific Multiskan Go Thermo Varioskan, Singapur
Otomatik pipetler	Socorex
pH metre	Ohaus Starter 300
Vorteks	Visemix WM–10 Wisd
Yatay DNA elektroforezi	Biorad Wide Mini-Sub Cell GT System

3.1.2. Kimyevi Malzemeler

Araştırmada kullanılan kimyasal maddelerin listesi Tablo 2 belirtilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasallar

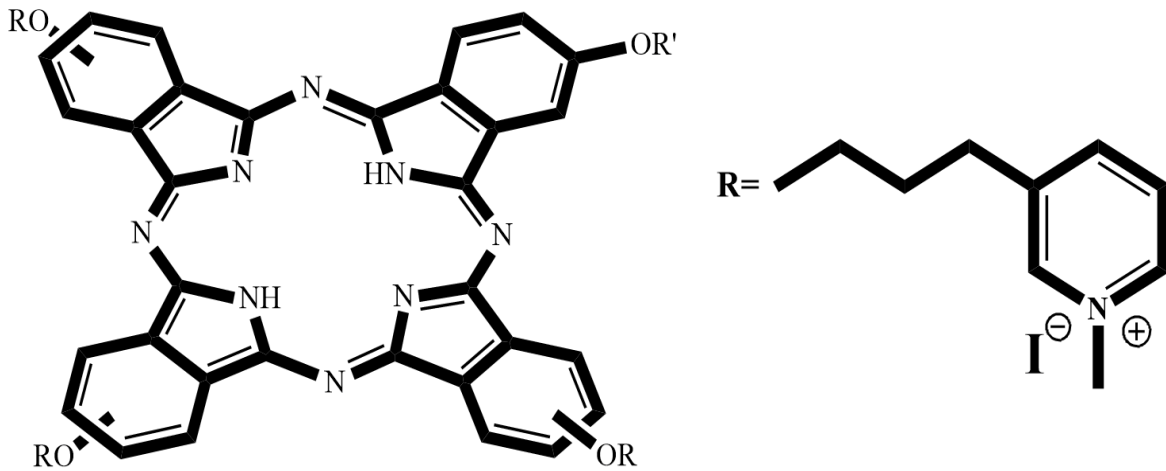
Kimyasal İsmi	Marka – Kodu
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Sigma, D8130
Agaroz	Sigma, A9539
Asetik asit	Sigma, A6283
Asetilkolinesteraz	Sigma, C3389
Asetiltiyokolin iyodür (ATCI)	Sigma, A5751
Bromofenol mavisi	Sigma, B0126
Bütirilkolinesteraz	Sigma, C1057
Bütiriltiyokolin iyodür (BTCl)	Sigma, 20820
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, 472301
Etidyum bromür (EB)	Sigma, E7637
Etilendiamin tetraasetik asit disodyum (EDTA-Na ₂)	Sigma, E5134
Galantamin	Sigma, G1660
Gliserol	Sigma, G5516
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma, 216763
Ksilen siyanol	Sigma, X4126
pBR322 plasmid DNA	Thermo Scientific, SD0041
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, L3771
Trisma baz	Sigma, 93362

3.1.3. Araştırmada Kullanılan Bileşikler

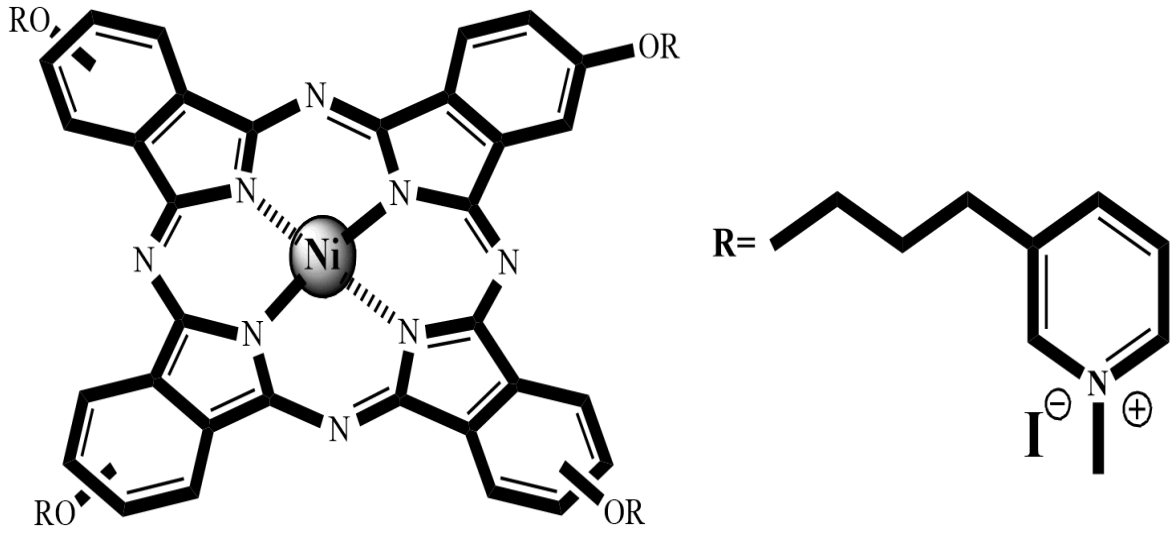
Bu çalışma kapsamında kullanılan bileşikler Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Anorganik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU ve araştırma grubu tarafından sentezlenmiş olup, çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu bileşiklere ait bilgiler aşağıdaki Tablo 3'te sunulmuştur ve Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6'da moleküler yapıları gösterilmiştir.

Tablo 3. Bileşikler

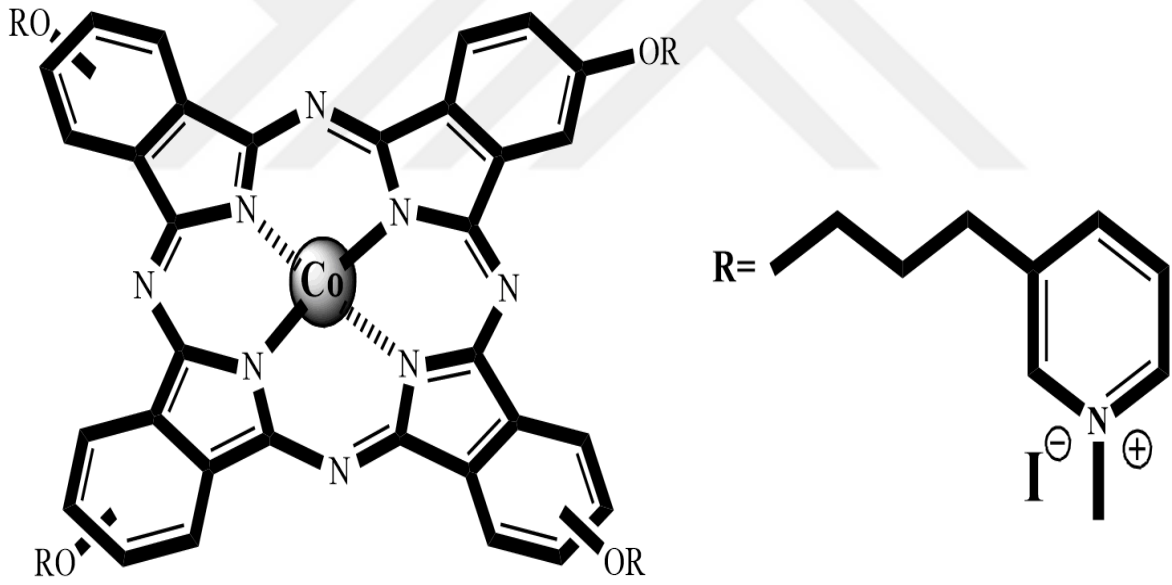
İsimlendirmesi	Bileşiğin Kodu
2(3),9(10),16(17),23(24)-Tetrakis-(3-piridin-3-ilpropoksi)ftalosiyanın iyodür	3PY.H₂Q
2(3),9(10),16(17),23(24)-Tetrakis-(3-piridin-3-ilpropoksi)ftalosiyaninato nikel(II) iyodür	3PY.NiQ
2(3),9(10),16(17),23(24)-Tetrakis-(3-piridin-3-ilpropoksi)ftalosiyaninato kobalt(II) iyodür	3PY.CoQ



Şekil 4. 3PY.H₂Q bileşiğinin moleküler yapısı



Şekil 5. 3PY.NiQ bileşiğinin moleküler yapısı



Şekil 6. 3PY.CoQ bileşiğinin moleküler yapısı

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Solüsyon ve İçerikleri

50 mM Tris-HCl (pH 8) Tamponu (TBS)

1.514 g trisma baz tartılmıştır. Saf su ile çözülüp hacmi 225 mL'ye tamamlandıktan sonra, seyreltik HCl ile pH 8'e ayarlanıp, saf su ile hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.

Yürütme Tamponu (10×TAE) (pH 8)

24.20 g trisma baz, 5.60 mL asetik asit, 10 mL 0.5 M EDTA son hacim 500 mL olacak şekilde saf su içerisinde çözülüp, 4 °C'de saklanmıştır.

% 0.8'lik Agaroz Jel

800 mg agaroz tartılıp, 100 mL TAE (x1) çözeltisi ilave edildikten sonra, ısıtıcı yardımıyla kaynatılarak çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra soğutulan çözeltiye 7 µL EB (5 mg/mL) ilave edilerek agaroz jel tankına dökülüp soğuması beklenmiştir.

Agaroz Jel Yükleme Boyası

1 g SDS (%10), 20 mg bromofenol mavisi (% 0.2), 20 mg ksilen siyanol (% 0.2) ve 3 mL gliserol (%30) içerecek şekilde saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

50 mM Tris-HCl (pH 7) Tamponu

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

%2 (h/h) H₂O₂ Çözeltisi

Stok H₂O₂ çözeltisinden 200 µL alınarak, saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

AChE Stok Enzim Çözeltisi

1 mg AChE tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 14.9 U/mL asetilkolinesteraz enzimi içermektedir. Bu enzim çözeltisi -20°C'de saklanmıştır.

BuChE Stok Enzim Çözeltisi

1 mg BuChE tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 12.62 U/mL bütirikolinesteraz enzimi içermektedir. Bu enzim çözeltisi -20°C'de saklanmıştır.

0.2 U/mL AChE Enzim Çözeltisi

Önceden hazırlanan AChE stok enzim çözeltisinden 134.23 µL alınarak 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

0.2 U/mL BuChE Enzim Çözeltisi

Önceden hazırlanan BuChE stok enzim çözeltisinden 158.48 µL alınarak 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

3 mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) Çözeltisi

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) maddesinden 12 mg tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp aynı tamponla hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

15 mM Asetiltiyokolin iyodür (ATCI) Çözeltisi

43.37 mg ATCI tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

60 mM Asetiltiyokolin iyodür (ATCI) Çözeltisi

173.48 mg ATCI tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

15 mM Bütiriltiyokolin iyodür (BTCI) İyodür Çözeltisi

45.17 mg BTCI tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

60 mM Bütiriltiyokolin iyodür (BTCI) Çözeltisi

180.68 mg BTCI tartılıp 8 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözündürülüp hacmi 10 mL'ye aynı tamponla tamamlanmıştır.

0.01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (10×PBS)

10 adet PBS tableti balon jojenin içerisine konuldu, saf su ile hacmi 900 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 7.4'e ayarlanıp saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Otoklavlanan çözelti, +4 °C'de saklanmıştır.

Tripsin-EDTA Çözeltisi

200 mg tripsin, 40 mg EDTA tartıldı, PBS çözelti ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 0.22 µm çapındaki steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

%20 (h/h) DMSO Çözeltisi

Stok DMSO çözeltisinden 20 mL alınarak, saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

%0.5 (h/h) DMSO Çözeltisi

Stok DMSO çözeltisinden 500 µL alınarak, saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2. İzlenilen Metot

3.2.1. Kolinesteraz Enzimlerinin Moleküler Kenetleme Modellemeleri

Kolinesteraz enzimleri ile ftalosiyenin türevleri arasındaki olası bağlanma modlarının belirlenmesi amacıyla moleküler kenetleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm hesaplamalı çalışmalar, Windows 11 tabanlı bir işletim sisteminde, çok çekirdekli işlemci ve 32 GB RAM donanım konfigürasyonu kullanılarak yürütülmüştür.

Ligand Hazırlığı: Çalışmada kullanılan ftalosiyenin türevleri öncelikle ChemDraw Ultra 12.0 programında (CambridgeSoft) iki boyutlu (2D) olarak çizilmiş, ardından MarvinSketch (ChemAxon) yazılımı ile yapı optimizasyonları yapılmıştır. Bu yapılar, üç boyutlu (3D) formatta Avogadro (Version 1.2.0) yazılımında enerji minimizasyonuna tabi tutulmuştur. Hesaplamalarda, moleküllerin konformasyonel esnekliği dikkate alınarak Merck Molecular Force Field (MMFF94) uygulanmıştır.

Protein Hazırlığı: Asetilkolinesteraz (AChE; PDB ID: 6NTO) ve bütirilkolinesteraz (BuChE; PDB ID: 1XLW) kristal yapıları, Protein Data Bank (PDB) veri tabanından indirildikten sonra PyMOL (Schrödinger, LLC) ve Discovery Studio 2021 Client yazılımları ile temizlenmiştir. Bu aşamada ligand dışı moleküller, su molekülleri ve kofaktörler uzaklaştırılmış; polar hidrojen atomları eklenmiş ve Gasteiger yükleri atanmıştır.

Format Dönüşümü: Ligand ve protein dosyalarının kenetleme yazılımına uygun formata dönüştürülmesi için Open Babel GUI kullanılmıştır. Böylece tüm yapılar “pdbqt” formatına çevrilerek diğer programlarda kullanılmak üzere hazırlanması yapılmıştır.

Kenetleme İşlemleri: Moleküler kenetleme analizleri AutoDock 4.2 ve AutoDock Vina yazılımları kullanılarak yürütülmüştür. Kenetleme öncesinde bağlanma bölgeleri, literatürde raporlanan aktif bölge amino asitleri referans alınarak (ör. AChE için Trp86, Tyr337, Phe338; BuChE için Trp82, Tyr332, His438) belirlenmiştir. Grid kutusu boyutları, ligandın tüm bağlanma cebini kapsayacak şekilde ayarlanmıştır (AChE: 120×112×108 Å; BuChE: 74×68×90 Å). Skorlama fonksiyonu olarak bağlanma serbest enerjisi (ΔG , kcal/mol) değeri esas alınmıştır. AutoDock Vina analizleri, daha hızlı hesaplama ve doğrulama amacıyla tekrarlanmıştır.

Görselleştirme ve Etkileşim Analizi: Kenetleme sonuçları PyMOL ve Discovery Studio Visualizer ile üç boyutlu (3D) olarak; iki boyutlu (2D) etkileşim şemaları ise ChemSketch yazılımında hazırlanmıştır. Hidrojen bağları, π - π stacking etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler ve metal-ligand koordinasyon bağları detaylı olarak işaretlenmiştir.

Veri Değerlendirme: Elde edilen bağlanma serbest enerjileri, inhibitör etkinlik sonuçları ile karşılaştırılarak yapısal-etkinlik ilişkisi (SAR) analizi yapılmıştır. En düşük ΔG değerine sahip bağlanma pozisyonları, farmakofor özellikleri açısından ayrıca incelenmiştir.

3.2.2. Kolinesteraz Enzimlerinin İnhibisyonu

AChE ve BuChE inhibisyonlarının belirlenmesinde, spektrofotometrik Ellman yöntemi (58) 96 kuyucuklu mikrolaka formatına uyarlanarak uygulanmıştır. Deneylerde enzim kaynağı olarak elektrik balığından izole edilmiş AChE ile at serumundan elde edilmiş BuChE kullanılmıştır. Kolinesteraz aktivitesinin izlenmesinde substrat olarak asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin iyodür; kromojen olarak ise 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoik) asit (DTNB) tercih edilmiştir. Hidrolizle açığa çıkan tiyokolin ile DTNB'nin oluşturduğu sarı ürünün absorbanısı 412 nm'de ölçülmüştür.

Çalışmada kullanılan bileşikler 10 mM stok çözeltisi DMSO kullanılarak hazırlanmıştır. Kontrol ve bileşikler 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) ile çözülerek son konsantrasyonları 0.01–30 μ M olacak şekilde seyreltilmiştir. Çalışılan mikrolatedeki tüm kuyucuklara 50 μ L 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) pipetlendikten sonra son konsantrasyonları 0.01–30 μ M olacak şekilde 25 μ L bileşik çözeltileri eklenmiştir. Negatif kontrol olarak ayrılan kuyucuklara 25 μ L 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) ilave edilmiştir. Daha sonra tüm kuyucuklara 125 μ L 3 mM DTNB çözeltisi çok kanallı otomatik pipet yardımıyla ilave edilmiştir. Stok enzim çözeltisinden 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) ile 0.2 U/mL konsantrasyonunda enzim çözeltileri hazırlanmıştır ve ilgili mikrokuyucuklara 25

μL 'lik karışımlar pipetlenmiş ve oda ısısında 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben her kuyuya, 15 mM derişimde hazırlanan substratlardan (asetiltiyokolin iyodür ya da bütiriltiyokolin iyodür) 25 μL eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Substrat hidroliziyle oluşan tiyokolin, DTNB ile tepkimeye girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat (TNB^-) kromoforunu meydana getirmiştir. Absorbanslar 412 nm'de Thermo Scientific Multiskan Go cihazı ile spektrofotometrik olarak kaydedilmiştir. AChE ve BuChE için inhibisyon yüzdeleri Eşitlik (1) kullanılarak hesaplanmış; bulgular, pozitif kontrol olarak kullanılan galantamin ile karşılaştırılmıştır. Tüm deneyler üç bağımsız tekrar halinde yürütülmüştür.

$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

A_1 = Bileşiklerin yer almadığı içeriğin absorbansı

A_2 = Bileşiklerin yer aldığı içeriğin absorbansı

3.2.3. Kolinesteraz Enzimlerinin Kinetik İncelemesinin Yapılması

Kinetik çalışmalarda, inhibisyon çalışmasında belirtilen deney protokolü uygulanmıştır. Fakat, inhibisyon yönteminden farklı olarak, bileşiklerin hesaplanan IC_{50} değerlerindeki konsantrasyonları baz alınarak dört adet konsantrasyon seçilmiştir. Konsantrasyonlardaki seçim şu şekilde olmuştur: Bileşiklerin hesaplanan IC_{50} değerlerindeki konsantrasyonundan düşük bir konsantrasyon, bileşiklerin hesaplanan IC_{50} değerlerindeki konsantrasyonları ve bileşiklerin hesaplanan IC_{50} değerlerindeki konsantrasyonlarından daha yüksek olan iki değer olarak belirlenmiştir. Substrat çözeltileri, ardışık seyreltmelerle 5–40 mM aralığını kapsayacak biçimde altı basamakta hazırlandı. Ölçümler, inhibitörün belirlenen derişimlerinde ve inhibitör bulunmayan durumda olmak üzere toplam beş koşul altında yürütüldü. Denemelerden elde edilen absorbans verileri, değişen substrat derişimleriyle ilişkilendirilerek Microsoft Office Excel 2013 ortamında analiz edildi; bu çıktılarından Lineweaver–Burk ve Dixon diyagramları oluşturuldu.

3.2.4. Ftalosiyanın Bileşiklerinin DNA Nükleaz İncelemeleri

3PY·H₂O, 3PY·CoQ ve 3PY·NiQ bileşiklerinin olası DNA nükleaz etkileri, model sistem olarak seçilen pBR322'nin süpersarmal plazmid formu üzerinde agaroz jel elektroforeziyle değerlendirildi. pBR322 plazmidi, nükleaz aktivitesinin saptanmasında literatürde yaygın biçimde başvuru bir DNA substratı olmuştur. Elektroforez altında süpersarmal (SC) form en yüksek mobilitayı gösterirken, bileşiklerle etkileşim sonrasında

tek iplikte meydana gelen kesiler “kırık/relaks” (OC) formu oluşturmakta ve bu formun göçü en yavaş olduğu bilinmektedir. Çift iplik kesisi geliştiğinde ise lineer (L) form ortaya çıkmaktadır. Oluşan form, süpersarmal ve kırık form arasında olacak şekilde göç ettiği bilinmektedir (94). Bu tez çalışması kapsamında 3PY-H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiklerinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA nükleaz aktivitesi oksidatif ajanların varlığında ve yokluğunda incelenmiştir.

3.2.4.1. Ftalosiyanın Bileşiklerinin Hidrolitik Nükleaz Aktivitelerinin İncelenmesi

3PY-H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiklerinin hidrolitik nükleaz etkilerini değerlendirmek üzere, farklı derişim basamaklarında hidrolitik ortamda bir tarama yürütülmüştür. Agaroz jel kuyuları 10 µL’lik yükleme hacmine göre hazırlanmıştır. Her kuyuda 1 µL pBR322 plazmid DNA, 7 µL tampon (50 mM Tris-HCl, pH 7) ve 2 µL bileşik çözeltisi (son derişimler 10, 50 veya 100 µM) birleştirilerek 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından yükleme boyası eklenen karışımlar agaroz jele uygulanmıştır. TAE koşma tamponu altında, 100 V ve 400 mA koşullarında 90 dakika elektroforez gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak Metilen Mavisi (MB) kullanılmıştır. Jel görüntüleri Bio-Rad Gel Doc XR System ile elde edilerek, nükleaz etki yüzdeleri Image Lab v4.0.1 yazılımı ile hesaplanması sağlanmıştır (95).

3.2.4.2. Ftalosiyanın Bileşiklerinin Bileşiklerin Fotonükleaz Aktivitesi

3PY-H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiklerinin beyaz ışık varlığında süpersarmal pBR322 plazmid DNA’nın fotonükleaz aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmada agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine 1 µL pBR322 plasmid DNA, 7 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)) ve 2 µL bileşiklerin artan konsantrasyonları (10, 50, 100 µM) ilave edilmiştir. Oluşturulan karışım 30 dakika ve 60 dakika süreyle ışığa (beyaz, 17.5 mw/cm²) maruz bırakılmıştır. Daha sonra, karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika jelde yürütülmüştür. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak Metilen Mavisi (MB) kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR System cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (95).

3.2.4.3. Ftalosiyenin Bileşiklerinin Oksidatif Nükleaz Aktivitelerinin İncelenmesi

Bileşiklerin nükleaz etkinliğinin, ortamda bulunan yardımcı ajanlara bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği bilinmektedir. Bu nedenle, oksidatif koşullardaki etkilerini incelemek amacıyla %2 (h/h) H₂O₂ yardımcı ajanı ile tarama gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel için kuyu karışımları toplam 10 µL hacimde standardize edildi: her bir karışım 1 µL (250 ng) pBR322 plazmid DNA, 5 µL 50 mM Tris-HCl (pH 7) tamponu, 2 µL H₂O₂ ve bileşik çözeltisinden 2 µL (son derişimler 10, 50 ve 100 µM) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Karışımlar 37 °C’de 60 dakika inkübe edildikten sonra yükleme boyası eklenerek agaroz jele aktarılmıştır. TAE koşma tamponu altında 100 V ve 400 mA uygulanarak 90 dakika elektroforez yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak Metilen Mavisi (MB) kullanılmıştır. Jel görüntüleri Bio-Rad Gel Doc XR System ile elde edilmiştir ve nükleaz aktivite yüzdeleri Image Lab v4.0.1 yazılımı ile hesaplanmıştır (95).

3.2.4.4. Ftalosiyenin Bileşiklerinin Oksidatif Nükleaz Aktivitelerinin İncelenmesi

Agaroz jel için kuyu yükleme hacmi 10 µL olarak standardize edilmiştir. Her bir kuyuya sırasıyla 1 µL pBR322 plazmid DNA, 5 µL 50 mM Tris-HCl (pH 7) tamponu, 2 µL yardımcı ajan ve 2 µL bileşik çözeltisi (son derişimler 10, 50 ve 100 µM) eklenerek karışımlar hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler beyaz ışık altında (17.5 mW/cm²) 30 ve 60 dakika olmak üzere iki farklı süreyle ışınlanmıştır. Bunu takiben yükleme boyası ilavesiyle örnekler agaroz jele aktarılmıştır. TAE koşma tamponu kullanılarak 100 V ve 400 mA koşullarında 90 dakika elektroforez uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak Metilen Mavisi (MB) kullanılmıştır. Jel görüntüleri Bio-Rad Gel Doc XR System ile kaydedilmiştir ve nükleaz aktivite yüzdeleri Image Lab v4.0.1 yazılımı aracılığıyla hesaplanmıştır (95).

4. BULGULAR

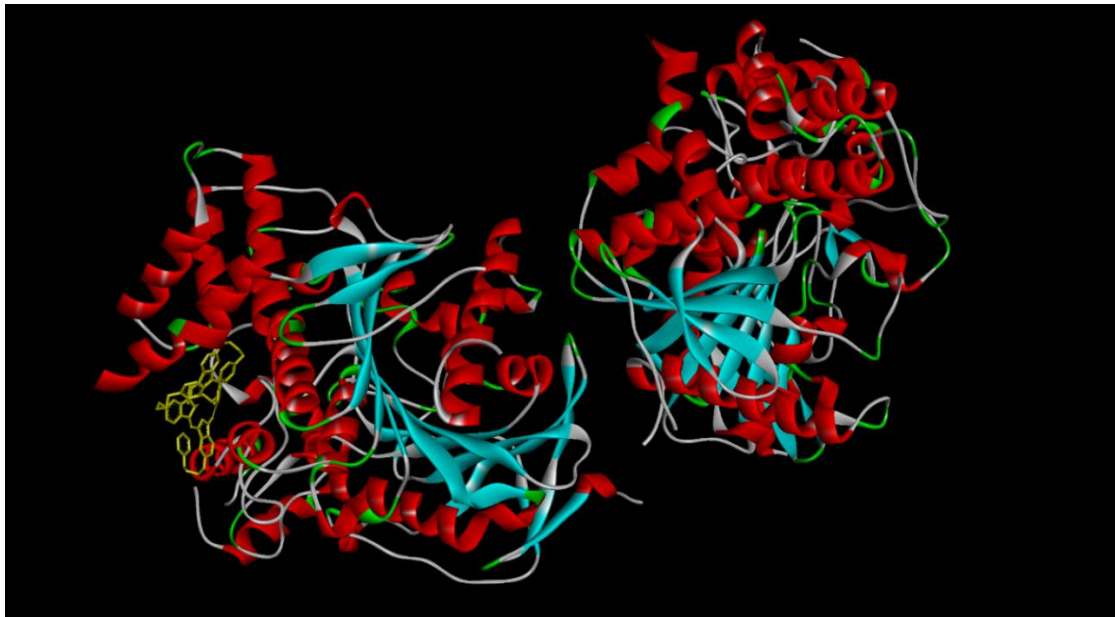
4.1. Moleküler Kenetleme Analizlerinin İncelenmesi

Kenetleme analizleri için sadece 3PY.H₂O bileşiği ile modelleme çalışması yapılmış olup, çıkan sonuçlar ftalosiyanin türevlerinin hedef enzimlerin aktif bölgelerine yüksek bağlanma afinitesi ile yerleştiğini göstermektedir. Diğer varyantlarının dahi enzimle vermiş olduğu reaksiyon oldukça güçlü olmuştur. Bağlanma serbest enerjileri (ΔG°), bileşiklerin inhibitör güçleri ile uyumlu olması bunu kanıtlamıştır; en düşük bağlanma enerjisine sahip bileşikler deneysel olarak da en güçlü inhibitör olduğu saptanmıştır (Tablo 4).

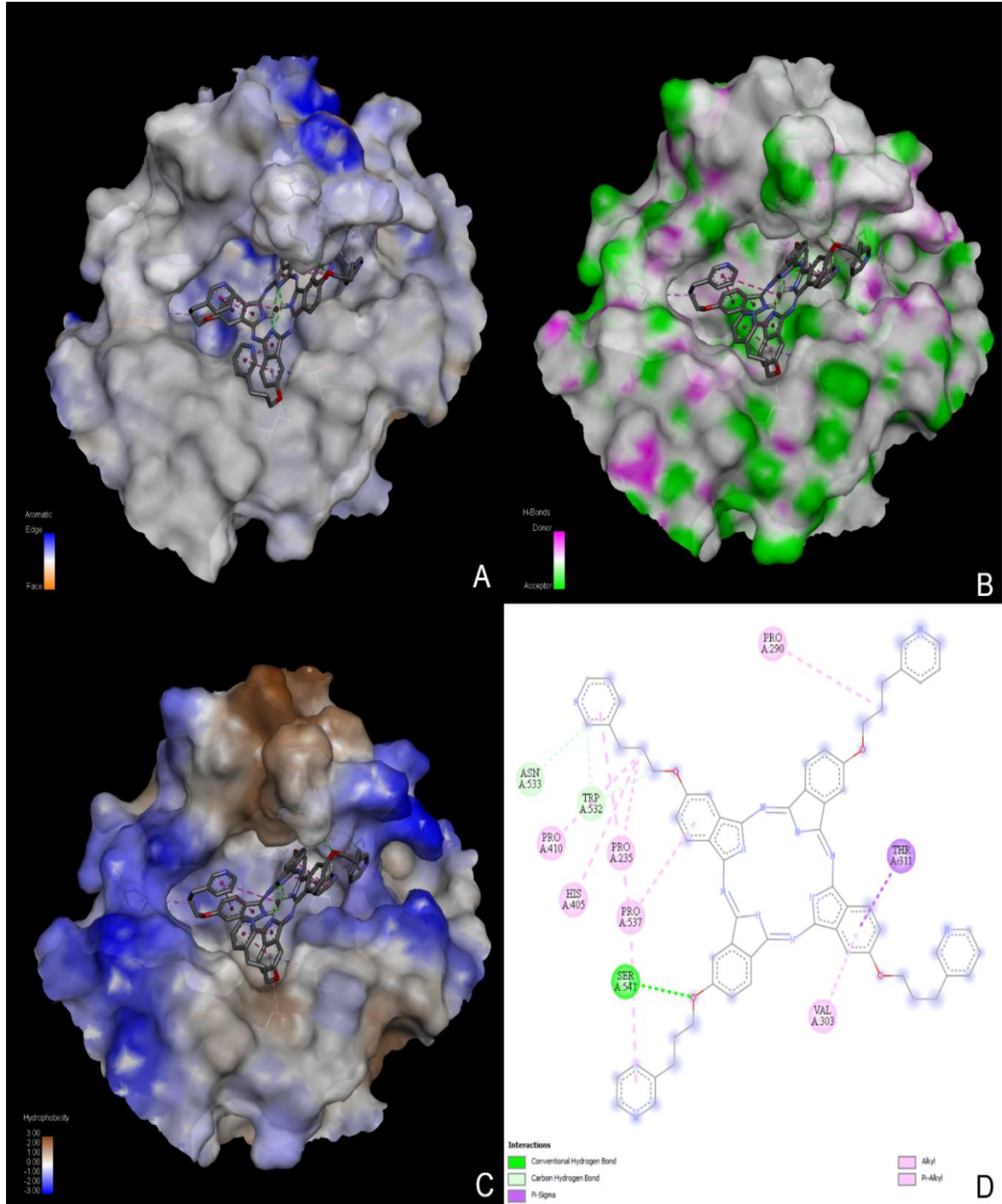
3PY.H₂O bileşiği asetilkolinesteraz enziminde A zinciriyle oldukça bağlanma afinitesi göstererek güçlü bir şekilde etkileşim göstermiştir (Şekil 7). Özellikle π - π etkileşimleri (Şekil 8A), hidrojen bağları (Şekil 8B), ve hidrofobik temaslar (Şekil 8C), enzim-ligand komplekslerinin stabilitesine katkıda bulunmuştur. 3PY.H₂O bileşiğinin, katalitik aktif bölgede kritik amino asit kalıntıları ile güçlü etkileşimler kurduğu görülmüştür. Özellikle ftalosiyanin halka sisteminde yer alan izoindol iskeletinde pirol halkasının asetilkolinesteraz enziminde bulunan GLU A:238 ile etkileştiği görülmüştür. İzoindolde yer alan benzen halkası ise özellikle THR A:311 ve VAL A:303 peptit kalıntılarıyla etkileşim göstermiştir. Yan grupta yer alan propiloksideki oksijen atomu SER A:541 ile hidrojen bağı yapmıştır; diğer bir grup pirimidin halkası da çeşitli aminoasit rezidüleriyle hidrojen bağı ve π -alkil etkileşimleri gösterdiği görülmüştür.

Tablo 4. 3PY.H₂O bileşiğinin asetilkolinesteraz (PDB ID: 6NTO) ile yapmış olduğu optimum (No:1) ve diğer varyasyonlarının bağlanma enerjileri ile RMSD alt ve üst sınır verileri

No	Affinite Enerjisi (kcal/mol)	En İyiden Uzaklık	
		RMSD Alt Sınır	RMSD Üst Sınır
1	-8,5	0,000	0,000
2	-8,3	65,933	72,262
3	-8,2	4,771	9,090
4	-8,2	68,429	73,676
5	-8,1	72,408	79,155
6	-8,1	4,543	7,929
7	-8,0	71,670	78,339
8	-8,0	65,641	71,778
9	-7,9	41,864	47,238



Şekil 7. 3PY.H₂O bileşiğinin (sarı renkli) asetilkolinesteraz (PDB ID: 6NTO) ile yapmış olduğu optimum (No:1) molekülünün A zinciriyle yapmış olduğu moleküler kenetleme görüntüsü



Şekil 8. 3PY.H₂O bileşiğinin asetilkolinesteraz (PDB ID: 6NTO) ile yapmış olduğu optimum (No:1) molekülünün A zinciriyle yapmış olduğu aromatik etkileşimleri (A), hidrojen bağlarının gösterimi (B), hidrofobik etkileşimlerinin gösterimi (C) ve 2D olarak proteindeki aminoasitlerle etkileşim diyagramı (D)

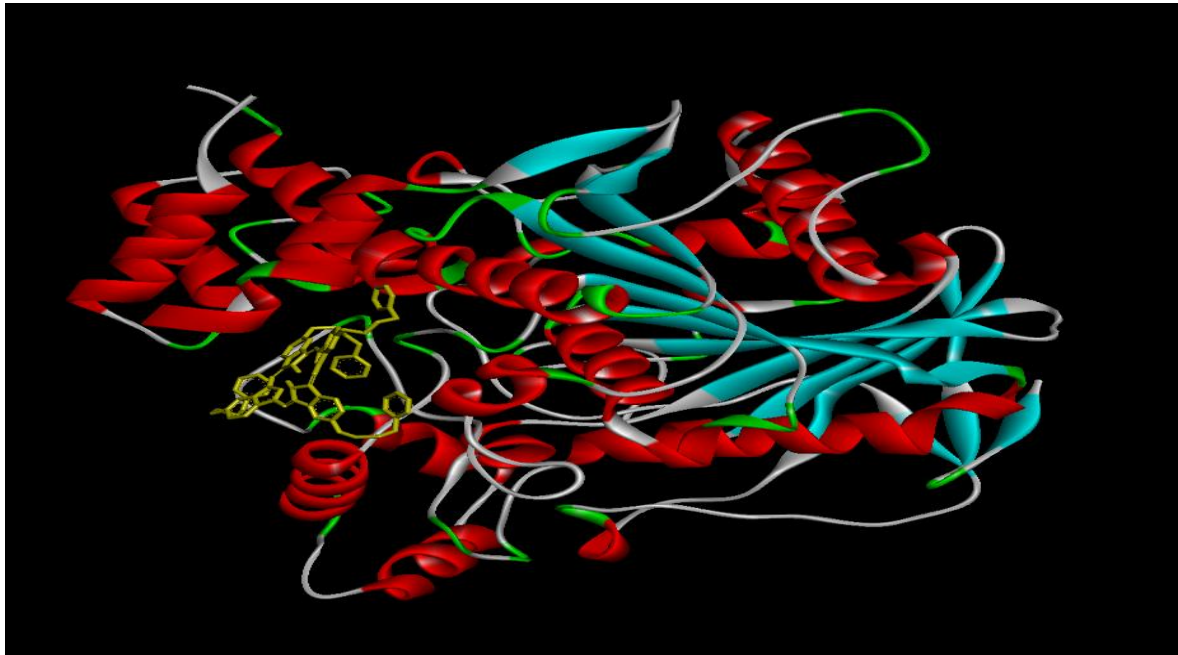
3PY.H₂O bileşiğinin bütirilkolinesteraz enzimiyle vermiş olduğu reaksiyon da oldukça kuvvetli olduğu görülmüştür. ΔG° , bileşiklerin inhibitör güçleri ile uyumlu olması bunu kanıtlamıştır (Tablo 5).

3PY.H₂O bileşiği bütirilkolinesteraz enzimi de oldukça yüksek bir bağlanma afinitesi göstererek güçlü bir şekilde etkileşim göstermiştir (Şekil 9). Özellikle π - π etkileşimleri (Şekil 10A), hidrojen bağları (Şekil 10B), ve hidrofobik temaslar (Şekil 11C), enzim-ligand komplekslerinin stabilitesine katkıda bulunmuştur. 3PY.H₂O bileşiğinin, asetilkolinesteraz enziminde olduğu gibi katalitik aktif bölgede kritik amino asit kalıntıları ile güçlü etkileşimler kurduğu görölmüştür. Özellikle ftalosiyanın halka sisteminde yer alan izoindol iskeletinde pirol halkasının bütirilkolinesteraz enziminde GLU A:238 ile etkileştiği görölmüştür. İzoidolde yer alan benzen halkası asetilkolinesteraz dan farklı olarak MET A:302 peptit kalıntısıyla etkileşim göstermiştir.

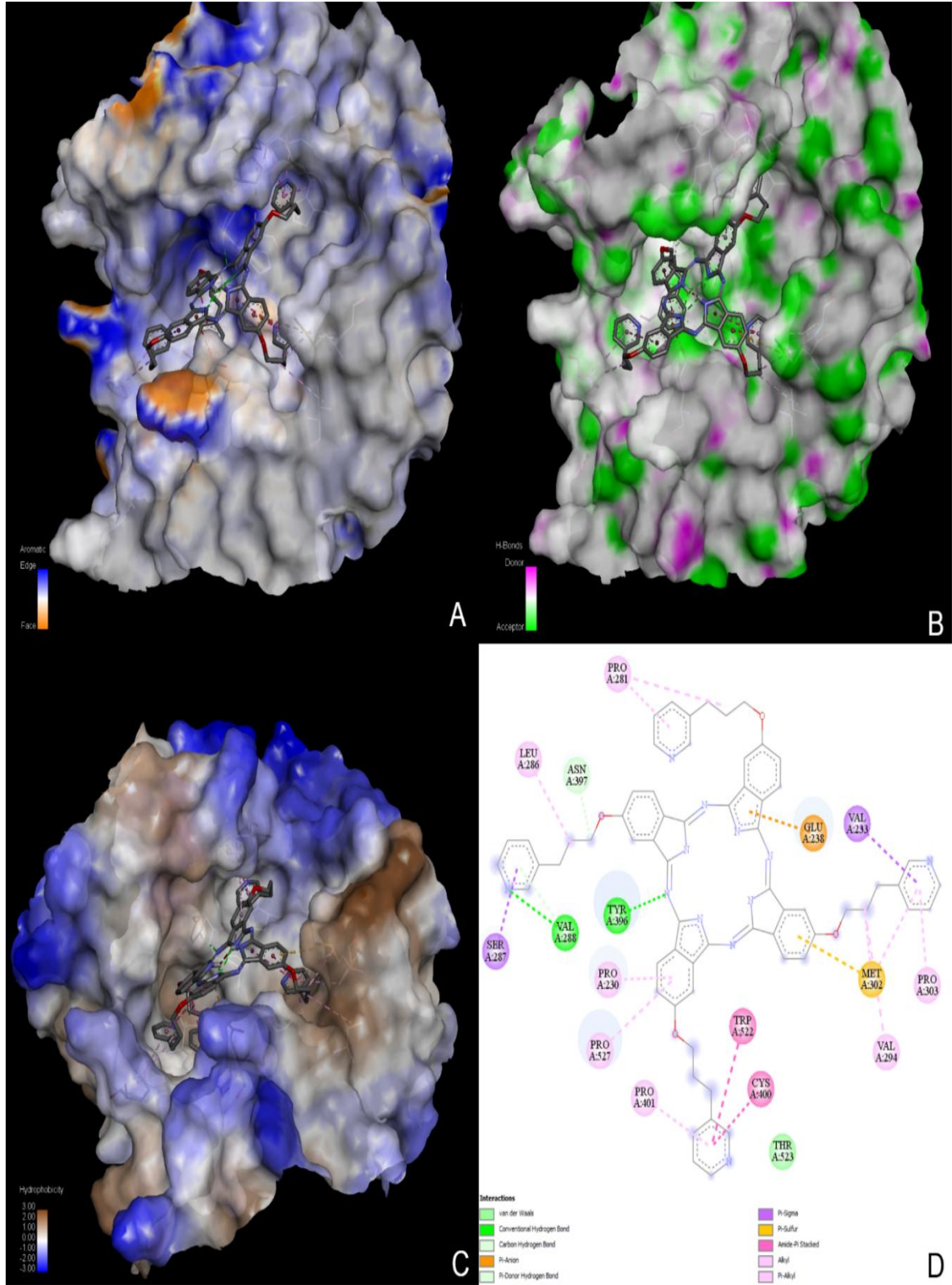
Bu sonuçlar neticesinde, moleküler düzeydeki etkileşimlerin deneysel inhibisyon verileri ile uyumlu olduğunu ve ftalosiyanın türevlerinin kolinesteraz inhibitörü olarak olası potansiyelini desteklediğini göstermektedir. Ftalosiyanınların *in silico* aktivite çalışmaları oldukça anlamlı rakamlar vererek inhibitör potansiyelini şiddetli bir şekilde ortaya koymuştur.

Tablo 5. 3PY.H₂O bileşiğinin bütirilkolinesteraz (PDB ID: 1XLW) ile yapmış olduğu optimum (No:1) ve diğer varyasyonlarının bağlanma enerjileri ile RMSD alt ve üst sınır verileri

No	Affinite Enerjisi (kcal/mol)	En İyiden Uzaklık	
		RMSD Alt Sınır	RMSD Üst Sınır
1	-10,7	0,000	0,000
2	-9,8	2,357	4,170
3	-9,8	2,081	2,847
4	-9,7	4,785	10,796
5	-9,7	5,086	10,928
6	-9,6	6,846	11,481
7	-9,6	2,669	5,016
8	-9,5	5,813	12,827
9	-9,3	3,811	10,198



Şekil 9. 3PY.H₂O bileşiğinin (sarı renkli) bütirilkolinesteraz (PDB ID: 1XLW) ile yapmış olduğu optimum (No:1) molekülünün zincirle yapmış olduğu moleküler kenetleme görüntüsü



Şekil 10. 3PY.H₂O bileşiğinin bütirilkolinesteraz (PDB ID: 1XLW) ile yapmış olduğu optimum (No:1) molekülünün A zinciriyle yapmış olduğu aromatik etkileşimleri (A), hidrojen bağlarının gösterimi (B), hidrofobik etkileşimlerinin gösterimi (C) ve 2D olarak proteindeki aminoasitlerle etkileşim diyagramı (D)

4.2. Kolinesteraz Enzimlerinin İnhibisyonları

Ftalosiyanin türevlerinin AChE ve BuChE enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri Ellman yöntemi (58) kullanılarak belirlenmiştir. IC₅₀ değerleri Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 6. Ftalosiyanin bileşiklerinin AchE ve BuChE enzimlerine karşı IC₅₀ değerleri

	AChE IC₅₀ (μM)	BuChE IC₅₀(μM)
3PY.H₂O	6.17 ± 1.73	38.47 ± 2.34
3PY.NiQ	8.67 ± 0.97	71.52 ± 1.68
3PY.CoQ	8.61 ± 0.88	48.42 ± 2.05
Galantamin	2.54 ± 0.56	40.85 ± 0.83

IC₅₀ değerleri incelendiğinde, ftalosiyanin türevlerinin her iki enzim üzerinde de anlamlı inhibitör etki gösterdiği görülmüştür. Özellikle 3PY.H₂O bileşiği, AChE üzerinde 6.17 ± 1.73 μM olarak en güçlü inhibitör etki gösterirken, BuChE enzimi için ise 38.47 ± 2.34 μM ile en güçlü ftalosiyanin türevi olarak öne çıkmıştır (Tablo 6). Galantamin referans inhibitörüne göre inhibitörün güç anlamında oldukça yakın bir performans gösterdiği görülmüştür. 3PY.H₂O bileşiğini ikinci olarak 3PY.CoQ takip ettiği görülmüştür. Bu durum merkezdeki metalik varlığın AChE ve BuChE için inhibitör etkisi için oldukça az etkili olduğu anlaşılmaktadır.

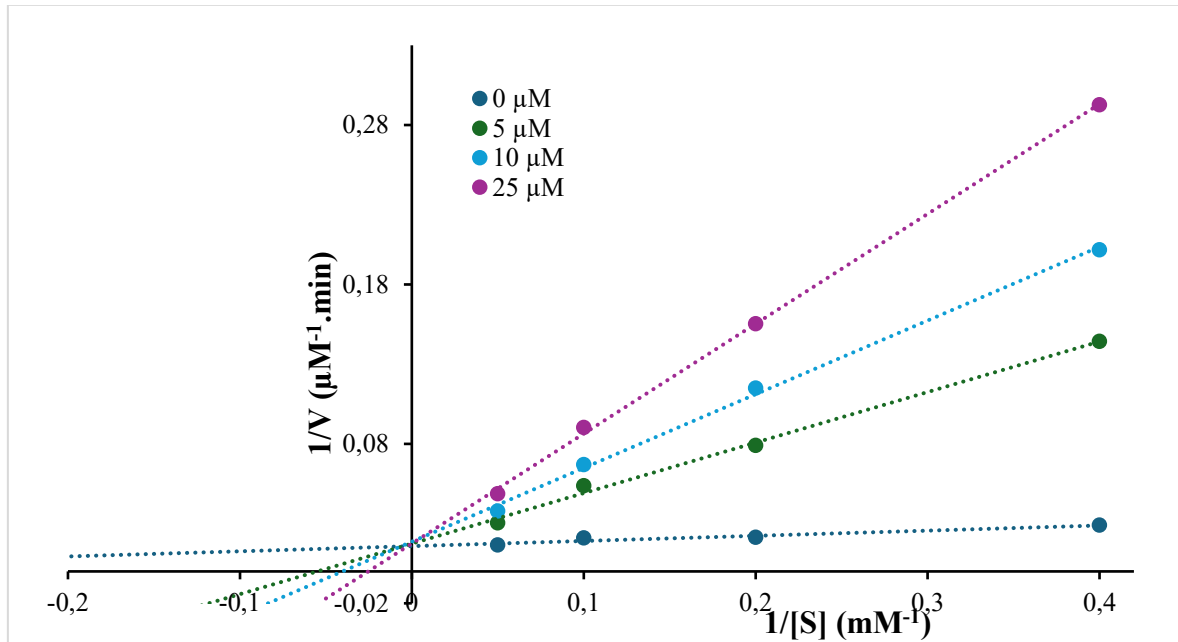
4.3. Enzim Kinetiğinin İncelenmesi

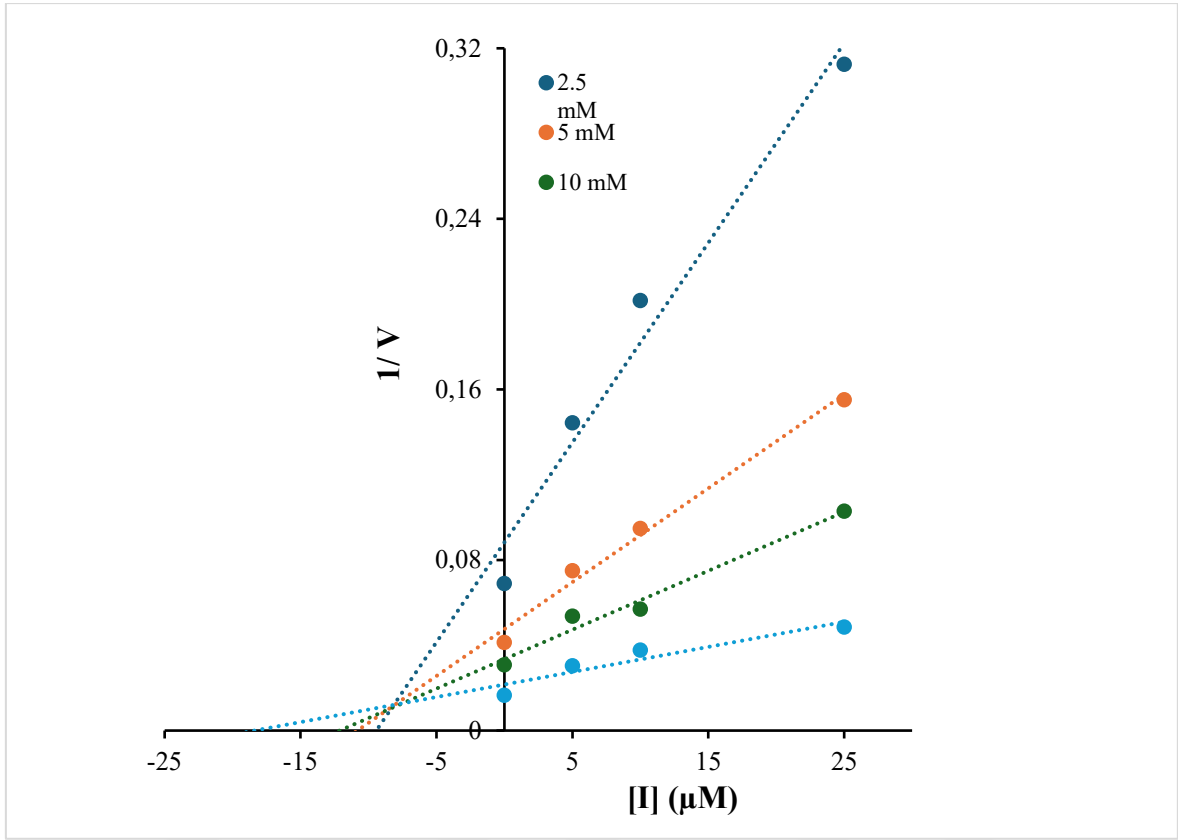
Kolinesteraz enzimleri ile ftalosiyanin türevlerinin etkileşim tiplerini belirlemek amacıyla farklı substrat konsantrasyonlarında enzim kinetiği çalışmaları yapılmıştır. K_i değerleri Tablo 6’de verilmiştir.

Tablo 7. Bileşiklerin AchE ve BuChE için kinetik parametreleri

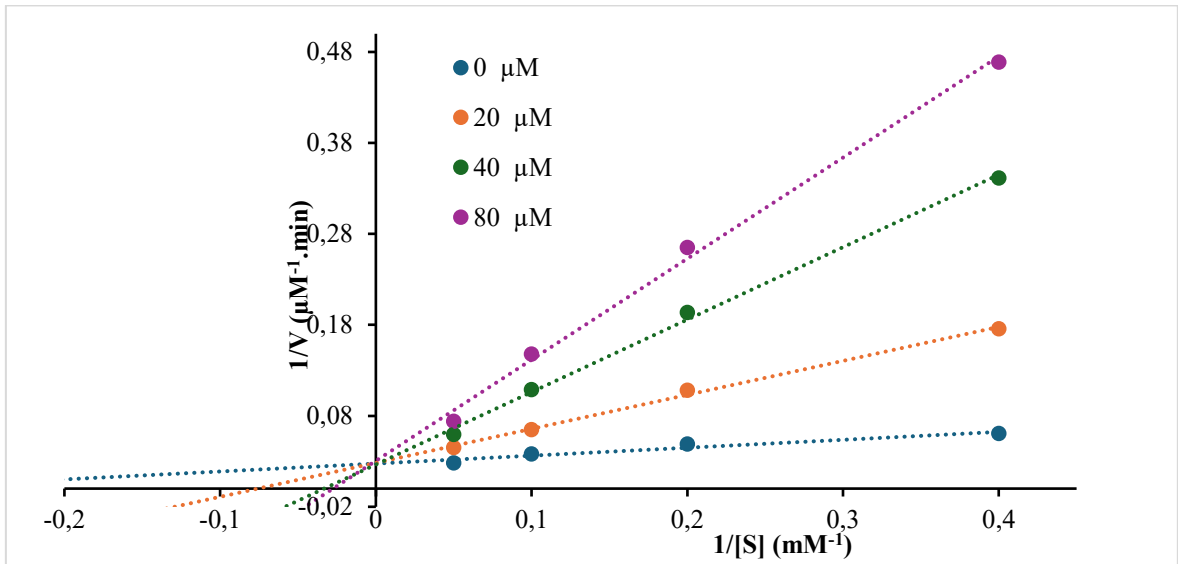
Enzimler	AchE		BuChE	
Bileşik Kodları	<i>İnhibisyon Tipi</i>	K_i (μM)	<i>İnhibisyon Tipi</i>	K_i (μM)
3PY.H ₂ O	Yarışmalı	8.2 ± 1.19	Yarışmalı	12 ± 1.95
3PY.NiQ	Yarışmalı	3.7 ± 0.86	Yarışmalı	11.1 ± 1.37
3PY.CoQ	Yarışmalı	5.1 ± 1.65	Yarışmalı	19.2 ± 1.84

Kinetik çalışmalar, tüm ftalosiyanın türevlerinin yarışmalı inhibitör özellik gösterdiğini ortaya koymuştur (Tablo 6). Lineweaver–Burk grafiklerinde inhibitör varlığında K_m değerlerinde artış, V_{max} değerlerinde ise değişim olmaması bu sonucu desteklemektedir (Şekil 11). AchE için en düşük K_i değeri 3PY.NiQ bileşiğinde ($3.7 \pm 0.86 \mu M$) bulunmuş, bu da yüksek bağlanma afinitesini göstermektedir. BuChE için de en düşük K_i değeri yine 3PY.NiQ’de ($11.1 \pm 1.37 \mu M$) saptanmıştır. Bu bulgular, özellikle 3PY.NiQ bileşiğinin hem AchE hem BuChE için güçlü bir inhibitör adayı olabileceğini ortaya koymaktadır.

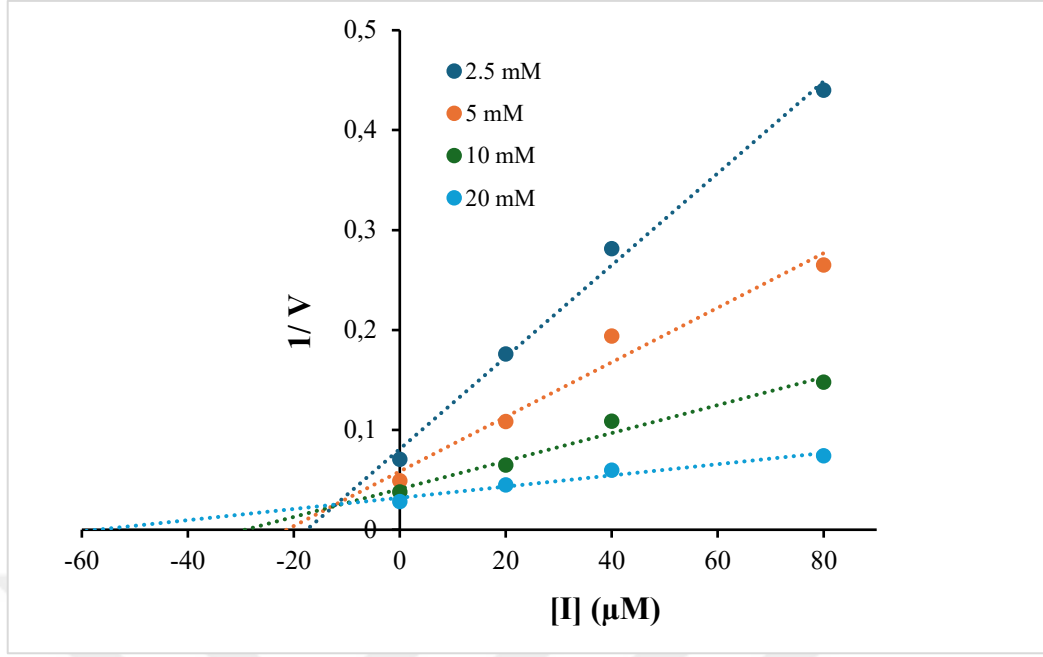
**Şekil 11.** 3PY.H₂O bileşiğinin AchE için Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 12. 3PY.H₂O bileşiğinin AChE için Dixon Grafiği

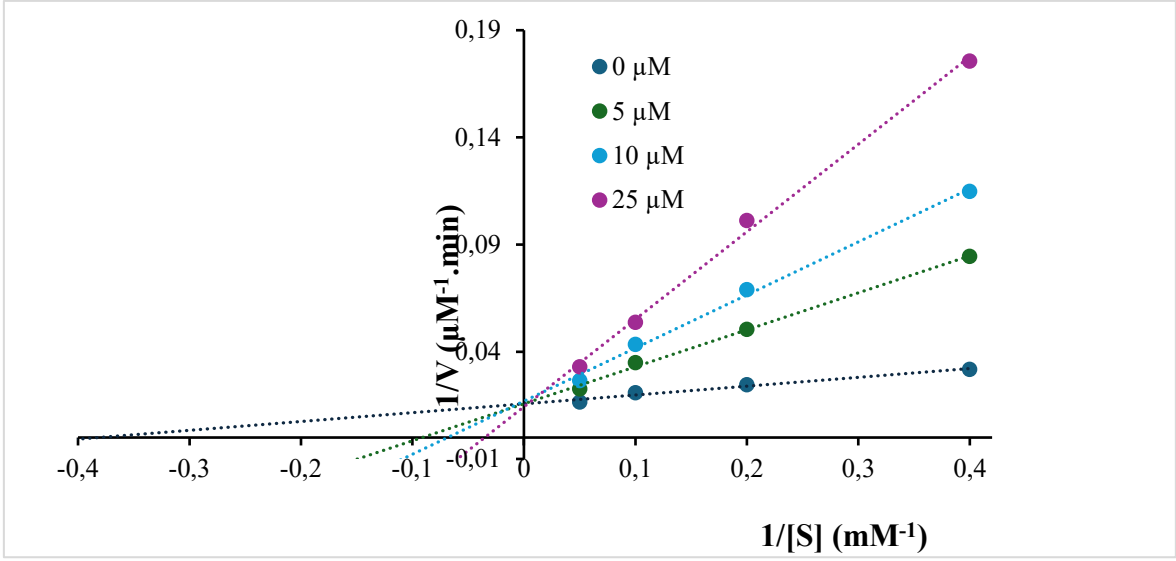


Şekil 13. 3PY.H₂O bileşiğinin BuChE için Lineweaver-Burk Grafiği

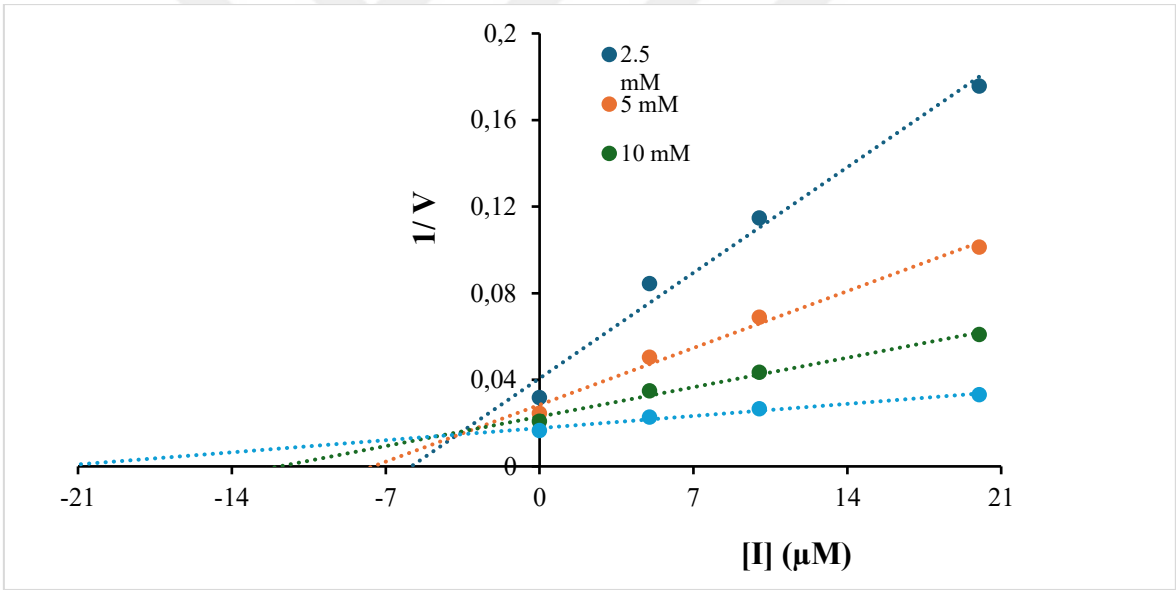


Şekil 14. 3PY.H₂O bileşiğinin BuChE için Dixon Grafiği

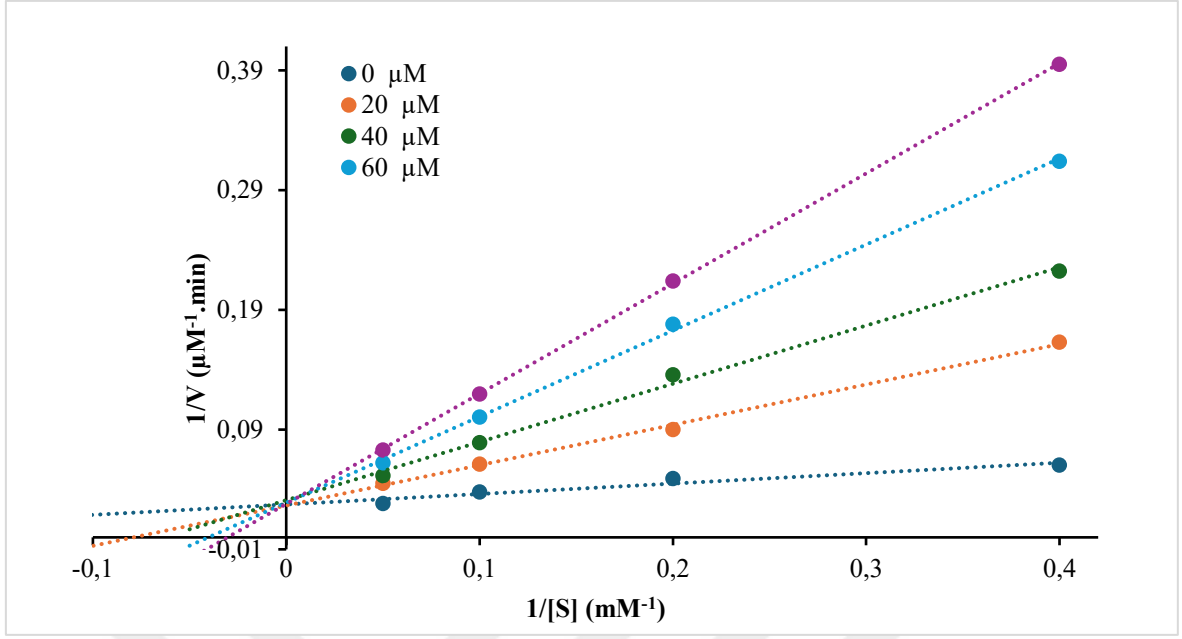
Lineweaver–Burk grafiklerinden elde edilen veriler, tüm ftalosiyanın türevlerinin yarışmalı inhibitör özellik gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 11, 13, 15, 17, 19). En düşük K_i değeri AChE için 3PY.NiQ’de ($3.7 \pm 0.86 \mu\text{M}$) olarak görülmüştür, bu da bağlanma afinitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. BuChE için en düşük K_i değeri ise 3PY.NiQ’de ($11.1 \pm 1.37 \mu\text{M}$) tespit edilmiştir (Tablo 6). Lineweaver–Burk grafikleri, inhibitör varlığında K_m değerlerindeki artışı açıkça göstermektedir. $V_{\max}$ değerlerinin sabit kalması, inhibitör tipinin yarışmalı olduğunu güçlü bir şekilde doğrulamaktadır. Dixon grafikleri K_i değerlerinin hesaplanmasında kullanılmış ve elde edilen değerler Tablo 6 ile uyumlu olduğu görülmüştür.



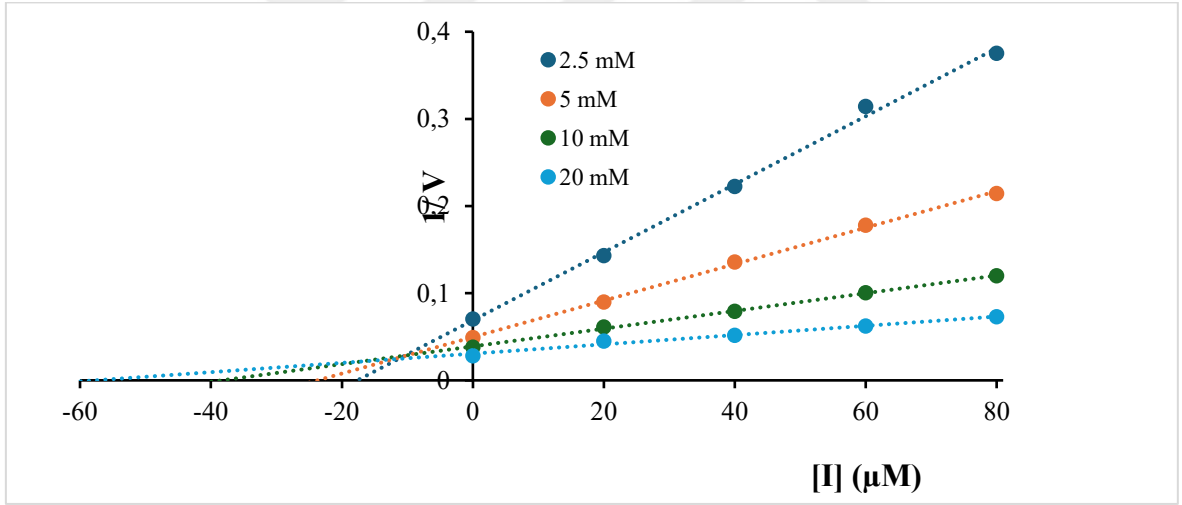
Şekil 15. 3PY.NiQ bileşiğinin AChE için Lineweaver-Burk Grafiği



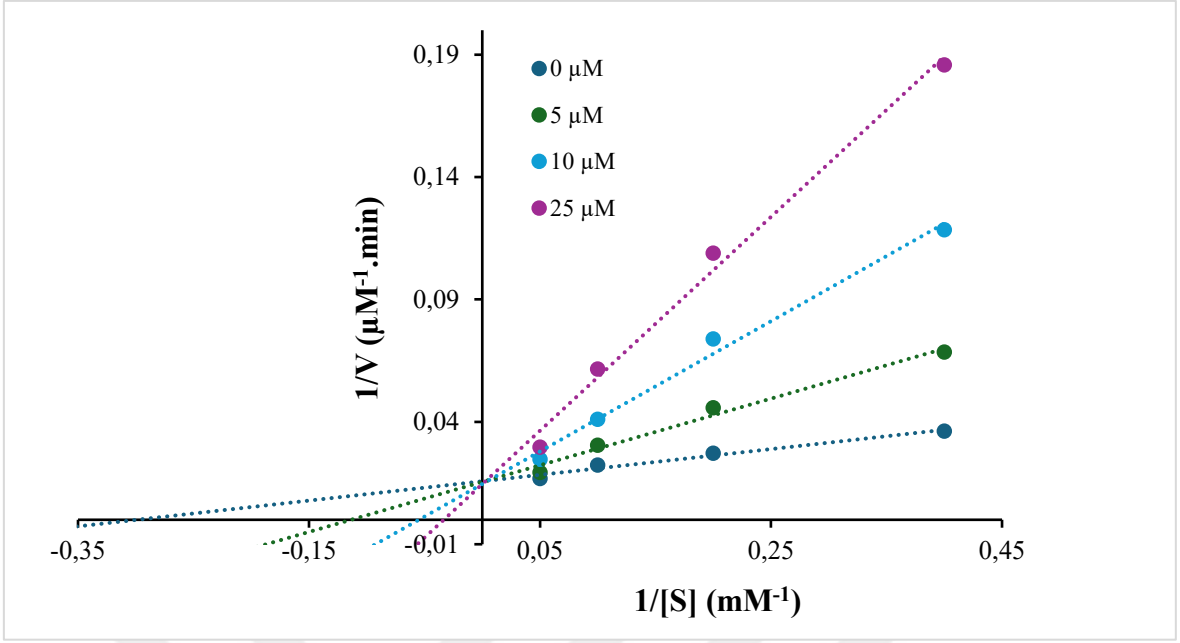
Şekil 16. 3PY.NiQ bileşiğinin AChE için Dixon Grafiği



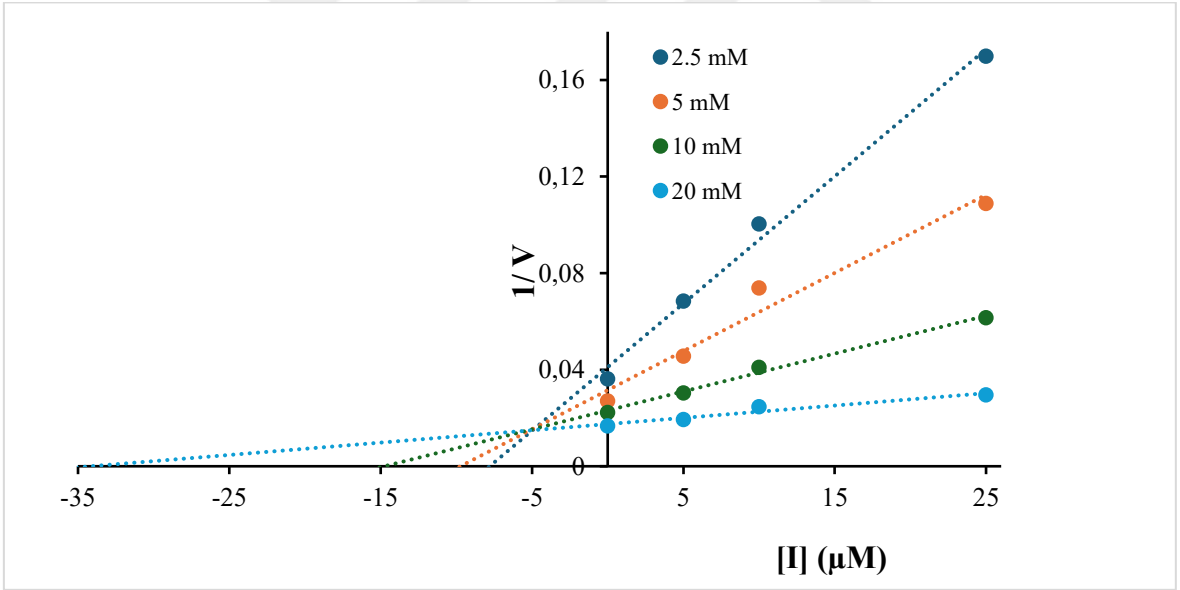
Şekil 17. 3PY.NiQ bileşiğinin BuChE için Lineweaver-Burk Grafiği



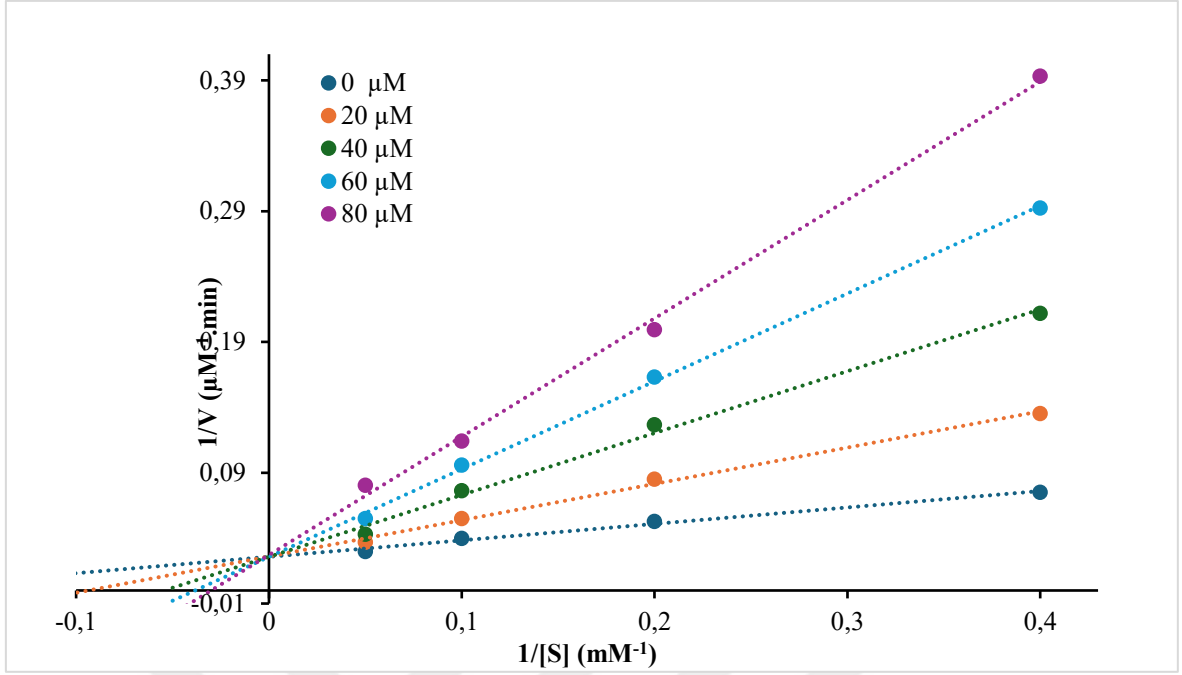
Şekil 18. 3PY.NiQ bileşiğinin BuChE için Dixon Grafiği



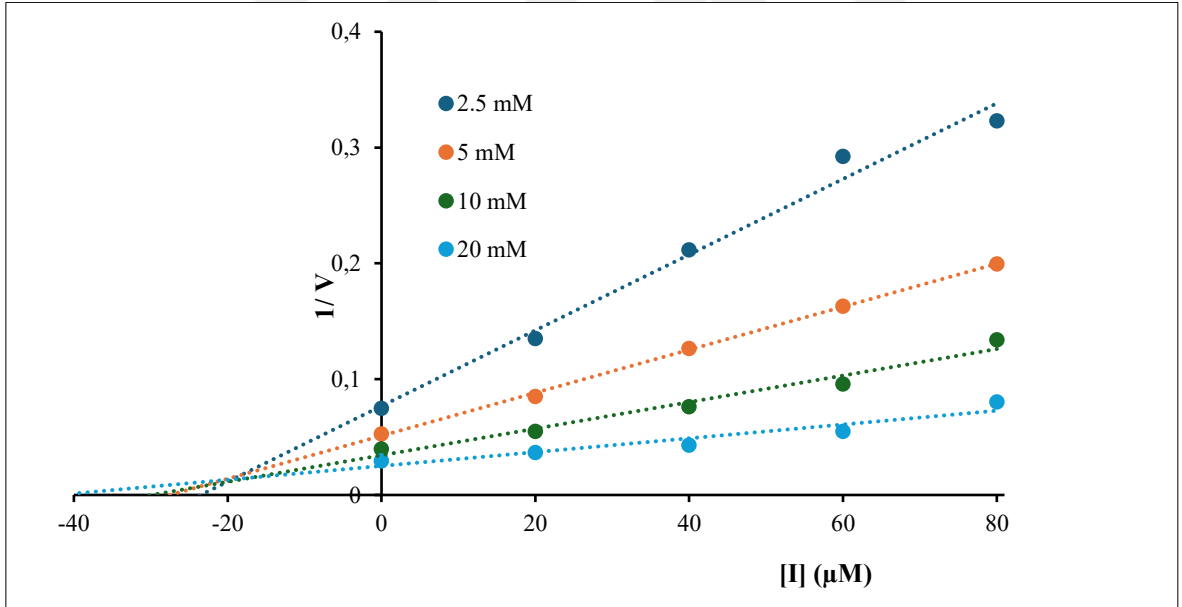
Şekil 19. 3PY.CoQ bileşiğinin AChE için Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 20. 3PY.CoQ bileşiğinin AChE için Dixon Grafiği



Şekil 21. 3PY.CoQ bileşiğinin BuChE için Lineweaver-Burk Grafiği



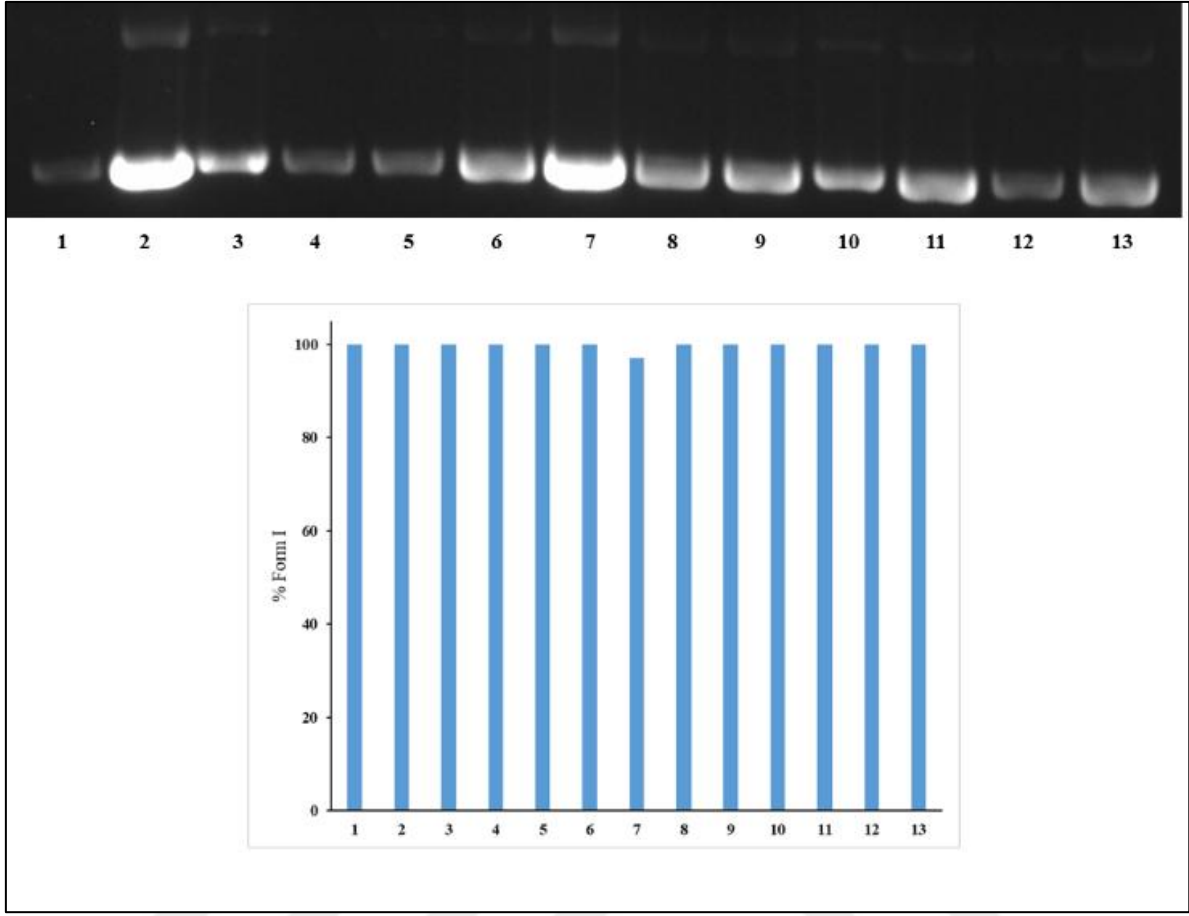
Şekil 22. 3PY.CoQ bileşiğinin BuChE için Dixon Grafiği

4.4. Ftalosiyenin Bileşiklerinin DNA Nükleaz Aktivitesinin İncelenmesi

3PY.H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiklerinin süpersarmal pBR322 plasmid DNA nükleaz aktivitelerini belirlemek amacıyla agaroz jel elektroforez tekniği kullanılmıştır. Uygun şartların sağlanmasıyla gerçekleştirilen nükleaz reaksiyonları sonrasında elde edilen ürünler BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile analiz edilmiştir.

4.4.1. Ftalosiyenin Bileşiklerinin Hidrolitik DNA Nükleaz Aktivitesinin İncelenmesi

3PY.H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiklerinin süpersarmal pBR322 plasmid DNA'nın fosfodiester bağlarını hidroliz ederek kesebilme etkinliğini incelemek için hidrolitik nükleaz deneyi yapılmıştır. Bileşiklerin hidrolitik nükleaz aktivitesinin sonuçları Şekil 23'te verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak metilen mavisi kullanılmıştır. 3PY.H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiği için 100, 50 ve 10 µM'da dikkate değer nükleaz aktiviteleri gözlenmemiştir. 3PY.H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiğinde de 100, 50 ve 10 µM'da kayda değer bir nükleaz aktivitesi tespit edilememiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan metilen mavisi bileşiğinin varlığında ise çalışılan tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole göre dikkate değer nükleaz aktiviteleri gözlenmemiştir. 37 °C'de 60 dakikalık inkübasyonda bekletilen bu deneyin sonucunda çalışmada kullanılan 3PY.H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiklerinin karanlıkta önemli ölçüde DNA hasarı oluşturmadıkları saptanmıştır (Şekil 23).



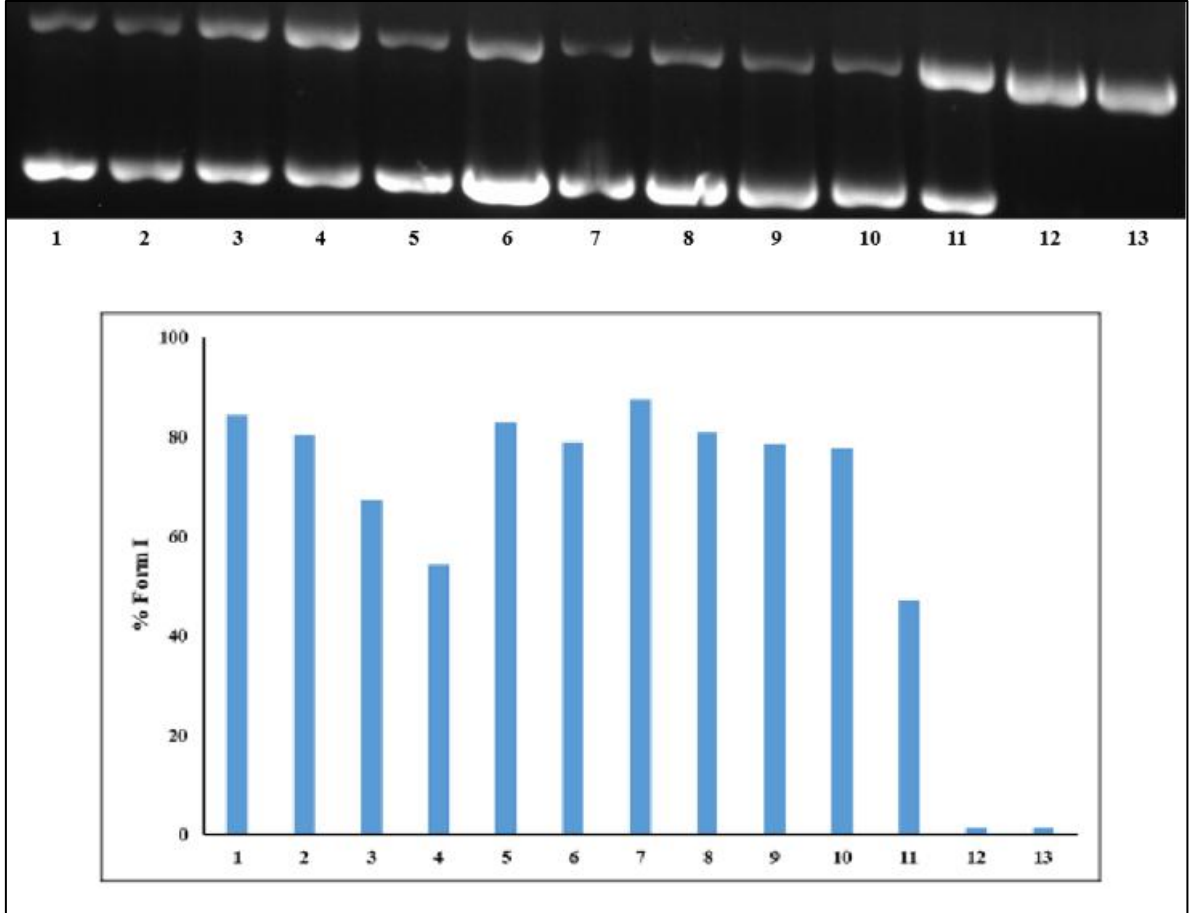
Şekil 23. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi (30 dakika 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2–4: DNA+ 3PY-H₂O (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 5–7: DNA + 3PY.NiQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 8–10: DNA + 3PY.CoQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 11–13: DNA + metilen mavisi (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon.

4.4.2. Ftalosiyanın Bileşiklerinin Hidrolitik DNA Fotonükleaz Aktivitesinin İncelenmesi

Şekil 24'te pBR322 süpersarmal plazmid DNA üzerinde 3PY.H₂O, 3PY.NiQ ve 3PY.CoQ bileşiklerinin fotonükleaz aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma 30 dakika boyunca 37 °C'de beyaz ışık altında gerçekleştirilmiş ve bant yoğunlukları ile beraber süpersarmal DNA formunun korunma düzeyi değerlendirilmiştir.

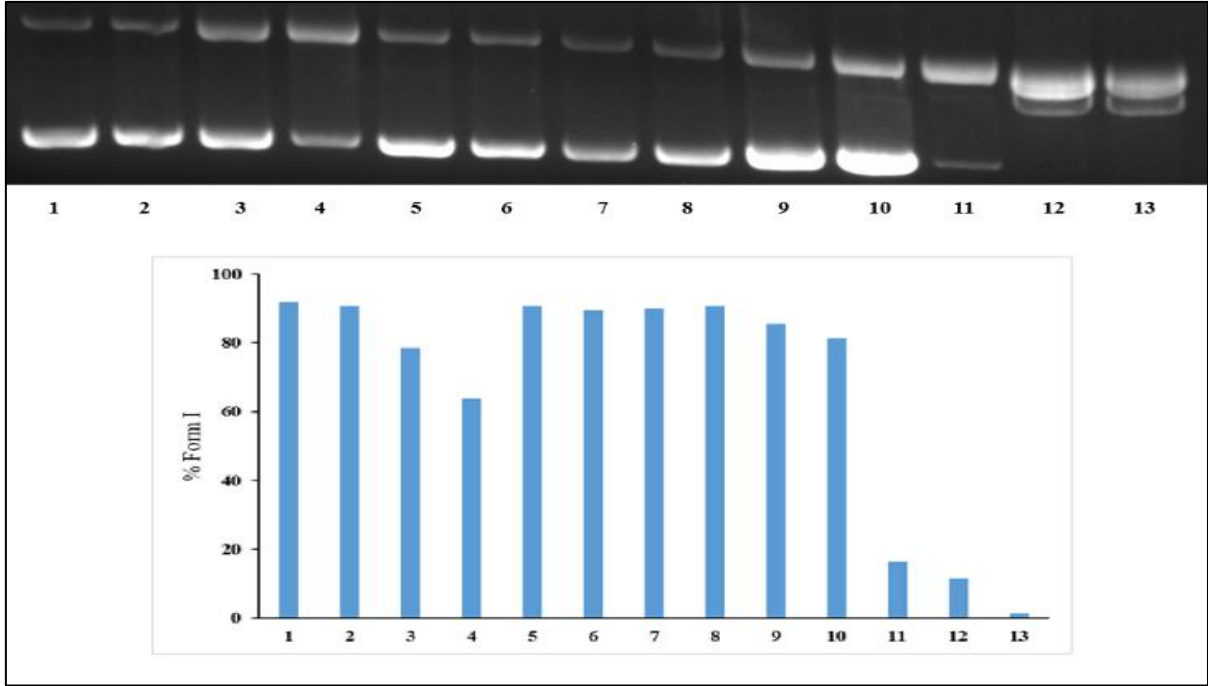
3PY.H₂O bileşiği için 10 ve 50 µM derişimlerinde genel olarak DNA üzerinde anlamlı bir kesilme veya parçalanma saptanmamasına rağmen ve 100 µM bandında diğer konsantrasyonlarına kıyasla daha etkili fotonükleaz aktivitesi sergilediği görülmüştür. Fakat DNA bütünlüğü oldukça fazla korunduğu dikkatten kaçmamıştır

Sonuç olarak, beyaz ışık altında yürütülen bu deneyde 3PY.H₂O, 3PY.NiQ ve 3PY.CoQ bileşiklerinin çalışılan konsantrasyonlarda fotonükleaz aktivitesi göstermedikleri, yani DNA üzerinde anlamlı bir hidrolitik etki oluşturmadıkları ortaya konmuştur. Buna karşın pozitif kontrol olan metilen mavisinin DNA bütünlüğünü bozarak form I DNA miktarını ciddi şekilde azalttığı doğrulanmıştır (Şekil 24).



Şekil 24. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA fotonükleaz aktivitesi (30 dakika beyaz ışık, 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2–4: DNA+ 3PY-H₂O (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 5–7: DNA + 3PY.NiQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 8–10: DNA + 3PY.CoQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 11–13: DNA + metilen mavisinin (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon.

Bileşikler 60 dakikanın sonunda da inceleme yapılmış olup benzer sonuç elde edildiği görülmüştür. Bu durum süre ilerledikçe de nükleaz aktivitesinin gözlemlenmediği sonucuna varılmıştır (Şekil 25).

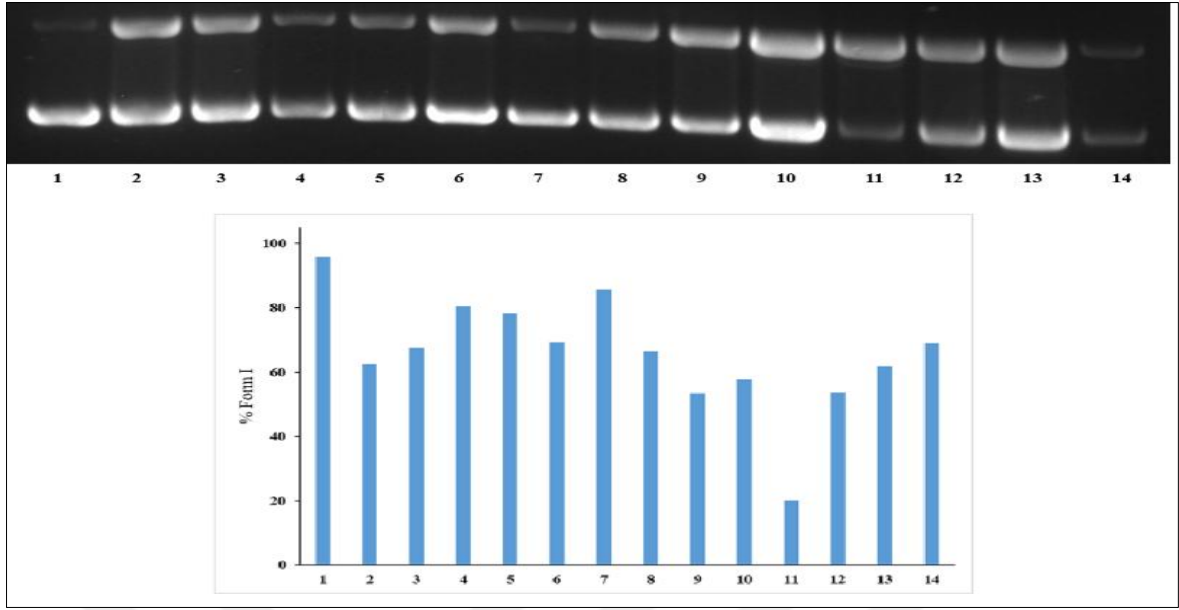


Şekil 25. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA fotonükleaz aktivitesi (60 dakika beyaz ışık, 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2–4: DNA+ 3PY-H₂O (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 5–7: DNA + 3PY.NiQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 8–10: DNA + 3PY.CoQ (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon; bant 11–13: DNA + metilen mavisi (10 µM–50 µM–100 µM) + Tampon

4.4.3. Ftalosiyanın Bileşiklerinin Oksidatif DNA Nükleaz Aktivitesinin İncelenmesi

3PY-H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiklerinin hidrolitik aktivitelerinin belirlenmesinin ardından oksidatif nükleaz etkilerinin incelenmesi için nükleaz reaksiyonları %2 (h/h) H₂O₂ ajanının ilavesiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların sonucu Şekil 26’da verilmiştir. Kullanılan bu ajan, DNA’ya tek başına ilave edildiğinde herhangi bir nükleaz aktivitesi göstermemiştir, ancak bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarıyla (100 ve 50 µM) birlikte ilave edildiklerinde negatif kontrole göre yüksek bir nükleaz özellik gösterdiği görülmüştür.

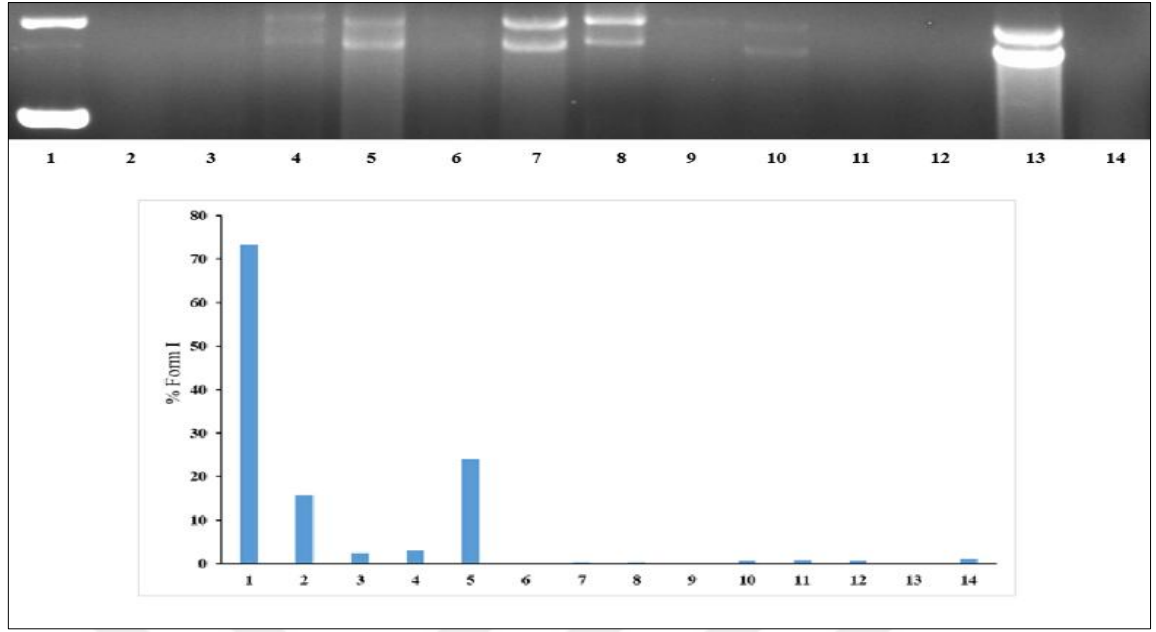
Ortamda H₂O₂ varlığında bileşiklerin 100 ve 50 µM konsantrasyonlarında negatif kontrole göre hasar gözlense de düşük konsantrasyonda herhangi bir hasar etkisi gözlenmemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan metilen mavisi varlığında ise 100, 50 µM’da bant yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. 3PY-H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiklerinin ajan varlığında düşük konsantrasyonda dikkate değer oksidatif nükleaz aktivitesine sahip olmadığı gösterilmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA oksidatif nükleaz aktivitesi (30 dakika beyaz ışık, 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon; bant 3–5: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + 3PY-H₂O (10 µM–50 µM–100 µM); bant 6–8: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + 3PY.NiQ (10 µM–50 µM–100 µM); bant 9–11: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + 3PY.CoQ (10 µM–50 µM–100 µM); bant 12–14: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + Metilen Mavisi (10 µM–50 µM–100 µM).

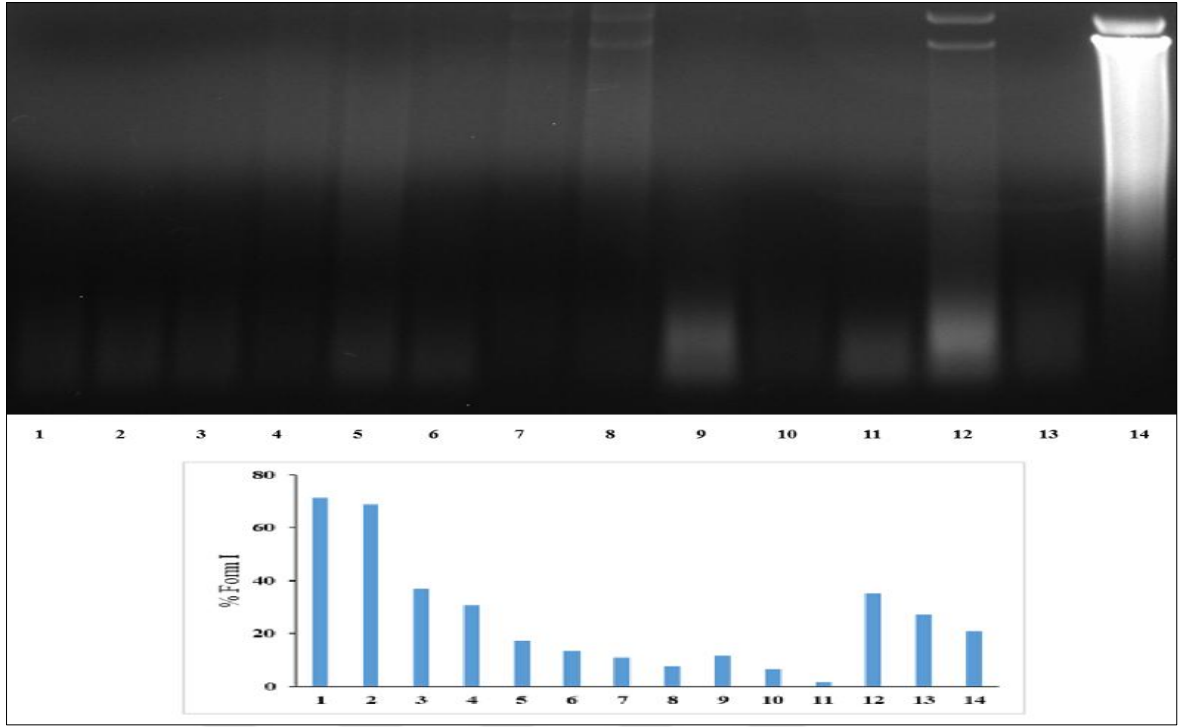
4.4.4. Ftalosiyanın Bileşiklerinin Oksidatif DNA Fotonükleaz Aktivitesinin İncelenmesi

Şekil 27’de pBR322 süpersarmal plazmid DNA üzerinde 3PY.H₂O, 3PY.NiQ ve 3PY.CoQ bileşiklerinin oksidatif fotonükleaz aktiviteleri değerlendirilmiştir. 3PY.NiQ, oksidatif koşullarda DNA bütünlüğünü önemli ölçüde bozmuş ve DNA yüzdesinde ciddi azalmaya neden olmuştur. Jel görüntüsünde bu bileşiğin farklı konsantrasyonlarda uygulandığı bantlarda DNA’nın açık form ve lineer forma kaydığı görülmektedir. 3PY.H₂O ise daha sınırlı bir etki göstermiş, DNA süpersarmal formu büyük oranda korunmuş ve DNA yüzdesinde yalnızca kısmi bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuç, 3PY.H₂O bileşiğinin oksidatif koşullarda DNA hasarı oluşturma kapasitesinin görece diğer bileşiklerle kıyaslandığında düşük olduğunu düşündürmektedir. 3PY.CoQ varlığında ise DNA bütünlüğü belirgin şekilde bozulmuş, özellikle yüksek konsantrasyonlarda süpersarmal formun azaldığı ve parçalanma ürünlerinin arttığı saptanmıştır. Grafik sonuçları da bu bulgularla uyumlu olup, 3PY.NiQ ve 3PY.CoQ’un DNA hasarını artırıcı etkisinin daha belirgin, 3PY.H₂O’nun ise daha zayıf olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 27).



Şekil 27. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA foto-oksidatif nükleaz aktivitesi (30 dakika beyaz ışık, 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon; bant 3–5: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + 3PY-H₂O (10 µM–50 µM–100 µM); bant 6–8: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + 3PY.NiQ (10 µM–50 µM–100 µM); bant 9–11: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + 3PY.CoQ (10 µM–50 µM–100 µM); bant 12–14: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + Metilen Mavisi (10 µM–50 µM–100 µM).

Bileşiklerin 60 dakikanın sonunda da incelemesi yapılmış ve Şekil 28’de gösterilmiştir. Işığa maruz kalma süresi ftalosiyaninlerin DNA foto-oksidatif nükleaz aktivitesinde oldukça anlamlı olduğu görülmüştür.



Şekil 28. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA foto-oksidatif nükleaz aktivitesi (60 dakika beyaz ışık, 37°C). Bant 1: DNA kontrol (1 µL DNA + 9 µL Tampon); bant 2: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon; bant 3–5: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + 3PY-H₂O (10 µM–50 µM–100 µM); bant 6–8: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + 3PY.NiQ (10 µM–50 µM–100 µM); bant 9–11: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + 3PY.CoQ (10 µM–50 µM–100 µM); bant 12–14: DNA + %2 H₂O₂ ve 1 mM FeSO₄ + Tampon + Metilen Mavisi (10 µM–50 µM–100 µM).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, suda çözünebilir ftalosiyanin türevlerinin asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BuChE) enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri hem deneysel hem de *in silico* yöntemlerle incelenmiştir. Elde edilen veriler, özellikle 3PY.H₂O bileşiğinin her iki enzim üzerinde anlamlı inhibitör aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. AChE için belirlenen IC₅₀ değeri ($6.17 \pm 1.73 \mu\text{M}$), klinikte Alzheimer tedavisinde kullanılan galantaminin IC₅₀ değerine ($2.54 \pm 0.56 \mu\text{M}$) oldukça yakın olmakla birlikte, ftalosiyanin türevlerinin güçlü inhibitör potansiyel taşıdığını ve yapısal optimizasyon çalışmalarıyla etkinliğin artırılabilceğini göstermektedir (96).

AChE inhibitörleri, Alzheimer hastalığında bilişsel fonksiyonların korunmasına yardımcı olurken, BuChE inhibitörlerinin özellikle hastalığın ilerlemiş evrelerinde daha belirgin bir rol üstlendiği bildirilmektedir (97). Bu araştırmada, 3PY.H₂O bileşiğinin her iki enzimde de inhibitör etki göstermesi, dual inhibitör potansiyelini işaret etmektedir. Literatürde dual inhibitör stratejisinin, tek hedefe yönelik inhibitörlere kıyasla daha uzun süreli terapötik etki sağladığı ve hastalığın semptomlarını daha etkili şekilde hafiflettiği bildirilmiştir (98).

Moleküler kenetleme çalışmaları yalnızca 3PY.H₂O bileşiği ile yürütülmüş, elde edilen bağlanma serbest enerjisi değerleri deneysel IC₅₀ verileri ile uyumlu bulunmuştur. Kenetleme analizlerinde, ligandın AChE'nin aktif bölgesinde yer alan Ser200, His440, Glu327 gibi katalitik triad amino asitleri ile hidrojen bağları kurduğu ve Trp84, Phe330 gibi aromatik kalıntılarla π - π etkileşimleri gerçekleştirdiği görülmüştür. Bu etkileşimler, inhibitörün aktif bölgeye yüksek afiniteli bağlanmasını sağlayarak enzimin katalitik aktivitesini baskıladığı görülmüştür (99).

Metal kompleksli ftalosiyanin türevlerinin kenetleme analizleri, mevcut teknik sınırlılıklar nedeniyle gerçekleştirilememiştir. Ancak literatürde metal iyonlarının ftalosiyanin çekirdeğine koordinasyonunun, molekülün düzlemsel yapısını ve elektronik özelliklerini değiştirerek bağlanma afinitesini artırabileceği belirtilmektedir (100). Bu nedenle, gelecekte yapılacak modelleme çalışmalarında metal kompleksli türevlerin de dahil edilmesi, inhibitör potansiyelin daha kapsamlı şekilde anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Suda çözünebilir ftalosiyanınların farmasötik açıdan en önemli avantajlarından biri, lipofilik yapıları klasik ftalosiyaninlere kıyasla biyoyararlanımlarının daha yüksek olmasından kaynaklandığı bilinmektedir (101). Ayrıca, su çözünürlüğü sayesinde fizyolojik koşullarda agregasyon eğilimi azalmakta ve biyolojik hedeflere ulaşma kabiliyeti arttığı görülmüştür. Bu özellik, özellikle merkezi sinir sistemi hedefli ilaç geliştirme çalışmalarında klinik açıdan önemli bir avantaj sağlamaktadır (102).

Literatürde ftalosiyanın türevlerinin kolinesteraz inhibitör etkilerini araştıran çalışmalar sınırlı sayıda olup, çoğunlukla fotodinamik terapi ve antioksidan özellikler üzerine yoğunlaştığı görülmüştür (85). Bu açıdan, çalışmada hem deneysel hem de moleküler modelleme verilerini birlikte sunarak literatüre önemli bir katkı sağlamak amaçlanmıştır. Ayrıca, 3PY.H₂O bileşiğinin suda çözünebilir yapısını temel alarak ve dual inhibitör potansiyelini de göz önünde alınırsa, gelecekte klinik öncesi araştırmalar için umut verici bir temel oluşturması adına önemli bir adım atılmış olacaktır.

Bu tez çalışması, suda çözünebilir ftalosiyanın türevlerinin AChE ve BuChE enzimleri üzerindeki inhibitör potansiyelini detaylı bir şekilde ortaya koymuştur. Özellikle 3PY.H₂O bileşiği, her iki enzimde de anlamlı inhibitör aktivite göstermiştir. Moleküler modelleme sonuçları, deneysel verilerle uyumlu bulunmuş ve inhibitör etkinliğin moleküler düzeydeki mekanizmaları açıklanmıştır.

Galantamin referans inhibitörüne kıyasla, incelenen diğer bileşiklere göre daha yüksek IC₅₀ değerlerine sahip olunması, etkinliğin yapısal modifikasyonlarla geliştirilebileceğini göstermektedir. Bu amaçla, gelecekte yapılacak çalışmalarda; metal kompleksli türevlerin sentezlenmesi ve hem deneysel hem de *in silico* olarak test edilmesi yapılabilirliğini ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra yapısal optimizasyon stratejileri ile bağlanma afinitesinin artırılması ve hücre kültürü ve *in vivo* modellerde biyolojik etkinliğin doğrulanması önerilmektedir.

Bu çalışmada incelenen 3PY.H₂O, 3PY.CoQ ve 3PY.NiQ bileşiklerinin DNA üzerinde anlamlı bir hidrolitik, fotonükleaz veya oksidatif nükleaz aktivitesi göstermediği belirlenmiştir. DNA bütünlüğünün korunduğu bu sonuç, ftalosiyanın türevlerinin karanlık koşullarda genotoksik risk taşımadığını ortaya koymuştur.

Literatürde bazı ftalosiyanın ve türevlerinin ışık varlığında DNA üzerinde fotooksidatif hasar oluşturabildiği bildirilmiştir (103, 104). Ancak bu tez çalışmasında

kullanılan bileşiklerin, aynı koşullarda dahi DNA’da ciddi bir form değişikliğine yol açmaması, onların daha güvenli bir profil sergilediğini düşündürmektedir.

Benzer şekilde, Martins ve arkadaşlarının (2022) ftalosiyanın türevleri ile yaptıkları çalışmada bazı moleküllerin oksidatif DNA hasarı oluşturabildiği kayda geçmiştir (105). Bu tezin bulguları ise, seçilen bileşiklerin oksidatif stres koşullarında bile DNA’ya zarar verme kapasitesinin oldukça düşük olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, bu bileşikler kolinesteraz inhibitörlük etkileri ile birlikte değerlendirildiğinde, nörodejeneratif hastalıklara yönelik ilaç adayı potansiyellerini genotoksisite açısından destekleyen olumlu veriler olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, ftalosiyanın türevleri Alzheimer tedavisinde dual inhibitör adayları olarak değerlendirilebilecek, suda çözünabilirlikleri sayesinde farmakokinetik avantaj sunabilecek ve gelecekte klinik öncesi çalışmalara taşıyabilecek önemli kimyasal yapı olduğunu büyük ölçüde ortaya çıkarmış ve ileride yapılacak çalışmalar için literatüre ışık tutacağı kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Dugger BN, Dickson DW (2017). Pathology of neurodegenerative diseases. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 9(7):a028035.
2. 2022 Alzheimer's disease facts and figures (2022). Alzheimer's and Dementia 18: 700–789.
3. Feigin VL, Nichols E, Alam T, Bannick MS, Beghi E, Blake N, Culpepper WJ, Dorsey ER, Elbaz A, Ellenbogen RG, Fisher, James L., Johnson, Catherine Owens (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet Neurology 18: 459–480.
4. Ali N, Sayeed U, Shahid SMA, Akhtar S, Khan MKA (2025). Molecular mechanisms and biomarkers in neurodegenerative disorders: a comprehensive review. Molecular Biology Reports 52(1): 1-19.
5. Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu QS, Mamczarz J, Holloway HW, Giordano T. (2001). New therapeutic strategies and drug candidates for neurodegenerative diseases. Expert Opinion on Investigational Drugs 10: 703–720.
6. Ahsen V, Gül A (2000). Synthesis and properties of novel metal phthalocyanines. Journal of Coordination Chemistry 49: 31–41.
7. Koca A, Öztürk A, Gül A (2013). *In vitro* inhibitory effects of new metal phthalocyanines on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. Applied Biochemistry and Biotechnology 171: 1120–1131.
8. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V (2003). Neurodegeneration: What is it and where are we? The Journal of Clinical Investigation 111: 3–10.
9. Soto C, Pritzkow S (2018). Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. Nature Neuroscience 21(10): 1332-1340.
10. Jucker M, Walker LC (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. Nature 501(7465): 45-51.

11. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews Neurology* 9(1): 13-24.
12. Nichols E, Steinmetz JD, Vollset SE, Fukutaki K, Chalek J, Abd-Allah F, Abdoli A, Abualhasan A, Abu-Gharbieh E, Akram TT. (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health* 7: e105–e125.
13. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology* 15(10): 565-581.
14. Dauer W, Przedborski S (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6): 889-909.
15. Heneka MT, Golenbock DT, Latz E (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology* 16(3): 229-236.
16. Miller RG, Jackson CE, Kasarskis EJ, England JD, Forsheve FD, Johnston W, Kalra S, Katz JS, Mitsumoto H, Rosenfeld FJ. (2009). Practice Parameter update: The care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: Drug, nutritional, and respiratory therapies (an evidence-based review). *73(15): 1218-1226.*
17. Hardy J, Selkoe DJ (n.d.). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. 297(5580), 353-356.
18. Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, Nance M, Ross CA, Scahill RI, Wetzel R. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews Disease Primers* 1(1): 1-21.
19. Bang J, Spina S, Miller BL (2015). Frontotemporal dementia. *The Lancet* 386(10004), 1672-1682.
20. Wales S, C Kiernan DSc AM, Cheah MBIostat BC, Burrell MBBS J, Zoing BNurs MC, Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A. (2011). Seminar Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377: 942–55.
21. 2023 Alzheimer's disease facts and figures (2023). *Alzheimer's and Dementia*. 19: 1598–1695.

22. Querfurth HW, LaFerla FM (2010). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* 362: 329–344.
23. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, Holtzman DM, Jagust W, Jessen F, Karlawish J. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* 14(4): 535-562.
24. Ross CA, Tabrizi SJ (2011). Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology* 10(1): 83-98.
25. Chaudhuri KR, Schapira AH (2009). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurology* 8(5): 464-474..
26. Tabrizi SJ, Leavitt BR, Landwehrmeyer GB, Wild EJ, Saft C, Barker RA, Blair NF, Craufurd D, Priller J, Rickards H. (2019). Targeting Huntingtin Expression in Patients with Huntington's Disease. *New England Journal of Medicine* 380: 2307–2316.
27. Bennett CF, Swayze EE (2010). RNA targeting therapeutics: Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50(1): 259-293.
28. Walker FO (2007). Huntington's disease. *The Lancet* 369: 218–228.
29. Lane RM, Potkin SG (2000). Enzymes in cholinergic pathways as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Journal of Psychopharmacology* 14: 25–30.
30. Brown RH, Al-Chalabi A (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. (D. L. Longo, editor) *New England Journal of Medicine* 377: 162–172.
31. McKeith IG, Sci M, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor J-P, Psych M, Weintraub D, Aarsland D, Galvin J. (2017). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies Fourth consensus report of the DLB Consortium. 89(1): 88-100.
32. van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, van den Berg LH (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 390(10107): 2084-2098.
33. Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW (2016). Decoding ALS: From genes to mechanism. *Nature* 539(7628): 197-206.

34. Tysnes OB, Storstein A (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 124(8): 901-905.
35. Novak MJU, Tabrizi SJ (2010). Huntington's disease. *BMJ (Online)* 340.
36. Armstrong MJ, Miyasaki JM (2012). Evidence-based guideline: Pharmacologic treatment of chorea in Huntington disease. 79(6): 597.
37. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature Neuroscience* 17(1): 17-23.
38. Petersen RC, Caracciolo B, Brayne C, Gauthier S, Jelic V, Fratiglioni L (2014). Mild cognitive impairment: A concept in evolution. *Journal of Internal Medicine* 275: 214–228.
39. Martin Prince A, Wimo A, Guerchet M, Gemma-Claire Ali M, Wu Y-T, Prina M, Yee Chan K, Xia Z (n.d.). *World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends*.
40. Rademakers R, Neumann M, MacKenzie IR (2012). Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nature Reviews Neurology* 8(8): 423-434.
41. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, Dekosky ST, Gauthier S, Selkoe D, Bateman R. (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria. *The Lancet Neurology* 13(6): 614-629.
42. Kumar A, Sidhu J, Lui F (2024). *Alzheimer Disease*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK499922/> [Accessed 23 May 2025].
43. Palmqvist S, Janelidze S, Quiroz YT, Zetterberg H, Lopera F, Stomrud E, Su Y, Chen Y, Serrano GE, Leuzy A. (2020). Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 324: 772–781.
44. 2024 Alzheimer's disease facts and figures (2024). *Alzheimer's and Dementia* 20: 3708–3821.
45. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-

- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* 7: 263–269.
46. Leon ED (1982). The Global Deterioration Scale for Assessment of Primary Degenerative Dementia. *Am J Psychiatry* 139(9): 1136-1139.
 47. Dementia: Key facts (2023). World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> [Accessed 23 May 2025].
 48. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G (2013). Apolipoprotein e and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology* 9(2): 106-118.
 49. Altıntaş A, Taşdelen B, Yıldız M, Gökçe-Kutsal Y, Ertan T, Küçükdeveci A (2019). Epidemiology of dementia in Turkey. *Turkish Journal of Geriatrics* 22: 135–143.
 50. Brodaty H, Donkin M (2009). Family caregivers of people with dementia. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 11(2): 217-228.
 51. Williamson JD, Pajewski NM, Auchus AP, Bryan RN, Chelune G, Cheung AK, Cleveland ML, Coker LH, Crowe MG, Cushman WC. (2004). Intensive vs standard blood pressure control and probable dementia (SPRINT MIND). *Journal of Internal Medicine* 256: 240–246.
 52. Prusiner SB (2013). Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annual Review of Genetics* 47(1): 601-623.
 53. Hodges JR (2006). Alzheimer's disease and the clinical spectrum of dementia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1097: 16–29.
 54. Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund LO, Nordberg A, Bäckman L, Albert M, Almkvist O. (2004). Mild cognitive impairment - Beyond controversies, towards a consensus: Report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *Journal of Internal Medicine* 256(3): 240-246.
 55. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Brayne C, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet* 396(10248): 413-446.
 56. Kalaria RN (2010). Vascular basis for brain degeneration: Faltering controls and risk factors for dementia. *Nutrition Reviews* 68: 74–87.

57. Busche MA, Hyman BT (2020). Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience* 23(10): 1183-1193.
58. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961). A New And Rapid Colorimetric Determination Of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* 7(2): 88-95.
59. Folstein MF, Folstein SE, Mchugh PR (1975). "Mini-Mental State" A Practical Method For Grading The Cognitive State Of Patients For The Clinician*. *Journal of psychiatric research*, 12(3): 189-198.
60. Coyle JT, Price DL, DeLong MR (n.d.). Alzheimer's Disease: A Disorder of Cortical Cholinergic Innervation. *Science* 219(4589): 1184-1190.
61. Deane R, Yan S Du, Submamaryan RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J. (2003). RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nature Medicine* 9: 907–913.
62. Bush AI (2003). The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences* 26(4): 207-214.
63. Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C (2014). Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: An analysis of population-based data. *The Lancet Neurology* 13: 788–794.
64. O'Brien JT, Thomas A (2015). Vascular dementia. *The Lancet* 386(10004): 1698-1706.
65. Fang EF, Hou Y, Palikaras K, Adriaanse BA, Kerr JS, Yang B, Lautrup S, Hasan-Olive MM, Caponio D, Dan X. (2019). Mitophagy. *Nature Neuroscience* 22: 401–412.
66. Farrer LA, Cupples LA, Myers RH, van Duijn CM, Mayeux R, Haines JL, Kukull WA, Hyman B, Pericak-Vance MA, Risch N (1998). Effects of Age and Ethnicity on the Link Between APOE ϵ 4 and Alzheimer Disease—Reply . *JAMA* 279(8): 581-582.
67. De Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA. (2012). Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. *Neuron* 73: 685–697.
68. De Felice FG, Ferreira ST (2014). Common denominators. 13: 187–196. *The Lancet Neurology* 13: 187–196.

69. Van Der Flier WM, Scheltens P (2005). Epidemiology and risk factors of dementia. *Neurology in Practice* 76(suppl 5): v2-v7.
70. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H (2005). The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society* 53: 695–699.
71. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JSK, Younkin S. (2013). TREM2 Variants in Alzheimer's Disease . *New England Journal of Medicine* 368: 117–127.
72. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66(2): 137-147.
73. De Strooper B, Karran E (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164(4): 603-615.
74. Giacobini E (2003). Cholinesterases: New Roles in Brain Function and in Alzheimer's Disease*. *Neurochemical Research* 28(3): 515-522.
75. Braak H, Braak E (1991). Acta H ' pathologica Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 82(4): 239-259.
76. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M. (2009). Tau transmission. *106*(16): 6820–6825.
77. Masson P, Froment M-T, Fortier PL, Albaret C, Enjalbal C, Valeur E, Lockridge O (2010). Comparative enzymology of cholinesterases in human tissues. *Chemico-Biological Interactions* 187: 5–14.
78. Bartolini M (2003). Inhibition of acetylcholinesterase peripheral site prevents β amyloid induced aggregation and toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* 46: 2279–2282.
79. Soreq H, Seidman S (2001). Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 294–302.
80. Nachon F, Carletti E, Ronco C, Trovaslet M, Nicolet Y, Jean L, Renard PY (2013). Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine:

Elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochemical Journal* 453: 393–399.

81. Mesulam MM, Geula C, Cosgrove R, Mash DC (2002). Cholinesterases in the pathobiology of Alzheimer disease. *Trends in Neurosciences* 25: 45–50.
82. Birks JS, Harvey RJ (2018). Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database of systematic reviews* (6).
83. Bajgar J (2004). Organophosphates/Nerve Agent Poisoning: Mechanism Of Action, Diagnosis, Prophylaxis, And Treatment. *Advances in clinical chemistry* 38: 151-216.
84. Wöhrle D (1993). Phthalocyanines: Properties and applications. Edited by C. C. Leznoff and A. B. P. Lever, VCH, Weinheim. Volume 1, 1989, 436 pp., ISBN 3-527-26955-X; Volume 2, 1993, 305 pp., DM 268, ISBN 3-527-89544-2. *Advanced Materials* 5: 942–943.
85. De La Torre G, Claessens CG, Torres T (2007). Phthalocyanines: Old dyes, new materials. Putting color in nanotechnology. *Chemical Communications. Chemical communications* (20): 2000-2015.
86. Dini D, Calvete MJ, Hanack M (2016). Metallophthalocyanines: versatile compounds for advanced applications. *Coordination Chemistry Reviews* 254: 2459–2477.
87. Abrahamse H, Hamblin MR (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal* 473(4): 347-364.
88. Durmuş M, Ahsen V (2010). Potential biological applications of functional phthalocyanines. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 14: 1091–1110.
89. Arslan T, Koca A, Gül A, Bekaroğlu Ö (2020). Design, synthesis and cholinesterase inhibition potential of novel metal phthalocyanines. *Bioorganic Chemistry* 104: 104269.
90. Lionta, E., Spyrou, G., K Vassilatis, D., & Cournia, Z. (2014). Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Current topics in medicinal chemistry* 14(16): 1923-1938.
91. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M (n.d.). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design* 7(2): 146-157.

92. Trott O, Olson AJ (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31: 455–461.
93. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* 3(11): 935-949.
94. Small SA, Petsko GA (n.d.). Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 16(3): 126-132.
95. Barut B (2016). Suda çözünür Ti (IV) ftalosiyanın bileşiklerinin DNA bağlanma, DNA kesim, antioksidan, antimikrobiyal aktivitelerinin ve topoizomeraz I inhibisyonunun incelenmesi Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
96. Howes M-JR, Perry E (n.d.). The Role of Phytochemicals in the Treatment and Prevention of Dementia. *Drugs & aging* 28(6): 439-468.
97. Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology* 11(3): 315-335.
98. Anand P, Singh B (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research* 36(4): 375-399.
99. Morris GM, Ruth H, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009). Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 30: 2785–2791.
100. Tarasova N, Kireev D (2021). Metal phthalocyanines as enzyme inhibitors: Advances and prospects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36: 1368–1381.
101. Boyle RW, Dolphin D (1996). Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochemistry and Photobiology* 64(3): 469-485.
102. Beppu T, Niwa H, Tanaka T, Okamoto K, Tani N, Oda K (2020). Water-soluble phthalocyanines for biomedical applications. *Dyes and Pigments* 180: 108450.

103. Ali S, Khan M, Ahmed R (2025). Photobiological interactions of phthalocyanines with nucleic acids: Implications for therapeutic safety. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 278: 113129.
104. Zhao Y, Chen L, Wang X (2024). DNA cleavage and binding properties of metallophthalocyanines: A comparative study with methylene blue. *Bioorganic Chemistry* 142: 106589.
105. Martins F, Silva J, Pereira C (2022). Safety assessment of phthalocyanine-based compounds: DNA binding, cleavage and therapeutic perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules* 101: 517–526.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı – Soyadı : Nuri Mert DODO
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) :
Yazışma Adresi :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı	-
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi / Eczacılık	2022
Lise	Mecidiyeköy Anadolu Lisesi	2016

AKADEMİK / MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Eczacı	Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi / E Blok Eczane	2023 -
2. Araştırma Görevlisi	İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi / Biyokimya Anabilim Dalı	2022 - 2023

YABANCI DİL

İngilizce (B1)

UZMANLIK ALANI

Eczacılıkta Biyokimya; Moleküler Modelleme

YAYINLAR

-

BİLDİRİLER

-





TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**SUDA ÇÖZÜNEBİLİR FTALOSİYANİN
BİLEŞİKLERİNİN ASETİLKOLİNESTERAZ ve
BÜTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR
ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nuri Mert DODO

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Arzu ÖZEL

TRABZON – 2025