



**T.C.  
BATMAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SÜLFONAT BİRİMLERİ İÇEREN BAZI YENİ HİDRAZON  
TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Fatih DEDEOĞLU**

**Kasım-2025  
BATMAN**

**T.C.  
BATMAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SÜLFONAT BİRİMLERİ İÇEREN BAZI YENİ HİDRAZON  
TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Fatih DEDEOĞLU**

**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Murat SUNKUR**

**Diğer Jüri Üyeleri**

**Pof. Dr. Giray TOPAL      Doç. Dr. Reşit ÇAKMAK**

**Kasım-2025  
BATMAN**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Fatih DEDEOĞLU tarafından hazırlanan “Sülfonat Birimleri İçeren Bazı Yeni Hidrazon Türevlerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması.” adlı tez çalışması 20/11/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Prof. Dr. Giray TOPAL

.....

#### Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Murat SUNKUR

.....

#### Üye

Doç. Dr. Reşit ÇAKMAK

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Ömer Murat ÖTER  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Batman Üniversitesi - Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **BTÜBAP-2024-YL-10** nolu proje ile desteklenmiştir.

## ETİK BEYANI

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sorumluluğu kabullendiğimi bildiririm.

## ETHICAL DECLARATION

I declare that all the information in this thesis has been obtained within the framework of ethical behavior and academic rules, and that the source of any statements and information that do not belong to me in this study prepared in accordance with the thesis writing rules has been fully cited, and I declare that I accept all kinds of legal responsibility in case of any contrary situation.

İmza  
Fatih DEDEOĞLU  
Tarih:

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

## SÜLFONAT BİRİMLERİ İÇEREN BAZI YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatih DEDEOĞLU

Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Murat SUNKUR

2025, 81 Sayfa

Bu tez kapsamında, iki farklı seri halinde yeni hidrazon türevlerinin (**2a-f** ve **3a-f**) sentezi gerçekleştirilmiş; elde edilen moleküllerin insan karbonik anhidraz izoenzimleri I ve II (hCA I ve hCA II) ile asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) hedefleri üzerindeki inhibitör aktiviteleri araştırılmıştır. Söz konusu etkileşimler hem *in vitro* testler hem de *in silico* yöntemler kullanılarak detaylandırılmıştır. Sentezlenen tüm bileşiklerin nanomolar seviyede inhibisyon sergilediği görülmüş olup; hCA I için 47,3–317,8 nM, hCA II için 71,9–376,2 nM, AChE için 81,01–832,9 nM ve BChE için ise 134,5–2264 nM aralığında IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır.

Aktivite sonuçları kıyaslandığında; özellikle **2a** ve **2b** kodlu türevlerin, hCA I izoenzimi üzerinde referans ilaç asetazolamidden (AZA) daha kuvvetli bir baskılayıcı etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Dikkate değer bir diğer bulgu ise, sentezlenen moleküllerin tamamının AChE üzerinde rivastigmin'e kıyasla daha yüksek etkinlik profili sergilemesidir. Bu grupta bilhassa **2f** bileşiği, AChE inhibisyonu açısından en güçlü aday olarak öne çıkmaktadır. BChE enzimi özelinde yapılan karşılaştırmada ise bazı spesifik türevlerin (**2b**, **2c**, **2f**, **3a** ve **3b**), rivastigmin'den daha üstün nanomolar inhibisyon değerlerine ulaştığı belirlenmiştir. Çoklu hedef yaklaşımı çerçevesinde; hCA I, hCA II ve BChE enzimlerinin üçü için de en ideal inhibitör adayın **2b** bileşiği olduğu sonucuna varılmıştır.

Tezde ayrıca, moleküllerin elektronik yapılarını aydınlatmak ve geometrik optimizasyonlarını sağlamak adına B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) metodolojisinden yararlanılmıştır. Ligandların olası bağlanma pozisyonlarını ve reseptörle etkileşim dinamiklerini saptamak amacıyla moleküler kenetleme (docking) ve moleküler dinamik simülasyonları uygulanmıştır. Son aşamada ise, öne çıkan **2b** ve **2f** bileşiklerinin farmakokinetik davranışları, ADME parametreleri ve toksikolojik profilleri; SwissADME ve ADMETlab 3.0 platformları aracılığıyla değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** : AChE ve BChE, DFT, hCA I ve hCA II, Hidrazon, Moleküler docking, Moleküler dinamik.

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

## SYNTHESIS OF SOME NEW HYDRAZONE DERIVATIVES CONTAINING SULFONATE MOIETIES AND INVESTIGATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES

Fatih DEDEOĞLU

Batman University Graduate Education Institute

Chemistry Department of Science

Advisor: Asst. Prof. Murat SUNKUR

2025, 81 Pages

In this thesis, the synthesis of two distinct series of new hydrazone derivatives (**2a–f** and **3a–f**) was carried out, and their inhibitory activities against human carbonic anhydrase isoenzymes I and II (hCA I and hCA II), acetylcholinesterase (AChE), and butyrylcholinesterase (BChE) targets were investigated. These interactions were detailed using both *in vitro* assays and *in silico* methods. It was observed that all synthesized compounds exhibited inhibition in the nanomolar range, with  $IC_{50}$  values calculated in the ranges of 47.3–317.8 nM for hCA I, 71.9–376.2 nM for hCA II, 81.01–832.9 nM for AChE, and 134.5–2264 nM for BChE.

Upon comparison of the activity results, it was determined that derivatives coded **2a** and **2b**, in particular, exerted a more potent inhibitory effect on the hCA I isoenzyme than the reference drug acetazolamide (AZA). Another noteworthy finding is that all synthesized molecules displayed a higher efficacy profile on AChE compared to rivastigmine. In this group, compound **2f**, in particular, emerged as the strongest candidate for AChE inhibition. In the comparison specific to the BChE enzyme, it was determined that certain specific derivatives (**2b**, **2c**, **2f**, **3a**, and **3b**) achieved superior nanomolar inhibition values compared to rivastigmine. Within the framework of a multi-target approach, compound **2b** was concluded to be the most suitable inhibitor candidate for all three enzymes: hCA I, hCA II, and BChE.

Furthermore, the B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) methodology was utilized in the thesis to elucidate the electronic structures of the molecules and to ensure their geometric optimizations. Molecular docking and molecular dynamics simulations were applied to determine the probable binding positions of the ligands and their interaction dynamics with the receptor. In the final stage, the pharmacokinetic behaviors, ADME parameters, and toxicological profiles of the prominent compounds **2b** and **2f** were evaluated via the SwissADME and ADMETlab 3.0 platforms.

**Keywords:** AChE and BChE, DFT, hCA I and hCA II, Hydrazone, Molecular docking, Molecular dynamic.

## ÖN SÖZ

Bu çalışma, sülfonat birimleri içeren bazı yeni hidrazon türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması konusunu incelemek ve literatürdeki eksikliği gidermek, veriler ışığında yeni bir perspektif sunmak amacıyla hazırlanmıştır. Çalışma süreci boyunca akademik ve kişisel anlamda pek çok deneyim kazanmamı sağlayan bu araştırma, yoğun bir emeğin ürünüdür.

Çalışmamın başlangıcından bitimine kadar olan süreçte,engin bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her türlü zorlukta desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat SUNKUR'a, ikinci danışmanım Doç. Dr. Aykut ÖZTEKİN'e ve Doç. Dr. Reşit ÇAKMAK'a en içten şükranlarımı sunarım.

Araştırmaya **BTÜBAP-2024-YL-10** nolu proje ile katkı sağlayan Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, tezin jüri aşamasında görüşleriyle çalışmaya değer katan tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca olduğu gibi, bu zorlu süreçte de, güvenleri ve maddi-manevi destekleriyle her zaman yanımda olan babam Halil DEDEOĞLU ve ablam Fatma DEDEOĞLU'na, ayrıca anlayışları, destekleri, güvenleri ve motivasyonları ile her zaman yanımda olan eşim Merve DEDEOĞLU ve oğlum Doruk DEDEOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu tezin ilgili alanda çalışma yapacak olan araştırmacılara ve akademi dünyasına faydalı olmasını temenni ederim.

Fatih DEDEOĞLU  
BATMAN-2025

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET .....                                                                                                | iv  |
| ABSTRACT.....                                                                                             | v   |
| ÖN SÖZ .....                                                                                              | vi  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                         | vii |
| ÇİZELGELER/TABLolar LİSTESİ.....                                                                          | x   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                                                    | xi  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                                             | xii |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                            | 13  |
| 1.1. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA) İzofomlarının Moleküler ve Fonksiyonel Çeşitliliği.....                | 13  |
| 1.2. hCA Katalitik Mekanizmasının Moleküler Temeli ve İnhibitör Etkileşimleri .....                       | 15  |
| 1.3. Alzheimer Hastalığının Çok Yönlü Patofizyolojisi: Kolinerjik Hipotezin Ötesindeki Mekanizmalar ..... | 17  |
| 1.4. Kolinesteraz Enzimlerinin Rolü ve Çoklu Hedefli Tedavi Yaklaşımı .....                               | 18  |
| 1.5. hCA İnhibitörlerinin (hCAI'ler) Alzheimer Hastalığındaki Potansiyel Rolü ..                          | 19  |
| 1.6. HCA ve Kolinesteraz Enzimlerinin İnhibisyonunda Hidrazid-Hidrazonların Rolü ..                       | 21  |
| 1.7. Moleküler Hibritleşme Yönteminin Detaylı İncelenmesi .....                                           | 23  |
| 1.8. Hesaplamalı Yöntemlerin İlaç Geliştirme Sürecindeki Rolü .....                                       | 24  |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....                                                                               | 26  |
| 2.1. Kolinesteraz İnhibitörleri ve Alzheimer Hastalığı Üzerine Yapılan Çalışmalar .                       | 26  |
| 2.1.1. Hastalığın patogenezi, enzim yapıları ve tedavi stratejileri .....                                 | 26  |
| 2.1.2. Hidrazon iskeletine sahip inhibitörlerin geliştirilmesi.....                                       | 27  |
| 2.1.3. Triazol, tiyadiazol ve diğer heterosiklik bileşikler .....                                         | 29  |
| 2.1.4. Hibrit yapılar ve farklı kimyasal iskeletler .....                                                 | 29  |
| 2.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Terapötik Uygulamaları Üzerine Çalışmalar .....                   | 30  |
| 2.2.1. Karbonik anhidrazların fizyolojik rolü ve ilaç hedefi olarak önemi.....                            | 31  |
| 2.2.2. Sülfonamid ve sülfonilkarbamat türevlerinin inhibitör özellikleri .....                            | 31  |
| 2.2.3. Benzofenon ve naftalen sülfonat türevleri .....                                                    | 32  |
| 2.3. Karbonik Anhidraz ve Kolinesteraz Enzimlerine Yönelik Çoklu Hedefli Çalışmalar .....                 | 33  |
| 2.3.1. Çoklu hedefli yaklaşımın teorik temelleri .....                                                    | 33  |
| 2.3.2. Hidrazon ve Schiff bazı türevlerinin çoklu inhibisyon profilleri.....                              | 34  |
| 2.3.3. Sülfonamid iskeletli hibrit yapılar .....                                                          | 34  |
| 2.3.4. Azotlu heterosiklik bileşikler: Triazol ve benzotriazol türevleri .....                            | 35  |
| 2.4. Kimyasal Bileşiklerin Antikanser, Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri ..                      | 36  |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.1. Hidrazon iskeletinin yapı-aktivite ilişkisi ve genel biyolojik potansiyeli..... | 36 |
| 2.4.2. Antikanser aktivite ve sitotoksosite çalışmaları .....                          | 37 |
| 2.4.3. Antioksidan aktivite ve oksidatif stres ile mücadele .....                      | 38 |
| 2.4.4. Antimikrobiyal ve antitüberküloz aktivite .....                                 | 39 |
| 2.5. Hesaplamalı Kimya Yöntemleri ve Teorik Temeller .....                             | 39 |
| 2.5.1. Yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) ve kuantum kimyasal hesaplamalar ...         | 40 |
| 2.5.2. DFT yönteminin ilaç adaylarına uygulanması.....                                 | 41 |
| 2.5.3. Moleküler kenetleme (docking) ve görselleştirme .....                           | 41 |
| 2.5.4. Moleküler dinamik (MD) simülasyonları .....                                     | 42 |
| 2.5.5. ADME ve toksisite tahminleri .....                                              | 42 |

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM..... 44

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Sülfonat Bileşiklerinin Sentezi .....                                                       | 44 |
| 3.1.1. 1-Formilnaftalen-2-il benzen sülfonat (1a).....                                           | 45 |
| 3.1.2. 1-Formilnaftalen-2-il 4-florobenzen sülfonat (1b) .....                                   | 45 |
| 3.1.3. 1-Formilnaftalen-2-il 4-klorobenzen sülfonat (1c) .....                                   | 45 |
| 3.1.4. 1-Formilnaftalen-2-il 4-bromobenzen sülfonat (1d).....                                    | 45 |
| 3.1.5. 1-Formilnaftalen-2-il 4-metilbenzen sülfonat (1e) .....                                   | 45 |
| 3.1.6. 1-Formilnaftalen-2-il 4-metoksibenzen sülfonat (1f) .....                                 | 46 |
| 3.2. Hedef Bileşiklerin Sentezi .....                                                            | 46 |
| 3.3. Spektroskopik Veriler .....                                                                 | 46 |
| 3.3.1. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il benzen sülfonat (2a) .....         | 46 |
| 3.3.2. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-florobenzen sülfonat (2b).....   | 47 |
| 3.3.3. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-klorobenzen sülfonat (2c) .....  | 47 |
| 3.3.4. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-bromobenzen sülfonat (2d).....   | 48 |
| 3.3.5. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metilbenzen sülfonat (2e) .....  | 48 |
| 3.3.6. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metoksibenzen sülfonat (2f)..... | 49 |
| 3.3.7. 1-((2-İsonikotinilhidrazono)metil)naftalen-2-il benzen sülfonat (3a) .....                | 49 |
| 3.3.8. 1-((2-İsonikotinilhidrazono)metil)naftalen-2-il 4-florobenzen sülfonat (3b).....          | 50 |
| 3.3.9. 1-((2-İsonikotinilhidrazono)metil)naftalen-2-il 4-klorobenzen sülfonat (3c) .....         | 50 |
| 3.3.10. 1-((2-İsonikotinilhidrazono)metil)naftalen-2-il 4-bromobenzen sülfonat (3d).....         | 51 |
| 3.3.11. 1-((2-İsonikotinilhidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metilbenzen sülfonat (3e) .....        | 51 |
| 3.3.12. 1-((2-İsonikotinilhidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metoksibenzen sülfonat (3f) .....      | 51 |
| 3.4. Biyolojik Deneyler.....                                                                     | 52 |
| 3.5. hCA I ve hCA II Esteraz Aktivite Deneyleri .....                                            | 52 |
| 3.6. AChE ve BChE İnhibitörlük Aktivite Deneyleri .....                                          | 53 |
| 3.7. İstatistiksel Analiz.....                                                                   | 53 |
| 3.8. DFT Çalışmaları .....                                                                       | 53 |
| 3.9. Moleküler Docking Çalışmaları.....                                                          | 54 |

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| 3.10. MD Simülasyonu .....            | 54        |
| 3.11. ADMET Analizi .....             | 55        |
| <b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>   | <b>56</b> |
| 4.1. Kimya.....                       | 56        |
| 4.2. Biyolojik Değerlendirme .....    | 57        |
| 4.3. Yapı-Aktivite İlişkileri.....    | 59        |
| 4.4. DFT Sonuçları.....               | 59        |
| 4.5. Moleküler Docking Sonuçları..... | 62        |
| 4.6. MD Simülasyon Sonuçları.....     | 64        |
| 4.7. ADMET Analiz Sonuçları .....     | 66        |
| <b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>  | <b>68</b> |
| 5.1 Sonuçlar .....                    | 68        |
| 5.2 Öneriler .....                    | 69        |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                | <b>71</b> |
| <b>EKLER .....</b>                    | <b>82</b> |
| EK-1 Spektrumlar .....                | 82        |
| EK-2 Aktivite Grafikleri .....        | 108       |

## ÇİZELGELER/TABLolar LİSTESİ

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 4.1:</b> Hedeflenen moleküllerin ve referans inhibitörlerin inhibisyon sonuçları .....                                            | 58 |
| <b>Tablo 4.2:</b> B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) yöntemiyle hesaplanan 2a–f ve 3a–f bileşik serisine ait reaktivite parametreleri .....          | 60 |
| <b>Tablo 4.3:</b> 2a–f ve 3a–f serilerinin AChE, BChE, hCA I ve hCA II üzerindeki bağlanma etkileşimi ve in vitro inhibisyon verileri..... | 61 |
| <b>Tablo 4.4:</b> 2b ve 2f bileşiklerinin ADME, Farmakokinetik özellikleri ve toksikolojik değerlendirme sonuçları .....                   | 67 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 4.1:** Yeni hidrazon türevlerinin sentez yolları .....56
- Şekil 4.2:** B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) yöntemiyle hesaplanan **2b** (A) ve **2f** (B) bileşiklerinin optimize edilmiş yapıları ve HOMO–LUMO gösterimleri.....60
- Şekil 4.3:** AChE-**2f** (A), BChE-**2b** (B), hCA I-**2b** (C) ve hCA II-**2b** (D) komplekslerinin 3 boyutlu en iyi yerleşim pozisyonu ve detaylı 2 boyutlu etkileşimleri.....63
- Şekil 4.4:** AChE ve AChE-**2f** kompleksinin (A), BChE ve AChE-**2b** kompleksinin (B) 200 ns'lik MD simülasyonu yörünge analizinden elde edilen RMSD, RMSF, H-bağı sayısı ve Rg değerleri.....65

## SİMGELER VE KISALTMALAR

**$\delta$ :** Kimyasal kayma (ppm cinsinden).  
***J*:** Kenetlenme sabiti (Hertz cinsinden).  
 **$\nu_{\max}$ :** Maksimum dalga sayısı (Kızılötesi spektrumu için).  
**AChE:** Asetilkolinesteraz enzimi.  
**AD:** Alzheimer Hastalığı.  
**ADME:** Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Atılım.  
**AZA:** Asetazolamid (Referans ilaç).  
**BChE:** Bütirikolinesteraz enzimi.  
**CAS:** Katalitik Aktif Bölge (Enzim için).  
**ChE:** Kolinesteraz.  
**DFT:** Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi.  
**DMSO:** Dimetilsülfoksit (Çözücü).  
**DTNB:** 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (Ellman reaktifi).  
**FT-IR:** Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi.  
**hCA:** İnsan Karbonik Anhidraz enzimi.  
**HOMO:** En Yüksek Dolu Moleküler Orbital.  
**HRMS:** Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometrisi.  
**IC<sub>50</sub>:** Maksimum inhibisyonun %50'sini sağlayan konsantrasyon.  
**LUMO:** En Düşük Boş Moleküler Orbital.  
**MD:** Moleküler Dinamik (Simülasyon).  
**MTDL:** Çok Hedefli Yönlendirilmiş Ligand.  
**NMR:** Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi.  
**PAS:** Periferik Anyonik Bölge (Enzim için).  
**PDB:** Protein Veri Bankası.  
**RMSD:** Kök Ortalama Kare Sapma.  
**RMSF:** Kök Ortalama Kare Dalgalanma.  
**ROS:** Reaktif Oksijen Türleri.  
**SAR:** Yapı-Aktivite İlişkisi.  
**TEA:** Trietilamin.  
**TLC:** İnce Tabaka Kromatografisi.

## 1. GİRİŞ

İnsan karbonik anhidrazlar (hCA'lar, EC 4.2.1.1), karbondioksit ile suyun birleşmesi sonucu karbonik asit oluşumunu katalizleyen, birçok biyolojik süreçte temel rol oynayan metaloenzimlerdir. Karbonat dehidratazlar olarak da adlandırılan hCA'lar hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunmakta olup, farklı işlevlere sahip çok sayıda izoenzim içerir (Çakmak, Başaran, Türkmenoğlu ve ark., 2025c; Kurban ve ark., 2024; Poslu ve ark., 2024; Supuran, 2008). Karbondioksitin hidrasyonunun ötesinde, hCA'lar glukoneogenez, üreogenez ve lipogenez gibi biyosentetik yolların yanı sıra sıvı ve elektrolit sekresyonu, pH düzenlenmesi, mide asidi üretimi ve dokulardan akciğerlere bikarbonat formunda karbondioksit taşınması gibi süreçlerde de önemli işlevler üstlenmektedir (Kurban ve ark., 2024; Poslu ve ark., 2024). Bu enzimler; solunum, karbondioksit ve bikarbonat taşınımı, pH ve karbondioksit homeostazı, elektrolit salgılanması, kalsifikasyon, kemik rezorpsiyonu, tümör oluşumu ve daha pek çok fizyolojik olay açısından büyük önem taşımaktadır (Poslu ve ark., 2024; Supuran, 2008; Said, George, Petreni ve ark., 2022). Bu nedenle, çeşitli patolojik durumların tedavisinde önemli hedeflerdir. Etkilerinden dolayı insan karbonik anhidraz inhibitörleri (hCAI'ler), kanser, glokom ve epilepsi gibi birçok hastalığın tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılmaktadır (Said, George, Petreni ve ark., 2022; Akış, Çakmak ve Şentürk, 2024; Singh, Arifuddin, Supuran ve Nerella, 2025). Son yıllarda, CA izoformlarıyla ilişkili bu hastalıkların tedavisindeki kritik rolleri nedeniyle hCAI'lere yönelik ilgi giderek artmıştır (Çakmak, Başaran, Şahin ve ark., 2024a; Innocenti, Vullo, Scozzafava ve Supuran, 2008; Işık ve ark., 2015).

### 1.1. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA) İzoformlarının Moleküler ve Fonksiyonel Çeşitliliği

İnsan genomu, katalitik açıdan aktif 15 farklı alfa-karbonik anhidraz ( $\alpha$ -CA) izoformunu (hCA I, II, III, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII, XIV, XV) kodlar. Bu izoenzimler, amino asit dizilimlerindeki benzerliklere rağmen, hücresel lokalizasyonları, doku dağılımları ve fizyolojik rollerinde büyük farklılıklar gösterir (Supuran, 2016). Bu

çeşitlilik, her bir izoformun belirli biyolojik ihtiyaçlara cevap verecek şekilde özelleşmiş olmasından kaynaklanır.

#### Sitoplazmik İzoformlar:

- hCA I ve hCA II: Eritrositlerde, böbrek tübül hücrelerinde ve gastrointestinal sistemde bol miktarda bulunur. Bu izoformlar, özellikle CO<sub>2</sub> ve bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) iyonlarının taşınması ve pH dengesinin korunması gibi genel fizyolojik süreçlerde anahtar rol oynar. hCA II, bilinen en hızlı enzimlerden biri olup, CO<sub>2</sub>'in su ile reaksiyonunu saniyede 106 kat hızlandırarak nefes alıp verme sırasında kan pH'sının ani değişimlerine karşı tampon görevi görür. (Sly ve Hu, 1995). hCA I ise, daha düşük katalitik aktiviteye sahip olmasına rağmen, sinir sistemindeki klorür (Cl<sup>-</sup>) iyonlarının taşınmasında ve hormonal sinyalizasyonda rol alabilir.
- hCA III: Özellikle iskelet kası ve karaciğerde yüksek oranda eksprese edilen hCA III, en yavaş çalışan izoformlardan biridir. Düşük katalitik aktivitesine karşın, glutatyon metabolizması ve oksidatif stresin azaltılması gibi non-katalitik işlevlere sahiptir (Räisänen ve ark., 1999).

#### Mitokondriyal İzoformlar:

- hCA VA ve hCA VB: Mitokondride yerleşen bu izoenzimler, biyosentetik yollarda kritik öneme sahiptir. hCA VA, karaciğerdeki mitokondrilerde eksprese edilerek üre döngüsünün ve glukoneogenezin ilk adımlarını katalizler. Bu döngüler, amonyak detoksifikasyonu ve kan şekeri homeostazı için hayati önem taşır. hCA VB ise, yağ asidi sentezinin başlangıç basamağında rol oynar ve bu nedenle lipid metabolizmasıyla yakından ilişkilidir (Supuran, 2012). Bu izoformların disfonksiyonu, ciddi metabolik hastalıklara yol açabilir.

#### Membranla İlişkili İzoformlar:

- hCA IV, IX, XII, XIV: Bu izoformlar, hücre zarında bulunarak hücre dışı pH'ı düzenler ve hücre içi-hücre dışı iyon değişimine aracılık ederler. hCA IV, böbrek tübüllerinde ve göz dokusunda bulunur ve sıvı sekresyonu ile bikarbonat emilimini sağlar. hCA IX ve hCA XII ise, özellikle kanser biyolojisi açısından büyük ilgi çekmektedir. Hipoksik (oksijen yetersizliği) tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen bu izoenzimler, laktik asit gibi metabolik atıkları hücre dışına taşıyarak tümör mikroçevresinin asidik kalmasına yardımcı olur (McDonald, Winum, Supuran ve Dedhar, 2012). Bu asidik ortam, tümör büyümesini, anjiyogenezi (yeni damar oluşumu) ve metastazı desteklerken, bağışıklık

sisteminin anti-tümör yanıtını baskılar. Bu nedenle, hCA IX ve XII, kanser tedavisinde hedeflenen moleküller haline gelmiştir (Nocentini ve Supuran, 2019). Bu yapısal ve fonksiyonel çeşitlilik, hCA izoformlarının yalnızca CO<sub>2</sub>-bikarbonat dengesi için değil, aynı zamanda doku özgülüğüne göre farklı patofizyolojik süreçlerde de kritik roller üstlendiğini göstermektedir. Bu karmaşık işlev ağı, hCAI'lerin neden kanserden glokoma kadar geniş bir hastalık yelpazesinde terapötik potansiyele sahip olduğunu açıklamaktadır.

### **1.2. hCA Katalitik Mekanizmasının Moleküler Temeli ve İnhibitör Etkileşimleri**

hCA'ların olağanüstü katalitik verimi, aktif bölgelerindeki çinko (Zn<sup>2+</sup>) iyonu etrafında şekillenen sofistike bir mekanizmaya dayanır. Bu mekanizma, çinko-hidroksit mekanizması olarak adlandırılır.

1. Çinko-Koordine Su Aktivasyonu: Katalitik döngü, aktif bölgedeki çinko iyonuna koordinasyon sağlayan bir su molekülü ile başlar. Bu su molekülü, enzim içindeki bir proton taşıyıcı amino asit (genellikle His64) tarafından proton transferiyle bir hidroksit iyonuna (Zn<sup>2+</sup>-OH<sup>-</sup>) dönüştürülür. Bu hidroksit, son derece reaktif bir nükleofildir (Lindskog, 1997).

2. CO<sub>2</sub> Hidratasyonu: Reaktif hidroksit, aktif bölgeye giren bir karbondioksit (CO<sub>2</sub>) molekülüne saldırarak bir bikarbonat iyonu (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oluşturur. Bu bikarbonat iyonu hızla aktif bölgeden ayrılır ve döngü tamamlanır.

3. Yenilenme: Bikarbonatın ayrılmasıyla oluşan boş alana yeni bir su molekülü girer ve katalitik döngü yeniden başlar.

hCA inhibitörleri (hCAI'ler), bu katalitik döngüyü çeşitli mekanizmalarla bozarak enzim aktivitesini baskırlar. En yaygın ve güçlü hCAI'ler, birincil sülfonamidler (R-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) ve sülfonat türevleridir. Bu moleküller, yapılarındaki sülfonamid grubu sayesinde aktif bölgedeki çinko iyonuna kuvvetle bağlanır ve çinko-hidroksit mekanizmasını bloke ederler. Sülfonamidler, fizyolojik pH'da deprotone olarak sülfonamid aniyonuna dönüşür ve bu aniyon, çinko iyonuna tetrahedral geometriyle koordinasyon sağlar. Bu bağlanma, katalitik su molekülünün yerini alarak enzimi inaktive eder (Alterio ve ark., 2012).

Diğer inhibitör sınıfları arasında karboksilatlar, fenolik bileşikler ve tiyollar bulunur, ancak sülfonamid türevleri en etkili olanlar arasındadır ve klinik olarak en çok

kullanılanlardır. Bu moleküler düzeydeki etkileşimlerin anlaşılması, hastalığa spesifik hCA izoformlarını hedef alan yeni ve daha seçici inhibitörlerin rasyonel tasarımına olanak tanımaktadır. Örneğin, glokom tedavisinde göz içi basıncını düşürmek için kullanılan dorzolamid, özellikle hCA II'yi hedef alırken, kanser tedavisinde kullanılan yeni nesil hCAI'ler hCA IX ve hCA XII'ye karşı yüksek seçicilik göstermeye çalışır (Supuran, 2008). Bu seçici hedefleme, yan etkileri azaltarak tedavi etkinliğini artırmayı amaçlamaktadır.

Alzheimer hastalığı (AD), özellikle yaşlanan nüfuslara sahip gelişmiş ülkelerde önemli bir toplumsal sağlık sorunu olmaya devam eden, bilişsel bozukluk, hafıza kaybı ve anormal davranışlarla karakterize edilen ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (Ahmad ve ark., 2018; Çakmak, Başaran ve Şentürk, 2022c; Ulrich ve Holtzman, 2016). Hastalığın kesin nedeni bilinmemekle birlikte, sağlıklı ve hasta bireylerin beyin dokuları üzerinde yapılan kapsamlı çalışmalarda, asetilkolin (ACh) ve bütirikolin (BCh) gibi önemli nörotransmitterlerin düzeylerinin sağlıklı ve hasta beyinlerde belirgin farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir (Obaid ve ark., 2022; Marucci, Buccioni, Dal Ben ve ark., 2021). Çalışmaların çoğu, hastalık ilerledikçe beyindeki sinir iletiminin azaldığını ve bunun ciddi beyin küçülmesine yol açtığını bildirmektedir. Beyindeki nörotransmisyonu artırmaya yönelik tedavi stratejilerinde, beyin fonksiyonları için kritik öneme sahip ACh ve BCh nörotransmitterlerini hidrolize eden AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyonu, Alzheimer tedavisinde önemli bir seçenek haline gelmiştir (Çakmak, Başaran, Ercan ve ark., 2025a; Çakmak, Çınar, Başaran ve ark., 2024b; Arıkan Ölmez, Noma, Kaya ve Osman, 2024). Bu nedenle söz konusu enzimler ilaç tasarımında önemli hedefler olmuş, inhibitörlerinin kullanımı ise AD tedavisi için cazip bir terapötik strateji olarak değerlendirilmiştir. Son yıllarda dünyanın farklı bölgelerinden birçok araştırmacı, Alzheimer tedavisinde kullanılabilecek yeni ve güçlü kolinesteraz (ChE) inhibitörleri üzerine yoğunlaşmaktadır (Gao, Jiang, Zhan ve Sun, 2021; Akıncıoğlu ve Gülçin, 2020). Günümüzde rivastigmin, donepezil, galantamin ve neostigmin gibi inhibitörler, AChE ve BChE enzimlerini baskılama kapasiteleri sayesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Çınar, Boğa, Topal ve Çakmak, 2022; Başaran, Çakmak, Şentürk ve Taskin-Tok, 2022c). Bu inhibitörler, nörotransmitter düzeylerini (ACh ve BCh) artırarak beyindeki iletimi güçlendirmeyi ve Alzheimer ile ilişkili bilişsel semptomları hafifletmeyi hedeflemektedir. Kolinerjik yaklaşımın semptomların kontrolünde ve hastalık ilerleyişinin yavaşlatılmasında kısmen etkili olduğu gösterilmiştir (Gajendra, Pratap, Poornima ve ark., 2024; Singh, Prasad ve Kumar, 2024). Bununla birlikte, hastalığın

ilerlemesini durdurabilecek ya da tamamen iyileştirebilecek etkili tedavilere ve terapötik ilaçlara acil ihtiyaç duyulmaktadır (Çakmak, Ay, Çınar ve ark., 2023; Kuzu, Alagoz, Demir ve ark., 2024; Tutuş, Kaya, Baz ve ark., 2024; Sun, Zhen, Harakandi ve ark., 2024).

Alzheimer hastalığının tedavisinde erken dönem terapötik yaklaşımların çoğu AChE inhibisyonuna odaklanmıştır. Ancak son on yılda yapılan araştırmalar, CA inhibitörlerinin (CAI'ler) Alzheimer tedavisindeki potansiyel rolünü vurgulamaktadır. İnsan karbonik anhidraz inhibitörlerinin (hCAI'ler), amiloid  $\beta$  patolojisini azalttığı ve beyin damar sağlığını ile glial fonksiyonları iyileştirerek bilişsel performansı artırdığı bildirilmiştir. Bu konudaki çalışmalar, asetazolamid (AZA) ve metazolamid dahil olmak üzere hCAI'lerin, amiloid  $\beta$ 'nın hem damar hem de nöral hücrelerde tetiklediği mitokondriyal disfonksiyon ve apoptozu hafıflettiğini göstermiştir. Bu etkinin, mitokondride reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltarak ve mitokondriyal membran potansiyelinin düşmesini engelleyerek gerçekleştiği ifade edilmektedir. Bu bulgular, AChE/BChE ve hCA'ların eşzamanlı inhibisyonunun Alzheimer için daha etkili bir tedavi stratejisi sağlayabileceğini desteklemektedir (Çakmak, Başaran, Şahin ve ark., 2024a).

### **1.3. Alzheimer Hastalığının Çok Yönlü Patofizyolojisi: Kolinergic Hipotezin Ötesindeki Mekanizmalar**

Alzheimer hastalığı (AD), tek bir biyolojik yolun bozulmasıyla açıklanamayan, birden fazla patolojik mekanizmanın etkileşimi sonucu ortaya çıkan karmaşık bir nörodejeneratif bozukluktur. Mevcut metninizde yer alan kolinergic hipotez, hastalığın bilişsel semptomlarını açıklayan en eski ve en iyi bilinen yaklaşımlardan biri olsa da, hastalığın altında yatan patolojik süreçleri tam olarak tanımlamaktan uzaktır. Bu karmaşık süreçler, amiloid beta ( $A\beta$ ) plaklarının birikimi, tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu, nöroinflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyon gibi mekanizmaları içerir (Lane, Hardy ve Schott, 2018).

**Amiloid Beta Patolojisi:** Hastalığın en erken evrelerinde, amiloid öncü proteini (APP) adı verilen büyük bir transmembran proteinin anormal şekilde parçalanmasıyla  $A\beta$  peptidleri oluşur. Bu peptidlerin birikimi, nöronlar arasında çözünmeyen agregatlar ve plaklar oluşturarak sinaptik fonksiyonları bozar.  $A\beta$  plaklarının varlığı, sinir hücrelerinin birbirleriyle iletişim kurmasını engeller ve nöronal hasara yol açar. Bu süreç, aynı

zamanda nöronal stres, oksidatif hasar ve pro-inflamatuar moleküllerin salınımı gibi zincirleme reaksiyonları da tetikler (Hardy ve Selkoe, 2002).

**Tau Patolojisi:** Nöronların iç iskeletini oluşturan mikrotübüllerin stabilizasyonundan sorumlu olan tau proteini, AD'de anormal bir şekilde fosforilasyon sürecine girer. Bu durum, tau proteinlerinin mikrotübüllerden ayrılarak çözünmez nörofibriler yumaklar (NFTs) halinde birikmesine neden olur. Bu yumaklar, nöronal taşıma sistemini felç ederek hücre içi iletişimi bozar ve nihayetinde nöron ölümüne yol açar. Tau patolojisinin yayılması, bilişsel gerilemenin ciddiyeti ile A $\beta$  birikiminden daha güçlü bir korelasyon gösterir, bu da onun hastalığın ilerleyişinde kritik bir rol oynadığını düşündürmektedir (Kametani ve Hasegawa, 2018)

**Nöroinflamasyon:** Beynin bağışıklık hücreleri olan mikrogialar ve astrositler, A $\beta$  birikimine yanıt olarak aktive olurlar. Ancak, bu bağışıklık yanıtı kronik hale geldiğinde, sinaptik hasara ve nöronal ölüme katkıda bulunan sitokinler ve kemokinler gibi toksik maddeler salınır (Heneka ve ark., 2015). Kronik nöroinflamasyon, AD'nin ilerlemesinde kilit bir rol oynar ve terapötik müdahale için önemli bir hedef olarak değerlendirilmektedir. Bu çok faktörlü patofizyolojik tablo, sadece AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyonuna odaklanan mevcut tedavilerin neden sınırlı bir etkiye sahip olduğunu açıklamaktadır. Hastalığı tamamen durdurabilecek veya geri döndürebilecek bir tedavi geliştirmek için, birden fazla patolojik mekanizmayı aynı anda hedefleyen yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **1.4. Kolinesteraz Enzimlerinin Rolü ve Çoklu Hedefli Tedavi Yaklaşımı**

Alzheimer tedavisinde kolinerjik yaklaşım, ilk nesil ilaçların temelini oluşturmuştur. Bu yaklaşım, asetilkolin (ACh) gibi nörotransmitterlerin seviyelerini artırarak sinaptik iletişimi güçlendirmeyi hedefler. Bu süreçte rol oynayan başlıca iki enzim, asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE)'dir. AChE, sinapslarda salınan ACh'yi hızla hidrolize ederek sinyal iletiminin sonlanmasını sağlar. AD'de bu enzimin aktivitesi düşse de, hastalığın erken evrelerinde bile önemli bir hedef olmaya devam eder. BChE ise, sağlıklı beyinde daha düşük seviyelerde bulunmasına rağmen, özellikle glial hücrelerde, hastalık ilerledikçe aktivitesini artırır. Bazı araştırmalar, AD'nin ileri evrelerinde BChE'nin, AChE'den daha fazla ACh hidrolizine katkıda bulunarak bilişsel gerilemeyi hızlandırabileceğini öne sürmektedir (Greig ve ark., 2002). Bu durum, sadece AChE'yi değil, aynı zamanda BChE'yi de hedef alan çift etkili

inhibitörlerin geliştirilmesinin önemini vurgulamaktadır. Bu inhibitörler, nörotransmitter düzeylerini daha etkili bir şekilde artırarak hem bilişsel semptomların kontrolünü sağlamayı hem de hastalık ilerleyişini yavaşlatmayı amaçlamaktadır. Günümüzde kullanılan rivastigmin, donepezil ve galantamin gibi kolinesteraz inhibitörleri, hastalığın semptomlarını hafifletmede kısmen etkili olsalar da, hastalığın ilerlemesini durduramazlar. Ayrıca bu ilaçlar, bulantı, kusma ve diyare gibi yan etkileri nedeniyle hasta uyumunu düşürebilirler. Bu sınırlamalar, daha güçlü, daha seçici ve daha az yan etkili yeni inhibitörlere olan ihtiyacı gündeme getirmektedir (Sharma, (2019).

### **1.5. hCA İnhibitörlerinin (hCAI'ler) Alzheimer Hastalığındaki Potansiyel Rolü**

Son yıllarda yapılan araştırmalar, karbonik anhidrazların (CA'lar) da AD'nin patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, yalnızca kolinerjik sistemin değil, aynı zamanda metabolik ve iyonik dengenin de AD patolojisinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Özellikle, beyindeki pH dengesini ve iyon homeostazını düzenleyen hCA izoformlarının (hCA II, hCA IV) disfonksiyonu, nöronal sinyalizasyonun bozulmasına ve sinaptik plastisitenin azalmasına katkıda bulunabilir. Yapılan çalışmalar, hCAI'lerin, amiloid  $\beta$  patolojisini azalttığı ve beyin damar sağlığını ve glial fonksiyonları iyileştirerek bilişsel performansı artırdığını bildirmiştir. Bu konudaki çalışmalar, asetazolamid (AZA) ve metazolamid dahil olmak üzere hCAI'lerin, amiloid  $\beta$ 'nın hem damar hem de nöral hücrelerde tetiklediği mitokondriyal disfonksiyon ve apoptozu (hücre ölümü) hafiflettiğini göstermiştir. Bu etkinin, mitokondride reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azaltarak ve mitokondriyal membran potansiyelinin düşmesini engelleyerek gerçekleştiği ifade edilmektedir (Solesio, Peixoto, Debure ve ark., 2018). Bu bulgular, AChE/BChE ve hCA'ların eşzamanlı inhibisyonunun Alzheimer için daha etkili bir tedavi stratejisi sağlayabileceğini desteklemektedir. Bu tür çoklu hedefli ligandlar, sinaptik ACh seviyelerini artırarak kolinerjik sinyalizasyonu güçlendirirken, hCA inhibisyonu yoluyla beyindeki asidik stresi ve oksidatif hasarı da azaltabilirler. Bu sinerjik etki, tek hedefli tedavilere kıyasla daha kapsamlı bir terapötik yanıt sağlayabilir ve yan etkileri azaltabilir (Provensi, Carta, Nocentini ve ark., 2019), çünkü tek bir enzimi çok güçlü bir şekilde inhibe etmek yerine, birden fazla enzimi daha ılımlı bir şekilde hedefleyebilirler. Bu kapsamlı yaklaşım, hem semptomları kontrol

etmede hem de hastalığın ilerlemesini yavaşlatmada yeni bir çıkış açma potansiyeline sahiptir.

Bugüne kadar bu metabolik enzimler üzerindeki inhibitör etkileri açısından pek çok küçük organik molekül incelenmiştir. Bu moleküllerden biri de hidrazid-hidrazon türevleridir. Hidrazid-hidrazon yapısı, ilaç kimyasında önemli bir iskelet kabul edilmekte olup, hidrojen bağı alıcısı ve/veya vericisi olarak görev yapabilen, biyolojik hedeflerdeki farklı amino asitlerle etkileşim kurmaya olanak sağlayan özgün yapısıyla stratejik bir farmakofor olarak öne çıkmaktadır (Keskin, Doğan, Gündüz ve ark., 2022; Ramakrishnan, Chourasiyaa ve Bharatam, 2015). Hidrazid-hidrazon türevleri, azometin ( $-C=N-$ ) bağı içeren ve hidrazid ( $-CONHNH_2$ ) veya hidrazon ( $R_1R_2C=NNH_2$ ) iskeletinden oluşan bir bileşik sınıfıdır. Bu moleküler yapı, ilaç keşif ve tasarımında stratejik bir öneme sahiptir, çünkü moleküle çok yönlü etkileşim yetenekleri kazandırır. Azometin bağı, moleküle konformasyonel esneklik sağlamanın yanı sıra, proteinlerin aktif bölgelerindeki amino asitlerle güçlü  $\pi-\pi$  istifleme etkileşimlerine girebilir. Ayrıca, hidrazid grubundaki hidrojen bağı verici ve alıcıları, biyolojik hedeflerle çok sayıda hidrojen bağı kurarak molekülün bağlanma afinitesini artırır (Rollas ve Küçükgüzel, 2007). Bu özgün yapısı sayesinde, hidrazid-hidrazonlar biyolojik zarlar boyunca kolaylıkla geçiş yapabilir ve farklı dokulardaki enzimlere ulaşabilirler.

Bu bileşik sınıfının geniş biyolojik aktivite spektrumu, farklı patolojik durumların tedavisinde yeni ilaç adaylarının geliştirilmesine olanak tanımıştır.

- **Antikanser Aktivite:** Hidrazid-hidrazon türevleri, birçok kanser hücresi hattında apoptozu (programlanmış hücre ölümü) indüklemeye, hücre döngüsünü durdurma ve anti-angiyojenik (tümöre kan sağlayan yeni damar oluşumunu engelleme) özellikler sergilemiştir. Bazı türevler, tümör hücrelerinde eksprese edilen spesifik enzimleri veya proteinleri hedef alarak seçici bir sitotoksik etki gösterirler [Popiołek, (2016)].

- **Antioksidan Aktivite:** Hidrazid-hidrazonların, serbest radikalleri temizleme ve lipid peroksidasyonunu engelleme yetenekleri, onları oksidatif stresle ilişkili hastalıkların tedavisinde potansiyel ajanlar yapar. Bu antioksidan özellik, özellikle nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif hasarın önemli bir rol oynadığı durumlarda büyük önem taşır (Yılmaz, Coban ve Suzen, 2012).

- **Antimikrobiyal Aktivite:** Bu bileşikler, antibakteriyel ve antitüberküloz özellikleriyle de bilinirler. Örneğin, tüberküloz tedavisinde yaygın olarak kullanılan izoniazid, hidrazid grubunu içeren bir ön ilaçtır. Bakteriideki katalaz-peroksidaz enzimi tarafından aktive edilerek mikolik asit sentezini inhibe eder ve bu sayede mikobakterilerin

hücre duvarı oluşumunu engeller (Timmins ve Deretic, 2006). Benzer şekilde, nifuroksazid gibi diğer türevler de farklı bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu geniş farmakolojik profil, hidrazid-hidrazon iskeletinin, ilaç tasarımıda çok yönlü bir platform olarak hizmet ettiğini kanıtlamaktadır.

### **1.6. HCA ve Kolinesteraz Enzimlerinin İnhibisyonunda Hidrazid-Hidrazonların Rolü**

Son yıllarda, hidrazid-hidrazon türevlerine olan ilgi, onların hCA ve kolinesteraz (ChE) enzimlerini inhibe etme potansiyelleri nedeniyle artmıştır. Bu iki enzim sınıfının inhibisyonu, özellikle glokom ve Alzheimer gibi kompleks hastalıkların tedavisinde yeni stratejilerin önünü açmaktadır.

**hCA İnhibisyonu:** Hidrazid-hidrazon türevleri, hCA'ların aktif bölgesindeki katalitik çinko iyonuna farklı bağlanma modları aracılığıyla etki gösterebilirler. Bu moleküller, çinko iyonuna doğrudan bağlanabilir, aktif bölgedeki su molekülünün yerini alabilir veya enzimin yapısını değiştirerek aktivitesini bozabilirler. Özellikle, sülfonat veya sülfonamid gibi çinko bağlayıcı gruplar içeren hidrazonlar, hCA'lara karşı yüksek afinite sergileyerek güçlü inhibitörler olarak öne çıkarlar (Güzel, Temperini, Innocenti ve ark., 2008). Bu durum, glokom tedavisinde göz içi basıncını düşürmek için hCA'ların inhibisyonuna dayanan ilaçların geliştirilmesinde önemli bir yol açmıştır.

**Kolinesteraz İnhibisyonu:** Hidrazid-hidrazonlar, kolinesterazların (AChE ve BChE) aktif bölgelerindeki serin, histidin ve glutamat gibi kritik amino asitlerle etkileşime girerek enzim aktivitesini baskılayabilirler. Bu moleküllerin esnek yapısı, enzimlerin katalitik bölgesine veya periferik alt bölgelerine bağlanmalarına olanak tanır. Periferik bölgeye bağlanma, enzimin substrat (asetilkolin) ile etkileşimini sterik olarak engelleyerek inhibisyona yol açar (Bozbey, Özdemir, Uslu ve ark., 2020). Bu mekanizma, Alzheimer hastalığında kullanılan mevcut ilaçların (donepezil, rivastigmin) etki mekanizmasına benzerdir. Bazı hidrazon türevlerinin, AChE ve BChE üzerinde farklı inhibitör potansiyeller sergilemesi, bu molekül sınıfının hem AChE'yi hem de BChE'yi hedefleyen çift etkili inhibitörlerin geliştirilmesi için umut verici bir platform sunduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, hidrazid-hidrazon türevleri, benzersiz yapısal özellikleri sayesinde, çoklu biyolojik hedefleri olan karmaşık hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek çoklu

hedefli ligandların (MTDL'ler) tasarımında kritik bir role sahiptir (Guzior, Wieckowska, Panek ve Malawska, 2015). Bu moleküllerin hCA ve kolinesteraz enzimlerini aynı anda inhibe etme yeteneği, glokom ve Alzheimer gibi hastalıkların çok yönlü patofizyolojisine kapsamlı bir çözüm sunabilir.

Bu çalışmada hedeflenen bileşiklerin yapısında yer alan sülfonat grubu, bir diğer farmakofor olarak öne çıkmaktadır. Hidrazon iskeletinin yanı sıra, çalışmanızda hedeflediğiniz bileşiklerin yapısında bulunan sülfonat grubu, ilaç kimyasında kritik bir rol oynayan güçlü bir farmakofordur. Sülfonatlar,  $R-SO_3H$  genel formülüne sahip olup, fizyolojik pH değerlerinde genellikle sülfonat anyonu ( $R-SO_3^-$ ) olarak bulunur. Bu grup, moleküllere yüksek hidrofilik özellik kazandırır, ancak aromatik halkalara bağlı aril sülfonat türevleri, lipofilik kısımlara da sahip olabilir ve bu sayede hücresel biyolojik zarlardan daha kolay geçiş yapabilirler (Meanwell, (2011). Bu çift yönlü özellik, sülfonatları ilaç geliştirme sürecinde son derece değerli bir yapısal motif haline getirir. Sülfonatların ilaç kimyasında yaygın olarak kullanılmasının birkaç ana nedeni vardır:

1. Enzim Bağlama Yeteneği: Sülfonamid ( $R-SO_2NH_2$ ) grupları, hCA'lar gibi metalloproteinlerin aktif bölgelerindeki katalitik çinko ( $Zn^{2+}$ ) iyonuna yüksek afinite ile bağlanır. Bu güçlü koordinasyonel bağ, enzimin katalitik aktivitesini etkili bir şekilde bloke eder. Sülfonamid tabanlı ilaçlar, hCA inhibitörü olarak glokom (dorzolamid, asetazolamid) ve epilepsi gibi hastalıkların tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır. Sülfonatların kendileri de, sülfonamidler gibi güçlü çinko bağlayıcı özellikler sergilemeseler de, enzimin aktif bölgesindeki diğer amino asitlerle güçlü elektrostatik ve hidrojen bağ etkileşimleri kurarak inhibitör aktivite gösterebilirler (Supuran, C. T. (2010).
2. Yüksek Biyolojik Aktivite Spektrumu: Sülfonat içeren bileşikler, sadece karbonik anhidraz inhibisyonu ile sınırlı kalmayıp, çeşitli enzimler ve biyolojik hedefler üzerinde etki gösterirler. Bu moleküllerin antikolinesteraz aktiviteleri de geniş çapta incelenmiştir. Yapılan çalışmalar, aril sülfonat türevlerinin, asetilkolinesterazın (AChE) aktif bölgesindeki kritik serin ve histidin kalıntıları ile etkileşime girerek enzimin substrat hidrolizini engellediğini ortaya koymuştur (Şahin, Bingöl, Onur ve ark., 2022). Bu tür bileşikler, hem AChE hem de BChE'yi inhibe etme potansiyeli taşıyarak, Alzheimer hastalığının tedavisinde yeni bir yaklaşım sunmaktadır.
3. İlaç Özelliklerinin İyileştirilmesi: Sülfonat grupları, bir molekülün çözünürlüğünü artırmak, farmakokinetik özelliklerini optimize etmek ve metabolik stabilitesini

artırmak için yaygın olarak kullanılır. İlaç molekülüne sülfonat grubu eklemek, onun absorpsiyon, dağılım ve atılım profilini olumlu yönde etkileyebilir. Özellikle, hedef organa veya dokuya seçici bir şekilde yönlendirilmek üzere tasarlanan moleküllerde, sülfonatın fizyokimyasal özellikleri büyük önem taşır (Kerns ve Di, 2008). Lipinski, (2004).

Yapılan bir çalışmada, bazı sülfonat türevlerinin, asetilkolinesteraz üzerinde potansiyel inhibitör etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Bu durum, sülfonat ve hidrazon gibi iki farklı farmakoforun tek bir hibrit molekülde birleştirilmesinin, hem hCA'ları hem de kolinesterazları hedefleyebilen, güçlü ve çok etkili yeni ilaç adaylarının rasyonel tasarımına olanak sağladığını göstermektedir. Bu hibrit strateji, özellikle Alzheimer ve glokom gibi birden fazla enzimin patolojik süreçlerde rol oynadığı hastalıkların tedavisinde sinerjik bir etki sağlayarak daha yüksek terapötik etkinlik vaat etmektedir (Akış, Çakmak ve Şentürk, 2024).

Yukarıda belirtilen bulgular ışığında, bu çalışmada yeni sentezlenen hibrit moleküllerin (2a–f ve 3a–f) glokom ve Alzheimer hastalığı (AD) dahil olmak üzere çeşitli metabolik hastalıklarla ilişkili seçilmiş metabolik enzimler (hCA I, hCA II, AChE ve BChE) üzerindeki inhibitör özellikleri değerlendirilmiştir. Hem AChE/BChE hem de hCA I/II izoformlarını inhibe eden çift etkili küçük moleküller, yan etkileri azaltıp etkinliği artırarak AD tedavisinde umut verici bir strateji sunduğundan, bu çalışmada potansiyel antikolinesteraz ve karbonik anhidraz inhibitörleri olabilecek hedef molekülleri elde etmek amacıyla 4-hidroksibenzhidrazid (1) (veya izonikotinik hidrazid [izoniazid] (2)) ile sülfonat bileşikleri, hidrazon fonksiyonelliği kullanılarak moleküler hibritleşme yöntemiyle birleştirilmiştir.

### 1.7. Moleküler Hibritleşme Yönteminin Detaylı İncelenmesi

Moleküler hibritleşme, farklı biyolojik hedeflere etki eden iki veya daha fazla aktif bileşiğin (farmakoforun) tek bir yeni molekül içinde birleştirilmesine dayanan akıllı bir yaklaşımdır. (Viegas-Junior ve ark., 2007). Bu stratejinin temel amacı, tek etkili bir molekülün sahip olduğu sınırlılıkları aşarak, daha güçlü, daha seçici ve daha az yan etkiye sahip yeni nesil ilaç adayları üretmektir. (Meunier, (2008).

Bu yöntemle tasarlanan moleküllerin başlıca avantajları şunlardır:

- Sinerjik Etki: Hibrit molekül, her iki farmakoforun etkisini birleştirerek sinerjik bir biyolojik aktivite gösterebilir.
- Yan Etki Profilinin İyileştirilmesi: Çoklu hedefe sahip bir molekül, her bir hedefi daha düşük konsantrasyonlarda inhibe edebileceği için toksisite riski azalabilir.
- Hastalık Direncini Azaltma: Özellikle çoklu mekanizmaları olan hastalıklarda (örneğin kanser), hibrit moleküller tek hedefe dayalı ilaçlara karşı gelişen direnci engellemede daha başarılı olabilir.

Mevcut çalışmada hedef bileşiklerin tasarım stratejisi, 4-hidroksibenzhidrazid (**1**) türevleri olan **2a–f** bileşikleri ve izoniyazid (**2**) türevleri olan **3a–f** bileşikleri ile bunların aril sülfonat grubunun para pozisyonundaki çeşitli sübstitüentlerinin ( $-F$ ,  $-Cl$ ,  $-Br$ ,  $-CH_3$  ve  $-OCH_3$ ) aktivitelerinin incelenmesine dayandırılmıştır. Hedeflenen moleküllerin yapıları FT-IR,  $^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR ve HRMS gibi spektroskopik tekniklerle karakterize edilmiştir. Ayrıca, hidrazon-sülfonat hibritlerinin önemli yapısal ve reaktif özelliklerini ortaya koymak amacıyla yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) hesaplamaları, moleküler döngüleme (docking) ve moleküler dinamik (MD) simülasyonları gibi hesaplamalı yöntemler uygulanmıştır. Bunun yanında, **2b** ve **2f** bileşiklerinin absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım (ADME), farmakokinetik parametreleri ve toksikolojik değerlendirme sonuçları SwissADME ve ADMETlab 3.0 kullanılarak incelenmiştir.

### 1.8. Hesaplamalı Yöntemlerin İlaç Geliştirme Sürecindeki Rolü

- Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT): DFT, moleküllerin geometrisini, elektronik yapısını ve reaktivitesini kuantum mekaniksel düzeyde inceler. Bu analizler sayesinde sentezlenen moleküllerin neden belirli bir aktiviteye sahip oldukları veya sahip olmadıkları moleküler düzeyde anlaşılabilir. Örneğin, bir molekülün HOMO-LUMO enerji aralığı, onun reaktivitesi hakkında fikir verebilir ve bu, deneysel sonuçların teorik olarak desteklenmesini sağlar. (Geerlings, De Proft ve Langenaeker, 2003).
- Moleküler Kenetleme (Docking): Bu sanal tarama tekniği, sentezlenen moleküllerin hedef enzimlerin (hCA I, hCA II, AChE, BChE) aktif bölgelerine ne kadar iyi ve nasıl bağlanacağını öngörür. Bu analizler, biyolojik testler öncesinde en umut verici molekül adaylarını belirlemeye ve sentez-test sürecini hızlandırmaya yardımcı olur. (Meng ve ark., 2011).

- Moleküler Dinamik (MD) Simölasyonları: Moleküler kenetlemenin statik göröntüsünün aksine, MD simölasyonları, ligand-protein kompleksinin ve çevresindeki ortamın zaman içindeki dinamik hareketini inceler. Bu simölasyonlar, ligandın bağlanma stabilitesi, proteinin konformasyonel değışiklikleri ve su moleküllerinin rolü gibi kritik bilgileri sağlayarak moleküler kenetleme sonuçlarını doğrular. (Hollingsworth ve Dror, 2018).
- ADME ve Toksisite Değerlendirmesi: SwissADME ve ADMETlab gibi araçlar, sentezlenen moleküllerin klinik potansiyelini öngörmek için kullanılır. Bir molekülün oral yoldan alınabilirliği, kan-beyin bariyerini geçip geçemeyeceğı ve olası yan etkileri gibi kritik parametreleri değerlendirir. Bu ön analizler, laboratuvar ortamında harcanacak zaman ve maliyetten tasarruf etmeye yardımcı olur. (Daina, Michielin ve Zoete, 2017).

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Kolinesteraz İnhibitörleri ve Alzheimer Hastalığı Üzerine Yapılan Çalışmalar

Alzheimer hastalığı (AD), dünya genelinde demansın en yaygın nedeni olup, patogenezi karmaşık ve çok faktörlü bir süreçtir. Bu alandaki literatür, hastalığın altında yatan mekanizmaları anlamaya yönelik teorik çalışmalar ve bu mekanizmaları hedef alan yeni terapötik ajanların geliştirilmesine odaklanan deneysel araştırmalar olarak geniş bir yelpazeye yayılmaktadır.

#### 2.1.1. Hastalığın patogenezi, enzim yapıları ve tedavi stratejileri

Alzheimer hastalığının moleküler temelleri üzerine yapılan araştırmalar, ilaç tasarımı süreçlerine ışık tutmaktadır. J. D. Ulrich ve D. M. Holtzman (2016), yayımladıkları makalede amiloid hipotezini merkeze alarak, amiloid  $\beta$  birikiminin hastalığın gelişimindeki kritik rolünü tartışmışlardır. Yazarlar, amiloid  $\beta$  patolojisinin karmaşık doğasının tek hedefli tedavileri sınırladığını, bu nedenle hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için çoklu hedefli yaklaşımların geliştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Ulrich ve Holtzman, 2016). Benzer şekilde, kolinerjik hipotezin tedavi stratejilerindeki rolünü inceleyen G. Marucci ve ekibi (2021), rivastigmin, donepezil ve galantamin gibi mevcut ilaçların etki mekanizmalarını derinlemesine analiz etmişlerdir. Çalışma, bu ilaçların semptomatik iyileşme sağladığını ancak hastalığın seyrini değiştirecek yeni nesil çoklu hedefli ligandlara ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir (Marucci, Buccioni, Dal Ben ve ark., 2021).

Enzim inhibisyonu mekanizmalarının anlaşılması adına kristal yapı analizleri büyük önem taşımaktadır. Y. Bourne ve arkadaşları (2006) ile M. C. Franklin ve ekibi (2016), Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin kristal yapısını ve substrat ile olan etkileşimlerini detaylandırarak, aktif bölgedeki amino asitlerin katalitik süreçteki rollerini açıklamışlardır. Bu çalışmalar, enzim-ligand etkileşimlerinin moleküler dinamiklerini

ortaya koyarak rasyonel ilaç tasarımı için kritik veriler sağlamıştır (Bourne, Radic, Sulzenbacher ve ark., 2006; Franklin, Rudolph, Ginter ve ark., 2016). Butirilkolinesteraz (BChE) enzimi üzerine yapılan çalışmalarda ise M. N. Ngamelue ve diğerleri (2007), enzimin kristal yapısını inceleyerek BChE'ye özgü inhibitörlerin geliştirilmesi için yapısal bir temel oluşturmuşlardır (Ngamelue, Homma, Lockridge ve Asojo, 2007). Ayrıca L. Fang ve arkadaşları (2011), BChE ile donepezil arasındaki etkileşimi moleküler dinamik simülasyonları ve kuantum kimyasal hesaplamalarla incelemiş; inhibitörün aktif bölgedeki hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerini moleküler düzeyde aydınlatmışlardır (Fang, Pan, Muzyka ve Zhan, 2011).

Mevcut inhibitörlerin değerlendirildiği derleme çalışmalarında, G. Johnson ve S. W. Moore (2006) AChE inhibitörlerinin klinik kullanımlarını ve potansiyel yan etkilerini özetleyerek gelecekteki ilaç tasarımları için bir yol haritası sunmuşlardır (Johnson ve Moore, 2006). Daha güncel derlemelerde, H. Akıncıoğlu ve I. Gülçin (2020) ile R. J. Obaid ve diğerleri (2022), doğal ve sentetik kaynaklı heterosiklik bileşiklerin AChE ve BChE üzerindeki inhibitör potansiyellerini kapsamlı bir şekilde ele almışlardır. Bu çalışmalar, son on yılda (2010-2022) sentezlenen azot, oksijen ve kükürt içeren heterosiklik bileşiklerin yapı-aktivite ilişkilerini ortaya koymaktadır (Obaid ve ark., 2022; Akıncıoğlu ve Gülçin, 2020). E. Çınar ve arkadaşları (2022) ise AChE ve BChE enzimlerini inhibe etmenin nörotransmisyonu artırarak bilişsel semptomları nasıl hafiflettiğini açıklamış ve daha güçlü inhibitörlerin keşfinin önemini vurgulamışlardır (Başaran, Tür, Akkoc ve Taskin-Tok, 2024).

Deneysel çalışmaların temelini oluşturan ve enzim aktivitesini ölçmek için kullanılan spektrofotometrik yöntem, G. L. Ellman ve arkadaşları (1961) tarafından geliştirilmiştir. "Ellman Metodu" olarak bilinen bu teknik, tiyokolinin DTNB reaktifi ile verdiği renk reaksiyonuna dayanarak, günümüzde halen kolinesteraz inhibitörlerinin aktivitesini belirlemek için standart protokol olarak kabul edilmektedir (Ellman, Courtney, Andres ve Featherstone, 1961).

### **2.1.2. Hidrazon iskeletine sahip inhibitörlerin geliştirilmesi**

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, hidrazon grubu içeren bileşiklerin kolinesteraz enzimleri üzerinde güçlü inhibitör etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir. 2022 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, sentezlenen yeni hidrazon türevlerinin Alzheimer hastalığı için potansiyel terapötik ajanlar olduğu belirlenmiştir. In vitro testler, bu bileşiklerin

AChE ve BChE enzimlerine karşı nanomolar seviyelerde aktivite gösterdiğini kanıtlarken, moleküler kenetleme (docking) çalışmaları bileşiklerin enzim aktif bölgelerinde kararlı etkileşimler kurduğunu doğrulamıştır (Çakmak, Başaran ve Şentürk, 2022c). Aynı yıl yapılan bir başka çalışmada, farklı sübstitüentlere sahip hidrazon türevleri sentezlenmiş ve bunların enzim inhibisyon profilleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, hidrazon iskeletinin bu alanda umut vadeden bir yapı olduğunu ve moleküler dinamik simülasyonlarının in vitro bulguları desteklediğini göstermiştir (Çakmak, 2022a).

Hidrazon türevlerinin çoklu hedefli tedavi yaklaşımındaki rolü üzerine odaklanan 2022 tarihli bir diğer araştırmada, sentezlenen bileşiklerin hem AChE hem de BChE üzerinde güçlü aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada, in silico yöntemler kullanılarak bileşiklerin bağlanma afiniteleri ve etki mekanizmaları aydınlatılmıştır (Çınar, Boğa, Topal ve Çakmak, 2022). Benzer şekilde, E. Başaran ve ekibinin 2022 yılındaki çalışmalarında, sentezlenen hidrazon serilerinin kolinesteraz enzimleri üzerindeki etkileri detaylandırılmış; bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin yapısal özellikleriyle (SAR) olan ilişkisi derinlemesine incelenmiştir. Bu araştırmalar, hidrazon iskeletinin yeni ilaç adaylarının rasyonel tasarımı için önemli bir temel oluşturduğunu kanıtlamıştır (Başaran, Çakmak, Şentürk ve Taskin-Tok, 2022a; Başaran, Çakmak, Akkoc ve Kaya, 2022).

Bu alandaki çalışmaların devamı niteliğinde olan 2024 tarihli bir araştırmada, yeni bir seri hidrazon türevinin sentezi gerçekleştirilmiş ve bunların inhibitör aktiviteleri in vitro ve in silico yöntemlerle değerlendirilmiştir. Çalışma, hidrazon iskeletinin kolinesteraz inhibitörlerinin geliştirilmesi için ne kadar kritik bir yapı olduğunu bir kez daha ortaya koymuş ve elde edilen verilerle gelecekteki çalışmalar için bir yol haritası sunulmuştur (Çakmak, Çınar, Başaran ve ark., 2024b). Aynı yıl yayımlanan başka bir çalışmada, B. Kuzu ve arkadaşları (2024), hidrazon türevlerinin AChE ve BChE inhibisyonundaki etkinliğini moleküler dinamik simülasyonları ile destekleyerek, bu bileşiklerin enzimlerle stabil kompleksler oluşturduğunu rapor etmişlerdir (Kuzu, Alagoz, Demir ve ark., 2024). En güncel çalışmalardan biri olan 2025 tarihli makalede ise, yeni sentezlenen hidrazon türevlerinin enzimler üzerindeki güçlü aktivitesi ve yapı-aktivite ilişkileri ortaya konulmuştur. Bu çalışma, hidrazon türevlerinin Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaç adayları olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır (Çakmak, Başaran, Ercan ve ark., 2025a).

### 2.1.3. Triazol, tiyadiazol ve diğer heterosiklik bileşikler

Hidrazonların yanı sıra, triazol ve tiyadiazol gibi azotça zengin heterosiklik halka sistemleri de kolinesteraz inhibisyonu açısından yoğun bir şekilde araştırılmıştır. H. Ahmad ve arkadaşları (2018), 1,2,4-triazol-3-tiyon türevlerinin AChE ve BChE enzimlerine karşı aktivitelerini incelemiş; en iyi sonuçları veren bileşiğin donepezil ve rivastigmin gibi standart ilaçlarla benzer etkilere sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu durum, triazol-tiyon iskeletinin ilaç tasarımında önemli bir rol oynayabileceğini kanıtlamaktadır (Ahmad ve ark., 2018). R. Çakmak ve ekibinin 2023 tarihli çalışmasında ise yeni bir seri 1,2,4-triazol türevi sentezlenmiş ve bunların enzimler üzerindeki güçlü aktiviteleri in vitro ve in silico yöntemlerle doğrulanmıştır. Moleküler dinamik simülasyonları, bu türevlerin enzimlerle kararlı etkileşimler kurduğunu göstermiştir (Çakmak, Ay, Çınar ve ark., 2023). Benzer bir yaklaşımla S. A. Güngör (2023), sentezlediği 1,2,4-triazol türevlerinin kolinesteraz inhibitör potansiyellerini araştırmış ve yapı-aktivite ilişkilerini aydınlatarak bu moleküllerin AD tedavisindeki önemine vurgu yapmıştır (Güngör, 2023).

Tiyadiazol halka sistemi üzerine yapılan çalışmalarda, B. Tutuş ve arkadaşları (2024), N-alkil-5-(4-süstitüe-fenil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin türevlerini sentezlemişlerdir. Bu bileşiklerin in vitro olarak AChE ve BChE üzerinde güçlü inhibitör aktivite gösterdiği ve moleküler kenetleme çalışmalarında aktif bölgelere kararlı bir şekilde bağlandığı belirlenmiştir. Çalışma, tiyadiazol türevlerinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni bir strateji olabileceğini düşündürmektedir (Tutuş, Kaya, Baz ve ark., 2024).

### 2.1.4. Hibrit yapılar ve farklı kimyasal iskeletler

Alzheimer hastalığının tedavisinde çoklu hedefli yaklaşımın önem kazanmasıyla birlikte, farklı kimyasal grupları bir arada bulunduran hibrit yapılar ve çeşitli iskeletler üzerine çalışmalar artmıştır. T. Sun ve arkadaşları (2024), benzofuran-1,2,3-triazol-dihidropiridin hibritlerini sentezleyerek, bu bileşiklerin hem AChE hem de BChE enzimlerini etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Moleküler modelleme çalışmaları, bu hibrit yapıların enzimlerle olan etkileşim mekanizmalarını aydınlatmıştır (Sun, Zhen, Harakandi ve ark., 2024). Benzer şekilde K. Gajendra ve ekibi (2024), kinazolin türevlerinin sadece kolinesterazları değil, aynı zamanda beta-sekretaz enzimini

de güçlü bir şekilde inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma, kinazolin türevlerinin çoklu hedefli tedavi potansiyelini vurgulamakta ve ADMET analizleri ile bileşiklerin farmakolojik özelliklerini desteklemektedir (Gajendra, Pratap, Poornima ve ark., 2024).

Diğer kimyasal sınıflar üzerine yapılan araştırmalarda; A. Oztekin ve N. Stellenboom (2024), yeni benzofenon türevlerinin (Öztekin ve Stellenboom, 2024); A. Bosak ve arkadaşları (2019) ise asetofenon türevlerinin (Bosak, Opsenica, Šinko ve ark., 2019) AChE ve BChE enzimlerine karşı güçlü inhibitör aktivitelerini rapor etmişlerdir. Her iki çalışma da moleküler kenetleme yöntemleriyle in vitro verileri desteklemiştir. Ayrıca N. Arıkan Ölmez ve arkadaşları (2024), yeni amin türevlerinin enzimlerle olan etkileşimlerini inceleyerek bu bileşiklerin AD tedavisinde yeni bir strateji olabileceğini belirtmişlerdir (Arıkan Ölmez, Noma, Kaya ve Osman, 2024). A. Kamalı ve ekibi (2022) aril sülfonat esterlerinin (Kamalı, Çakmak ve Boğa, 2022), Y. P. Singh ve arkadaşları (2024) ise indirgenmiş Schiff bazlarının (Singh, Prasad ve Kumar, 2024) kolinesteraz inhibisyon potansiyellerini ortaya koymuşlardır.

Son olarak, H. Gao ve ekibi (2021), farmakofor bazlı bir yaklaşımla AChE ve BChE'nin ikili inhibitörlerini keşfetmeyi amaçlamışlardır. Bu bilgisayarlı araştırma, geleneksel tek hedefli ilaçların aksine çoklu hedefli ilaçların önemini vurgulamakta ve hesaplamalı yöntemlerin ilaç tasarımındaki etkinliğini kanıtlamaktadır (Gao, Jiang, Zhan ve Sun, 2021). M. G. Kurban ve ekibi (2024) ise sülfonamid iskeletine sahip moleküllerin enzimlerle etkileşimini inceleyerek, bu yapıların da potansiyel ilaç adayı olarak değerlendirilebileceğini göstermişlerdir (Kurban, Çakmak, Başaran ve ark., 2024).

## **2.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Terapötik Uygulamaları Üzerine Çalışmalar**

Karbonik anhidrazlar (CA'lar), canlı organizmalarda karbondioksitin bikarbonata ve protona geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize eden, çinko içeren metalloenzimlerin geniş bir ailesidir. Bu enzimler, asit-baz dengesinin düzenlenmesi, solunum, iyon transportu ve biyosentez gibi hayati fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Literatürde, CA izoenzimlerinin (özellikle sitozolik hCA I ve hCA II ile tümör ilişkili hCA IX ve hCA XII) inhibisyonu, glokomdan kansere kadar pek çok hastalığın tedavisinde önemli bir strateji olarak kabul edilmektedir.

### 2.2.1. Karbonik anhidrazların fizyolojik rolü ve ilaç hedefi olarak önemi

Bu alandaki teorik çerçeveyi çizen en kapsamlı çalışmalardan biri C. T. Supuran (2008) tarafından yayımlanan derleme makalesidir. Çalışma, CA enzimlerinin glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi gibi temel metabolik yolların yanı sıra tümör oluşumu gibi patolojik süreçlerdeki kritik rollerini tartışmaktadır. Klasik kullanım alanları olan diüretik ve antiglokom ajanlarının ötesinde, CA inhibitörlerinin obezite, kanser ve çeşitli enfeksiyon hastalıkları için yeni nesil ilaç adayları olabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca, yakın tarihli bulgular ışığında CA aktivasyonunun Alzheimer hastalığı tedavisinde potansiyel bir yaklaşım olabileceği belirtilmiş ve spesifik modülatörlerin geliştirilmesinin önemi üzerinde durulmuştur. Bu derleme, enzim modülasyonu yoluyla geliştirilebilecek yeni terapötik yaklaşımlar için önemli bir yol haritası sağlamaktadır (Supuran, 2008).

### 2.2.2. Sülfonamid ve sülfonilkarbamat türevlerinin inhibitör özellikleri

Sülfonamid grubu ( $-SO_2NH_2$ ), CA inhibitörlerinin tasarımında kullanılan birincil farmakofor grubu (çinko bağlayan grup) olarak bilinmektedir. Bu alandaki yapı-aktivite ilişkilerini (SAR) inceleyen A. Innocenti ve arkadaşları (2008), yeni sülfonilkarbamat türevlerinin hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak analiz etmişlerdir. Çalışma, moleküler yapıda yapılan küçük değişikliklerin bile inhibitör potansiyeli ve izoenzim seçiciliğini dramatik şekilde etkilediğini ortaya koymuştur. Elde edilen veriler, sülfonilkarbamat iskeletinin güçlü ve seçici inhibitörlerin geliştirilmesi için kritik bir yapı taşı olduğunu göstermektedir (Innocenti, Vullo, Scozzafava ve Supuran, 2008). Benzer bir yaklaşımla, S. Işık ve ekibi (2015) tarafından yapılan çalışmada, yeni bir seri sülfonilkarbamat türevi sentezlenmiş ve bunların hCA I ve hCA II üzerindeki aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu bileşiklerin her iki izoenzim üzerinde de güçlü inhibitör etkiler sergilediği, moleküler kenetleme (docking) çalışmalarıyla da aktif bölgedeki bağlanma modlarının aydınlatıldığı rapor edilmiştir. Bulgular, bu türevlerin gelecekteki terapötik uygulamalar için umut verici olduğunu kanıtlamaktadır (Işık ve ark., 2015).

Sülfonamid türevleri üzerindeki araştırmalar, farklı kimyasal grupların bu yapıya entegre edilmesiyle çeşitlenmiştir. N. Chiaramonte ve arkadaşları (2018), sentezledikleri yeni sülfonamid serisinin hCA I ve hCA II enzimlerine karşı inhibitör potansiyellerini in

vitro ve in silico yöntemlerle incelemişlerdir. Çalışma, bileşiklerin enzim aktif bölgeleriyle kurduğu etkileşimleri detaylandırarak, sülfonamid iskeletinin ilaç tasarımıdaki önemini bir kez daha teyit etmiştir (Chiaramonte, Bua, Ferraroni ve ark., 2018). G. Vannozzi ve ekibinin 2021 tarihli çalışmasında da benzer şekilde yeni sülfonamid türevleri sentezlenmiş ve bunların güçlü hCA inhibisyon profilleri rapor edilmiştir. Bu çalışma, sülfonamid tabanlı moleküllerin yapısal özelliklerinin biyolojik aktivite ile olan ilişkisini derinlemesine inceleyerek, yeni ilaç adaylarının rasyonel tasarımı için önemli veriler sunmuştur (Vannozzi, Vullo, Angeli ve ark., 2021).

Daha güncel ve hibrit yapılar üzerine odaklanan bir çalışmada, P. Singh ve ekibi (2025), indol ve imidazo[2,1-b]tiyazol halka sistemlerini sülfonamid yapısıyla birleştirmişlerdir. Bu hibrit moleküllerin hCA I ve hCA II enzimlerine karşı nanomolar seviyelerde (çok düşük konsantrasyonlarda) etkili inhibisyon sağladığı belirtilmiştir. Moleküler kenetleme çalışmaları, bileşiklerin enzimlerin aktif bölgelerinde güçlü ve kararlı etkileşimler sergilediğini göstermiştir. Bu araştırma, özellikle glokom gibi hCA ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek yüksek potansiyelli adayların geliştirilmesi açısından önemli bir temel oluşturmaktadır (Singh, Arifuddin, Supuran ve Nerella, 2025).

### **2.2.3. Benzofenon ve naftalen sülfonat türevleri**

Sülfonamidlerin yanı sıra, farklı aromatik iskeletler de CA inhibisyonu için araştırılmaktadır. E. Başaran, 2021 ve 2023 yıllarında yayımladığı çalışmalarda benzofenon iskeletinin hCA inhibisyonundaki rolüne odaklanmıştır. 2021 tarihli çalışmada, yeni sentezlenen benzofenon türevlerinin hCA I ve hCA II izoenzimlerine karşı güçlü biyolojik aktiviteleri in vitro yöntemlerle belirlenmiştir. Deneysel bulgular, moleküler kenetleme ve moleküler dinamik simülasyonları ile desteklenerek bileşiklerin enzimlerle olan kararlı etkileşimleri doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, benzofenon türevlerinin glokom ve epilepsi gibi hastalıkların tedavisinde potansiyel terapötik ajanlar olabileceğini işaret etmektedir (Başaran, 2021). Yazarın 2023 yılındaki devam çalışmasında ise, benzofenon serisi genişletilmiş ve yapı-aktivite ilişkileri daha detaylı incelenmiştir. Bu çalışma da benzofenon iskeletinin CA inhibitörü geliştirmek için umut verici bir yapı olduğunu teyit etmiş ve gelecekteki çalışmalar için yeni perspektifler sunmuştur (Başaran, 2023).

Başka bir aromatik yapı olan naftalen halkası üzerine yapılan çalışmada, Y. İ. Esmer ve arkadaşları (2022), yeni naftalen-2-il-sülfonat türevlerini sentezlemişlerdir. Bu bileşiklerin hCA I ve hCA II enzimlerine karşı inhibitör aktiviteleri test edilmiş ve güçlü inhibisyon değerleri elde edilmiştir. Moleküler kenetleme çalışmaları, en aktif bileşiklerin enzimlerin aktif bölgelerine yüksek afinite ile bağlandığını göstermiştir. Araştırma, naftalen-sülfonat iskeletine sahip moleküllerin glokom ve benzeri hastalıkların tedavisi için potansiyel yeni ilaç adayları olarak değerlendirilebileceğini kanıtlamaktadır (Esmer, Çınar ve Başaran, 2022).

### **2.3. Karbonik Anhidraz ve Kolinesteraz Enzimlerine Yönelik Çoklu Hedefli Çalışmalar**

Geleneksel ilaç keşfi yaklaşımları uzun yıllar boyunca "tek hedef, tek hastalık" paradigmasına dayanmış olsa da, Alzheimer hastalığı (AD) gibi nörodejeneratif bozuklukların karmaşık etyolojisi, bu yaklaşımın sınırlı kalmasına neden olmuştur. Güncel literatür, birden fazla biyolojik yolağı aynı anda modüle edebilen "çoklu hedefli ligandların" (Multi-Target Directed Ligands - MTDLs) geliştirilmesine doğru evrilmektedir. Özellikle hem kolinerjik iletimi düzenleyen kolinesterazların (AChE ve BChE) hem de pH dengesi, iyon transportu ve serebrovasküler fizyolojide rol oynayan karbonik anhidrazların (CA) eş zamanlı inhibisyonu, sinerjistik bir terapötik etki yaratma potansiyeli taşımaktadır.

#### **2.3.1. Çoklu hedefli yaklaşımın teorik temelleri**

Karbonik anhidraz inhibitörlerinin nörodejeneratif hastalıklardaki rolünü moleküler düzeyde inceleyen R. Çakmak ve arkadaşları (2024), bu enzim ailesinin AD tedavisindeki potansiyelini ortaya koyan önemli bir çalışma yayımlamışlardır. Araştırmacılar, hCA inhibitörlerinin sadece fizyolojik pH'ı düzenlemekle kalmayıp, aynı zamanda amiloid  $\beta$  patolojisini azaltabileceğini, serebrovasküler sağlığı iyileştirebileceğini ve glial fonksiyonları destekleyerek bilişsel fonksiyonlara katkı sağlayabileceğini vurgulamışlardır. Bu çalışma, hCA inhibitörlerinin AD tedavisinde "yeni bir hedef" olarak konumlandırılması gerektiğini savunarak, hCA ve kolinesterazları aynı anda hedefleyen çoklu tedavi stratejilerine güçlü bir teorik zemin hazırlamıştır. Moleküler modelleme ve biyoinformatik analizlerle desteklenen bulgular, bu yaklaşımın

hastalığın altında yatan karmaşık mekanizmalara karşı çok yönlü faydalar sunabileceğini işaret etmektedir (Çakmak, Başaran, Şahin ve ark., 2024a).

### **2.3.2. Hidrazon ve Schiff bazı türevlerinin çoklu inhibisyon profilleri**

Çoklu hedefli ilaç tasarımı sıklıkla başvurulmuş kimyasal iskeletlerden biri hidrazon ve Schiff bazı yapılarıdır. R. Çakmak ve diğerlerinin 2025 tarihli güncel çalışmasında, yeni antipirin bazlı Schiff bazlarının sentezi gerçekleştirilmiş ve bu bileşiklerin hem kolinesteraz (AChE, BChE) hem de karbonik anhidraz enzimlerine karşı inhibitör potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışma, sentezlenen bileşiklerin her iki enzim ailesine karşı da güçlü aktivite sergilediğini in vitro testlerle kanıtlamıştır. Araştırmacılar, in vitro verileri in silico yöntemlerle birleştirerek, bileşiklerin enzimlerin aktif bölgelerindeki bağlanma modlarını ve enzimatik etkileşim mekanizmalarını aydınlatmışlardır. Elde edilen sonuçlar, antipirin bazlı bu moleküllerin çoklu hedefli inhibitör adayları olarak umut verici olduğunu ve yeni ilaç adaylarının geliştirilmesine önemli katkılar sunduğunu göstermektedir (Çakmak, Başaran, Türkmenoğlu ve ark., 2025c).

Benzer bir yaklaşımla, M. Özil ve arkadaşları (2024), naftilhidrazon türevleri üzerine odaklanarak bu bileşiklerin AChE, BChE ve hCA izoenzimlerine karşı inhibitör potansiyellerini incelemiştir. Çalışma, sentezlenen naftilhidrazonların test edilen her üç enzim ailesine karşı da kayda değer bir aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Moleküler modelleme çalışmaları, bu türevlerin enzimlerin katalitik bölgelerinde kararlı etkileşimler kurduğunu ve hidrazon iskeletinin çoklu hedefli ilaç tasarımı için uygun bir yapı taşı olduğunu doğrulamıştır. Bu araştırma, nörodejeneratif hastalıklar ve metabolik bozuklukların tedavisi için hidrazon temelli yeni adayların geliştirilmesinde önemli bir referans noktası oluşturmaktadır (Özil, Balaydın, Dogan ve ark., 2024).

### **2.3.3. Sülfonamid iskeletli hibrit yapılar**

Sülfonamid grubu, karbonik anhidraz inhibisyonu için klasik bir farmakofor olmakla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar bu grubun kolinesteraz inhibisyonu için de optimize edilebileceğini göstermektedir. M. G. Kurban ve ekibi (2024), yeni sülfonamid türevlerini sentezleyerek bunların karbonik anhidraz ve kolinesteraz enzimleri ile olan etkileşimlerini hem laboratuvar (in vitro) hem de bilgisayar (in silico)

ortamında değerlendirmişlerdir. Bu kapsamlı çalışma, sülfonamid iskeletine sahip moleküllerin ilgili enzimlerin aktivitesini etkili bir şekilde modüle edebileceğini ve Alzheimer hastalığı için potansiyel ilaç adayları olabileceğini kanıtlamıştır. Araştırma, bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin yapısal özellikleriyle (SAR) ilişkisini aydınlatarak, ilaç kimyası alanındaki gelecek tasarımlar için temel oluşturmaktadır (Kurban, Çakmak, Başaran ve ark., 2024).

Hibrit molekül stratejisini benimseyen A. Korkmaz ve arkadaşları (2023) ise, indol halkasını sülfonamid yapısıyla birleştirerek yeni bir seri indol-sülfonamid türevi sentezlemişlerdir. Bu çalışmanın amacı, indolün biyolojik aktif özellikleri ile sülfonamidin enzim bağlama kapasitesini tek bir molekülde birleştirmektir. Elde edilen veriler, sentezlenen bileşiklerin hem karbonik anhidraz hem de kolinesteraz enzimlerine karşı güçlü inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymuştur. In vitro testler ve moleküler modelleme çalışmaları, bileşiklerin enzimlerin aktif bölgelerinde kararlı etkileşimler kurduğunu göstermiş ve bu hibrit yapıların nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için umut verici çoklu hedefli ajanlar olduğunu kanıtlamıştır (Korkmaz, Kurtay, Kaya ve Bursal, 2023).

#### **2.3.4. Azotlu heterosiklik bileşikler: Triazol ve benzotriazol türevleri**

Azot atomu içeren heterosiklik bileşikler, enzimlerin aktif bölgelerindeki amino asitlerle hidrojen bağı ve diğer etkileşimleri kurma yetenekleri nedeniyle çoklu hedefli çalışmalarda sıkça tercih edilmektedir. B. Akış ve diğerlerinin 2024 tarihli çalışmasında, yeni 1,2,4-triazol-5-tiyon türevleri sentezlenerek, bunların glokom, epilepsi ve Alzheimer ile ilişkili hCA I, hCA II, AChE ve BChE enzimlerine karşı aktiviteleri araştırılmıştır. Araştırma, in vitro ve in silico yöntemleri birleştirerek bileşiklerin etki mekanizmalarını aydınlatmıştır. Dikkat çekici bir şekilde, bazı türevlerin standart ilaçlar olan asetazolamid (CA inhibitörü) ve rivastigmin (ChE inhibitörü) daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, triazol-tiyon türevlerinin farklı enzimleri aynı anda hedefleyerek hastalık tedavisinde daha etkili olabileceğini ve potansiyel çoklu hedefli ilaç adayları olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (Akış, Çakmak ve Şentürk, 2024).

Benzer şekilde, K. Zilbeyaz ve ekibi (2021), benzotriazol türevleri üzerine yoğunlaşarak bu bileşiklerin kolinesteraz (AChE, BChE) ve karbonik anhidraz (hCA I, hCA II) enzimleri üzerindeki inhibitör potansiyellerini incelemişlerdir. Çalışma, sentezlenen benzotriazol türevlerinin test edilen her iki enzim ailesine karşı da güçlü

inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Moleküler modelleme çalışmaları ile desteklenen bu bulgular, benzotriazol iskeletinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için geliştirilecek çoklu hedefli ilaçlarda önemli bir yapı taşı olabileceğini kanıtlamaktadır (Zilbeyaz, Öztekin ve Kutluana, 2021).

#### **2.4. Kimyasal Bileşiklerin Antikanser, Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri**

Modern ilaç kimyasında, tasarlanan moleküllerin yalnızca tek bir enzim üzerindeki inhibisyon profili değil, aynı zamanda kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri, oksidatif stresi azaltıcı antioksidan kapasiteleri ve patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal potansiyelleri de büyük önem taşımaktadır. Özellikle hidrazon ( $-C=N-NH-$ ) ve triazol farmakofor gruplarını taşıyan bileşiklerin, "pleiotropik" (çok yönlü) etki mekanizmaları sayesinde farklı hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek geniş bir terapötik spektrum sunduğu bilinmektedir. Bu bölümde, söz konusu kimyasal iskeletlerin enzim inhibisyonu dışındaki biyolojik aktivitelerine odaklanan çalışmalar detaylandırılmıştır.

##### **2.4.1. Hidrazon iskeletinin yapı-aktivite ilişkisi ve genel biyolojik potansiyeli**

Hidrazon grubu, donör ve akseptör atomlarına sahip esnek yapısı ve hidrojen bağı yapabilme yeteneği sayesinde DNA, enzimler ve reseptörlerle çok çeşitli etkileşimler kurabilmektedir. Bu yapısal çeşitliliğin biyolojik aktiviteye yansımalarını inceleyen S. Keskin ve arkadaşları (2022), hidrazon türevlerinin çok yönlü biyolojik aktivitelerini ele aldıkları kapsamlı derleme makalesinde, hidrazon çekirdeğinin ilaç geliştirme süreçlerinde kilit bir farmakofor olduğunu vurgulamışlardır. Yazarlar, bu iskeletin özellikle antikanser ve antibakteriyel ajanların tasarımında nasıl kullanıldığını ve biyolojik hedeflerle olan etkileşim mekanizmalarını geniş bir perspektiften sunmuşlardır (Keskin, Doğan, Gündüz ve ark., 2022). Benzer şekilde, A. Ramakrishnan ve ekibi (2015), sentezledikleri hidrazon bileşiklerinin yapı-aktivite ilişkilerini (SAR) derinlemesine incelemişlerdir. Çalışma, hidrazon iskeletine bağlı aromatik halkalar üzerindeki süstitüentlerin doğasının (elektron çekici veya verici gruplar), bileşiklerin biyolojik hedeflere karşı gösterdiği aktivite spektrumunu ve moleküler kenetleme

skorlarını doğrudan değiştirdiğini ortaya koymuştur (Ramakrishnan, Chourasiyaa ve Bharatam, 2015).

Biyolojik aktivitenin teorik temellerine odaklanan L. Feng ve arkadaşları (2018) ise yeni sentezledikleri hidrazon türevlerinin moleküler yapılarını ve reaktivite parametrelerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, bileşiklerin HOMO-LUMO enerji seviyeleri, kimyasal sertlik ve elektronegatiflik gibi elektronik özellikleri Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT) ile hesaplanmış ve bu parametrelerin biyolojik aktivite ile olan korelasyonu araştırılmıştır. Elde edilen veriler, hidrazon iskeletinin elektronik özelliklerinin optimize edilmesinin, ilaç adaylarının kararlılığı ve rasyonel tasarımı için kritik bir adım olduğunu göstermiştir (Feng, Yang, Cui ve ark., 2018).

#### **2.4.2. Antikanser aktivite ve sitotoksitesite çalışmaları**

Kanser tedavisinde yeni kemoterapötik ajanların geliştirilmesi, mevcut ilaçlara karşı gelişen direnç ve yüksek yan etki profilleri nedeniyle güncelliğini koruyan bir alandır. R. Çakmak ve çalışma grubu, hidrazon türevlerinin antikanser potansiyelini araştıran bir dizi ardışık çalışma yürütmüştür. Araştırmacılar, 2022 yılında yayımladıkları makalede, sentezlenen yeni seri hidrazon bileşiklerinin çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki güçlü sitotoksik etkilerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, in vitro testlerin yanı sıra moleküler kenetleme (docking) yöntemleri de kullanılarak, bileşiklerin kanserle ilişkili enzimatik hedeflerle (örneğin tirozin kinazlar veya topoizomeraazlar) olan etkileşim mekanizmaları aydınlatılmıştır (Çakmak, Başaran, Kaya ve Erkan, 2022b). Grubun 2025 tarihli güncel çalışmasında ise hidrazon iskeletinin antikanser etkinliği daha ileri düzeyde incelenmiş; sentezlenen türevlerin kanser hücrelerinde apoptotik süreçleri tetikleme potansiyeli ve moleküler yapıdaki değişikliklerin bu aktivite üzerindeki etkisi in silico yöntemlerle desteklenerek sunulmuştur. Bu bulgular, hidrazon yapısının onkolojik ilaç tasarımında vazgeçilmez bir yapı taşı olduğunu kanıtlamaktadır (Çakmak, Başaran, Erdoğan ve ark., 2025b).

E. Başaran ve ekibi (2022) de benzer bir strateji izleyerek, farklı sübstitüentler taşıyan hidrazon türevlerinin antikanser özelliklerini değerlendirmişlerdir. Çalışma, sentezlenen bileşiklerin sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücre hatlarına karşı gösterdiği seçici sitotoksitesiteyi belirlemiş ve bu aktivitenin moleküler düzeydeki nedenlerini kenetleme çalışmalarıyla açıklamıştır. Elde edilen sonuçlar, hidrazon iskeletinin

modifikasyonu ile yan etkileri azaltılmış ve etkinliği artırılmış antikanser ajanların tasarlanabileceğini göstermektedir (Başaran, Çakmak, Çınar ve Çevik, 2022b).

Heterosiklik bileşikler sınıfında yer alan 1,2,4-triazol türevlerinin antikanser potansiyeli ise E. Ergen ve arkadaşları (2024) tarafından detaylıca incelenmiştir. Bu çalışmada, yeni sentezlenen 1,2,4-triazol-5-tiyon türevlerinin özellikle meme ve kolon kanseri hücre hatları üzerinde kayda değer sitotoksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar, gerçekleştirdikleri moleküler kenetleme simülasyonları ile bu bileşiklerin kanser hücresi çoğalmasında kritik rol oynayan spesifik protein hedefleriyle güçlü hidrojen bağları kurduğunu göstermişlerdir. Bu veriler, triazol-tiyon iskeletinin antikanser ilaç geliştirme çalışmalarında umut verici bir farmakofor olduğunu vurgulamaktadır (Ergen, Çakmak, Başaran ve ark., 2024).

#### **2.4.3. Antioksidan aktivite ve oksidatif stres ile mücadele**

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif stres; nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler bozukluklar ve kanser dahil olmak üzere birçok patolojik sürecin temelinde yer almaktadır. Bu nedenle, serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahip antioksidan moleküllerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. N. Belkheiri ve arkadaşları (2010), hidrazon türevlerinin antioksidan potansiyelini inceleyen öncü çalışmalardan birini gerçekleştirmişlerdir. İn vitro yöntemlerle (DPPH radikal süpürücü aktivite testi vb.) yapılan analizlerde, sentezlenen bileşiklerin serbest radikalleri etkili bir şekilde temizlediği ve hidrazon yapısının oksidatif strese karşı koruyucu bir ajan olarak değerlendirilebileceği belirlenmiştir. Çalışma, bileşiklerin yapısal özelliklerinin antioksidan kapasite üzerindeki etkisini de tartışarak, elektron verici grupların aktiviteyi artırdığını belirtmiştir (Belkheiri, Bouguerne, Bedos-Belval ve ark., 2010).

Daha güncel bir çalışmada, E. Başaran ve ekibi (2022), yeni sentezlenen hidrazon türevlerinin antioksidan kapasitelerini değerlendirmişlerdir. Çalışma, bileşiklerin yapısında bulunan fenolik hidroksil grupları gibi spesifik fonksiyonel grupların radikal süpürücü aktiviteyi önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, hidrazon türevlerinin sadece enzim inhibitörü veya sitotoksik ajan olarak değil, aynı zamanda hücresel düzeyde oksidatif hasarı önleyici bileşikler olarak da terapötik değer taşıdığını düşündürmektedir (Başaran, Haşimi, Çakmak ve Çınar, 2022d).

#### 2.4.4. Antimikrobiyal ve antitüberküloz aktivite

Küresel bir sağlık krizi haline gelen antimikrobiyal direnç ve tüberküloz vakalarındaki artış, yeni etki mekanizmalarına sahip ilaçların keşfini zorunlu kılmaktadır. Z. Kaplancikli ve arkadaşları (2014), morfolin halkası içeren yeni hidrazon türevlerini sentezleyerek bunların antibakteriyel aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışma, bu bileşiklerin hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir aktivite sergilediğini göstermiştir. Morfolin ve hidrazon farmakoforlarının kombinasyonunun, bakteriyel direnç mekanizmalarını aşmada etkili bir strateji olabileceği ve yeni antibiyotik adayları için bir temel oluşturduğu belirtilmiştir (Kaplancikli, Altıntop, Ozdemir ve ark., 2014).

Tüberküloz tedavisine yönelik spesifik ve hedefe yönelik bir çalışmada ise E. Koçak Aslan ve ekibi (2022), tüberküloz tedavisinde birinci basamak ilaç olarak kullanılan izoniazidden türetilen yeni hidrazon bileşiklerini sentezlemişlerdir. Bu araştırmada, bileşiklerin moleküler yapıları DFT hesaplamalarıyla aydınlatılmış ve in vitro testlerle *Mycobacterium tuberculosis* etkenine karşı güçlü antitüberküloz aktivite gösterdikleri kanıtlanmıştır. Ayrıca, gerçekleştirilen moleküler kenetleme çalışmaları, bileşiklerin tüberküloz bakterisi için hayati öneme sahip olan Enoyl-ACP redüktaz (InhA) enzimi ile olan etkileşim mekanizmalarını detaylandırmıştır. Bu sonuçlar, hidrazon iskeletinin antitüberküloz ilaçlarının geliştirilmesinde umut verici bir yapı olduğunu doğrulamaktadır (Aslan, Krishna, Armaković ve ark., 2022).

#### 2.5. Hesaplamalı Kimya Yöntemleri ve Teorik Temeller

Modern ilaç tasarım süreçleri, sentezlenen moleküllerin elektronik yapılarının, reaktivitelerinin ve biyolojik hedeflerle olan etkileşimlerinin moleküler düzeyde anlaşılması için deneysel yöntemlerin yanı sıra gelişmiş hesaplamalı kimya tekniklerine de büyük ölçüde ihtiyaç duymaktadır. Bu tez çalışması kapsamında kullanılan Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT), moleküler kenetleme (docking), moleküler dinamik (MD) simülasyonları ve ADME/Tox analizleri, literatürdeki temel teoremlere ve doğrulanmış metodolojilere dayanmaktadır.

### 2.5.1. Yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) ve kuantum kimyasal hesaplamalar

Moleküler sistemlerin elektronik yapısının aydınlatılmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olan Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT), W. Kohn ve L. J. Sham (1965) tarafından geliştirilen Kohn-Sham denklemlerine dayanmaktadır. Bu temel çalışma, çok elektronlu karmaşık problemlerin, elektron yoğunluğu cinsinden daha basit ve uygulanabilir bir şekilde çözülmesini sağlayarak modern hesaplamalı kimyanın temelini atmıştır (Kohn ve Sham, 1965). Moleküler orbital teorisi bağlamında, bir molekülün kararlılığı ve reaktivitesi genellikle sınır moleküler orbitalleri (HOMO ve LUMO) üzerinden açıklanmaktadır. T. Koopmans (1934) tarafından ortaya konan ve Koopmans Teoremi olarak bilinen ilke, HOMO enerjisinin iyonlaşma potansiyeli ile ilişkisini kurarak, moleküllerin elektron verme veya alma eğilimlerinin tahmin edilmesinde teorik bir standart oluşturmuştur (Koopmans, 1934).

DFT hesaplamalarının doğruluğunu artırmak amacıyla, elektronların değişim (exchange) ve korelasyon etkileşimlerini modelleyen çeşitli fonksiyoneller geliştirilmiştir. A. D. Becke (1988), değişim fonksiyonelleri üzerine yaptığı çalışmada, kuantum kimyasal hesaplamaların hassasiyetini artıran yeni yaklaşımlar sunmuş ve bugün B3LYP gibi hibrit fonksiyonellerin geliştirilmesine öncülük etmiştir (Becke, 1988). Ancak, standart DFT yöntemleri van der Waals kuvvetleri gibi zayıf ve uzun menzilli etkileşimleri tanımlamada yetersiz kalabilmektedir. Bu sorunu aşmak için E. R. Johnson ve A. D. Becke (2005, 2006) tarafından geliştirilen dipol-moment tabanlı düzeltme modelleri, moleküller arası etkileşimlerin daha gerçekçi modellenmesini sağlamıştır (Becke ve Johnson, 2005; Johnson ve Becke, 2006). Benzer şekilde, S. Grimme ve arkadaşlarının (2010) geliştirdiği DFT-D3 dispersiyon düzeltme yöntemi, özellikle biyomoleküler sistemler ve ilaç adayları gibi büyük moleküllerin geometrik optimizasyonunda standart bir yaklaşım haline gelmiştir (Grimme, Antony, Ehrlich ve Krieg, 2010).

Kimyasal reaktivitenin teorik olarak açıklanmasında, moleküllerin "sertlik" ve "yumuşaklık" gibi global reaktivite indeksleri kullanılmaktadır. R. G. Parr ve arkadaşları (1999), kimyasal potansiyel ve sertlik kavramlarını DFT çerçevesinde tanımlayarak, bir molekülün elektron transferine karşı direncini veya eğilimini belirleyen matematiksel altyapıyı oluşturmuşlardır. Bu parametreler, sentezlenen ilaç adaylarının biyolojik ortamdaki stabilitesini öngörmek için kritik öneme sahiptir (Parr, Szentpály ve Liu, 1999). Bu karmaşık kuantum mekaniksel hesaplamaların gerçekleştirilmesinde kullanılan

yazılımlar da sürekli gelişmektedir. F. Neese ve ekibi (2020), ORCA yazılımının (v6.0.0) yeni özelliklerini tanıttıkları çalışmalarında, yazılımın karmaşık moleküler sistemlerin elektronik özelliklerini ve spektroskopik verilerini yüksek doğrulukla ve hızla hesaplayabildiğini göstermişlerdir (Neese, Wennmohs, Becker ve Riplinger, 2020).

### **2.5.2. DFT yönteminin ilaç adaylarına uygulanması**

Literatürde, DFT yönteminin spesifik ilaç adaylarının yapısal analizinde kullanıldığı pek çok çalışma mevcuttur. E. H. Avdović ve arkadaşları (2017), sentezledikleri benzofuran-1,2,3-triazol türevlerinin kimyasal reaktivitelerini, HOMO-LUMO enerji aralıklarını ve dipol momentlerini DFT hesaplamalarıyla belirlemişlerdir. Bu çalışma, teorik verilerin bileşiklerin potansiyel biyolojik aktiviteleriyle nasıl ilişkilendirilebileceğini gösteren önemli bir örnektir (Avdović, Milenković, Dimitrić-Marković ve ark., 2017). Benzer şekilde, C. Alaşalvar ve ekibi (2018) ile L. Feng ve arkadaşları (2018), yeni sentezlenen hidrazon türevlerinin moleküler yapılarını ve global reaktivite parametrelerini (kimyasal sertlik, elektronegatiflik vb.) DFT ile aydınlatmışlardır. Bu çalışmalar, ilaç tasarımı iskelet modifikasyonlarının moleküler kararlılık üzerindeki etkisini teorik olarak kanıtlamaktadır (Alaşalvar, Öztürk, Abdel-Aziz ve ark., 2018; Feng, Yang, Cui ve ark., 2018). Ayrıca, moleküler yapıların termal kararlılıklarının anlaşılması için R. El Bahnasawy (1993) tarafından yapılan termal analiz (TGA/DTA) çalışmaları, teorik hesaplamaların deneysel termal verilerle nasıl desteklenebileceğine dair temel bir referans oluşturmaktadır (El Bahnasawy, El Shereafy ve Kashar, 1993).

### **2.5.3. Moleküler kenetleme (docking) ve görselleştirme**

İlaç adaylarının hedef enzimlerle (AChE, BChE, CA vb.) olan etkileşimlerini tahmin etmek için moleküler kenetleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bu alandaki en yaygın araçlardan biri olan AutoDock Vina, O. Trott ve A. J. Olson (2010) tarafından geliştirilmiştir. Yazılımın temel algoritması, protein-ligand etkileşim enerjilerini ve bağlanma modlarını hızlı ve yüksek doğrulukla tahmin ederek, binlerce molekül arasından en iyi adayların seçilmesine olanak tanımaktadır (Trott ve Olson, 2010). Moleküler yapıların hazırlanması, optimizasyonu ve kenetleme sonuçlarının görselleştirilmesi aşamalarında ise M. D. Hanwell ve ekibi (2012) tarafından tanıtılan

açık kaynaklı Avogadro yazılımı kullanılmaktadır. Avogadro, moleküler modelleme ve analiz yetenekleriyle hesaplamalı kimya çalışmalarının vazgeçilmez bir parçasıdır (Hanwell, Curtis, Lonie ve ark., 2012).

#### **2.5.4. Moleküler dinamik (MD) simülasyonları**

Moleküler kenetleme çalışmaları molekülleri statik bir çerçevede değerlendirirken, Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları, ilaç-enzim komplekslerinin zaman içindeki davranışlarını ve kararlılığını atomik düzeyde incelemektedir. A. Rodriguez-Martinez (2024) ve N. Bertin (2024), yayımladıkları makalelerde MD simülasyonlarının biyomoleküler yapısal dinamikleri anlamadaki rolünü ve ilaç keşfindeki önemini vurgulamışlardır. Bu çalışmalar, MD'nin deneysel verileri tamamlayıcı nitelikte yeni içgörüler sunduğunu göstermektedir (Bertin, Bulatov ve Zhou, 2024; Rodríguez-Martínez, Nelen, Carmena-Bargueño ve ark., 2024).

MD simülasyonlarının gerçekleştirilmesinde en yaygın kullanılan paket programlardan biri olan GROMACS, M. J. Abraham ve arkadaşları (2015) tarafından detaylandırılmıştır. Yazılımın yüksek performansı, karmaşık biyolojik sistemlerin uzun süreli simülasyonlarını mümkün kılmaktadır (Abraham, Murtola, Schulz ve ark., 2015). Simülasyonların doğruluğu için sıcaklık kontrolü hayati önem taşımaktadır; bu amaçla G. Bussi ve ekibi (2007) tarafından geliştirilen "V-rescale" termostat algoritması, sistemin kanonik (NVT) dağılımını doğru bir şekilde üreterek simülasyon kararlılığını artırmaktadır (Bussi, Donadio ve Parrinello, 2007). Ayrıca, küçük moleküller (ligandlar) için gerekli kuvvet alanı (force field) parametrelerinin oluşturulmasında, V. Zoete ve arkadaşları (2011) tarafından geliştirilen SwissParam aracı kullanılmaktadır. SwissParam, GROMOS kuvvet alanına dayalı olarak ilaç adayları için güvenilir topoloji dosyaları üretmektedir (Zoete, Cuendet, Grosdidier ve Michielin, 2011).

#### **2.5.5. ADME ve toksisite tahminleri**

Bir molekülün ilaç olabilmesi için sadece biyolojik aktivite göstermesi yetmez; aynı zamanda uygun farmakokinetik özelliklere (Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Atılım - ADME) ve düşük toksisiteye sahip olması gerekir. J. Dulsat ve arkadaşları (2023), ilaç benzeri (drug-likeness) özelliklerin klinik başarı üzerindeki etkisini inceleyerek, Lipinski kuralları gibi kriterlerin önemini tartışmışlardır (Dulsat, López-

Nieto, Estrada-Tejedor ve Borrell, 2023). Bu özelliklerin in silico tahmini için geliştirilen SwissADME platformu, A. Daina ve ekibi (2017) tarafından tanıtılmıştır. SwissADME, moleküllerin fizikokimyasal özelliklerini ve ilaç olabilme potansiyellerini hızlı bir şekilde analiz ederek erken aşama elemelerine katkı sağlamaktadır (Daina, Michielin ve Zoete, 2017). Toksisite profillerinin (kardiyotoksisite, hepatotoksisite vb.) değerlendirilmesi için ise L. Fu ve arkadaşları (2024) tarafından geliştirilen ADMETlab 3.0 platformu kullanılmaktadır. Bu araç, potansiyel riskleri önceden belirleyerek ilaç geliştirme sürecindeki başarısızlık oranlarını düşürmeyi hedeflemektedir (Fu ve ark., 2024).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan ticari reaktifler ve çözücüler analitik saflıkta olup, Merck, Sigma–Aldrich ve Thermo Fisher Scientific firmalarından temin edilmiştir. Reaksiyonların ilerleyişi ince tabaka kromatografisi (TLC) ile izlenmiştir. Bileşiklerin erime noktaları kapiler erime noktası cihazı (Barnstead IA9100 Electrothermal Dijital Erime Noktası Cihazı) kullanılarak belirlenmiş ve düzeltilmemiştir. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HRMS) analizleri Agilent 6530 Accurate-Mass cihazında gerçekleştirilmiştir.

$^1\text{H}$ -NMR ve  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumları, DMSO- $d_6$  çözeltisinde Bruker AVANCE III 400 MHz spektrometresinde, sırasıyla 400 MHz ve 100 MHz frekanslarında, iç referans olarak tetrametilsilan (TMS) kullanılarak kaydedilmiştir. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrumları ise 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  tarama aralığında, ATR modunda Agilent Cary 630 spektrofotometresi ile alınmıştır.

Yeni sentezlenen moleküllere ait FT-IR, NMR ve HRMS spektrumları ile biyolojik aktivite verileri Ekler bölümünde sunulmuştur.

#### 3.1. Sülfonat Bileşiklerinin Sentezi

İlk olarak, birinci aşamada 6-aril sülfonat bileşikleri (**1a–f**) elde edilmiştir. Bu bileşikler, 2-hidroksi-1-naftaldehit'in, katalitik miktarda trietilamin içeren diklorometan içerisinde, toplam altı sübstitüe ve sübstitüe olmayan benzensülfonil klorür ile 5 saat boyunca sürekli karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Daha sonra, hedeflenen moleküller (**2a–f** ve **3a–f**), yani yeni hidrazon bileşikleri, sülfonat bileşiklerinin 4-hidroksibenzhidrazit (**1**) veya izoniazid (**2**) ile etanol reflüks sıcaklıklarında 8 saat reaksiyona sokulmasıyla elde edilmiştir. Bu çalışmada, bilinen sülfonat bileşikleri (**1a–f**) yeniden sentezlenmiş ve hedeflenen bileşiklerin, yani hidrazon türevlerinin (**2a–f** ve **3a–f**) sentezinde kullanılmıştır. Seri **1a–f** nin kimyasal yapısı, belgelenmiş erime noktaları ve FT-IR (sülfonat bileşiklerinin sentezi bölümüne bakınız) ile uyumluluk göstermiştir. Öte yandan, yeni sentezlenen moleküller (**2a–f** ve **3a–f**) ise FT-IR,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve HRMS kullanılarak karakterize edilmiştir.

### 3.1.1. 1-Formilnaftalen-2-il benzen sülfonat (1a)

Açık sarı katı; verim: %89; erime noktası: 98–99 °C ((Başaran, 2023) 99–100 °C). FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3107, 3064 (aromatik, C–H ger.), 2891, 2803 (aldehit, C–H ger.), 1684 (C=O ger.), 1361 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1152 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

### 3.1.2. 1-Formilnaftalen-2-il 4-florobenzen sülfonat (1b)

Kahverengi katı; verim: %81; erime noktası: 130–131 °C ((Kamalı, Çakmak ve Boğa, 2022) 127–129 °C). FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3107, 3080 (aromatik, C–H ger.), 2881, 2779 (aldehit, C–H ger.), 1684 (C=O ger.), 1373 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1153 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

### 3.1.3. 1-Formilnaftalen-2-il 4-klorobenzen sülfonat (1c)

Açık sarı katı; verim: %85; erime noktası: 132–133 °C ((Esmer, Çınar ve Başaran, 2022) 132–133 °C). FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3093, 3025 (aromatik, C–H ger.), 2884, 2782 (aldehit, C–H ger.), 1683 (C=O ger.), 1336 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1158 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

### 3.1.4. 1-Formilnaftalen-2-il 4-bromobenzen sülfonat (1d)

Açık sarı katı; verim: %83; erime noktası: 134–135 °C ((Korkmaz, Kurtay, Kaya ve Bursal, 2023) 135–137 °C). FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3089, 3056 (aromatik, C–H ger.), 2874, 2776 (aldehit, C–H ger.), 1682 (C=O ger.), 1341 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1156 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

### 3.1.5. 1-Formilnaftalen-2-il 4-metilbenzen sülfonat (1e)

Açık sarı katı; verim: %83; erime noktası: 133–134 °C ((Başaran, 2021) 136–138 °C). FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3097, 3071 (aromatik, C–H ger.), 2974, 2926 (alifatik, C–H ger.), 2877, 2775 (aldehit, C–H ger.), 1684 (C=O ger.), 1370 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1170 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

### 3.1.6. 1-Formilnaftalen-2-il 4-metoksibenzen sülfonat (1f)

Kahverengi katı; verim: %80; erime noktası: 106–108 °C ((Başaran, Çakmak, Akkoc ve Kaya, 2022a) 108–110 °C). FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3100, 3010 (aromatik, C—H ger.), 2983, 2943 (alifatik, C—H ger.), 2886, 2786 (aldehit, C—H ger.), 1686 (C=O ger.), 1366 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1163 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

### 3.2. Hedef Bileşiklerin Sentezi

Aromatik sülfonat türevi (2,5 mmol) ile 4-hidroksibenzhidrazid veya izoniazid (2,5 mmol), 10 mL etanol içinde 8 saat boyunca geri soğutucu altında karıştırılarak reflux edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım ezilmiş buz üzerine döküldü. Elde edilen katı ürün süzüldü, etanol ve su ile yıkandı, oda sıcaklığında kurutuldu. Son olarak, hedef bileşikler etanolden kristallendirildi.

### 3.3. Spektroskopik Veriler

#### 3.3.1. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il benzen sülfonat (2a)

Sarı katı; verim: %76; erime noktası: 213–215 °C.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3325 (O—H ve N—H gerilme titreşimleri), 1650 (C=O ger.), 1578 (C=N ger.), 1356 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1168 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 11.75 (s, 1H, NH), 10.18 (s, 1H, OH), 9.25 (d, J = 7.0 Hz, 1H, ArH), 8.74 (s, 1H, —N=CH), 8.04 (s, 1H, ArH), 7.98 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.87 (d, J = 7.7 Hz, 4H, ArH), 7.71 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.63–7.54 (m, 4H, ArH), 7.33 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 6.92 (d, J = 7.9 Hz, 2H, ArH).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 163.15 (C=O), 161.34 (OH'ye bağlı Cipso), 147.34 (C=N), 142.12, 135.75, 133.96, 132.57, 132.33, 130.51, 130.31, 130.11, 129.05, 127.27, 124.09, 122.74, 121.36, 115.59 (ArC).

**HRMS (m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> için hesaplanan: 469.09458; bulunan: 469.08293 (C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SNa).

### 3.3.2. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-florobenzen sülfonat (2b)

Açık kahverengi katı; verim: %72; erime noktası: 186–188 °C.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3268 (O—H ve N—H gerilme titreşimleri), 1621 (C=O ger.), 1586 (C=N ger.), 1365 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1183 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm):** 11.71 (s, 1H, NH), 10.18 (s, 1H, OH), 9.21 (d, J = 6.3 Hz, 1H, ArH), 8.69 (s, 1H, —N=CH), 8.06 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.00 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.91 (d, J = 5.4 Hz, 2H, ArH), 7.85 (d, J = 5.4 Hz, 2H, ArH), 7.61 (d, J = 7.4 Hz, 2H, ArH), 7.41–7.36 (m, 3H, ArH), 6.91 (d, J = 7.2 Hz, 2H, ArH).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm):** 166.26 (F'ye bağlı Cipso), 163.14 (C=O), 161.34 (OH'ye bağlı Cipso), 147.18 (C=N), 141.94, 132.63, 132.41, 132.31, 130.51, 130.28, 130.20, 130.17, 129.07, 128.83, 127.33, 124.04, 122.79, 121.54, 117.66, 117.43, 115.58 (ArC).

**HRMS (m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> için hesaplanan: 487.0844; bulunan: 487.07329 (C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SNa).

### 3.3.3. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-klorobenzen sülfonat (2c)

Beyaz katı; verim: %75; erime noktası: 218–220 °C.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3351, 3155 (O—H ve N—H gerilme titreşimleri), 1666 (C=O ger.), 1588 (C=N ger.), 1372 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1169 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm):** 11.68 (s, 1H, NH), 10.17 (s, 1H, OH), 9.21 (d, J = 6.8 Hz, 1H, ArH), 8.67 (s, 1H, —N=CH), 8.06 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.00 (d, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.85 (d, J = 8.3 Hz, 4H, ArH), 7.68–7.58 (m, 4H, ArH), 7.38 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 6.91 (d, J = 7.9 Hz, 2H, ArH).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm):** 163.12 (C=O), 161.32 (OH'ye bağlı Cipso), 147.13 (C=N), 141.82, 141.01, 132.76, 132.65, 132.42, 130.84, 130.51, 130.36, 129.26, 129.07, 128.85, 127.35, 124.07, 122.78, 121.55, 115.58, 115.26 (ArC).

**HRMS (m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> için hesaplanan: 503.05595; bulunan: 503.04356 (C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SNa).

**3.3.4. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-bromobenzen sülfonat (2d)**

Sarı katı; verim: %71; erime noktası: 229 °C’de bozunma.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3351, 3158 (O—H ve N—H gerilme titreşimleri), 1666 (C=O ger.), 1598 (C=N ger.), 1370 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1169 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 11.68 (s, 1H, NH), 10.17 (s, 1H, OH), 9.22 (d, J = 6.9 Hz, 1H, ArH), 8.67 (s, 1H, —N=CH), 8.06 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.00 (d, J = 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.85 (d, J = 7.2 Hz, 2H, ArH), 7.65–7.59 (m, 6H, ArH), 7.38 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 6.91 (d, J = 7.9 Hz, 2H, ArH).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 163.12 (C=O), 161.31 (OH’ye bağlı Cipso), 147.13 (C=N), 141.76, 133.32, 133.19, 132.66, 132.42, 130.79, 130.50, 130.24, 129.08, 128.86, 127.36, 124.10, 122.77, 121.56, 115.56 (ArC).

**HRMS ( $m/z$ ):** [M+H]<sup>+</sup> için hesaplanan: 525.00547; bulunan: 525.01192 (C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SH).

**3.3.5. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metilbenzen sülfonat (2e)**

Sarı katı; verim: %78; erime noktası: 230 °C’de bozunma.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3346, 3142 (O—H ve N—H gerilme titreşimleri), 1659 (C=O ger.), 1593 (C=N ger.), 1367 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1169 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 11.66 (s, 1H, NH), 10.19 (s, 1H, OH), 9.21 (d, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 8.67 (s, 1H, —N=CH), 8.03 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.98 (d, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.87 (d, J = 7.3 Hz, 2H, ArH), 7.72 (d, J = 8.1 Hz, 2H, ArH), 7.63–7.57 (m, 2H, ArH), 7.34 (t, J = 7.7 Hz, 3H, ArH), 6.92 (d, J = 7.8 Hz, 2H, ArH), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 163.05 (C=O), 161.35 (OH’ye bağlı Cipso), 147.39 (C=N), 146.70, 142.03, 132.56, 132.26, 131.04, 130.58, 130.49, 130.23, 129.02, 128.91, 128.75, 127.22, 124.05, 122.75, 121.58, 115.59 (ArC), 21.57 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS ( $m/z$ ):** [M+H]<sup>+</sup> için hesaplanan: 461.1099; bulunan: 461.11693 (C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SH).

**3.3.6. 1-((2-(4-Hidroksibenzoyl)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metoksibenzen sülfonat (2f)**

Açık kahverengi katı; verim: %71; erime noktası: 230 °C’de bozunma.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3346, 3152 (O—H ve N—H gerilme titreşimleri), 1657 (C=O ger.), 1595 (C=N ger.), 1367 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1163 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm):** 11.69 (s, 1H, NH), 10.17 (s, 1H, OH), 9.23 (d, J = 7.2 Hz, 1H, ArH), 8.69 (s, 1H, —N=CH), 8.04 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.98 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.87 (d, J = 6.9 Hz, 2H, ArH), 7.75 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ArH), 7.62–7.57 (m, 2H, ArH), 7.36 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.02 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ArH), 6.91 (d, J = 7.9 Hz, 2H, ArH), 3.69 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm):** 164.75 (OCH<sub>3</sub>’ye bağlı Cipso), 163.03 (C=O), 161.32 (OH’ye bağlı Cipso), 147.48 (C=N), 142.19, 132.55, 132.25, 131.38, 130.49, 130.26, 129.02, 128.73, 127.34, 127.19, 124.99, 124.06, 122.75, 121.69, 115.58, 115.29 (ArC), 56.18 (OCH<sub>3</sub>).

**HRMS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> için hesaplanan: 477.10491; bulunan: 477.11165 (C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>SH).

**3.3.7. 1-((2-İsonikotinilhidrazono)metil)naftalen-2-il benzen sülfonat (3a)**

Beyaz katı; verim: %74; erime noktası: 179–180 °C.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3189 (N—H gerilme titreşimi), 1655 (C=O ger.), 1580 (C=N ger.), 1374 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1178 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm):** 12.16 (s, 1H, NH), 9.21 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 8.84 (d, J = 4.2 Hz, 2H, Py-H), 8.77 (s, 1H, —N=CH), 8.07 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.00 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.88–7.85 (m, 4H, Py-H ve ArH), 7.72 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.65–7.56 (m, 4H, ArH), 7.34 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm):** 162.11 (C=O), 150.91 (2×Py-C), 147.72 (C=N), 144.41, 140.68, 135.83, 135.75, 133.83, 132.95, 132.56, 130.46, 130.18, 129.14, 128.98, 127.37, 127.12, 122.27, 122.06, 121.38 (ArC ve 2×Py-C).

**HRMS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> için hesaplanan: 432.09425; bulunan: 432.10109 (C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>SH).

### 3.3.8. 1-((2-İsonikotinilhidrazono)metil)naftalen-2-il 4-florobenzen sülfonat (3b)

Beyaz katı; verim: %66; erime noktası: 192–194 °C.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3200 (N–H gerilme titreşimi), 1676 (C=O ger.), 1584 (C=N ger.), 1374 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1181 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 12.12 (s, 1H, NH), 9.17 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 8.84 (d, J = 5.6 Hz, 2H, Py-H), 8.73 (s, 1H, –N=CH), 8.11 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.02 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.91 (dd, J = 8.8, 5.0 Hz, 2H, ArH), 7.87 (d, J = 5.7 Hz, 2H, Py-H), 7.69–7.61 (m, 2H, ArH), 7.44–7.37 (m, 3H, ArH).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 166.32 (F'ye bağlı Cipso), 162.09 (C=O), 150.90 (2×Py-C), 147.55 (C=N), 144.25, 140.61, 133.02, 132.63, 132.44, 132.34, 130.47, 130.09, 129.17, 129.06, 127.44, 127.05, 122.33, 122.03, 121.55, 117.74, 117.51 (ArC ve 2×Py-C).

**HRMS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> için hesaplanan: 450.08496; bulunan: 450.09185 (C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>SH).

### 3.3.9. 1-((2-İsonikotinilhidrazono)metil)naftalen-2-il 4-klorobenzen sülfonat (3c)

Açık sarı katı; verim: %69; erime noktası: 194–195 °C.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3142 (N–H gerilme titreşimi), 1655 (C=O ger.), 1547 (C=N ger.), 1385 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1173 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 12.09 (s, 1H, NH), 9.16 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 8.84 (d, J = 5.1 Hz, 2H, Py-H), 8.70 (s, 1H, –N=CH), 8.11 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.02 (d, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.87 (d, J = 5.4 Hz, 2H, Py-H), 7.83 (d, J = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.69–7.60 (m, 4H, ArH), 7.39 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 162.04 (C=O), 150.90 (2×Py-C), 147.50 (C=N), 144.08, 141.09, 140.61, 133.03, 132.64, 130.85, 130.46, 130.42, 129.16, 129.07, 127.46, 127.06, 122.32, 122.04, 121.60 (ArC ve 2×Py-C).

**HRMS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> için hesaplanan: 466.05553; bulunan: 466.06239 (C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>SH).

### 3.3.10. 1-((2-İsonikotinihidrazono)metil)naftalen-2-il 4-bromobenzen sülfonat (3d)

Açık pembe katı; verim: %73; erime noktası: 197–198 °C.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3142 (N–H gerilme titreşimi), 1655 (C=O ger.), 1550 (C=N ger.), 1385 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1171 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 12.08 (s, 1H, NH), 9.16 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 8.84 (d, J = 5.0 Hz, 2H, Py-H), 8.70 (s, 1H, –N=CH), 8.11 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.02 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.87 (d, J = 5.5 Hz, 2H, Py-H), 7.83 (d, J = 8.6 Hz, 2H, ArH), 7.69–7.60 (m, 4H, ArH), 7.39 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 162.02 (C=O), 150.90 (2×Py-C), 147.51 (C=N), 140.62, 133.38, 133.06, 133.04, 132.66, 130.79, 130.45, 130.33, 130.28, 129.17, 129.12, 129.07, 127.46, 127.08, 122.31, 122.05, 121.62 (ArC ve 2×Py-C).

**HRMS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> için hesaplanan: 510.00476; bulunan: 510.01136 (C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>SH).

### 3.3.11. 1-((2-İsonikotinihidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metilbenzen sülfonat (3e)

Beyaz katı; verim: %76; erime noktası: 194–195 °C.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3187 (N–H gerilme titreşimi), 1666 (C=O ger.), 1596 (C=N ger.), 1349 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1171 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 12.09 (s, 1H, NH), 9.18 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 8.85 (d, J = 5.1 Hz, 2H, Py-H), 8.72 (s, 1H, –N=CH), 8.08 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.00 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.88 (d, J = 5.4 Hz, 2H, Py-H), 7.71 (d, J = 8.1 Hz, 2H, ArH), 7.68–7.58 (m, 2H, ArH), 7.36 (d, J = 7.6 Hz, 3H, ArH), 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , ppm):** 161.99 (C=O), 150.94 (2×Py-C), 147.77 (C=N), 146.79, 144.36, 140.62, 132.90, 132.55, 130.91, 130.63, 130.44, 129.12, 128.99, 128.94, 127.33, 127.12, 122.28, 122.01, 121.56 (ArC ve 2×Py-C), 21.58 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> için hesaplanan: 446.1102; bulunan: 446.11698 (C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>SH).

### 3.3.12. 1-((2-İsonikotinihidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metoksibenzen sülfonat (3f)

Beyaz katı; verim: %76; erime noktası: 233–234 °C.

**FT-IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3286 (N–H gerilme titreşimi), 1666 (C=O ger.), 1590 (C=N ger.), 1367 (asimetrik, SO<sub>2</sub> ger.), 1160 (simetrik, SO<sub>2</sub> ger.).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ, ppm):** 12.10 (s, 1H, NH), 9.19 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 8.83 (d, J = 5.6 Hz, 2H, Py-H), 8.72 (s, 1H, -N=CH), 8.08 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.00 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.88 (d, J = 5.6 Hz, 2H, Py-H), 7.74 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.67–7.58 (m, 2H, ArH), 7.37 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.03 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ArH), 3.70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ, ppm):** 164.82 (Cipso-OCH<sub>3</sub>), 161.96 (C=O), 150.90 (2×Py-C), 147.86 (C=N), 144.44, 140.63, 132.86, 132.54, 131.40, 130.45, 129.11, 128.95, 127.30, 127.13, 124.87, 122.29, 122.02, 121.73, 115.37 (ArC ve 2×Py-C), 56.24 (OCH<sub>3</sub>).

**HRMS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> için hesaplanan: 462.10466; bulunan: 462.11185 (C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>SH).

### 3.4. Biyolojik Deneyler

İnsan eritrositlerinden elde edilen AChE (≥500 ünite/mg protein), at serumu BChE (≥900 ünite/mg protein), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB), asetilkolin iyodür, bütiltirikolin iyodür ve tris hidroklorür Merck KGaA (Darmstadt, Almanya) firması tarafından temin edilmiştir.

### 3.5. hCA I ve hCA II Esteraz Aktivite Deneyleri

Bu çalışmada, hCA I ve II, Sepharose-4B-L-tirozin-sülfamid ligandı kullanılarak tek adımlı afiniteli kromatografi yöntemiyle insan kanından saflaştırılmıştır (Ellman, Courtney, Andres ve Featherstone, 1961). Saflaştırma sonrası, test edilen bileşiklerin her bir enzim üzerindeki inhibitör etkileri, substrat olarak p-nitrofenil asetat (PNF) kullanılarak 348 nm'de değerlendirildi. Reaksiyon karışımı, 50 mM Tris-SO<sub>4</sub> tamponu (pH 7,4), 3 mM PNF, saf su ve enzim çözeltisinden oluşmuştur. Hiçbir inhibitör bulunmadığında enzim aktivitesi %100 kabul edildi. İnhibitör potansiyelini belirlemek için her bir bileşik için aktivite-konsantrasyon eğrileri çizildi ve IC<sub>50</sub> değerleri buna göre hesaplandı (Öztekin ve Stellenboom, 2024; Zilbeyaz, Öztekin ve Kutluana, 2021).

### 3.6. AChE ve BChE İnhibitörlük Aktivite Deneyleri

Test edilen bileşiklerin AChE ve BChE üzerindeki inhibitör etkileri, Ellman spektrofotometrik yöntemi ile (küçük modifikasyonlarla) değerlendirildi (Öztekin ve Stellenboom, 2024; Zilbeyaz, Öztekin ve Kutluana, 2021; Ellman, Courtney, Andres ve Featherstone, 1961). Öncelikle bileşikler farklı konsantrasyonlarda seyreltilmiş ve her bir enzim için inhibisyon aralıkları belirlenmiştir. Beş farklı konsantrasyonda yapılan aktivite ölçümleri üçer kez tekrarlanmış ve IC<sub>50</sub> değerleri % aktivite/konsantrasyon eğrilerinden hesaplanmıştır.

Reaksiyon karışımı, 0,3 mL'lik mikrolaka kuyucuklarında hazırlanmış olup; 0,001–2 µM bileşik, 0,1 M Tris/HCl tamponu, 25 µM DTNB ve yaklaşık 0,20 ünite enzim çözeltisi içermektedir. Reaksiyon, 0,5 mM asetiltiyokolin veya bütiltiyokolin eklenerek başlatılmış ve 25 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Ölçümler, Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis mikrolaka spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.7. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada, inhibitörlük verileri ortalama ± Standart Sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. IC<sub>50</sub> grafikleri, deneysel verilerin doğrusal olmayan regresyon analizi kullanılarak Office 365 Excel ile hazırlanmıştır. Ortalama ve SS değerlerinin hesaplanmasında SPSS (versiyon 27) yazılımı kullanılmıştır.

### 3.8. DFT Çalışmaları

DFT hesaplamaları, moleküllerin reaktivitesini tahmin etmek için kullanılan, bilgisayar destekli yaygın bir yöntemdir. Test edilen bileşiklerin optimize geometrik yapıları ve HOMO–LUMO enerjilerinin hesaplanması için Orca v6.0.0 yazılımı kullanılarak B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) düzeyinde hesaplamalar yapılmıştır (Becke, 1988; Becke ve Johnson, 2005; Johnson ve Becke, 2006; Grimme, Antony, Ehrlich ve Krieg, 2010; Neese, Wennmohs, Becker ve Riplinger, 2020). Ayrıca, aşağıdaki denklemler kullanılarak bileşiklerin iyonizasyon potansiyeli, elektron ilgisi, kimyasal potansiyeli, sertlik ve elektrofiliklik indeksi tahmin edilmiş ve tartışılmıştır (Kohn ve Sham, 1965; Feng, Yang, Cui ve ark., 2018; Koopmans, 1934; Parr, Szentpály ve Liu, 1999).

$E_{\text{HOMO}} = \text{İyonizasyon Potansiyeli (IP)}$

$E_{\text{LUMO}} = \text{Elektron İlgisi (EA)}$

$\text{Enerji Farkı } (\Delta E) = EA - IP$

$\text{Kimyasal Potansiyel } (\mu) = (EA + IP) / 2$

$\text{Sertlik } (\eta) = (EA - IP) / 2$

$\text{Elektrofiliklik İndeksi } (\omega) = \mu^2 / 2\eta$

### 3.9. Moleküler Docking Çalışmaları

Hedef enzimlerin test edilen bileşiklerle bağlanma etkileşimlerini analiz etmek için moleküler docking simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, AChE, (Ngamelue, Homma, Lockridge ve Asojo, 2007) BChE, (Franklin, Rudolph, Ginter ve ark., 2016) hCA I, (Chiaramonte, Bua, Ferraroni ve ark., 2018) ve hCA II (Vannozzi, Vullo, Angeli ve ark., 2021) 3B yapıları Protein Data Bank'dan elde edilmiş ve AutoDockTools-1.5.6 programı kullanılarak PDBQT formatında hazırlanmıştır. B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) yöntemiyle ORCA 6.0.0 çıktılarından elde edilen bileşiklerin 3B optimize yapıları Avogadro yazılımı ile düzenlenmiştir (Hanwell, Curtis, Lonie ve ark., 2012). Hedef makromoleküller ve bileşikler Autodock Vina programına sunulmuştur (Trott ve Olson, 2010). Docking analizinde, en olası 10 docking pozisyonu değerlendirilmiş ve en yüksek bağlanma enerjisine sahip pozlar en güçlü kompleksler olarak kabul edilmiştir. Docking konformasyonlarının ve etkileşimlerinin 2B ve 3B görselleştirilmesi için Discovery Studio Visualizer kullanılmıştır.

### 3.10. MD Simülasyonu

MD simülasyon sürecinde, en olası bağlanma modeli olarak bileşik **2f** 5HFA'nın aktif bölgesinde ve **2b** 2PM8'de kullanılmıştır. Her iki kompleks dosyasından, USCF Chimera kullanılarak topolojiler çıkarılmıştır. Bileşikler **2b** ve **2f** için parametreler SwissParam web sunucusundan alınmıştır (Zoete, Cuendet, Grosdidier ve Michielin, 2011). 5HFA ve 2PM8'in topolojileri GROMACS'in pdb2gmX aracı ile oluşturulmuştur. Ardından proteinler, TIP3P çözeltisi modeli kullanılarak dodekahedral bir kutuda çözündürülmüştür. Enerji minimizasyonu, kutu sınırlarını tanımlamak için 50.000 adım boyunca steepest descent algoritması ile gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra iki aşamalı bir dengeleme süreci uygulanmıştır:

1. NVT dengelemesi: 300 K'de 100 ps, V-rescale termostat kullanılarak (Bussi, Donadio ve Parrinello, 2007).
2. NPT dengelemesi: 1 bar basınçta 100 ps, Parrinello–Rahman barostat ile.

MD simülasyonları, AChE/BChE ve en yüksek inhibitör etkisi gösteren bileşiklerle 200 ns süreyle GROMACS 2024.1 ve CHARMM36 kuvvet alanı kullanılarak yapılmıştır (Abraham, Murtola, Schulz ve ark., 2015). Yörünge analizleri, GROMACS'ın analiz araçlarıyla gerçekleştirilmiştir. Son olarak, kompleksler ve enzimler için ayrı ayrı RMSD (root-mean-square deviation), RMSF (root mean square fluctuations), H-bağları ve Rg (Radius of gyration) hesaplanmıştır.

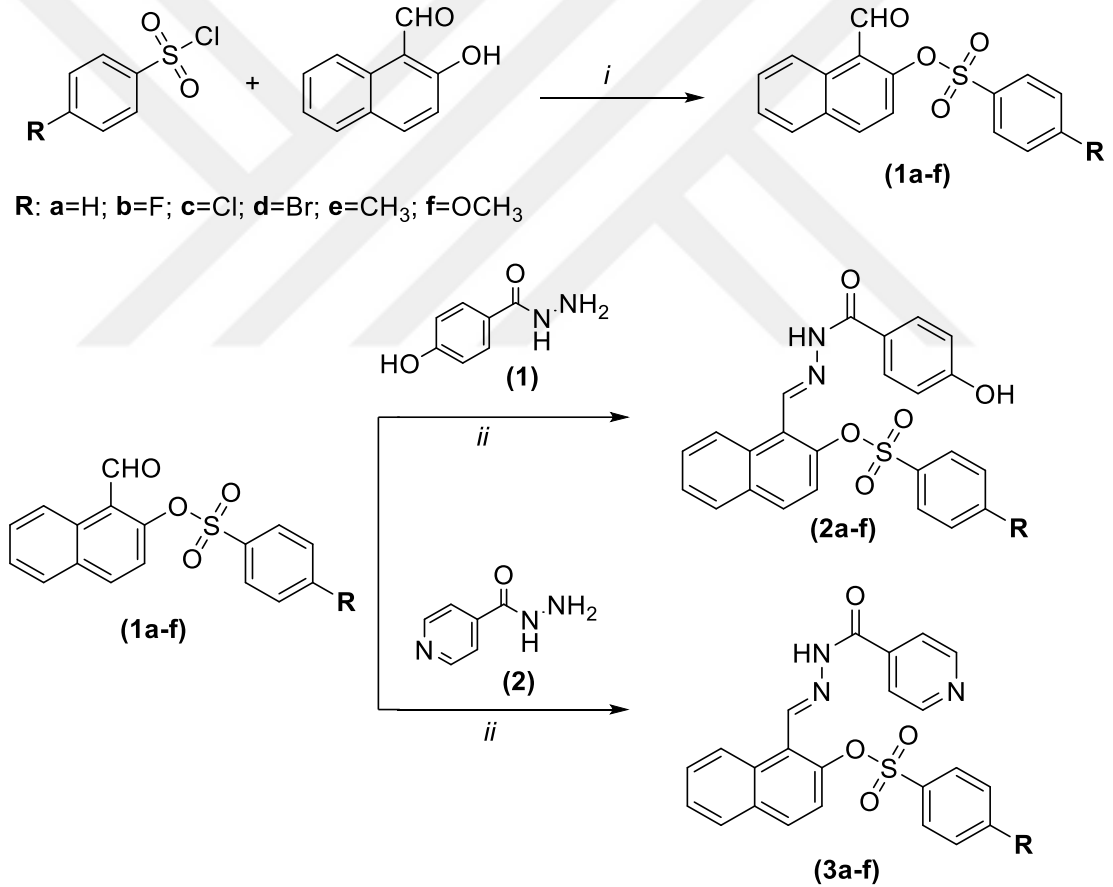
### **3.11. ADMET Analizi**

Bileşikler 2b ve 2f'nin, in vitro ve moleküler docking çalışmalarıyla ChE ve CA enzimlerinin potansiyel inhibitörleri olarak tanımlanan absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım (ADME) özellikleri SwissADME web aracı ile değerlendirilmiştir (<http://www.swissadme.ch/index.php>) (Daina, Michielin ve Zoete, 2017). Ayrıca aynı bileşiklerin kapsamlı toksisite değerlendirmesi ADMETlab 3.0 platformu kullanılarak yapılmıştır (Fu ve ark., 2024).

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Kimya

Bu çalışmada, AChE, BChE, hCA I ve hCA II enzimlerinin yeni ikili inhibitörlerini keşfetmek amacıyla, elektron çekici ve elektron verici atomlar ve gruplar ( $-F$ ,  $-Cl$ ,  $-CH_3$ ,  $-OCH_3$ ) taşıyan, aril sülfonat grubu içeren küçük bir dizi yeni hidrazon türevi (**2a-f** ve **3a-f**) başarıyla sentezlenmiştir. İki aşamalı sentez yolu Şekil 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Yeni hidrazon türevlerinin sentez yolları. Reaktifler ve koşullar: (i) benzensülfonil klorürler, 2-hidroksi-1-naftaldehit, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TEA, 5 saat; (ii) Bileşikler (**1a-f**), 4-hidroksibenzhidrazit/izoniazid, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, 80 °C, 8 saat.

İlk olarak, birinci aşamada 6-aril sülfonat bileşikleri (**1a-f**) elde edilmiştir. Bu bileşikler, 2-hidroksi-1-naftaldehit'in, katalitik miktarda trietilamin içeren diklorometan içerisinde, toplam altı sübstitüe ve sübstitüe olmayan benzensülfonil klorür ile 5 saat

boyunca sürekli karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Daha sonra, hedeflenen moleküller (**2a-f** ve **3a-f**), yani yeni hidrazon bileşikler, sülfonat bileşiklerinin 4-hidroksibenzhidrazit (**1**) veya izoniazid (**2**) ile etanol reflüks sıcaklıklarında 8 saat reaksiyona sokulmasıyla elde edilmiştir. Bu çalışmada, bilinen sülfonat bileşikler (**1a-f**) yeniden sentezlenmiş ve hedeflenen bileşiklerin, yani hidrazon türevlerinin (**2a-f** ve **3a-f**) sentezinde kullanılmıştır. Seri **1a-f** nin kimyasal yapısı, belgelenmiş erime noktaları ve FT-IR (sülfonat bileşiklerinin sentezi bölümüne bakınız) ile uyumluluk göstermiştir. Öte yandan, yeni sentezlenen moleküller (**2a-f** ve **3a-f**) ise FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C NMR ve HRMS kullanılarak karakterize edilmiştir.

Bu çalışmada, yeni sentezlenen hidrazon bileşiklerinin (**2a-f** ve **3a-f**) spektroskopik verileri, ilgili yapılarıyla tam bir uyum sergilemiştir. FT-IR spektrumlarında, bileşikler (**2a-f** ve **3a-f**), sırasıyla N—H, C=O, C=N ve S=O (asimetrik/simetrik) germe bantlarına karşılık gelen 3351–3142 cm<sup>-1</sup>, 1676–1621 cm<sup>-1</sup>, 1598–1550 cm<sup>-1</sup> ve 1385–1349/1183–1160 cm<sup>-1</sup> spektral aralıklarında absorpsiyon bantlarının ortaya çıkmasıyla tanımlanmıştır.

Hedeflenen tüm bileşiklerin <sup>1</sup>H-NMR spektrumlarında, azometin (N=CH) protonuna karşılık gelen sinyaller, 8,67–8,74 ppm aralığında kimyasal kayma gösteren singletler halinde gözlemlenmiştir; bu da hidrazon yapısının oluştuğunun bir kanıtıdır. Bileşiklerin (**2a-f**) yapısındaki hidroksil (OH) protonuna ait sinyaller 10,17 ila 10,19 ppm arasında rezonans göstermiştir. Ancak, NH protonlarına karşılık gelen bir singlet tepe noktası 11,66–12,16 ppm kimyasal kayma aralığında gözlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerdeki fenil, naftil ve piridin halkalarına ait protonların sinyalleri de beklenen alanda gözlenmiştir.

<sup>13</sup>C NMR spektrumlarında, tüm hidrazon bileşiklerindeki C=O ve C=N gruplarının karbon atomlarının kimyasal kaymaları sırasıyla 161,96–163,14 ve 147,13–147,86 ppm aralıklarında belirlenmiştir. Hedeflenen bileşikler için HRMS verileri, ilgili molekül ağırlıklarıyla uyumluydu. Hedeflenen bileşiklerin spektroskopik analiz spektrumları Ekler bölümünde sunulmaktadır.

#### 4.2. Biyolojik Değerlendirme

Kolin estera inhibitörleri, Alzheimer hastalığı (AD) tedavisinde kullanılan önemli terapötik ajanlardır. Günümüzde, Alzheimer hastalığı yolundaki birden fazla hedefi veya mekanizmayı aynı anda etkileyebilen yeni çok hedefli ilaçlar geliştirmek,

hastalığın tedavisi için etkili bir yaklaşım olabilir. Çalışmalar, hCA'ların (insan karbonik anhidrazlarının) Alzheimer hastalığı tedavisi için önemli bir hedef olduğunu gösteren ek kanıtlar sunmuştur. Bu nedenle, bu çalışmada, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerle yakından ilişkili olan önemli metabolik enzimler olan hCA I, hCA II, AChE ve BChE'nin etkili ikili inhibitör adayları olarak yeni hidrazon türevleri tasarlamayı ve sentezlemeyi amaçladık. Bu çalışmada, yeni sentezlenen bileşiklerin ve referans inhibitörlerin hCA I, hCA II, AChE ve BChE'ye karşı inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.1'de sunulmaktadır.

**Tablo 4.1.** Hedeflenen moleküllerin ve referans inhibitörlerin inhibisyon sonuçları

| Kod                       | R                 | IC <sub>50</sub> (nm) <sup>a</sup> |            |            |            |
|---------------------------|-------------------|------------------------------------|------------|------------|------------|
|                           |                   | hCA I                              | hCA II     | AChE       | BChE       |
| 2a                        | -H                | 88.6±6.3                           | 128.8±8.6  | 832.9±65.2 | 659.3±34.1 |
| 2b                        | -F                | 47.3±5.2                           | 71.9±11.5  | 156.0±5.2  | 134.5±11.9 |
| 2c                        | -Cl               | 247.1±15.6                         | 242.4±21.8 | 231.0±11.8 | 138.6±9.1  |
| 2d                        | -Br               | 188.7±7.9                          | 203.8±14.3 | 391.9±39.8 | 656.8±53.7 |
| 2e                        | -CH <sub>3</sub>  | 254.3±7.6                          | 147.4±17.7 | 561.1±53.2 | 1058±143.5 |
| 2f                        | -OCH <sub>3</sub> | 185.1±12.6                         | 112.7±5.5  | 81.01±8.2  | 160.2±18.3 |
| 3a                        | -H                | 108.1±12.9                         | 289.2±11.9 | 156.7±20.5 | 214.2±18.7 |
| 3b                        | -F                | 223.7±8.3                          | 324.7±23.9 | 214.1±19.3 | 306.3±19.9 |
| 3c                        | -Cl               | 230.3±9.2                          | 124.8±12.4 | 629.3±56.8 | 542.6±48.2 |
| 3d                        | -Br               | 317.8±15.7                         | 224.1±8.7  | 635.7±23.4 | 1235±85.3  |
| 3e                        | -CH <sub>3</sub>  | 186.9±17.6                         | 218.6±12.5 | 550.8±38.5 | 1248±64.9  |
| 3f                        | -OCH <sub>3</sub> | 262.3±15.7                         | 376.2±25.9 | 672.8±59.4 | 2264±128.8 |
| AZA <sup>b</sup>          |                   | 98.5±6.8                           | 66±5.2     |            |            |
| Rivastigmine <sup>c</sup> |                   |                                    |            | 894±82.2   | 349±17.7   |

<sup>[a]</sup> En az üç belirlemeden alınan ortalama değerler. <sup>[b]</sup> hCA I ve hCA II için kontrol olarak AZA kullanılmıştır. <sup>[c]</sup> AChE ve BChE için kontrol olarak rivastigmin kullanılmıştır.

(i) hCA I deneyinde, yeni sentezlenen hidrazon-sülfonat hibritleri (**2a-f** ve **3a-f**), Tablo 4.1'de görüldüğü gibi 47,3 ila 317,8 nM aralığında IC<sub>50</sub> değerleri ile hCA I'e karşı inhibitör aktivite sergilemiştir. Ayrıca, 4-hidroksi benzohidrazit türevleri (**2a-f**), yani birinci grup, genellikle hCA I'i ve diğer enzimleri (hCA II, AChE ve BChE) izoniazid türevlerinden (**3a-f**) daha iyi inhibe etmiştir. Bu seride, **2a** (88,6 nM) ve **2b** (47,3) bileşikleri, referans inhibitör olan AZA'ya (98,5 nM) kıyasla bu enzimi daha iyi inhibe etmiştir. En iyi inhibitör adayları olan bu bileşiklerden **2b** bileşiği, bu enzimi AZA'dan iki kat daha potent bir şekilde inhibe etmiştir. hCA I, hCA II ve BChE için en iyi çok hedefli inhibitör adayı olarak 1-((2-(4-hidroksibenzoil)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-florobenzen-sülfonat olan **2b** bileşiğini belirledik. hCA II deneyinde, test edilen tüm moleküller (**2a-f** ve **3a-f**), bu enzimi 71,9–376,2 nM aralığındaki nanomolar konsantrasyonlarda inhibe etmiştir. Serideki **2b** bileşiği (71,9 nM), AZA'ya (66 nM) en

yakın aktiviteyi göstermiştir. Bu bileşik dışında, sırasıyla **2f** (112,7 nM) ve **2a** (128,8 nM) bileşikleri AZA'ya (66 nM) en yakın aktiviteyi göstermiştir.

(ii) AChE deneyinde, yeni hibritler (**2a-f** ve **3a-f**), 81,01–832,9 nM aralığında IC<sub>50</sub> değerleri ile AChE'yi inhibe etmiştir. İnhibisyon sonuçları, test edilen tüm moleküllerin bu enzimi referans inhibitör rivastigminde daha iyi inhibe ettiğini göstermiştir. Test edilen moleküller arasında, **2f** bileşiği (81,01 nM) AChE'ye karşı rivastigmine (894 nM) kıyasla en iyi inhibisyonu göstermiştir. 1-((2-(4-hidroksibenzoil)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metoksibenzensülfonat olan bu bileşik (**2f**), bu enzimi rivastigmine kıyasla yaklaşık 11 kattan fazla inhibe etmiştir. Öte yandan, hedeflenen moleküller (**2a-f** ve **3a-f**), BChE'yi 134,5–2264 nM aralığındaki konsantrasyonlarda inhibe etmiştir. Test edilen bileşikler arasında, **2b** (134,5 nM), **2c** (138,6 nM) ve **2f** (160,2) bileşikleri, referans inhibitör olan rivastigmine (349 nM) kıyasla bu enzimi daha iyi inhibe etmiştir. En iyi inhibitör adayları olan bu bileşiklerden **2b** bileşiği, bu enzimi rivastigminde iki kat daha potent bir şekilde inhibe etmiştir.

#### 4.3. Yapı-Aktivite İlişkileri

Bu çalışmada, 4-hidroksibenzhidrazit'ten (**1**) türetilen bileşikler (**2a-f**) ve izoniazid'den (**2**) türetilen bileşiklerin (**3a-f**) ile bunların aril sülfonat gruplarının para pozisyonundaki çeşitli süstitüentlerin (–F, –Cl, –Br, –CH<sub>3</sub> ve –OCH<sub>3</sub>) yapı-aktivite ilişkileri (SAR) incelenmiştir. Bu çalışmada, iki serinin aktivite sonuçları incelenmiş olup, genel olarak **2a-f** bileşikleri bu enzimlere karşı daha iyi inhibitör aktivite göstermiştir. Ayrıca, aril sülfonat grubunun para pozisyonundaki bazı süstitüentlerin aktiviteyi artırıcı, bazılarının ise aktiviteyi düşürücü olduğu belirlenmiştir. Aril sülfonat grubunun para pozisyonunda aktiviteyi artırıcı flor atomu taşıyan **2b** bileşiği, hCA I, hCA II ve BChE için en iyi inhibitör aday olarak belirlenmiştir. Öte yandan, aromatik halkanın para pozisyonunda aktiviteyi artıran bir metoksi grubu taşıyan **2f** bileşiği, AChE için en iyi inhibitör adaydır.

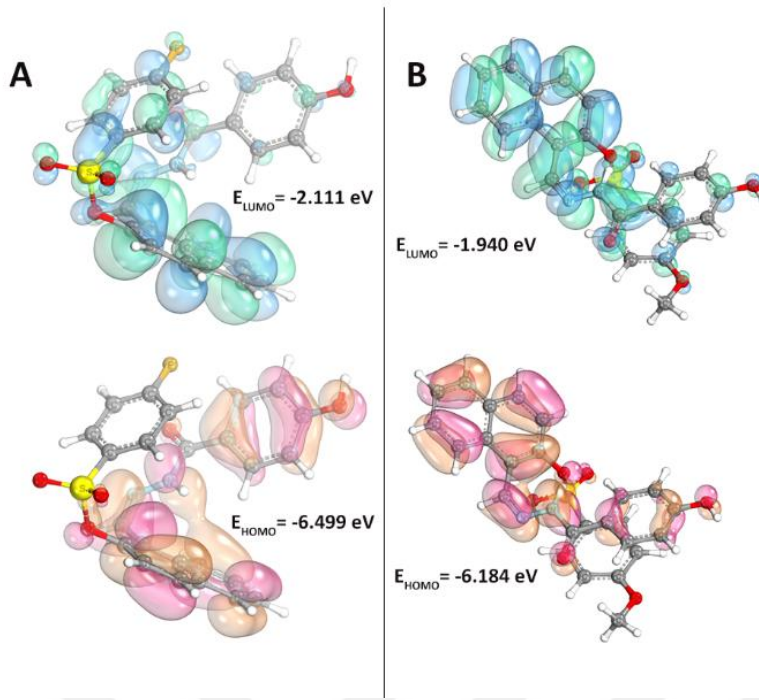
#### 4.4. DFT Sonuçları

Kimyasal hesaplamalarda geometri optimizasyonu önemli bir adımdır, molekülün en yüksek stabilite düzeyini sağlayacak atomik düzenlemeyi belirler. B3LYP-D3BJ, özellikle kısa ve orta mesafelerde ( $\leq 5$  Å) atomlar arası etkileşimleri geleneksel DFT

yöntemlerine kıyasla daha doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlayan, yaygın olarak uygulanabilir bir yöntemdir. Çalışmamızda, test edilen bileşiklerin kimyasal reaktivite tanımlayıcılarını belirlemek için B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) düzeylerinde DFT hesaplamaları yapılmıştır. Her bir bileşiğin reaktivite indeksleri Tablo 4.2'de, en potent inhibitörler olan **2b** ve **2f**'nin HOMO–LUMO enerji seviyeleri ise optimize edilmiş yapılarıyla birlikte Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.** B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) yöntemiyle hesaplanan **2a–f** ve **3a–f** bileşik serisine ait reaktivite parametreleri.

| Bileşikler | IP     | EA     | $\Delta E$ | $\mu$  | $\eta$ | $\omega$ |
|------------|--------|--------|------------|--------|--------|----------|
| <b>2a</b>  | -6,465 | -2,098 | 4,367      | -4,282 | 2,184  | 4,198    |
| <b>2b</b>  | -6,449 | -2,211 | 4,238      | -4,330 | 2,119  | 4,424    |
| <b>2c</b>  | -6,492 | -2,164 | 4,328      | -4,328 | 2,164  | 4,328    |
| <b>2d</b>  | -6,465 | -2,178 | 4,287      | -4,322 | 2,144  | 4,356    |
| <b>2e</b>  | -6,409 | -2,023 | 4,386      | -4,216 | 2,193  | 4,053    |
| <b>2f</b>  | -6,184 | -1,940 | 4,244      | -4,062 | 2,122  | 3,888    |
| <b>3a</b>  | -6,670 | -2,341 | 4,329      | -4,506 | 2,165  | 4,689    |
| <b>3b</b>  | -6,715 | -2,335 | 4,380      | -4,525 | 2,190  | 4,675    |
| <b>3c</b>  | -6,730 | -2,390 | 4,340      | -4,560 | 2,170  | 4,791    |
| <b>3d</b>  | -6,697 | -2,379 | 4,318      | -4,538 | 2,159  | 4,769    |
| <b>3e</b>  | -6,609 | -2,316 | 4,293      | -4,463 | 2,147  | 4,639    |
| <b>3f</b>  | -6,595 | -2,227 | 4,368      | -4,411 | 2,184  | 4,454    |



Şekil 4.2. B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) yöntemiyle hesaplanan **2b** (A) ve **2f** (B) bileşiklerinin optimize edilmiş yapıları ve HOMO–LUMO gösterimleri

HOMO–LUMO enerji aralığı, sınır orbitallerindeki enerji seviyeleri arasındaki farkı ifade eder; enerji aralığı ne kadar büyükse, molekül o kadar karardır. Kararlı bir molekülün daha az polarize olduğu ve bu durumun kimyasal reaktiviteyi azalttığı söylenebilir ve bu durum doğrudan biyolojik aktiviteyle ilişkilidir. Tablo 4.2'ye göre, **2b** ve **2f** bileşiklerinin enerji açığının en düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, inhibisyon çalışmalarından elde edilen deneysel verilerle karşılaştırıldığında, BChE, hCA I ve hCA II için en etkili molekülün **2b** bileşiği olması, AChE için ise en potent inhibitörün **2f** bileşiği olması şaşırtıcı değildir. Bu sonuçlara göre, inhibisyon değerlerinin elektronik yapıdan etkilendiğini ve elektron transfer kapasitesinin bağlanma eğilimini artırdığını kolayca tahmin edebiliriz. Ayrıca, yüksek sertliğe sahip moleküllerin daha kararlı olması ve daha düşük reaktiviteye sahip olması gerekir. Buna paralel olarak, **3b** ve **2e** bileşiklerinin bağlı gruplarının aktivitesi bazı durumlarda inhibisyon kapasitesini değiştirmesine rağmen, inhibisyon etkileri genellikle düşüktür (Tablo 4.3).

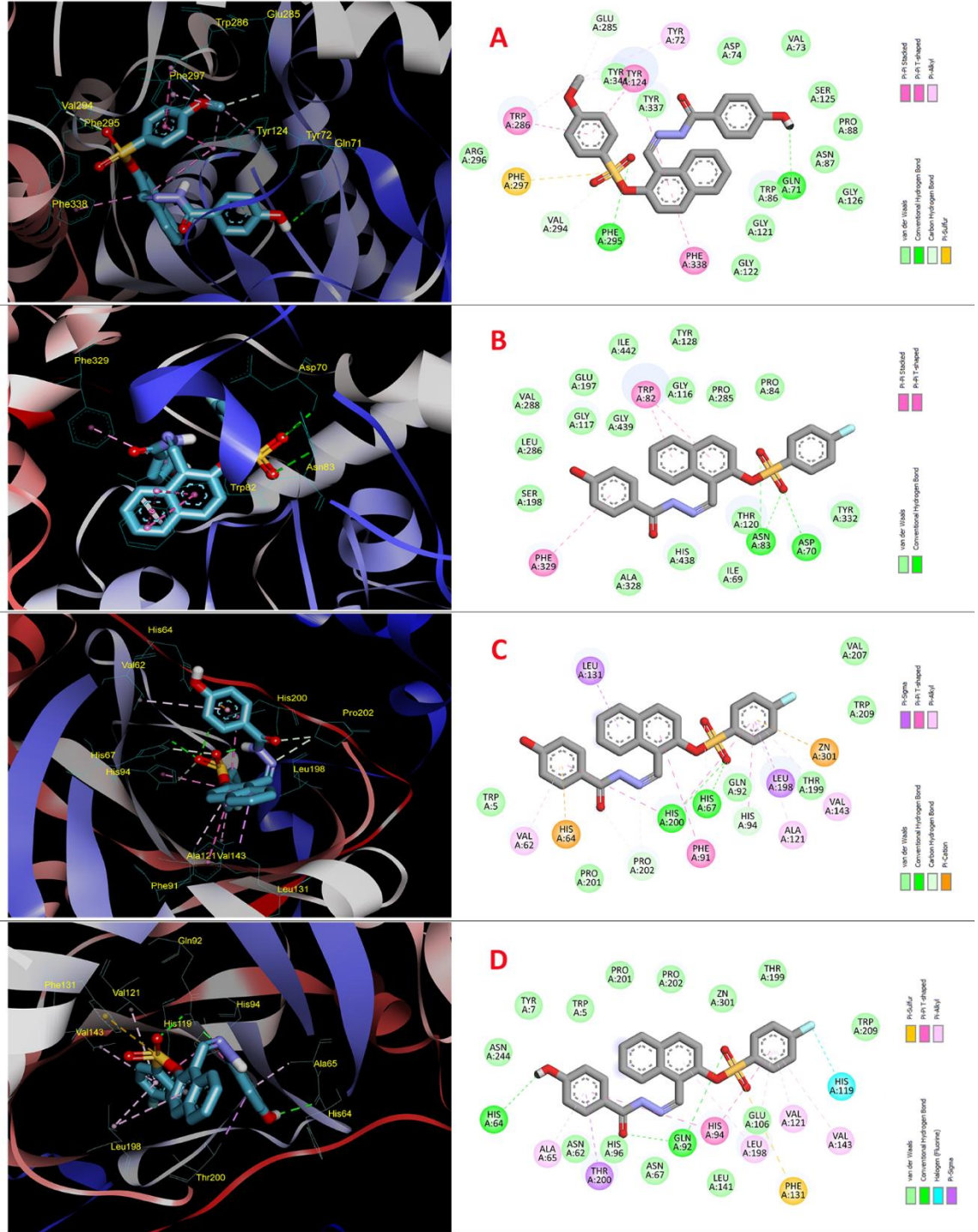
**Tablo 4.3.** 2a-f ve 3a-f serilerinin AChE, BChE, hCA I ve hCA II üzerindeki bağlanma etkileşimi ve in vitro inhibisyon verileri.

| Kod | AChE<br>$\Delta G$ Vina<br>(kcal/<br>mol) | AChE<br>IC <sub>50</sub><br>(nM) | BChE<br>$\Delta G$ Vina<br>(kcal/<br>mol) | BChE<br>IC <sub>50</sub><br>(nM) | hCA I<br>$\Delta G$ Vina<br>(kcal/<br>mol) | hCA I<br>IC <sub>50</sub><br>(nM) | hCA II<br>$\Delta G$ Vina<br>(kcal/<br>mol) | hCA II<br>IC <sub>50</sub><br>(nM) |
|-----|-------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------|
| 2a  | 9.6                                       | 832.9                            | 10.0                                      | 659.3                            | 11.2                                       | 88.6                              | 10.8                                        | 128.8                              |
| 2b  | 11.1                                      | 156                              | 10.9                                      | 134.5                            | 11.1                                       | 47.3                              | 10.9                                        | 71.9                               |
| 2c  | 10.7                                      | 231                              | 11.2                                      | 138.6                            | 10.8                                       | 247.1                             | 10.1                                        | 242.4                              |
| 2d  | 10.3                                      | 391.9                            | 10.5                                      | 656.8                            | 10.7                                       | 188.7                             | 10.3                                        | 203.8                              |
| 2e  | 9.6                                       | 561.1                            | 9.9                                       | 1058                             | 10.3                                       | 254.3                             | 10.7                                        | 147.4                              |
| 2f  | 11.1                                      | 81.01                            | 10.7                                      | 160.2                            | 11.1                                       | 185.1                             | 11.0                                        | 112.7                              |
| 3a  | 10.8                                      | 156.7                            | 10.7                                      | 214.2                            | 10.8                                       | 108.1                             | 10.7                                        | 289.2                              |
| 3b  | 10.6                                      | 214.1                            | 10.8                                      | 306.3                            | 10.5                                       | 223.7                             | 10.0                                        | 324.7                              |
| 3c  | 10.1                                      | 629.3                            | 10.4                                      | 542.6                            | 10.6                                       | 230.3                             | 10.4                                        | 124.8                              |
| 3d  | 10.1                                      | 635.7                            | 9.3                                       | 1235                             | 10.1                                       | 317.8                             | 10.1                                        | 224.1                              |
| 3e  | 9.8                                       | 550.8                            | 10.1                                      | 1248                             | 10.6                                       | 186.9                             | 10.6                                        | 218.6                              |
| 3f  | 9.5                                       | 672.8                            | 9.0                                       | 2264                             | 10.5                                       | 262.3                             | 9.9                                         | 376.2                              |

#### 4.5. Moleküler Docking Sonuçları

Docking programları, test edilen bileşiklerin hedef enzimle nasıl etkileşime gireceğini tahmin etmek için kullanılabilir. Buna göre, enzimlerin (AChE, BChE, hCA I ve hCA II) hedeflenen bileşiklerle (2a-f ve 3a-f) olan bağlanma modunu açıklığa kavuşturmak için, bağlanma kapasitesini belirlemede iyi bir tahmine sahip olan Autodock Vina programı kullanılarak moleküler docking analizi yapılmıştır. Docking analizlerinin bağlanma enerjileri, test edilen bileşiklerin biyolojik aktivitesini birlikte değerlendirmeyi sağlayan deneysel IC<sub>50</sub> sonuçlarıyla birlikte Tablo 4.3'te gösterilmiştir. AChE'nin iki bağlanma bölgesi vardır; Ser203, Glu334 ve His447 amino asitlerinden oluşan bir katalitik aktif bölge (CAS) ve Tyr72, Asp74, Tyr124, Trp286 ve Tyr341 amino asitlerinden oluşan bir periferik anyonik bölge (PAS). Bileşik 2f'nin AChE'nin aktif bölgesindeki en iyi bağlanma konumu Şekil 4.3'te görülebilir. Docking sonuçları, bileşik 2f'nin, substratın aktif bölgeye geçmesine izin veren PAS bölgesinin Tyr72, Asp74, Tyr124, Trp286 ve Tyr341 amino asitleri ile çeşitli etkileşimler oluşturduğunu göstermiştir. Bileşik 2f'nin PAS bölgesindeki önemli etkileşimleri, substratın CAS'a geçişini engeller ve düşük inhibisyon değerini (81 nM) açıklar. BChE'nin aktif

bölgesindeki önemli amino asit kalıntıları His438, His447, Trp82 ve Trp86'dır.



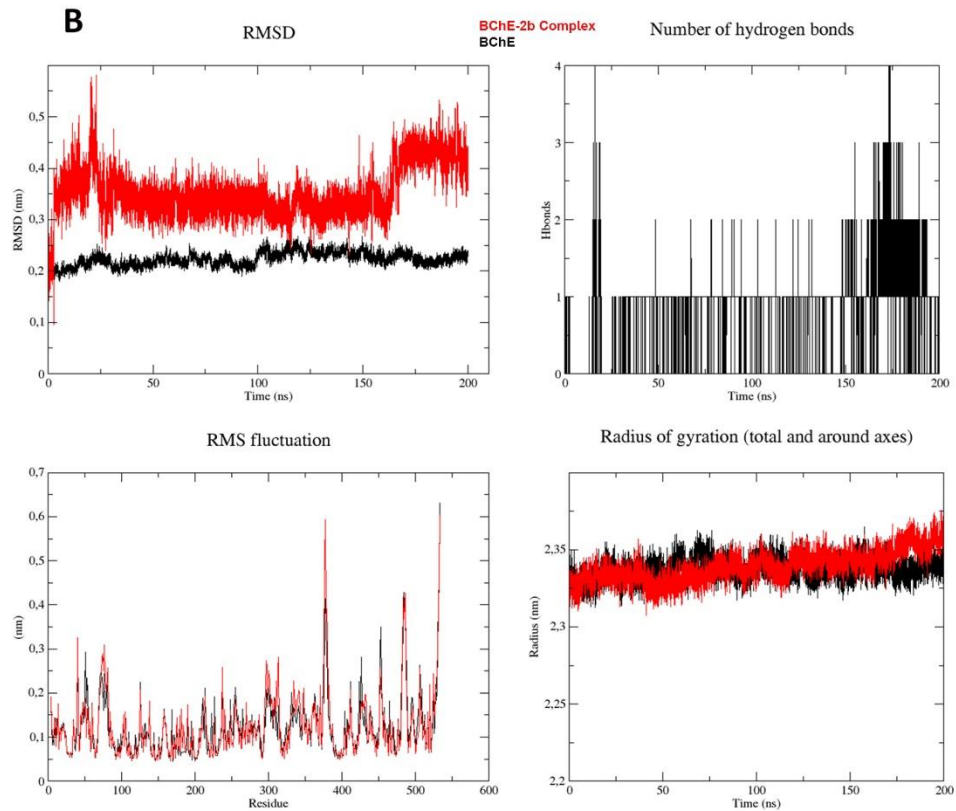
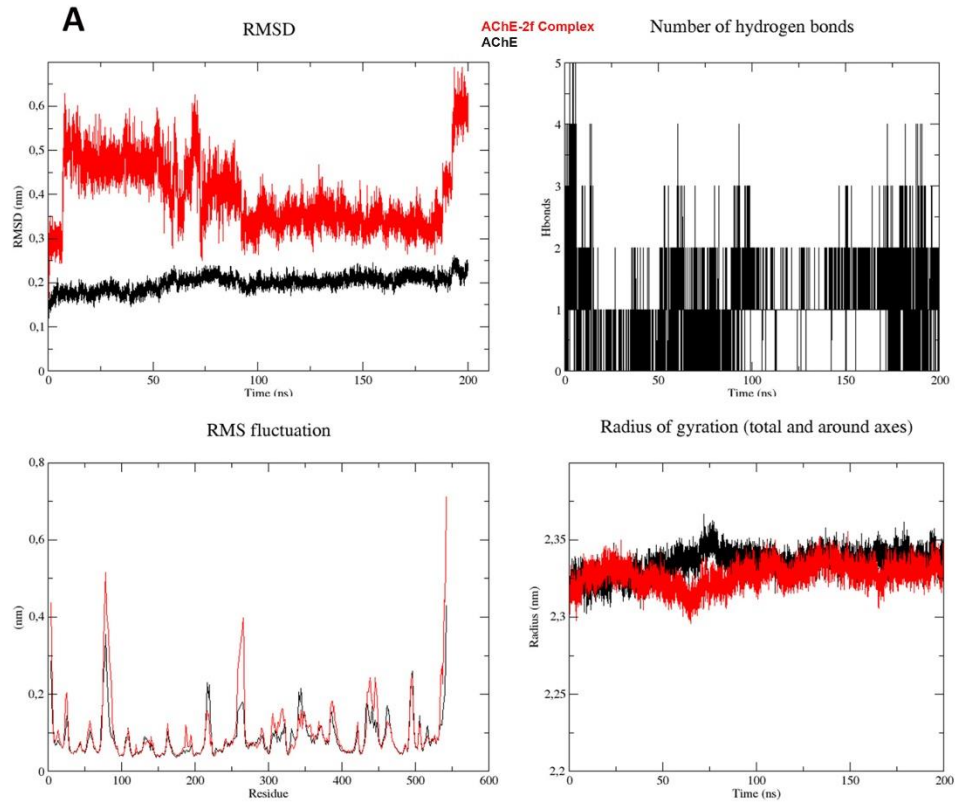
Şekil 4.3. AChE-2f (A), BChE-2b (B), hCA I-2b (C) ve hCA II-2b (D) komplekslerinin 3 boyutlu en iyi yerleşim pozisyonu ve detaylı 2 boyutlu etkileşimleri.

**2b**-BChE kompleksinin docking sonuçları, bileşik **2b**'nin aromatik kısmının His438 ile bir  $\pi$ - $\pi$  etkileşimi oluşturduğunu ve His438 ile van der Waals etkileşimi gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, molekülün sülfonat kısmı, aktif oyukta bulunan

Asp70 ve Asn83 ile hidrojen bağları sergilemiştir. İn siliko verileri ışığında, sentezlediğimiz moleküllerin sülfonat gruplarının AChE ve BChE ile anahtar etkileşimlere neden olduğu ve diğer grupların etkileşimi güçlendirmeye yardımcı olduğu, bunun da enzimler üzerinde daha güçlü bir inhibisyona yol açtığı gösterilmiştir. hCA I ve II'nin docking sonuçlarına gelince, bileşik **2b**'nin hCA I'in aktif bölgesine çok yakın bir bölgede konumlandığı görülmektedir. Özellikle His200 ve His67 tarafından oluşturulan hidrojen bağları dikkat çekicidir ve moleküle o bölgede stabilite sağlamaktadır. Benzer şekilde, molekülün yapısındaki sülfonat grubu hCA II'nin Gln92'si ile bir hidrojen bağı oluşturmuş ve molekülün konformasyonel düzenlemesi, karbonil grubundaki oksijenle de aynı şekilde etkileşime girmesine olanak sağlamıştır (Şekil 4.3).

#### 4.6. MD Simülasyon Sonuçları

MD simülasyonları, atomik hareketleri, yapısal dalgalanmaları, esnekliği, kararlılığı ve genel olarak test edilen bileşiğin hedef proteinlerle etkileşimlerini analiz ederek netleştirir. Dolayısıyla, bu analiz potansiyel aktif bileşiklerin belirlenmesine yardımcı olabilir. Bu çalışmada, AChE, BChE ve bunların umut vadeden inhibitörler, bileşik **2b** ve **2f** ile olan komplekslerinin zamana bağlı hareketlerini test etmek için 200 ns MD simülasyonları yapılmıştır. MD simülasyonlarından elde edilen verilere göre (Şekil 4.4), AChE-**2f** kompleksinin stabilitesi, sadece AChE'nin RMSD değerleri değerlendirilerek karşılaştırılmıştır. AChE için RMSD değeri, 5 ns sonra yaklaşık 0,2 nm'de dengeye ulaşmış ve simülasyon boyunca nispeten stabil kalmıştır. Aksine, AChE-**2f** kompleksi ilk 10 ns boyunca bir denge durumunu korumuş, ardından ani bir değişim meydana gelmiştir. Bu değişim açıkça H bağlarının sayısındaki, 5'ten 1'e düşüşten kaynaklanmıştır, bu da ligandda hızlı bir konformasyonel değişikliğe işaret etmektedir. H bağlarındaki bu dramatik azalma, kompleksin RMSD değerlerinin daha yüksek aralıkta önemli ölçüde dalgalanmasına neden olmuştur. Her iki sistem için RMSF değerleri incelendiğinde, enzimin 90., 260-270. ve 330-335. kalıntıları civarında önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu farklılıklar, hidrojen bağı oluşumunda yer alan veya AChE ile etkileşimde bulunan kalıntıların bu bölgelerde bulunmasıyla açıklanabilir.



**Şekil 4.4.** AChE ve AChE-2f kompleksinin (A), BChE ve AChE-2b kompleksinin (B) 200 ns'lik MD simülasyonu yörünge analizinden elde edilen RMSD, RMSF, H-bağı sayısı ve Rg değerleri.

BChE-**2b** kompleksi için ise, RMSD'deki dalgalanmalar 0,3–0,5 nm arasında yoğunlaşmıştır. Bu kompleksin RMSD ve H bağı grafikleri birlikte incelendiğinde, komplekste oluşan H bağlarının sayısının ve RMSD dalgalanmalarının aynı anda meydana geldiğini belirtmek önemlidir. Simülasyonun ilk 40 ns'sinde gözlemlenen dalgalanmalar, H bağlarındaki değişikliklere atfedilmektedir. 50–160 ns arasında, kompleks bir ila iki hidrojen bağı ile dengeye ulaşmıştır. Son 40 ns'de, H bağlarının sayısı dörde veya beşe yükselmiş, bu da RMSD'deki sonraki dalgalanmalarla aynı zamana denk gelmiştir. Kompleksin RMSF grafiğinde, 60–85. kalıntılar arasındaki ani tepe artışları, bileşik **2f**'nin bu bölgelerle etkileşiminden kaynaklanmıştır. Benzer etkileşimler 300–400. kalıntılar arasında da gözlenmiştir. Bileşik **2b**'nin BChE bağlanma bölgesinin bu amino asitlere yakınlığı şaşırtıcı değildir; aksine, **2b**'nin BChE'ye bağlandığı bölgenin yapısının değişime uğradığını göstermektedir. Her iki enzim ve kompleksleri için jiroskop yarıçapı diyagramları incelendiğinde, AChE-**2f** kompleksinin oluşumunun AChE'de daha kompakt bir yapıya yol açtığı, oysa BChE-**2b** kompleksinin oluşumunun BChE'de önemli bir yapısal değişikliğe neden olmadığı açıkça gözlemlenebilmektedir.

#### 4.7. ADMET Analiz Sonuçları

Bileşik **2b** ve **2f**'nin ilaç benzerliği profilleri, SwissADME aracı kullanılarak çok yönlü bir şekilde değerlendirilmiştir (Tablo 4.4). Analizler, bu moleküllerin fizikokimyasal özelliklerini, lipofilik davranışlarını, suda çözünürlük seviyelerini, farmakokinetik özelliklerini, ilaç benzerliğini ve tıbbi kimya parametrelerini dikkate almaktadır. Bulgular, **2b** ve **2f**'nin ilaç benzerliği kategorisinde sadece bir ihlalinin olduğunu ortaya koymuştur. Her iki molekülün de gastrointestinal sistem yoluyla sınırlı da olsa emilebildiği, ancak kan-beyin bariyerini geçemediği belirlenmiştir.

Toksikolojik değerlendirmeler, olasılık değerleri kullanılarak ADMETlab 3.0 platformu aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. 0,7 ve üzeri eşik değeri dikkate alındığında, **2b**'nin oral yolla herhangi bir toksik etki göstermediği, ciltte duyarlılığa neden olmadığı ve kanserojen potansiyelinin sınırda olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde, **2f** bileşiği için oral toksisite riski bulunmadığı ve kanserojen etkisinin kabul edilebilir düzeyde olduğu tahmin edilmiştir.

**Tablo 4.4. 2b ve 2f bileşiklerinin ADME, farmakokinetik özellikleri ve toksikolojik değerlendirme sonuçları**

| <b>SwissADME</b>                   |                                                         |                                                        |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                                    | <b>2b</b>                                               | <b>2f</b>                                              |
| <b>Lipofiliklik</b>                |                                                         |                                                        |
| Log P <sub>o/w</sub> (iLOGP)       | 2.37                                                    | 2.84                                                   |
| Log P <sub>o/w</sub> (XLOGP3)      | 5.50                                                    | 5.16                                                   |
| Log P <sub>o/w</sub> (WLOGP)       | 5.72                                                    | 5.17                                                   |
| Log P <sub>o/w</sub> (MLOGP)       | 4.15                                                    | 3.46                                                   |
| <b>Suda çözünürlük</b>             |                                                         |                                                        |
| Çözünürlük                         | 2.82e <sup>-04</sup> mg/mL ; 6.08e <sup>-07</sup> mol/L | 4.81e <sup>-04</sup> mg/mL; 1.01e <sup>-06</sup> mol/L |
| Log S                              | -6.22                                                   | -6.00                                                  |
| <b>Farmakokinetikler</b>           |                                                         |                                                        |
| GI absorpsiyon                     | Düşük                                                   | Düşük                                                  |
| BBB geçiş                          | No                                                      | No                                                     |
| CYP1a2 inhibitor                   | No                                                      | No                                                     |
| Log K <sub>p</sub> (deriden geçiş) | -5.23 cm/s                                              | -5.54 cm/s                                             |
| <b>Druglikeness</b>                |                                                         |                                                        |
| Lipinski                           | Yes; 0 violation                                        | Yes; 0 violation                                       |
| Ghose                              | No; 1 violation: WLOGP>5.6                              | Yes                                                    |
| Veber                              | Yes                                                     | Yes                                                    |
| Biyoyararlanım skoru               | 0.55                                                    | 0.55                                                   |
| <b>ADMETlab 3.0</b>                |                                                         |                                                        |
|                                    | <b>2b</b>                                               | <b>2f</b>                                              |
| <b>Toksisite</b>                   |                                                         |                                                        |
| Rat oral                           |                                                         |                                                        |
| Akut toksisite                     | 0.237                                                   | 0.165                                                  |
| Deri duyarlılığı                   | 0.303                                                   | 0.327                                                  |
| Kanserojenlik                      | 0.738                                                   | 0.765                                                  |
| Göz aşındırıcılığı                 | 0.0                                                     | 0.0                                                    |
| Göz tahrişi                        | 0.539                                                   | 0.619                                                  |
| Solunum (toksisitesi)              | 0.212                                                   | 0.281                                                  |
| İlaca bağlı nefrotoksisite         | 0.534                                                   | 0.281                                                  |
| Ototoksisite                       | 0.242                                                   | 0.217                                                  |
| Hematotoksisite                    | 0.305                                                   | 0.334                                                  |
| İlaca bağlı nörotoksisite          | 0.131                                                   | 0.134                                                  |

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1 Sonuçlar

Bu çalışmada, glokom ve AD dâhil olmak üzere belirli hastalıkların tedavisi için potansiyel inhibitör adayları keşfetmek amacıyla hem hCA'ları hem de ChE'leri hedef alan ikili-aktif enzim inhibitörlerini araştırmaya odaklandık. Burada, serebral ve retinal ödem ile bağlantılı hCA I, ödem, glokom, irtifa hastalığı ve epilepsi ile bağlantılı hCA II ve AD ile ilişkili AChE ve BChE'nin ikili inhibitörleri olarak aril sülfonat grupları taşıyan 12 hidrazon türevinin (**2a-f** ve **3a-f**) in vitro ve in silico değerlendirmesini rapor ediyoruz. Sentezlenen bileşiklerin yapıları çeşitli spektroskopik tekniklerle aydınlatılmıştır. hCA I, hCA II, AChE ve BChE, hedeflenen moleküller (**2a-f** ve **3a-f**) tarafından sırasıyla 47,3-317,8, 71,9-376,2, 81,01-832,9 nM ve 134,5-2264 nM arasında değişen IC<sub>50</sub> değerleri ile inhibe edilmiştir. Oysa bu metabolik enzimler, standart inhibitörler AZA ve rivastigmin tarafından sırasıyla 98,5, 66, 894 ve 349 nM arasında değişen IC<sub>50</sub> değerleri ile inhibe edilmiştir. Hedeflenen bileşiklerin inhibisyon verileri, 4-hidroksi benzohidrazit türevlerinin (**2a-f**) bu metabolik enzimleri izoniazid türevlerinden (**3a-f**) genel olarak daha iyi inhibe ettiğini ortaya koymaktadır. Aril sülfonat grubundaki elektron verici ve elektron çekici yapılarının bu enzimlere karşı inhibitör aktiviteleri arasında herhangi bir benzerlik belirlenmemiştir. Test edilen hidrazon türevleri arasında, **2a** ve **2b** bileşikler hCA I'i AZA'ya kıyasla daha iyi inhibe etmiştir. Ancak, seride sadece **2b** bileşiği hCA II'yi AZA'ya yakın bir şekilde inhibe etmiştir. Öte yandan, test edilen tüm bileşikler (**2a-f** ve **3a-f**) rivastigmine kıyasla AChE'yi önemli ölçüde inhibe etmiştir. AChE'ye karşı en aktif inhibitör **2f** bileşiğidir. Test edilen bileşiklerden **2b**, **2c** ve **2f** bileşikler, rivastigmine kıyasla BChE'ye karşı en iyi inhibisyonu göstermiştir. İnhibisyon verilerine göre, **2b** bileşiği hCA I, hCA II ve BChE'ye karşı en iyi çoklu-hedef inhibitör aktivitesini sergilemiştir.

Docking çalışmaları, sentezlenen bileşiklerin çoğunun aktif enzim bölgelerindeki kritik amino asitlerle belirgin etkileşim gösterdiğini ve MD simülasyonlarının komplekslerin biyolojik ortamdaki stabilitesini desteklediğini ortaya koymuştur. Öte yandan, bulgular, **2b** ve **2f** bileşiklerinin ilaç benzerliği kategorisinde sadece bir ihlalinin olduğunu göstermiştir. Her iki molekülün de gastrointestinal sistem yoluyla sınırlı da olsa emilebildiği, ancak kan-beyin bariyerini geçemediği belirlenmiştir. Toksikolojik

değerlendirme sonuçlarına göre, 0,7 ve üzeri eşik değeri dikkate alındığında, **2b**'nin oral yolla herhangi bir toksik etki göstermediği, ciltte duyarlılığa neden olmadığı ve kanserojen potansiyelinin sınırdaki olduğu sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde, **2f** bileşiğinin oral toksisite riski bulunmadığı ve kanserojen etkisinin kabul edilebilir bir düzeyde olduğu tahmin edilmiştir.

## 5.2 Öneriler

Bu çalışmada sentezlenen ve değerlendirilen hidrazon türevleri, çok hedefli inhibitör adayları olarak umut verici sonuçlar ortaya koymuştur. Ancak, moleküllerin biyolojik aktivite ve potansiyel ilaç adayı niteliklerini tam olarak anlamak ve geliştirmek için daha kapsamlı ve derinlemesine çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Öncelikle, bileşiklerin in vitro inhibisyon verileri oldukça dikkat çekicidir, ancak bu moleküllerin hücre içi (in vivo) ortamda nasıl davrandığı ve hedeflerine ne kadar etkili ulaştığı test edilmelidir. Bu amaçla, AD ve glokom gibi hastalıkların hayvan modellerinde farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalar yürütülerek, bileşiklerin biyoyararlanımı, metabolizması ve biyolojik yarı ömrü incelenmelidir. Özellikle kan-beyin bariyerini geçemediği belirlenen bu moleküller için geçişi artıracak nanotaşıyıcı sistemler veya prodrug yaklaşımları araştırılabilir. Bu yöntemler, moleküllerin merkezi sinir sistemindeki hedeflere ulaşmasını sağlayarak terapötik potansiyellerini önemli ölçüde artırabilir.

Ayrıca, yapı-aktivite ilişkilerini daha detaylı incelemek amacıyla, mevcut serideki sübstituentlerin sayısı ve pozisyonu değiştirilerek yeni hidrazon türevleri sentezlenmelidir. Örneğin, aril sülfonat grubuna ek olarak farklı elektronik özelliklere sahip heterosiklik veya büyük aromatik grupların eklenmesi, enzim-ligand etkileşimlerini nasıl etkilediği araştırılabilir. Moleküler docking ve MD simülasyonları ile desteklenen bu sentez çalışmaları, bağlanma bölgelerindeki anahtar amino asitlerle daha güçlü hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimleri kuran moleküllerin tasarlanmasına yardımcı olacaktır.

Toksikolojik değerlendirme sonuçları, **2b** ve **2f** bileşiklerinin nispeten düşük toksisiteye sahip olduğunu gösterse de, bu bulgular daha geniş bir toksisite profili ile doğrulanmalıdır. Bu, sitotoksisite testlerinin yanı sıra farklı organ sistemleri üzerindeki potansiyel yan etkilerin incelenmesini de kapsamalıdır. Kanserogen potansiyellerinin sınırdaki olması, bu moleküllerin ileri aşama klinik çalışmalarına geçmeden önce daha

detaylı genotoksisite ve karsinojenite testlerinden geçmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Son olarak, çok hedefli inhibitörlerin potansiyel sinerjistik etkilerini anlamak adına, bu bileşiklerin diğer AD veya glokom ilaçları ile kombinasyon halinde etkinlikleri incelenmelidir. Bu tür kombinasyonlar, tek başına kullanılan ilaçlara göre daha düşük dozlarda bile daha yüksek terapötik etkinlik sağlayabilir. Mevcut spektroskopik veriler yeterli olsa da, sentezlenen bileşiklerin kristal yapıları elde edilerek X-ışını kristalografisi ile kesin moleküler geometrileri belirlenebilir. Bu veriler, hesaplamalı kimya modellerinin doğruluğunu artıracak ve ilaç tasarımını daha rasyonel bir temele oturtacaktır. Tüm bu önerilen çalışmalar, sentezlenen hidrazon türevlerinin biyolojik potansiyelini tam olarak ortaya koyacak ve gelecekteki ilaç geliştirme çabalarına önemli bir katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25.
- Ahmad, H., Ahmad, S., Ali, M., Latif, A., Shah, S. A. A., Naz, H., Rahman, N., Shaheen, F., Wadood, A., Khan, H. U., & Ahmad, M. (2018). Norditerpenoid alkaloids of *Delphinium denudatum* as cholinesterase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 78, 427–435.
- Akıncıoğlu, H., & Gülçin, İ. (2020). Potent acetylcholinesterase inhibitors: Potential drugs for alzheimer's disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(8), 703–715.
- Akış, B., Çakmak, R., & Şentürk, M. (2024). New sulfonate ester-linked fluorinated hydrazone derivatives as multitarget carbonic anhydrase and cholinesterase inhibitors. *Chemistry & Biodiversity*, 21(12), e202401849. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202401849>
- Alaşalvar, C., Öztürk, N., Abdel-Aziz, A. A.-M., Gökce, H., El-Azab, A. S., El-Gendy, M. A., & Sert, Y. (2018). Molecular structure, Hirshfeld surface analysis, spectroscopic (FT-IR, Laser-Raman, UV-vis. and NMR), HOMO-LUMO and NBO investigations on N-(12-amino-9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracen-11-yl)-4-methylbenzenesulfonamide. *Journal of Molecular Structure*, 1171, 696–705.
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T., & De Simone, G. (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chemical Reviews*, 112(8), 4421–4468. <https://doi.org/10.1021/cr200176r>
- Arikan Ölmez, N., Noma, S. A. A., Kaya, Y., & Osman, B. (2024). Synthesis, enzyme inhibition and molecular docking studies of novel 1,2,4-oxadiazole thioether derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 33(11), 2150–2168.
- Aslan, E. K., Krishna, V. S., Armaković, S. J., Armaković, S., Şahin, O., Tønjum, T., & Gündüz, M. G. (2022). Linking azoles to isoniazid via hydrazone bridge: Synthesis, crystal structure determination, antitubercular evaluation and computational studies. *Journal of Molecular Liquids*, 354, 118873.
- Avdović, E. H., Milenković, D., Dimitrić-Marković, J. M., Vuković, N., Trifunović, S. R., & Marković, Z. (2017). Structural, spectral and NBO analysis of 3-(1-(3-hydroxypropylamino)ethylidene)chroman-2,4-dione. *Journal of Molecular Structure*, 1147, 69–75.,
- Başaran, E. (2021). Some aryl sulfonyl ester-based heterocyclic schiff bases: Synthesis, structure elucidation and antioxidant activity. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11, 2967–2981.

- Başaran, E., Çakmak, R., Akkoc, S., & Kaya, S. (2022a). Combined experimental and theoretical analyses on design, synthesis, characterization, and in vitro cytotoxic activity evaluation of some novel imino derivatives containing pyrazolone ring. *Journal of Molecular Structure*, 1265, 133427.
- Başaran, E., Çakmak, R., Çınar, E., & Çevik, Ö. (2022b). Some heterocyclic hydrazone compounds: Synthesis, spectral characterization and anticancer activity study. *Cumhuriyet Science Journal*, 43(3), 437–445.
- Başaran, E., Çakmak, R., Şentürk, M., & Taskin-Tok, T. (2022c). Biological activity and molecular docking studies of some N-phenylsulfonamides against cholinesterases and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Molecular Recognition*, 35(10), e2982.
- Başaran, E., Haşimi, N., Çakmak, R., & Çınar, E. (2022d). Synthesis, structural characterization, and biological evaluation of some hydrazone compounds as potential antioxidant agents. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 48(1), 143–152.
- Başaran, E. (2023). Schiff base derivatives based on ampyrone as promising acetylcholinesterase inhibitors: Synthesis, spectral characterization, biological activity, and swissADME predictions. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 49(1), 114–126.
- Başaran, E., Tür, G., Akkoc, S., & Taskin-Tok, T. (2024). Design, synthesis, and in silico and in vitro cytotoxic activities of novel isoniazid–hydrazone analogues linked to fluorinated sulfonate esters. *ACS Omega*, 9(15), 17551–17562.
- Becke, A. D. (1988). Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A*, 38(6), 3098–3100.
- Becke, A. D., & Johnson, E. R. (2005). A density-functional model of the dispersion interaction. *The Journal of Chemical Physics*, 123(15), 154101.
- Belkheiri, N., Bouguerne, B., Bedos-Belval, F., Duran, H., Bernis, C., Salvayre, R., & Baltas, M. (2010). Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(7), 3019–3026.
- Bertin, N., Bulatov, V. V., & Zhou, F. (2024). Learning dislocation dynamics mobility laws from large-scale MD simulations. *npj Computational Materials*, 10(1), 192.
- Bosak, A., Opsenica, D. M., Šinko, G., Zlatař, M., & Kovarik, Z. (2019). Structural aspects of 4-aminoquinolines as reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions*, 308, 101–109.
- Bourne, Y., Radic, Z., Sulzenbacher, G., Kim, E., Taylor, P., & Marchot, P. (2006). Substrate and product trafficking through the active center gorge of acetylcholinesterase analyzed by crystallography and equilibrium binding. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 29256–29267.

- Bozbey, İ., Özdemir, Z., Uslu, H., Özçelik, A. B., Şenol Deniz, F. S., Erdoğan Orhan, İ., & Ece, A. (2020). A series of new hydrazone derivatives: Synthesis, molecular docking and anticholinesterase activity studies. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(11), 1042–1060. <https://doi.org/10.2174/1389557519666191010154444>
- Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, 126(1), 014101.
- Çakmak, R. (2022a). Synthesis and in vitro human carbonic anhydrase i and ii inhibition properties of some novel hydrazone compounds containing an aryl sulfonate moiety. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 15, 659–669.
- Çakmak, R., Başaran, E., Kaya, S., & Erkan, S. (2022b). Synthesis, spectral characterization, chemical reactivity and anticancer behaviors of some novel hydrazone derivatives: Experimental and theoretical insights. *Journal of Molecular Structure*, 1253, 132224.
- Çakmak, R., Başaran, E., & Şentürk, M. (2022c). Synthesis, characterization, and biological evaluation of some novel schiff bases as potential metabolic enzyme inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, 355(4), 2100430.
- Çakmak, R., Ay, B., Çınar, E., Başaran, E., Akkoç, S., Boğa, M., & Taş, E. (2023). Synthesis, spectroscopic, thermal analysis and in vitro cytotoxicity, anticholinesterase and antioxidant activities of new Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), and Ru(III) complexes of pyrazolone-based Schiff base ligand. *Journal of Molecular Structure*, 1292, 136225.
- Çakmak, R., Başaran, E., Şahin, K., Şentürk, M., & Durdağı, S. (2024a). Synthesis, enzyme inhibition, and molecular modeling studies of novel hydrazone-bearing sulfonamides as multitarget agents for inhibition of acetylcholinesterase and carbonic anhydrase enzymes. *ACS Omega*, 9(18), 20030–20043.
- Çakmak, R., Çınar, E., Başaran, E., Tuneğ, G., İzgi, S., & Boğa, M. (2024b). Synthesis of novel N-Acylhydrazones derived from 3,5-dinitrobenzohydrazide and evaluation of their anticholinesterase and antioxidant activities. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 50(1), 76–85.
- Çakmak, R., Başaran, E., Ercan, S., Boğa, M., Çınar, E., & Topal, G. (2025a). Synthesis of new fluorinated sulfonates and their schiff bases as anti-alzheimer drug candidates: An in vitro-in silico study. *Journal of Molecular Structure*, 1329, 141474.
- Çakmak, R., Başaran, E., Erdoğan, Ö., Mali, S. N., Köprü, S., Yasin, H., Gurav, S. S., & Topal, G. (2025b). Design, synthesis, structural characterization, in vitro anticancer activity, and in silico studies of some new hydroxylated and fluorinated-substituted hydrazone derivatives. *Chemical Physics Impact*, 10, 100829.
- Çakmak, R., Başaran, E., Türkmenoğlu, B., & Şentürk, M. (2025c). Design, synthesis of antipyrine-based schiff bases and investigation of their cholinesterase and carbonic

- anhydrase activities by in vitro and in silico approaches. *Journal of Molecular Structure*, 1322, 140599.
- Chiaramonte, N., Bua, S., Ferraroni, M., Nocentini, A., Bonardi, A., Bartolucci, G., Durante, M., Lucarini, L., Chiapponi, D., Dei, S., Manetti, D., Teodori, E., Gratteri, P., Masini, E., Supuran, C. T., & Romanelli, M. N. (2018). 2-Benzylpiperazine: A new scaffold for potent human carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis, enzyme inhibition, enantioselectivity, computational and crystallographic studies and in vivo activity for a new class of intraocular pressure lowering agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 151, 363–375.
- Çınar, E., Boğa, M., Topal, G., & Çakmak, R. (2022). Some novel schiff base derivatives as promising cholinesterase inhibitors with antioxidant activity against alzheimer's disease: Synthesis, characterization and biological evaluation. *Middle East Journal of Science*, 8(2), 138–147.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- Dulsat, J., López-Nieto, B., Estrada-Tejedor, R., & Borrell, J. I. (2023). Evaluation of free online ADMET tools for academic or small biotech environments. *Molecules*, 28(2), 776.
- El Bahnasawy, R., El Shereafy, E., & Kashar, T. (1993). Thermal and temperature dependence of electrical conductivity studies on Zn, Cd and Hg hydrazone complexes. *Journal of Thermal Analysis*, 39, 65–74.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95.
- Ergan, E., Çakmak, R., Başaran, E., Mali, S. N., Akkoc, S., & Annadurai, S. (2024). Molecular hybrid design, synthesis, in vitro cytotoxicity, in silico ADME and molecular docking studies of new benzoate ester-linked arylsulfonyl hydrazones. *Molecules*, 29(15), 3478.
- Esmer, Y. İ., Çınar, E., & Başaran, E. (2022). Design, docking, synthesis and biological evaluation of novel nicotinohydrazone derivatives as potential butyrylcholinesterase enzyme inhibitor. *ChemistrySelect*, 7(33), e202202771.
- Fang, L., Pan, Y., Muzyka, J. L., & Zhan, C. G. (2011). Active site gating and substrate specificity of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: Insights from molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(27), 8797–8805.
- Feng, L., Yang, H., Cui, D., Chen, D., & Li, G. (2018). Experimental and theoretical investigation on corrosion inhibitive properties of steel rebar by a newly designed environmentally friendly inhibitor formula. *RSC Advances*, 8, 6507–6514.

- Franklin, M. C., Rudolph, M. J., Ginter, C., Cassidy, M. S., & Cheung, J. (2016). Structures of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase reveal perturbations of the acyl loop and the dimer interface. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 84, 1246–1256.
- Fu, L., Shi, S., Yi, J., Wang, N., He, Y., Wu, Z., Peng, J., Deng, Y., Wang, W., Wu, C., Lyu, A., Zeng, X., Zhao, W., Hou, T., & Cao, D. (2024). ADMETLab 3.0: An updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W422–W431.
- Gajendra, K., Pratap, G. K., Poornima, D. V., Shantaram, M., & Ranjita, G. (2024). Natural acetylcholinesterase inhibitors: A multi-targeted therapeutic potential in alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 11, 100154.
- Gao, H., Jiang, Y., Zhan, J., & Sun, Y. (2021). Pharmacophore-based drug design of AChE and BChE dual inhibitors as potential anti-alzheimer's disease agents. *Bioorganic Chemistry*, 114, 105149.
- Geerlings, P., De Proft, F., & Langenaeker, W. (2003). Conceptual density functional theory. *Chemical Reviews*, 103(5), 1793–1874. <https://doi.org/10.1021/cr990029p>
- Greig, N. H., Utsuki, T., Ingram, D. K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., Yu, Q. S., Mamczarz, J., Holloway, H. W., Giordano, T., Chen, D., Furukawa, K., Sambamurti, K., Brossi, A., & Lahiri, D. K. (2002). Butyrylcholinesterase: An important new target in alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics*, 14(Suppl. 1), 77–91. <https://doi.org/10.1017/s1041610203008676>
- Grimme, S., Antony, J., Ehrlich, S., & Krieg, H. (2010). A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *The Journal of Chemical Physics*, 132(15), 154104.
- Guzior, N., Wieckowska, A., Panek, D., & Malawska, B. (2015). Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry*, 22(3), 373–404. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141106122628>
- Güngör, S. A. (2023). Synthesis, in silico and in vitro studies of hydrazide-hydrazone imine derivatives as potential cholinesterase inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design*, 102(4), 676–691.
- Güzel, Ö., Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., Salman, A., & Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrase inhibitors. Interaction of 2-(hydrazinocarbonyl)-3-phenyl-1H-indole-5-sulfonamide with 12 mammalian isoforms: Kinetic and X-ray crystallographic studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(1), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.110>

- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4, 17.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhatsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00001-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00001-6)
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
- Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrase inhibitors: Interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I–XIV). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(5), 1583–1587.
- Işık, S., Vullo, D., Durdagi, S., Ekinici, D., Şentürk, M., Çetin, A., Şentürk, E., & Supuran, C. T. (2015). Interaction of carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with some pyridine and phenol hydrazinecarbothioamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(23), 5636–5642.
- Johnson, E. R., & Becke, A. D. (2006). Van der Waals interactions from the exchange hole dipole moment: Application to bio-organic benchmark systems. *Chemical Physics Letters*, 432(4–6), 600–603.
- Johnson, G., & Moore, S. W. (2006). The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: Structure, functions and potential role in rational drug design. *Current Pharmaceutical Design*, 12(2), 217–225.
- Kamalı, A., Çakmak, R., & Boğa, M. (2022). Anticholinesterase and antioxidant activities of novel heterocyclic Schiff base derivatives containing an aryl sulfonate moiety. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 69, 731–740.
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 25. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
- Kaplancikli, Z. A., Altintop, M. D., Ozdemir, A., Turan-Zitouni, G., Goger, G., & Demirci, F. (2014). Synthesis and in vitro evaluation of some hydrazone derivatives as potential antibacterial agents. *Letters in Drug Design & Discovery*, 11(3), 355–362.

- Kerns, E. H., & Di, L. (2008). *Drug-like properties: Concepts, structure design and methods: From ADME to toxicity optimization*. Academic Press.
- Keskin, S., Doğan, Ş. D., Gündüz, M. G., Aleksic, I., Vojnovic, S., Lazic, J., & Nikodinovic-Runic, J. (2022). Indole-based hydrazone derivatives: Synthesis, cytotoxicity assessment, and molecular modeling studies. *Journal of Molecular Structure*, 1270, 133936.
- Kohn, W., & Sham, L. J. (1965). Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review*, 140(4A), A1133–A1138.
- Koopmans, T. (1934). Über die zuordnung von wellenfunktionen und eigenwerten zu den einzelnen elektronen eines atoms. *Physica*, 1(1–6), 104–113.
- Korkmaz, A., Kurtay, G., Kaya, E., & Bursal, E. (2023). Design, synthesis, spectroscopic characterizations, in vitro pancreatic lipase as well as tyrosinase inhibition evaluations and in silico analysis of novel aryl sulfonate-naphthalene hybrids. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(15), 7128–7143.
- Kurban, M. G., Çakmak, R., Başaran, E., Türkmenoğlu, B., & Şentürk, M. (2024). Synthesis of new sulfonamide derivatives: Investigation of their interactions with carbonic anhydrase and cholinesterase enzymes by in vitro and in silico evaluations. *Journal of Molecular Structure*, 1314, 138798.
- Kuzu, B., Alagoz, M. A., Demir, Y., Gulcin, I., Burmaoglu, S., & Algul, O. (2024). Structure-based inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with 2-Aryl-6-carboxamide benzoxazole derivatives: Synthesis, enzymatic assay, and in silico studies. *Molecular Diversity*, 29, 671–693.
- Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 25(1), 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>
- Lindskog, S. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics*, 74(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(96\)00198-2](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(96)00198-2)
- Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- Marucci, G., Buccioni, M., Dal Ben, D., Lambertucci, C., Volpini, R., & Amenta, F. (2021). Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 190, 108352.
- McDonald, P. C., Winum, J. Y., Supuran, C. T., & Dedhar, S. (2012). Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget*, 3(1), 84–97. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.422>
- Meanwell, N. A. (2011). Improving drug candidates by design: A focus on physicochemical properties as a means of improving compound disposition and

- safety. *Chemical Research in Toxicology*, 24(10), 1420–1456. <https://doi.org/10.1021/tx200211v>
- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Meunier, B. (2008). Hybrid molecules with a dual mode of action: Dream or reality? *Accounts of Chemical Research*, 41(1), 69–77. <https://doi.org/10.1021/ar7000843>
- Neese, F., Wennmohs, F., Becker, U., & Riplinger, C. (2020). The ORCA quantum chemistry program package. *The Journal of Chemical Physics*, 152(22), 224108.
- Ngamelue, M. N., Homma, K., Lockridge, O., & Asojo, O. A. (2007). Crystallization and X-Ray structure of full length recombinant human butyrylcholinesterase. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 63, 723–727.
- Nocentini, A., & Supuran, C. T. (2019). Carbonic anhydrase inhibitors as antitumor/antimetastatic agents: A patent review (2008–2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(10), 729–740. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1508453>
- Obaid, R. J., Naeem, N., Mughal, E. U., Al-Rooqi, M. M., Sadiq, A., Jassas, R. S., Moussa, Z., & Ahmed, S. A. (2022). Inhibitory potential of nitrogen, oxygen and sulfur containing heterocyclic scaffolds against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *RSC Advances*, 12(31), 19764–19778.
- Özil, M., Balaydın, H. T., Dogan, B., Şentürk, M., & Durdagi, S. (2024). Efficient, rapid, and high-yield synthesis of aryl Schiff base derivatives and their in vitro and in silico inhibition studies of hCA I, hCA II, AChE, and BuChE. *Archiv der Pharmazie*, 357(7), 2300266.
- Öztekin, A., & Stellenboom, N. (2024). Synthesis of flavonoid/sulfonamide hybrid molecules as potential inhibitors of cholinesterases: In vitro, molecular docking, molecular dynamic and dft studies. *ChemistrySelect*, 9, e202403212.
- Parr, R. G., Szentpály, L. v., & Liu, S. (1999). Electrophilicity index. *Journal of the American Chemical Society*, 121(9), 1922–1924.
- Popiołek, Ł. (2017). Hydrazide–hydrazones as potential antimicrobial agents: Overview of the literature since 2010. *Medicinal Chemistry Research*, 26(2), 287–301. <https://doi.org/10.1007/s00044-016-1756-y>
- Poslu, A. H., Aslan, Ş. E., Koz, G., Senturk, E., Koz, Ö., Senturk, M., Nalbantsoy, A., Öztekin, A., & Ekinici, D. (2024). Synthesis and biological evaluation of novel salicylidene uracils: Cytotoxic activity on human cancer cell lines and inhibitory action on enzymatic activity. *Archiv der Pharmazie*, 357(1), 2300374.

- Provensi, G., Carta, F., Nocentini, A., Supuran, C. T., Casamenti, F., & Passani, M. B. (2019). A new kid on the block? Carbonic anhydrases as possible new targets in alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4724. <https://doi.org/10.3390/ijms20194724>
- Räisänen, S. R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Härkönen, P. L., & Väänänen, H. K. (1999). Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *The FASEB Journal*, 13(3), 513–522. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.3.513>
- Ramakrishnan, A., Chourasiyaa, S. S., & Bharatam, P. V. (2015). Azine or hydrazone? The dilemma in amidinohydrazones. *RSC Advances*, 69, 55938–55946.
- Rodríguez-Martínez, A., Nelen, J., Carmena-Bargueño, M., Martínez-Cortés, C., Luque, I., & Pérez-Sánchez, H. (2024). Enhancing MD simulations: ASGARD's automated analysis for GROMACS. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–13.
- Rollas, S., & Küçükgüzel, Ş. G. (2007). Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules*, 12(8), 1910–1939. <https://doi.org/10.3390/12081910>
- Said, M. F., George, R. F., Petreni, A., Supuran, C. T., & Mohamed, N. M. (2022). Synthesis, molecular modelling and QSAR study of new N- phenylacetamide-2-oxoindole benzensulfonamide conjugates as carbonic anhydrase inhibitors with antiproliferative activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 701–714.
- Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*, 20(2), 1479–1487. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374>
- Singh, P., Arifuddin, M., Supuran, C. T., & Nerella, S. G. (2025). Carbonic anhydrase inhibitors: Structural insights and therapeutic potential. *Bioorganic Chemistry*, 156, 108224.
- Singh, Y. P., Prasad, S., & Kumar, H. (2024). A comprehensive analysis on galantamine based hybrids for the management of alzheimer's disease. *Chemical Biology & Drug Design*, 104(5), e70004.
- Sly, W. S., & Hu, P. Y. (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 375–401. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.002111>
- Solesio, M. E., Peixoto, P. M., Debure, L., Madamba, S. M., de Leon, M. J., Wisniewski, T., Pavlov, E. V., & Fossati, S. (2018). Carbonic anhydrase inhibition selectively prevents amyloid  $\beta$  neurovascular mitochondrial toxicity. *Aging Cell*, 17(4), e12787. <https://doi.org/10.1111/acel.12787>
- Sun, T., Zhen, T., Harakandi, C. H., Wang, L., Guo, H., Chen, Y., & Sun, H. (2024). New insights into butyrylcholinesterase: Pharmaceutical applications, selective

- inhibitors and multitarget-directed ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 275, 116569.
- Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), 168–181. <https://doi.org/10.1038/nrd2467>
- Supuran, C. T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(12), 3467–3474. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.009>
- Supuran, C. T. (2012). Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 17(1), 11–15. <https://doi.org/10.1517/14728214.2012.664132>
- Supuran, C. T. (2016). Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochemical Journal*, 473(14), 2023–2032. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160115>
- Şahin, İ., Bingöl, Z., Onur, S., Güngör, S. A., Köse, M., Gülçin, İ., & Tümer, F. (2022). Enzyme inhibition properties and molecular docking studies of 4-sulfonate containing aryl  $\alpha$ -hydroxyphosphonates based hybrid molecules. *Chemistry & Biodiversity*, 19(2), e202100787. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100787>
- Timmins, G. S., & Deretic, V. (2006). Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1220–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05467.x>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461.
- Tutuş, B., Kaya, A. Z., Baz, Y., Evren, A. E., Sağlık Özkan, B. N., & Yurttaş, L. (2024). Synthesis of new N-(5,6-methylenedioxybenzothiazole-2-yl)-2-[(substituted)thio/piperazine]acetamide/propanamide derivatives and evaluation of their AChE, BChE, and BACE-1 inhibitory activities. *Drug Development Research*, 85(4), e22214.
- Ulrich, J. D., & Holtzman, D. M. (2016). TREM2 function in alzheimer's disease and neurodegeneration. *ACS Chemical Neuroscience*, 7(4), 420–427.
- Vannozzi, G., Vullo, D., Angeli, A., Ferraroni, M., Combs, J., Lomelino, C., Andring, J., McKenna, R., Bartolucci, G., Pallecchi, M., Lucarini, L., Sgambellone, S., Masini, E., Carta, F., & Supuran, C. T. (2022). One-pot procedure for the synthesis of asymmetric substituted ureido benzene sulfonamides as effective inhibitors of carbonic anhydrase enzymes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65, 824–838.
- Viegas-Junior, C., Danuello, A., da Silva Bolzani, V., Barreiro, E. J., & Fraga, C. A. M. (2007). Molecular hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, 14(17), 1829–1852. <https://doi.org/10.2174/092986707781058805>

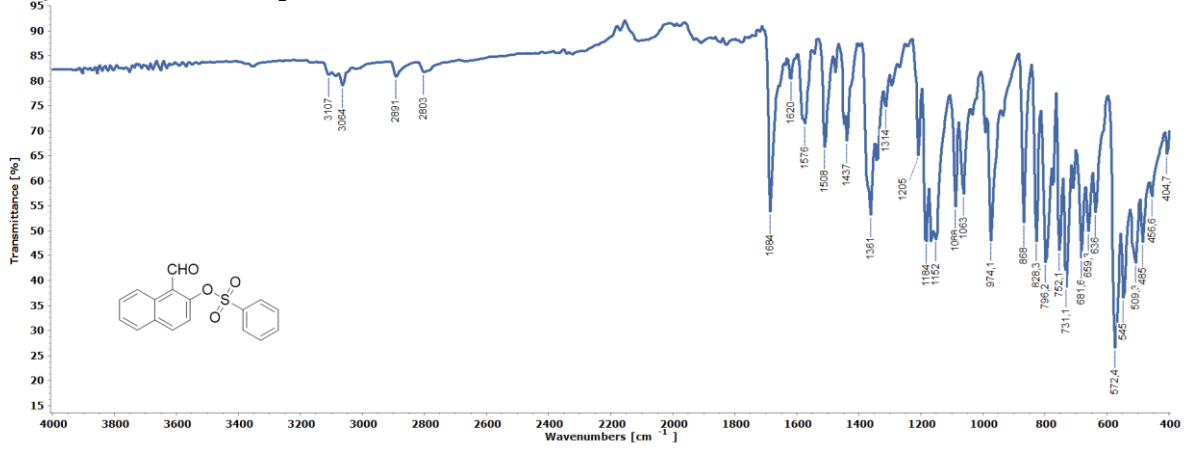
- Yılmaz, A. D., Coban, T., & Suzen, S. (2012). Synthesis and antioxidant activity evaluations of melatonin-based analogue indole-hydrazide/hydrazone derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(3), 428–436. <https://doi.org/10.3109/14756366.2011.594048>
- Zilbeyaz, K., Öztekin, A., & Kutluana, E. G. (2021). Design and synthesis of garlic-related unsymmetrical thiosulfonates as potential alzheimer's disease therapeutics: In vitro and in silico study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 40, 116194.
- Zoete, V., Cuendet, M. A., Grosdidier, A., & Michielin, O. (2011). SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 32(10), 2359–2368.



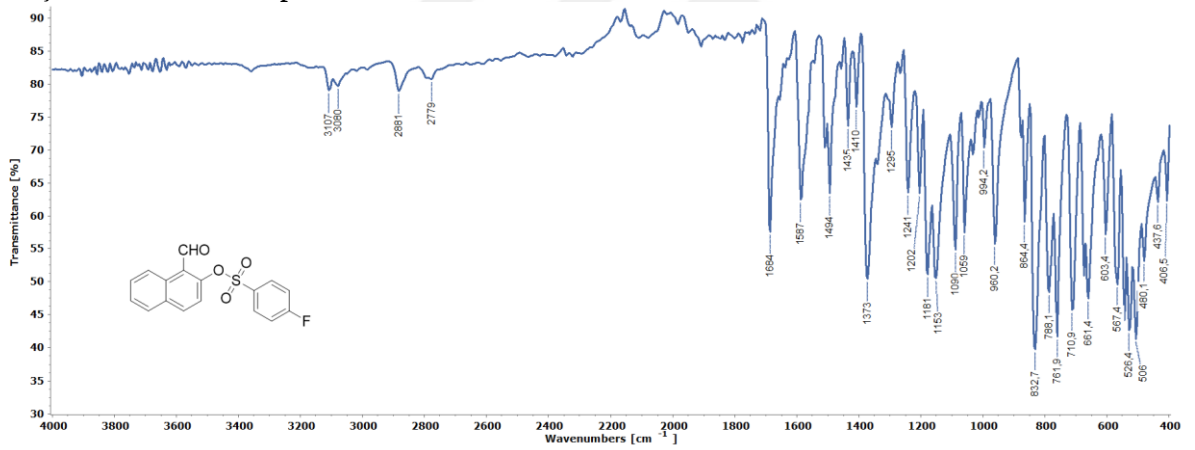
## EKLER

### EK-1 Spektrumlar

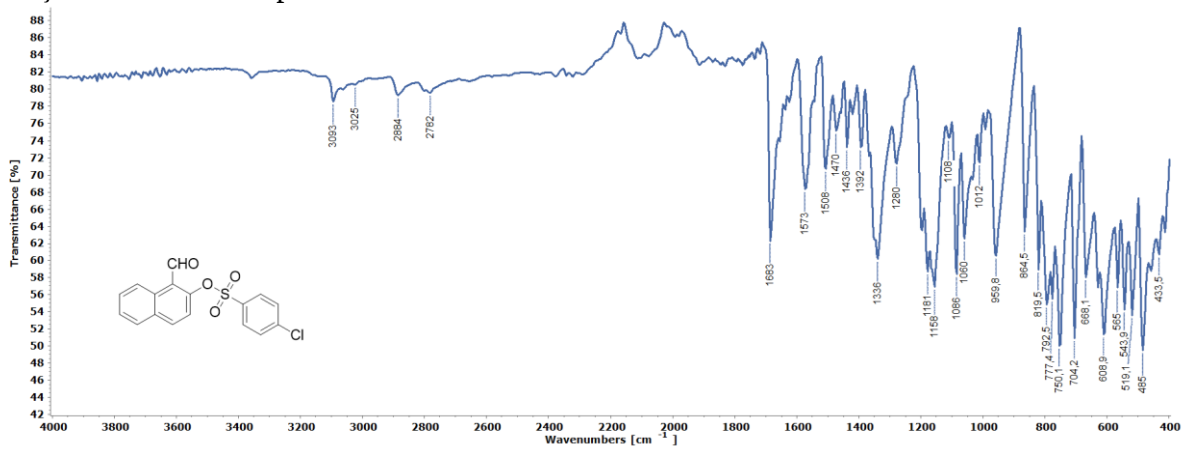
Bileşik 1a'nın FT-IR spektrumu



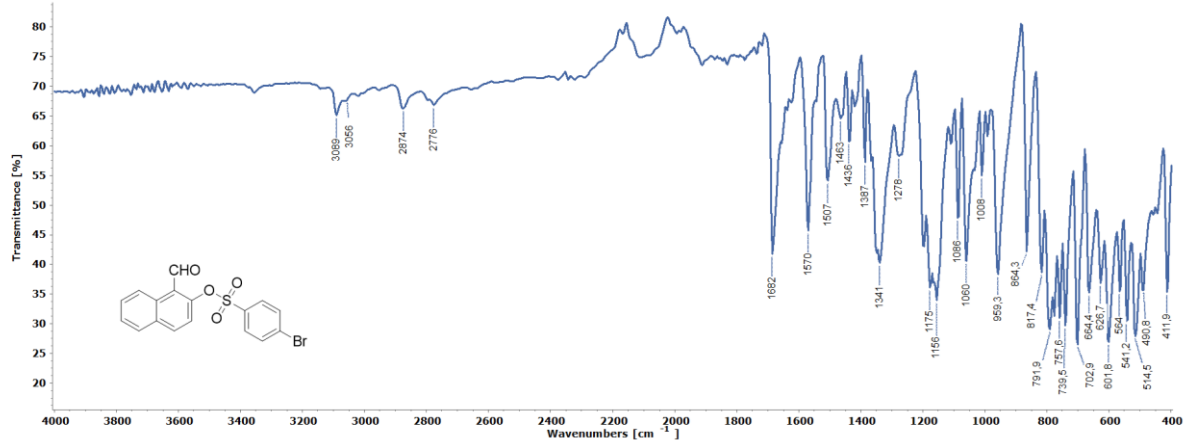
Bileşik 1b'nin FT-IR spektrumu



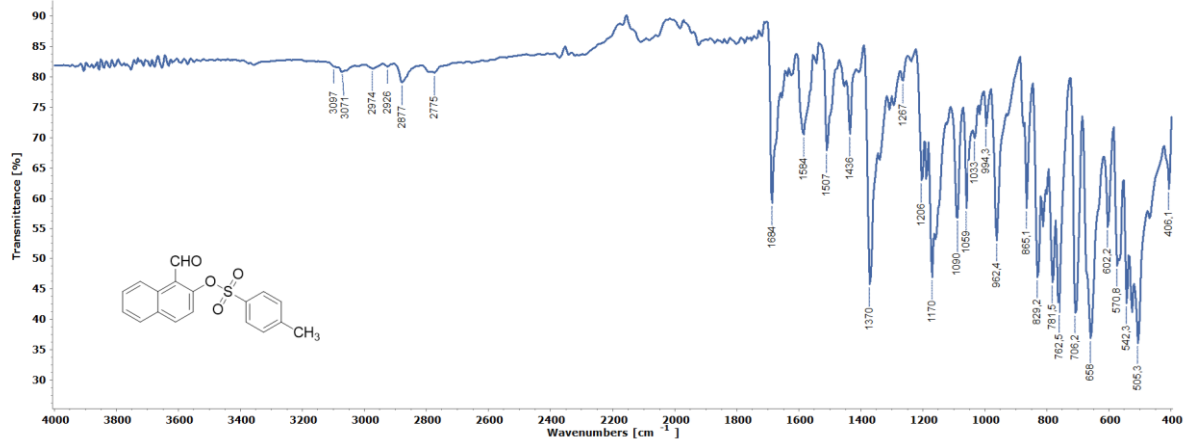
Bileşik 1c'nin FT-IR spektrumu



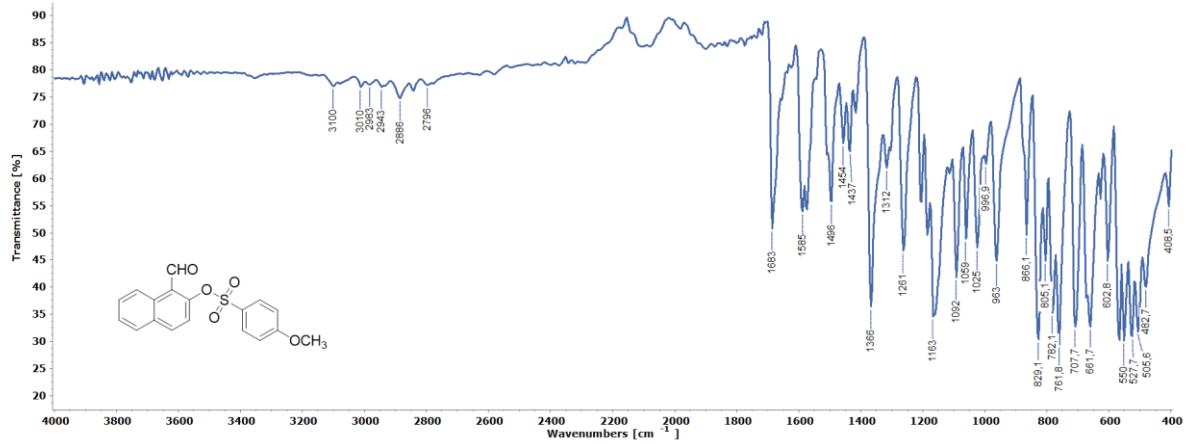
Bileşik **1d**'nin FT-IR spektrumu



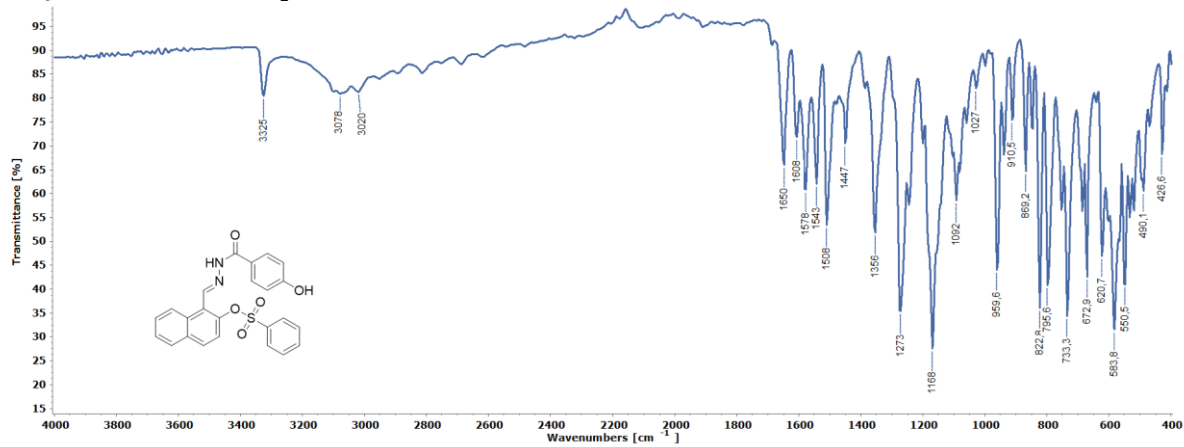
Bileşik **1e**'nin FT-IR spektrumu



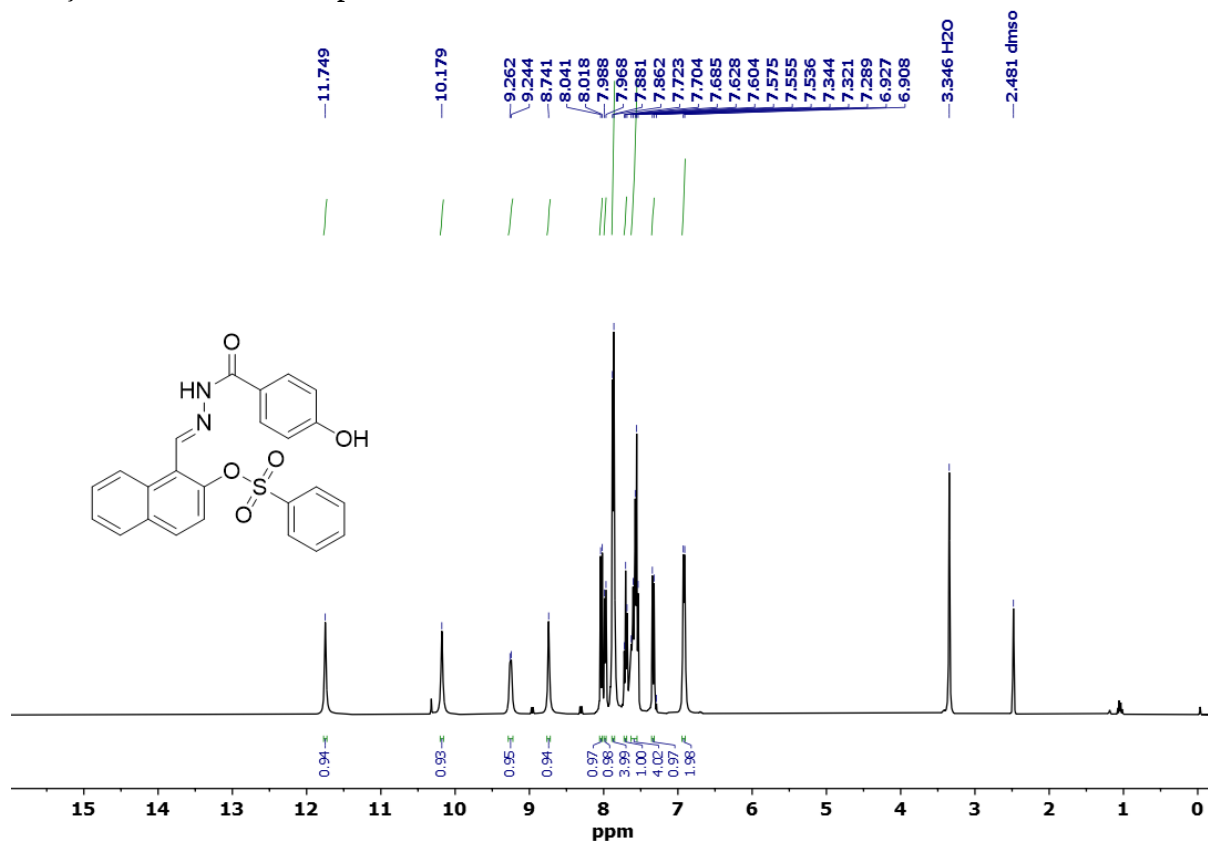
Bileşik **1f**'nin FT-IR spektrumu



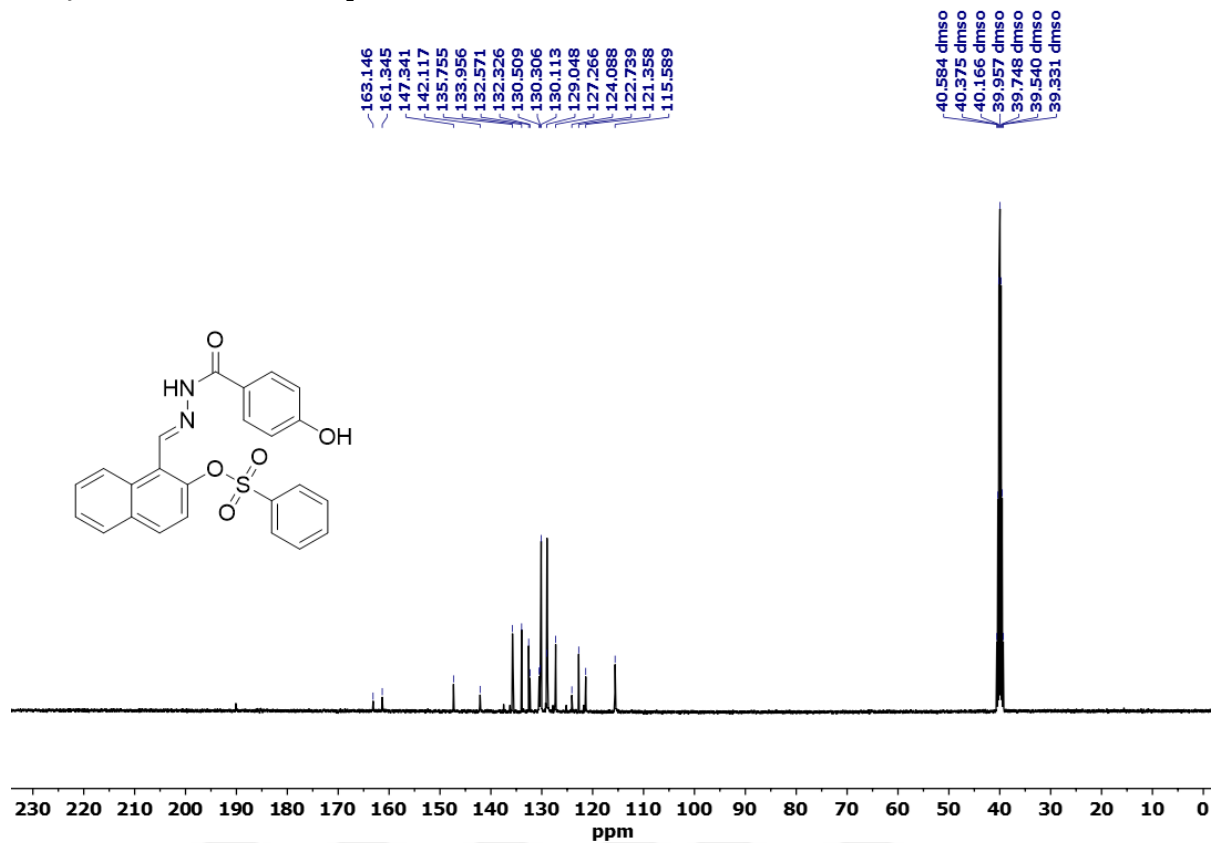
Bileşik 2a'nın FT-IR spektrumu



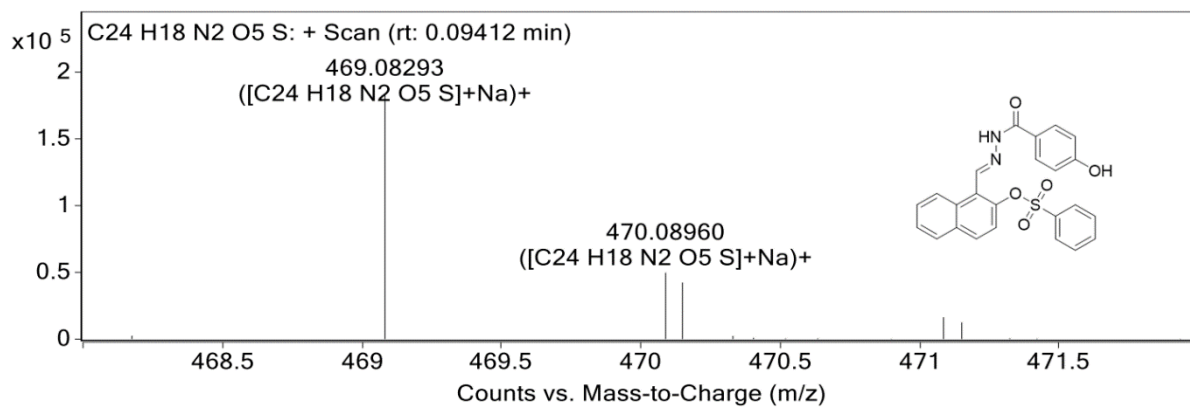
Bileşik 2a'nın <sup>1</sup>H NMR spektrumu



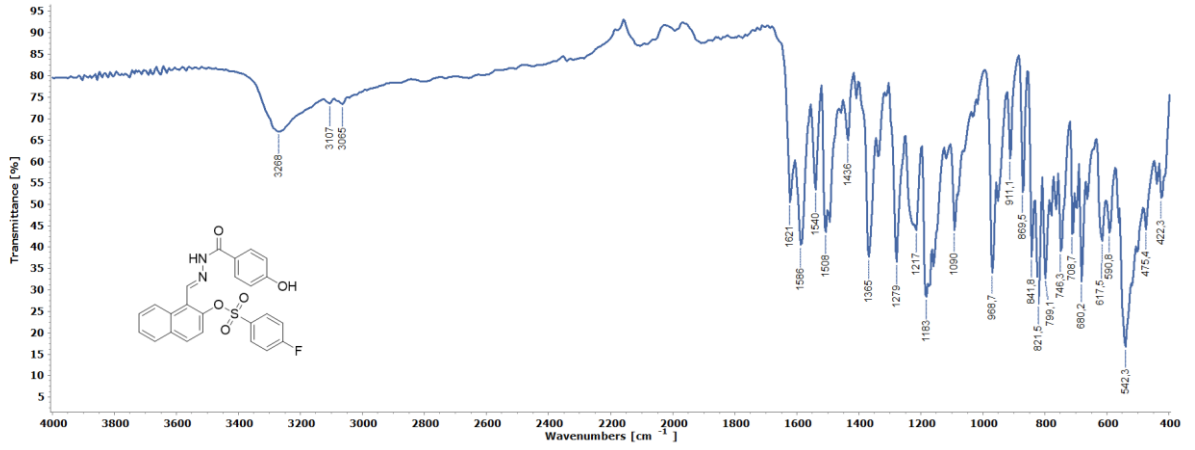
# Bileşik 2a'nın <sup>13</sup>C NMR spektrumu



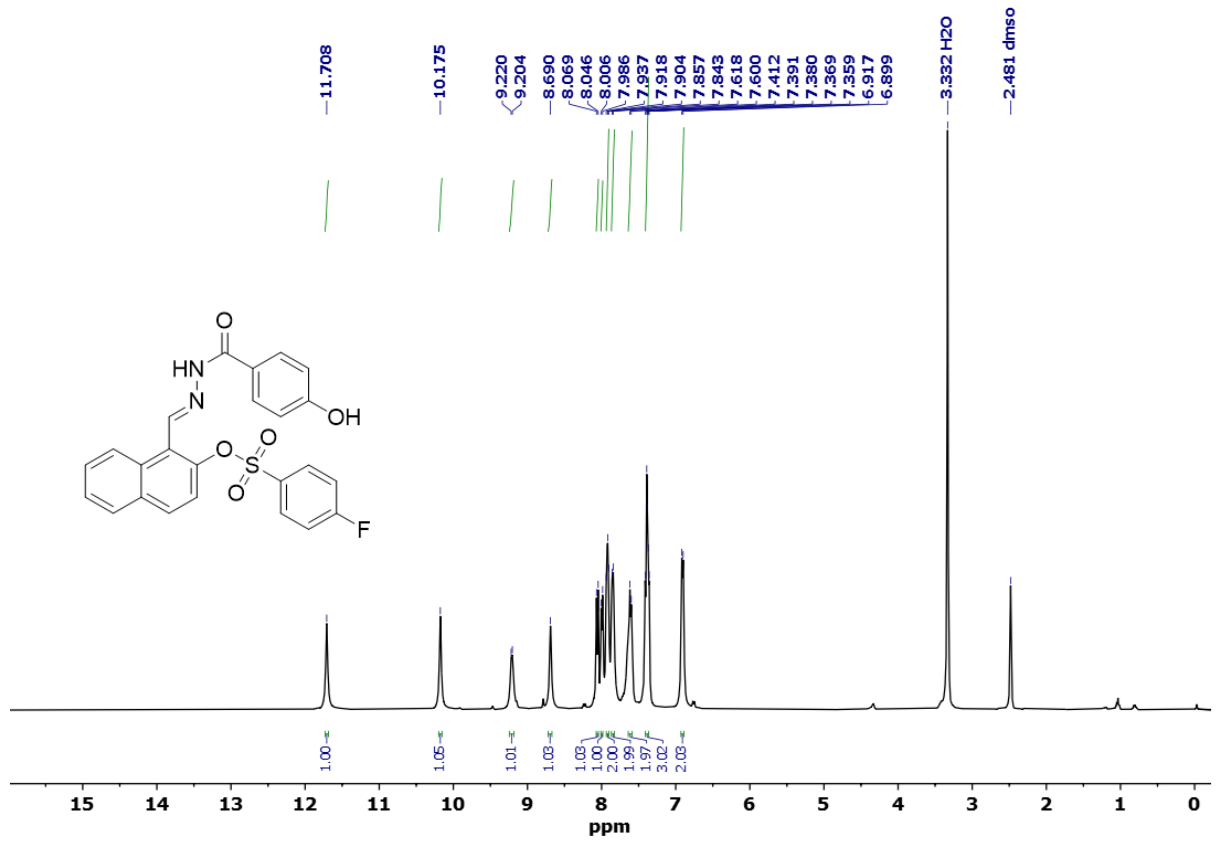
# Bileşik 2a'nın MS spektrumu



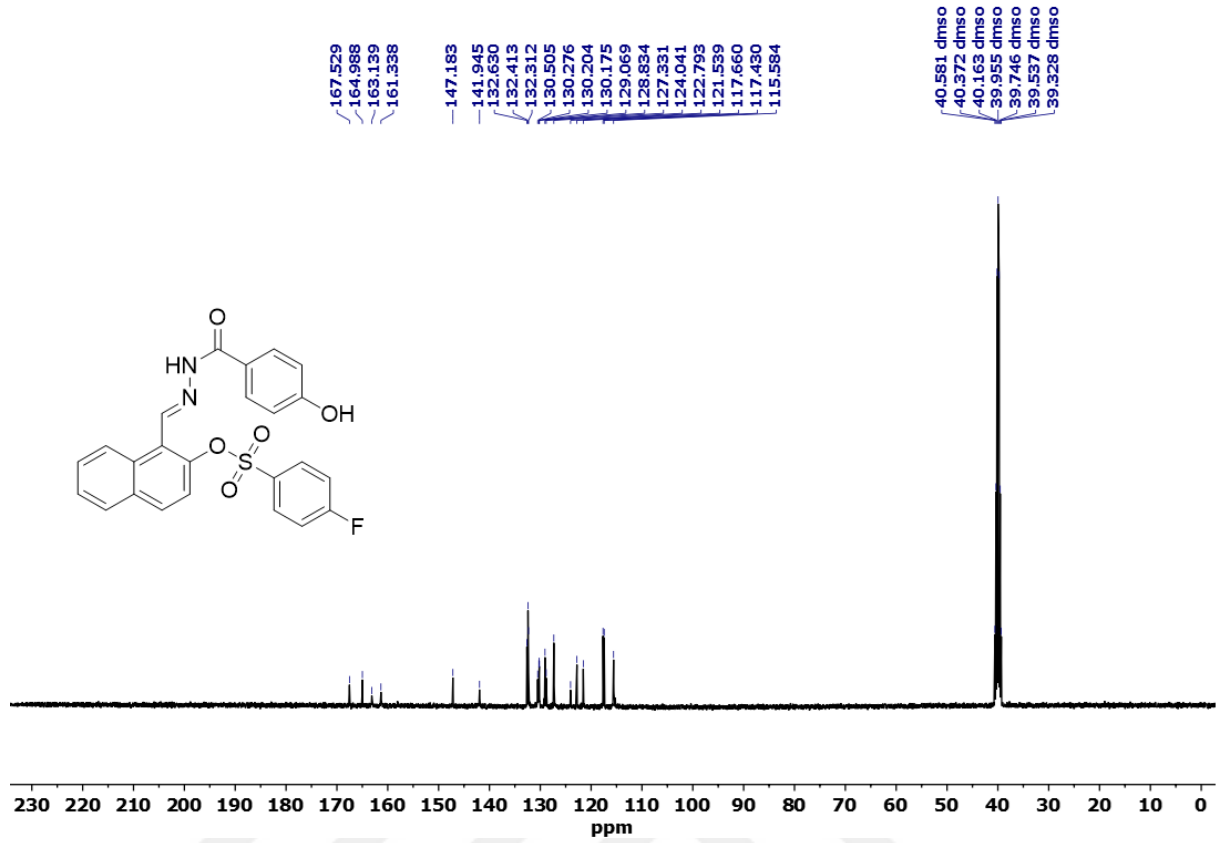
Bileşik 2b'nin FT-IR spektrumu



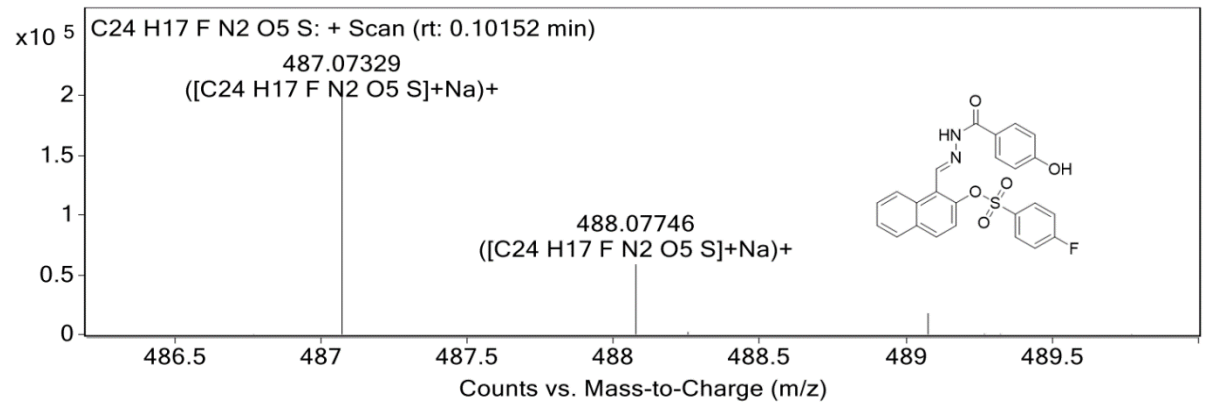
Bileşik 2b'nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



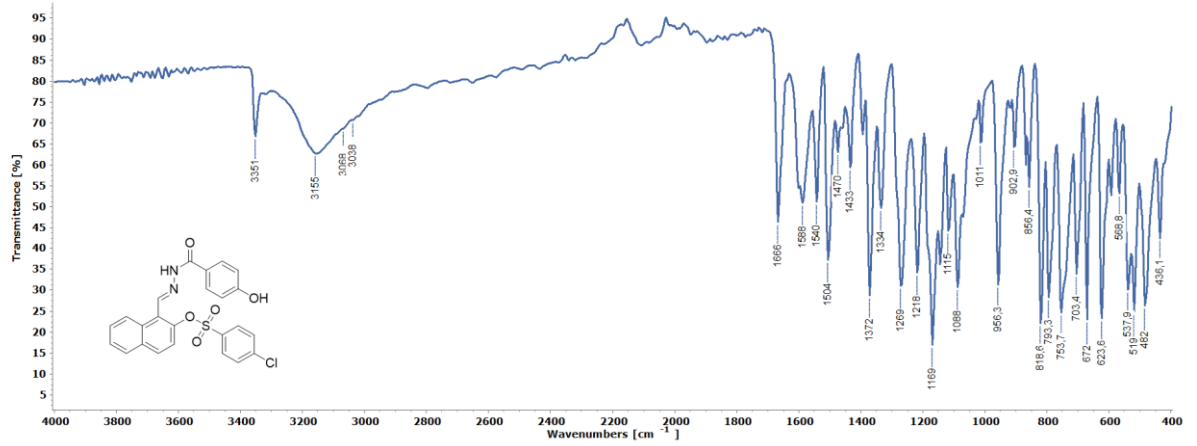
Bileşik **2b**'nin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



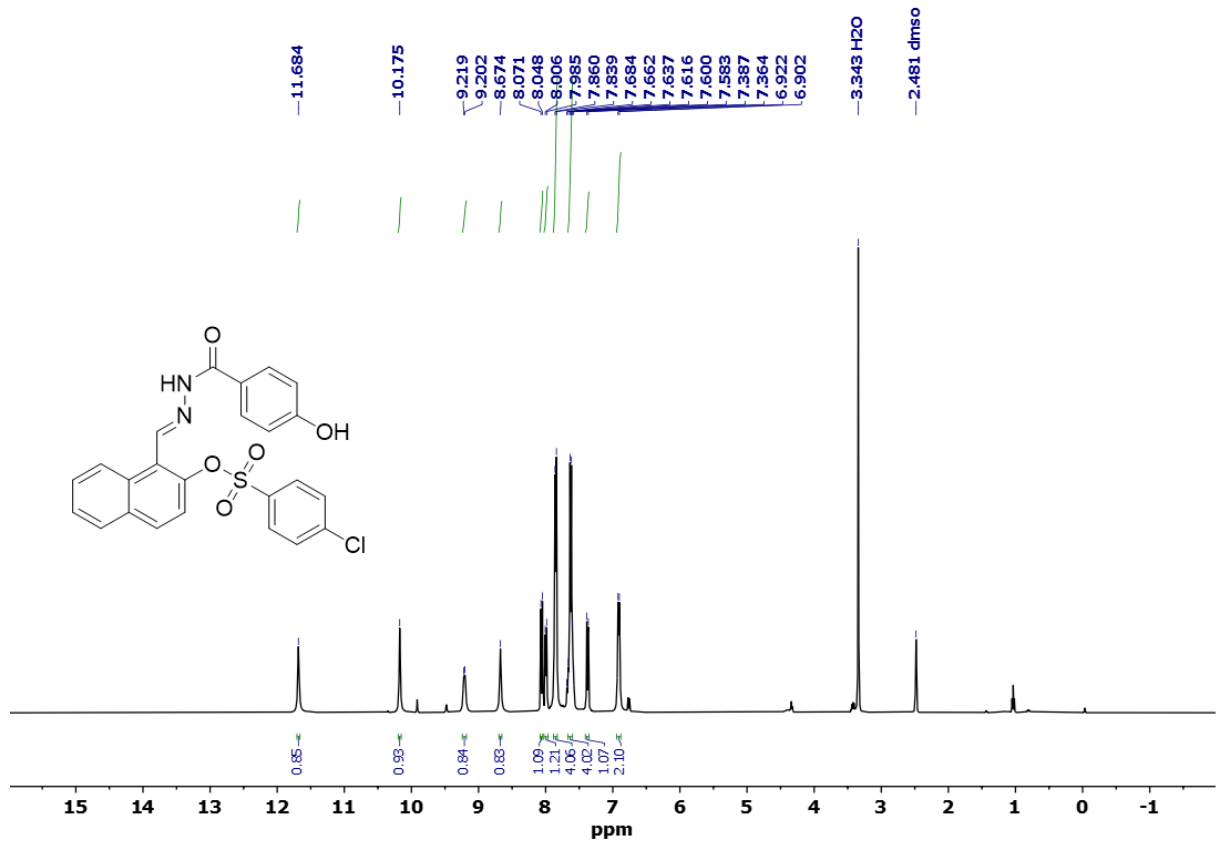
Bileşik **2b**'nin MS spektrumu



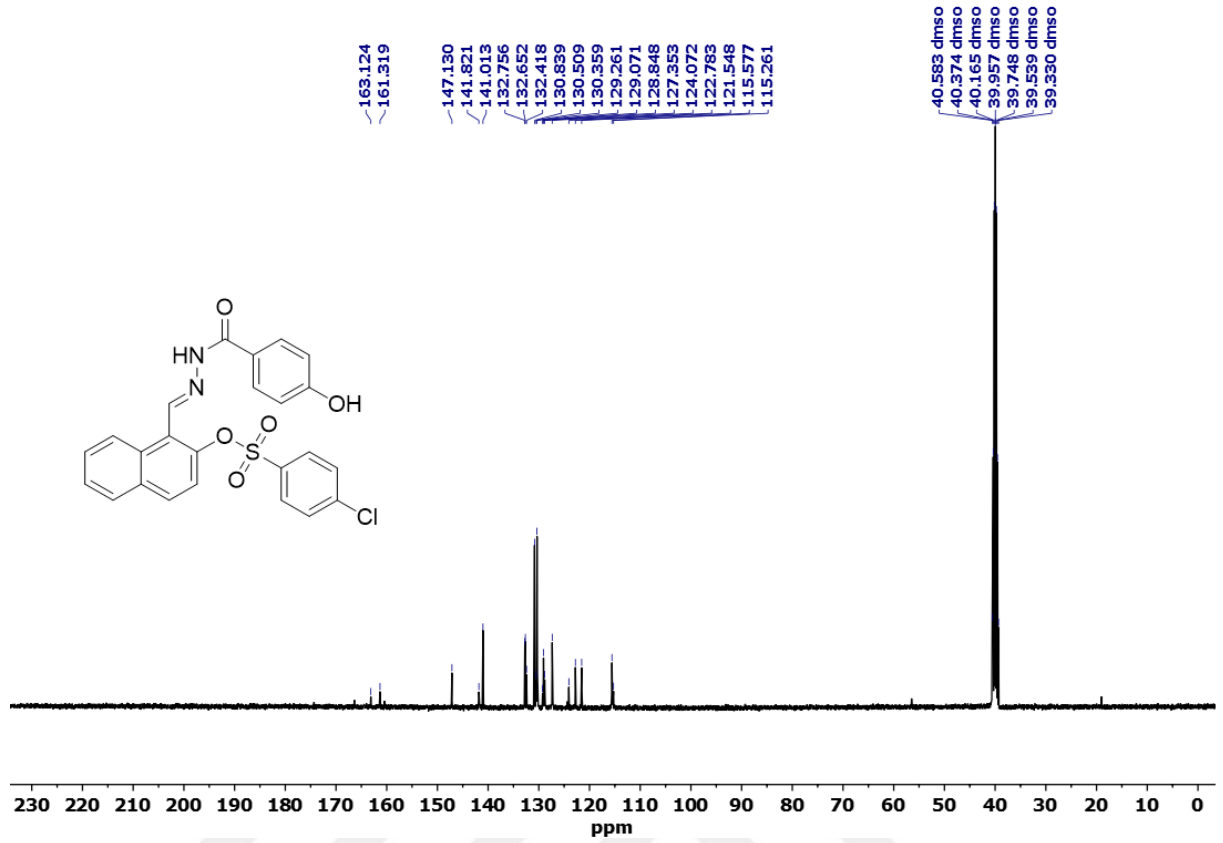
### Bileşik 2c'nin FT-IR spektrumu



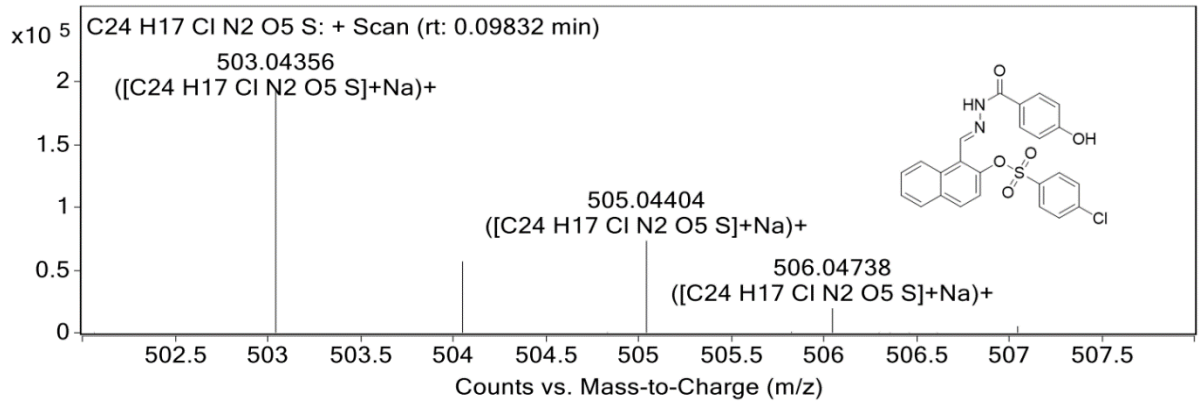
### Bileşik 2c'nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



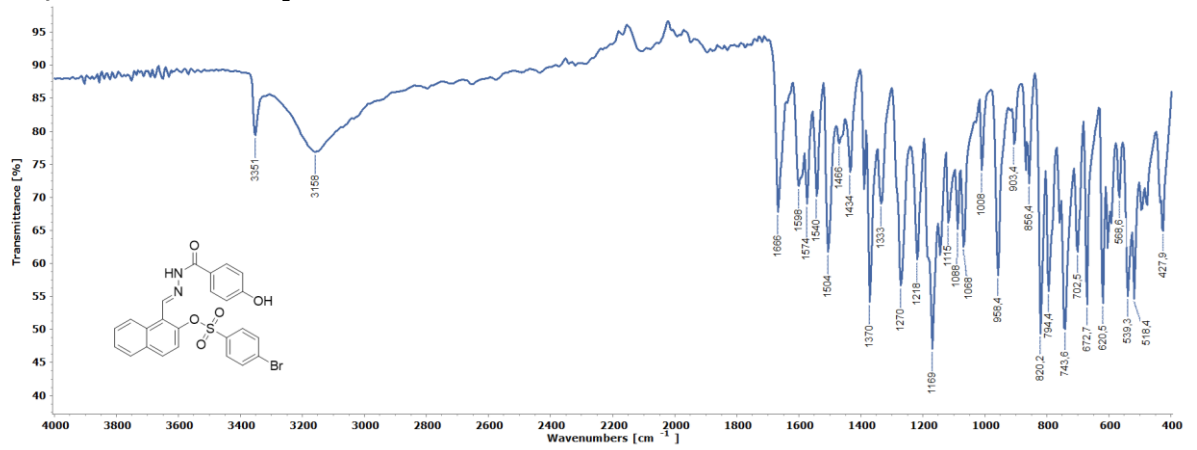
Bileşik 2c'nin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



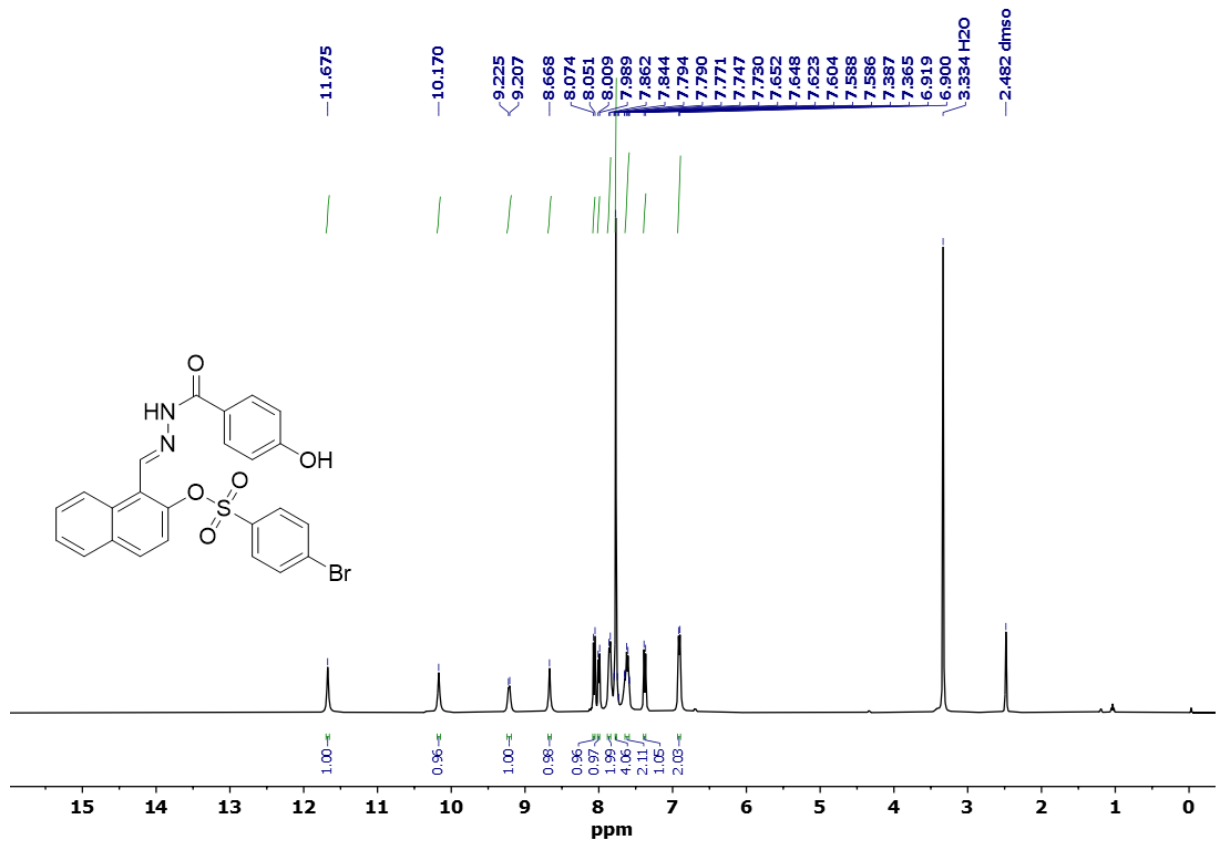
Bileşik 2c'nin MS spektrumu



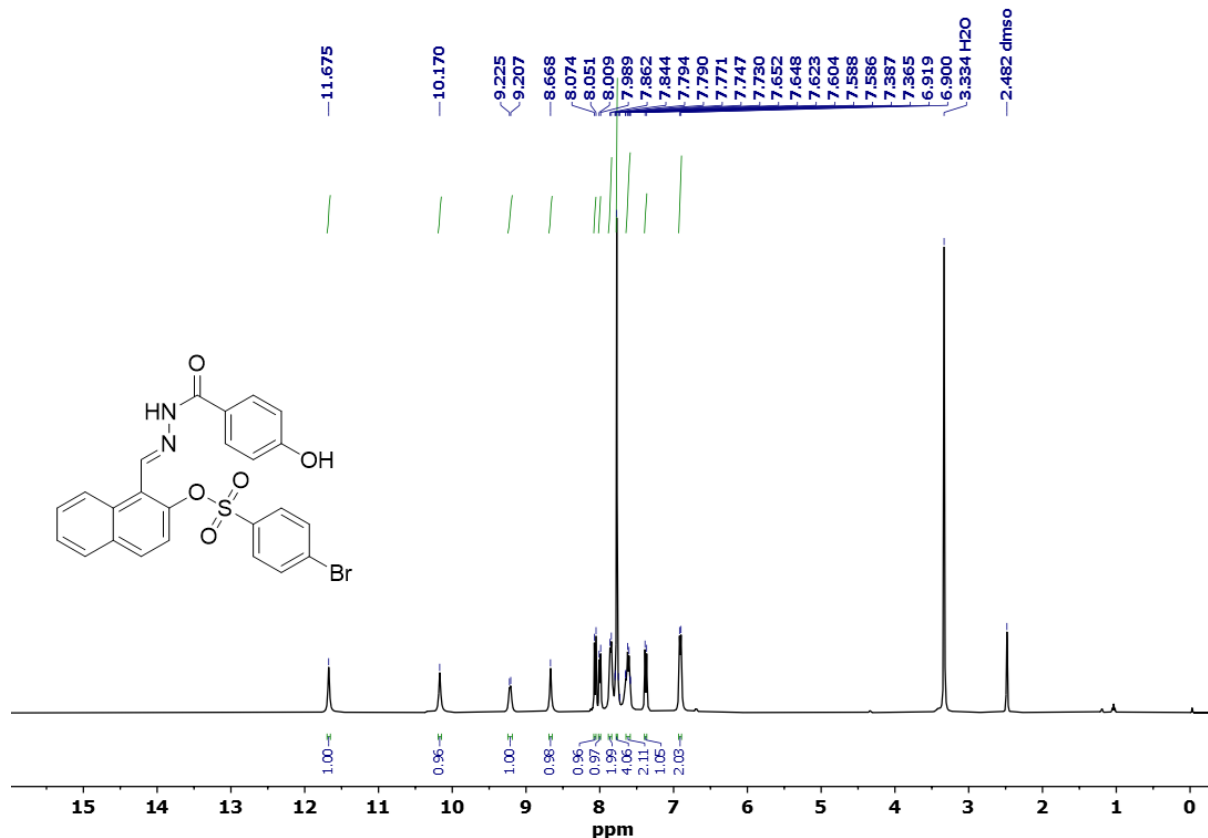
Bileşik 2d'nin FT-IR spektrumu



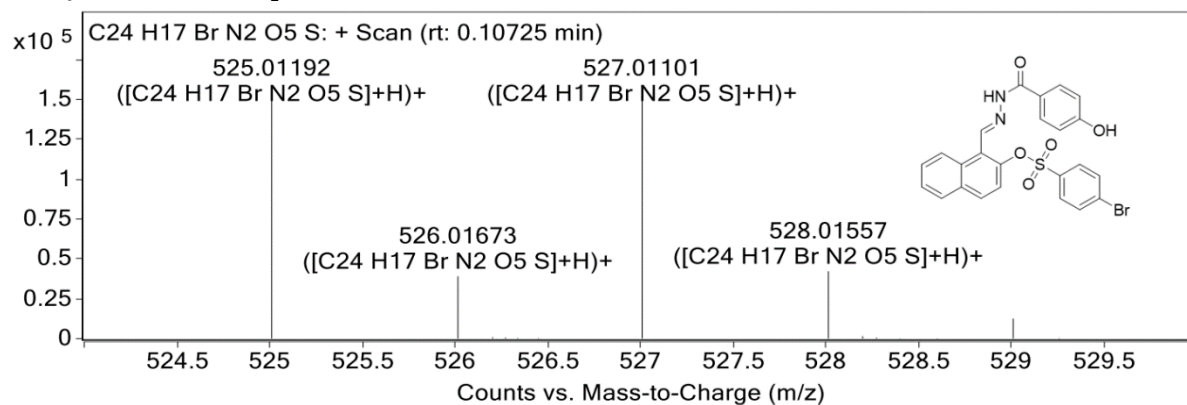
Bileşik 2d'nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



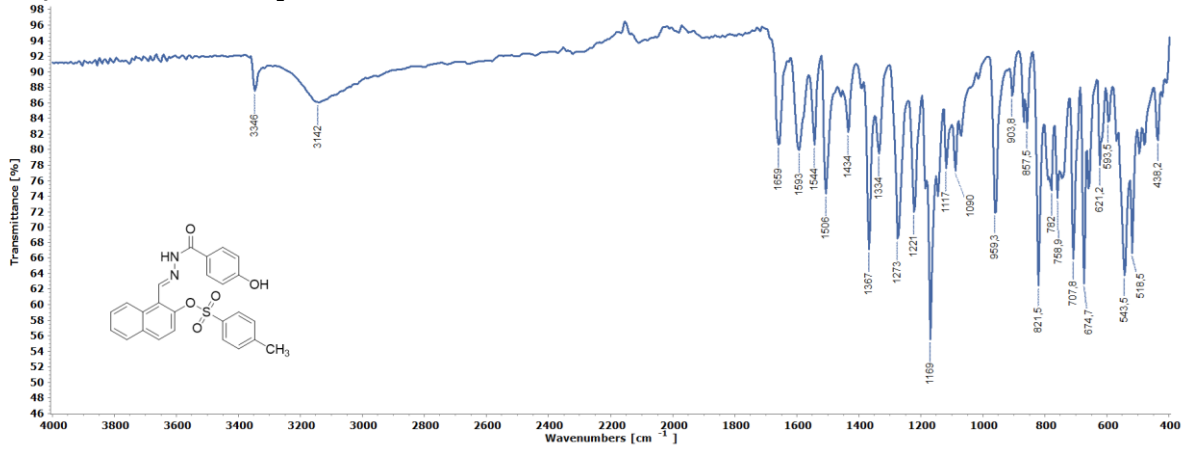
Bileşik **2d**'nin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



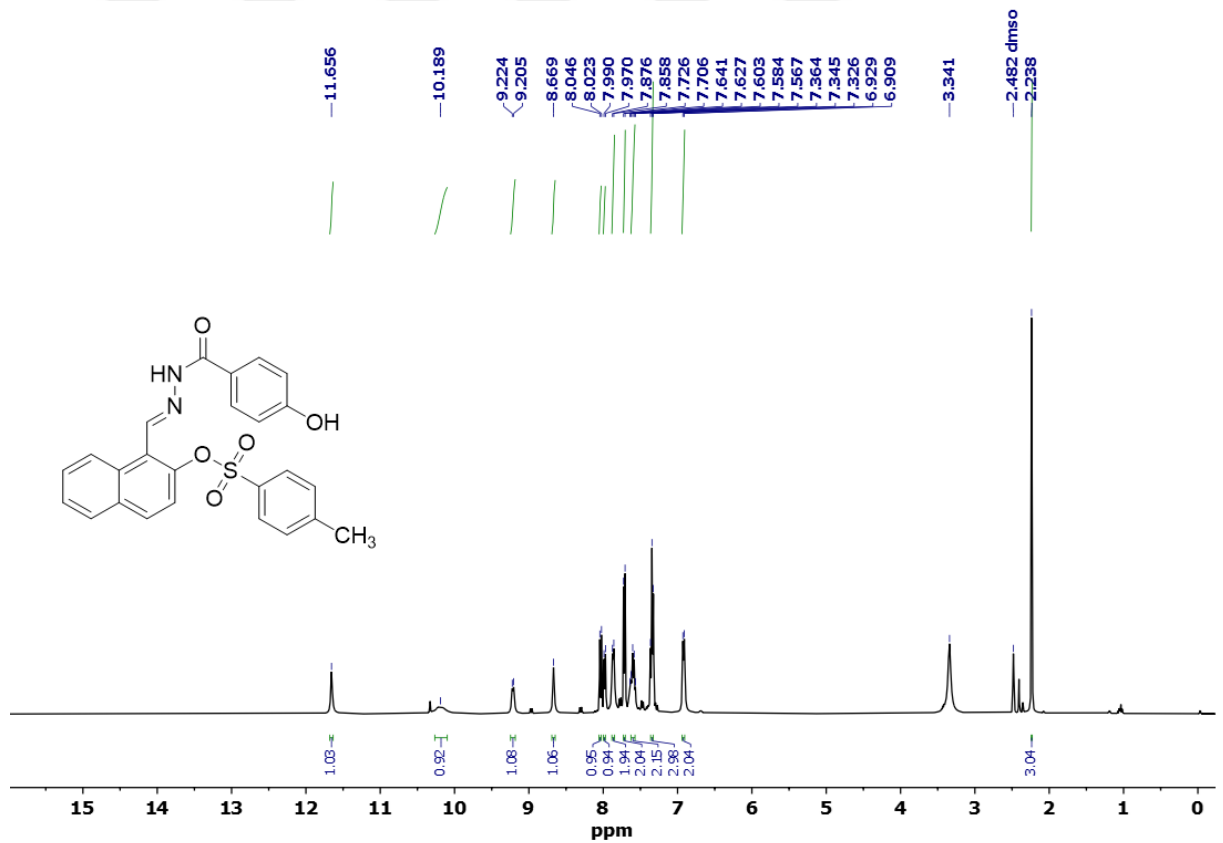
Bileşik **2d**'nin MS spektrumu



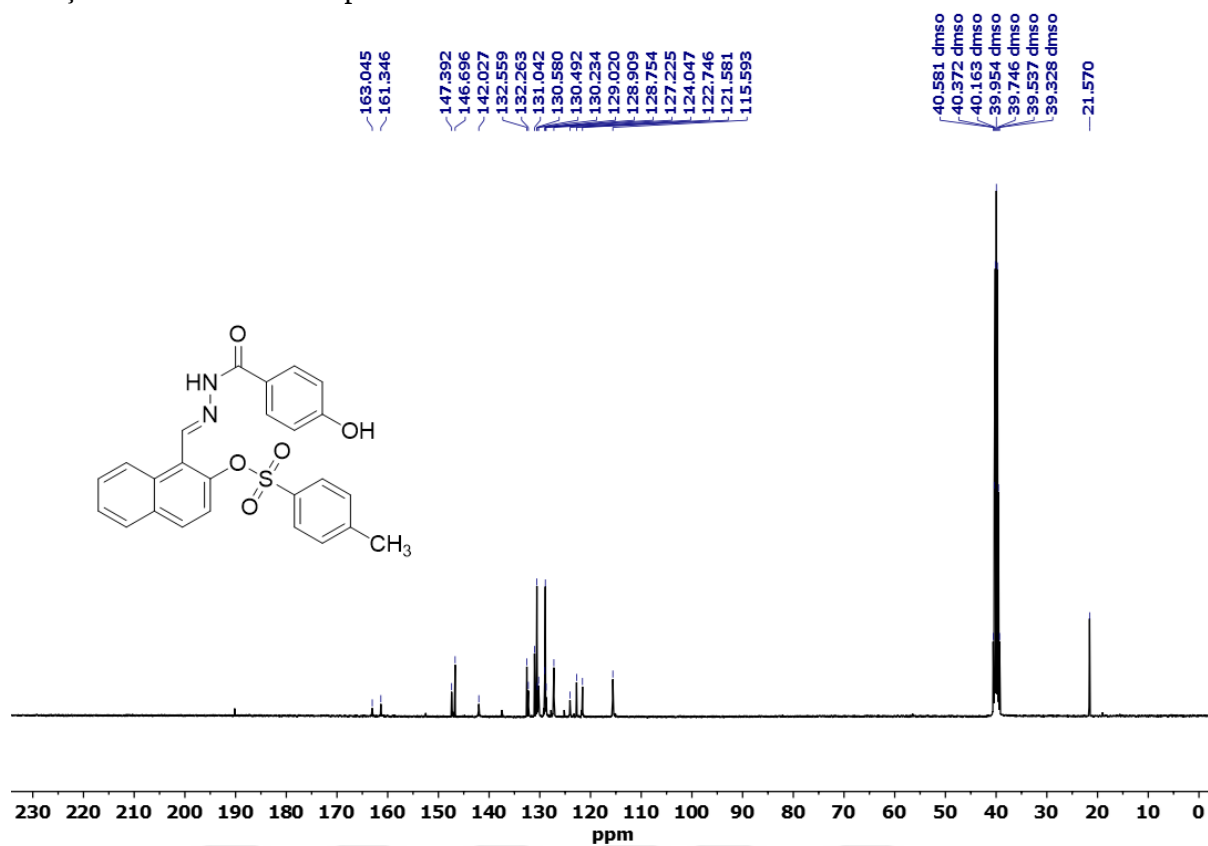
Bileşik 2e'nin FT-IR spektrumu



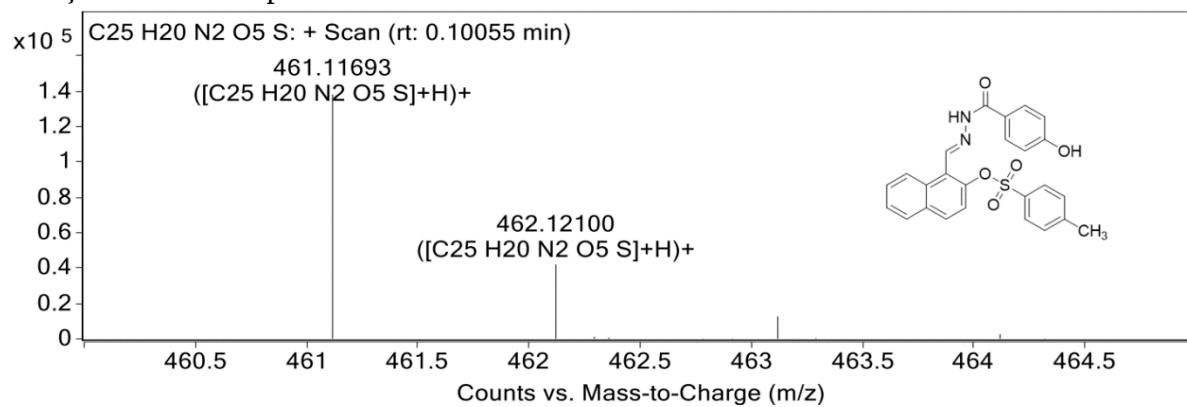
Bileşik 2e'nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



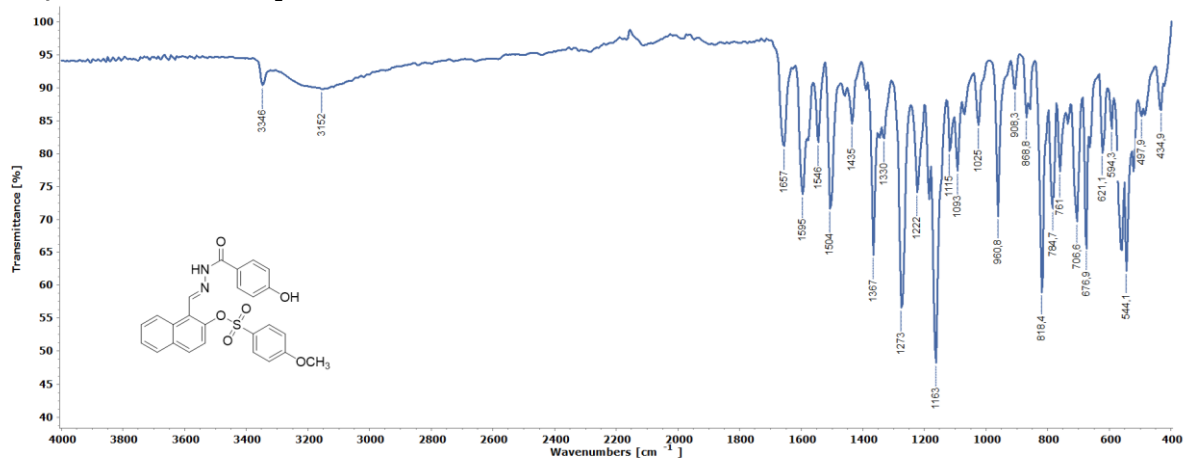
## Bileşik 2e'nin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu



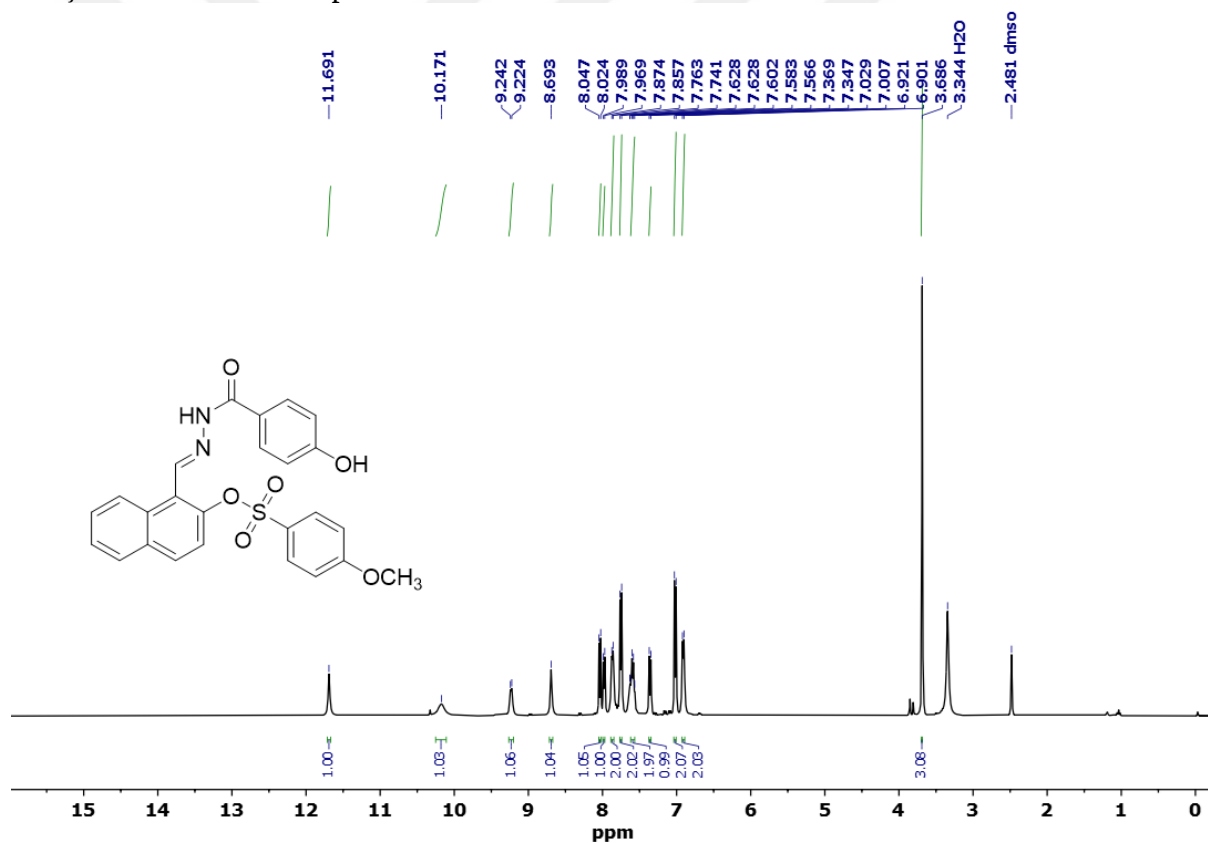
## Bileşik 2e'nin MS spektrumu



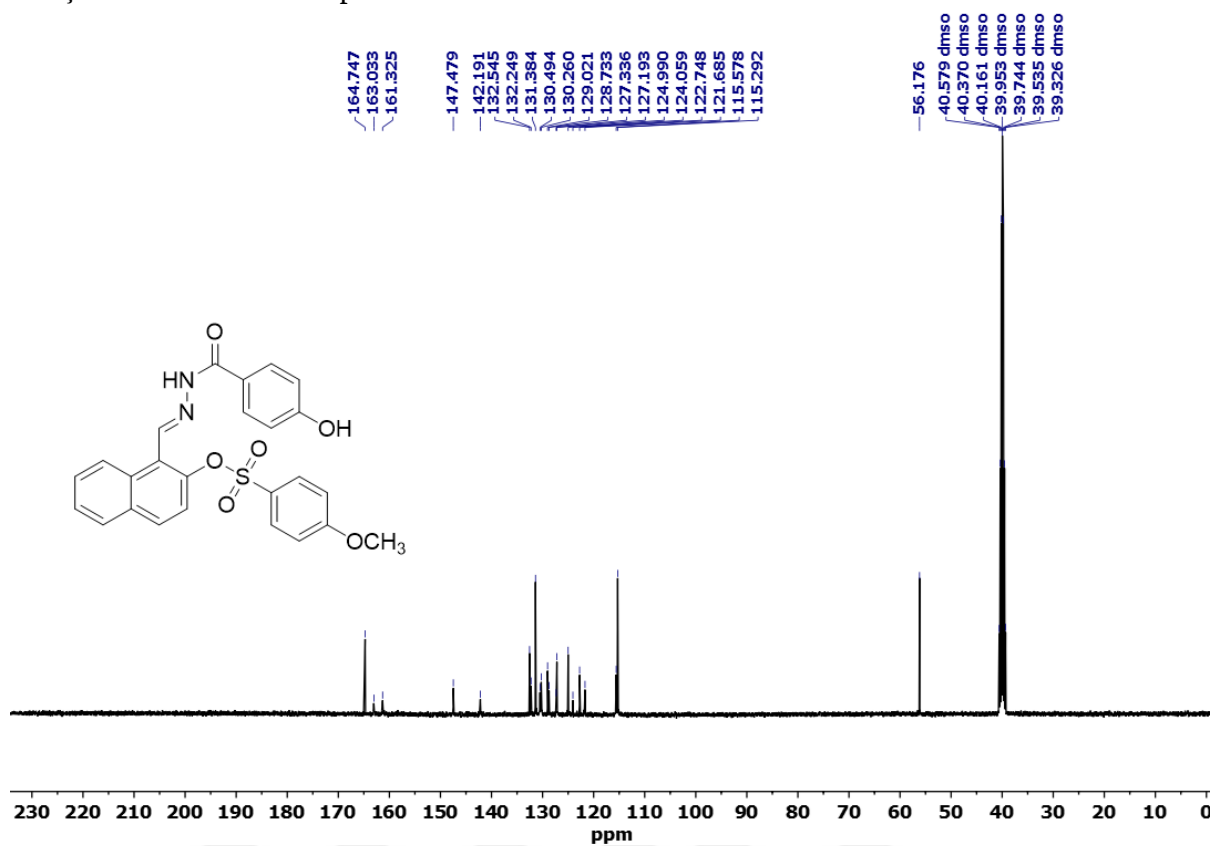
### Bileşik 2f'nin FT-IR spektrumu



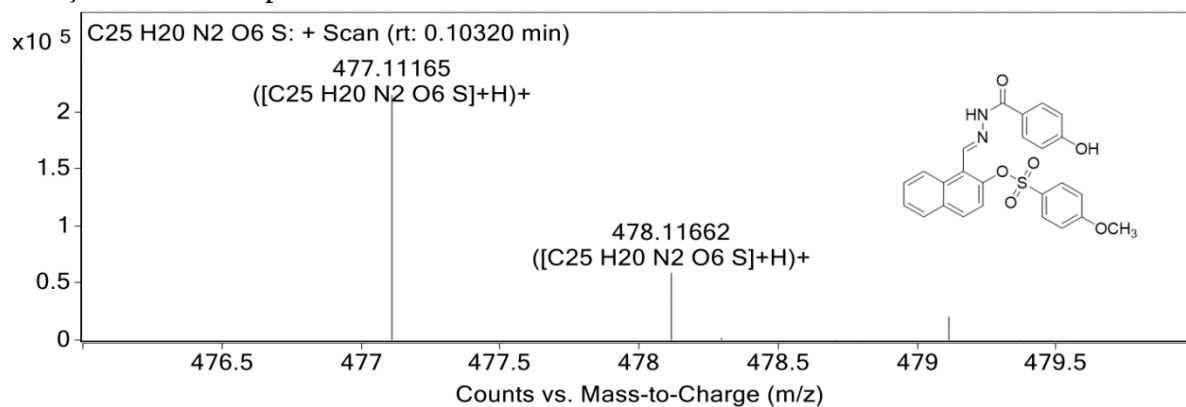
### Bileşik 2f'nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



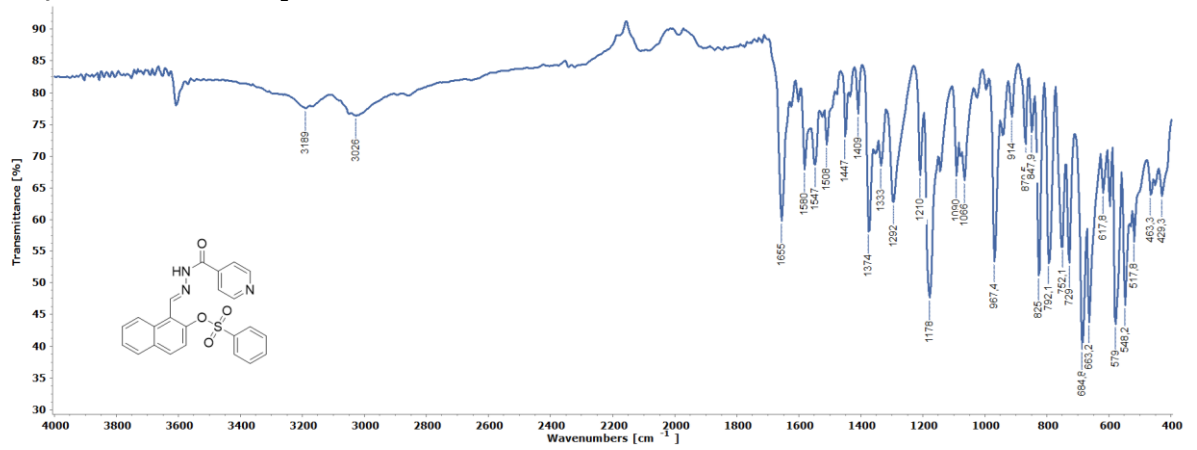
Bileşik 2f'nin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



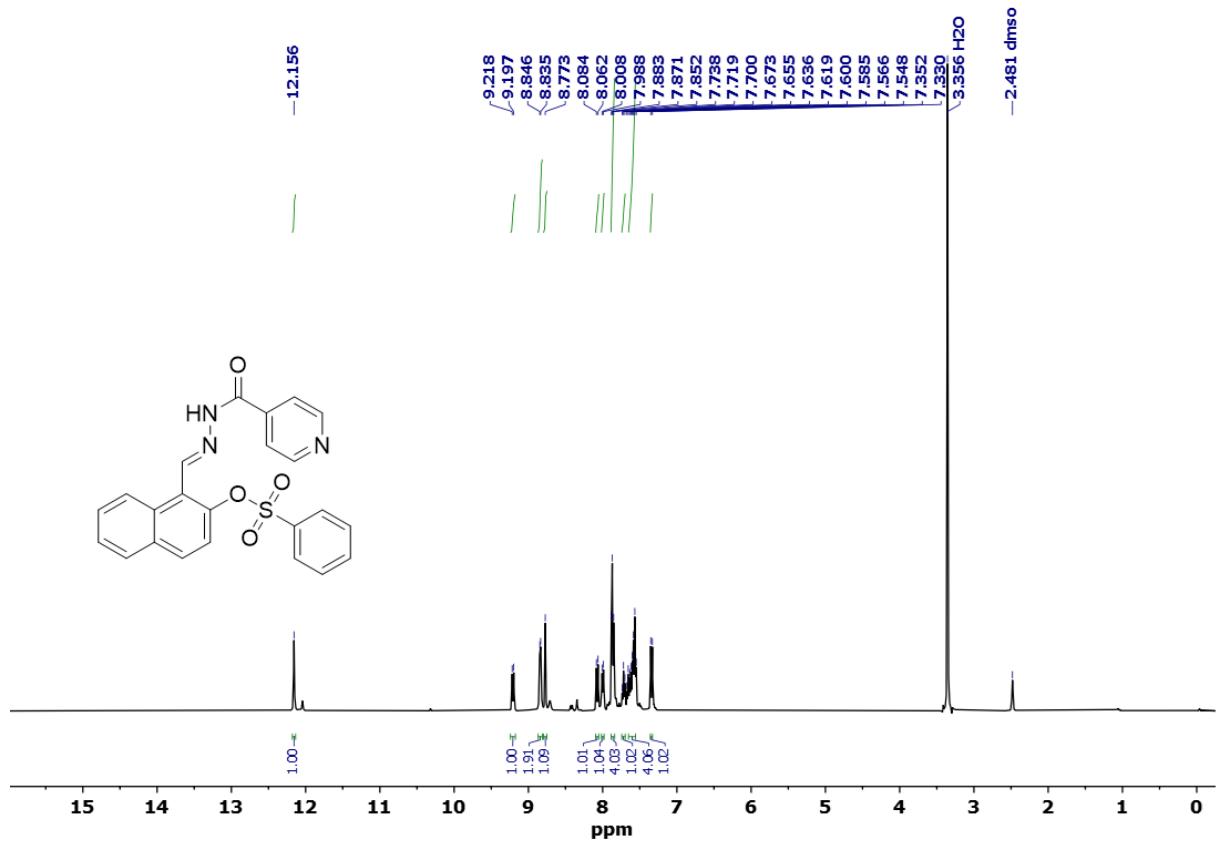
Bileşik 2f'nin MS spektrumu



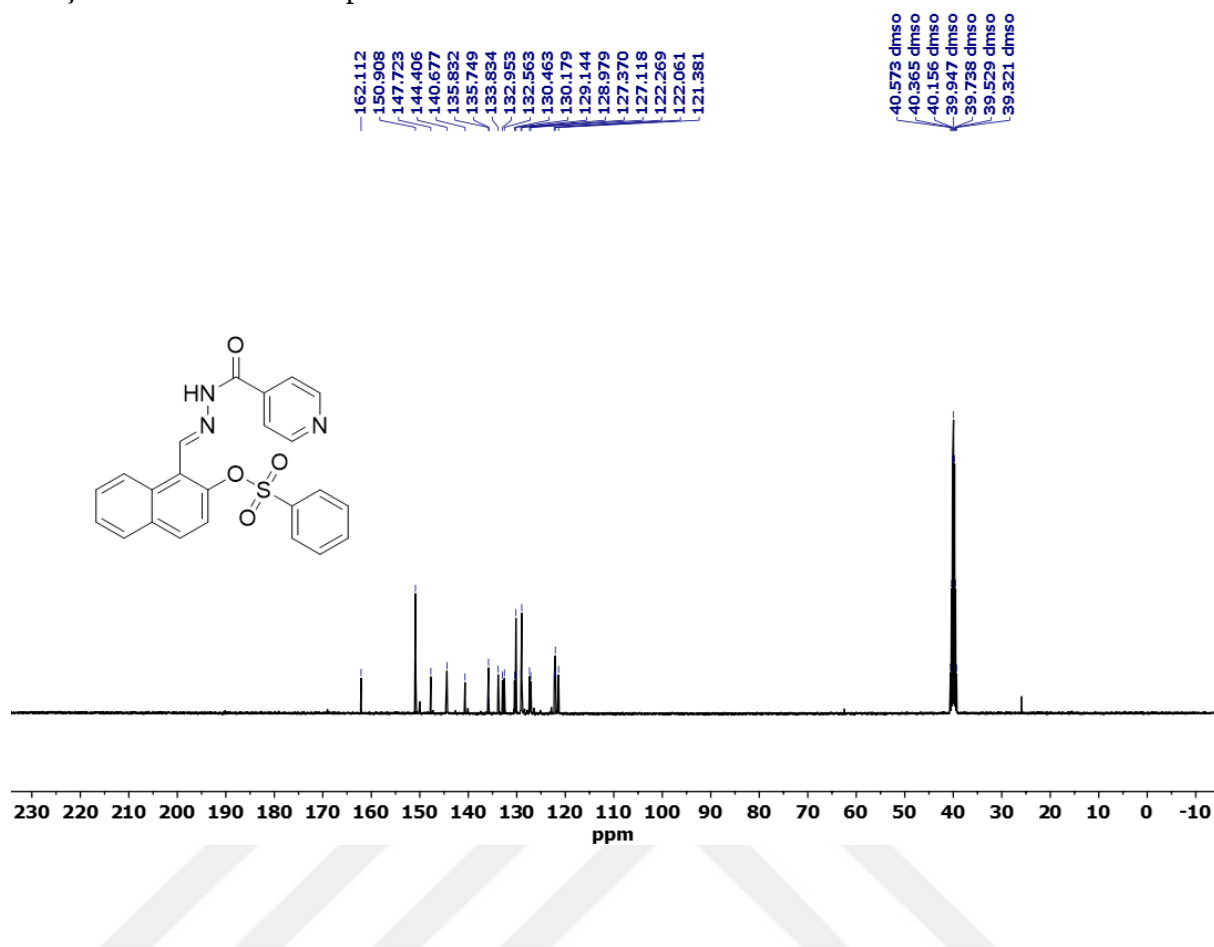
Bileşik 3a'nın FT-IR spektrumu



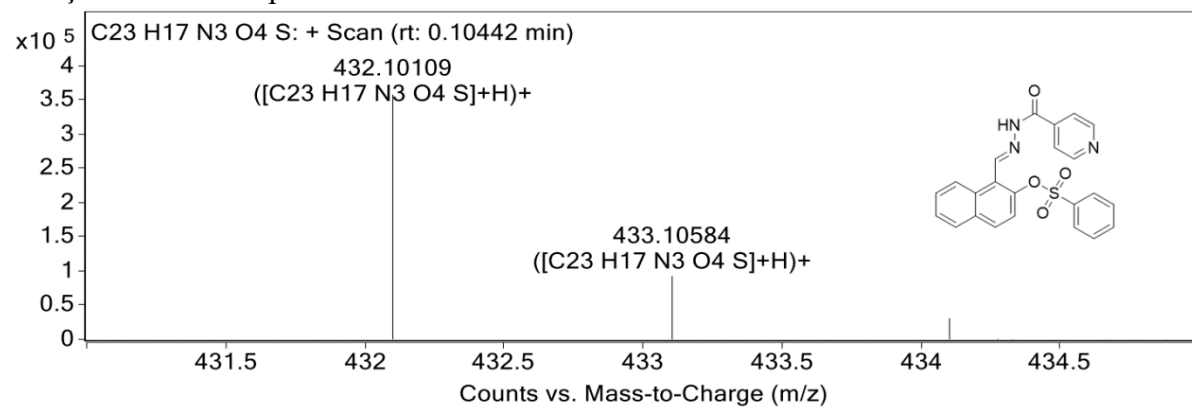
Bileşik 3a'nın <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Bileşik **3a**'nın  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

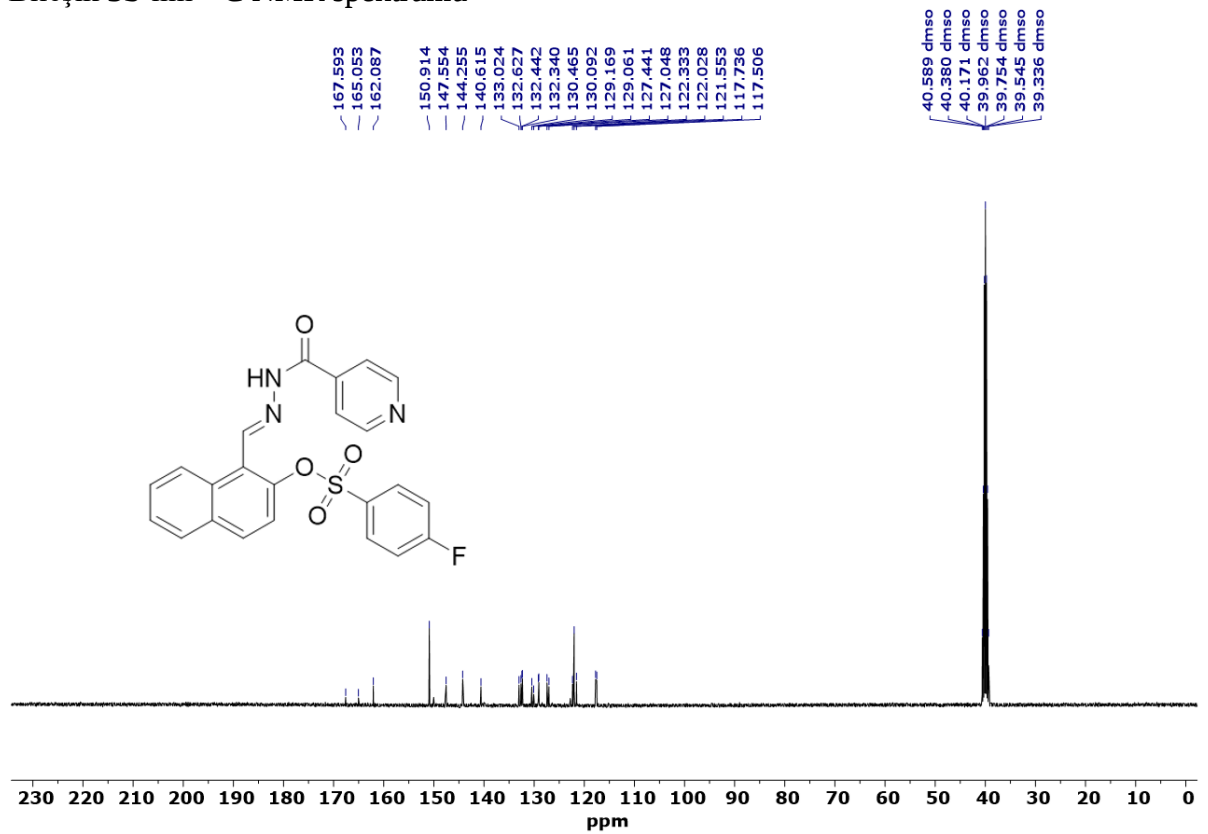


Bileşik **3a**'nın MS spektrumu

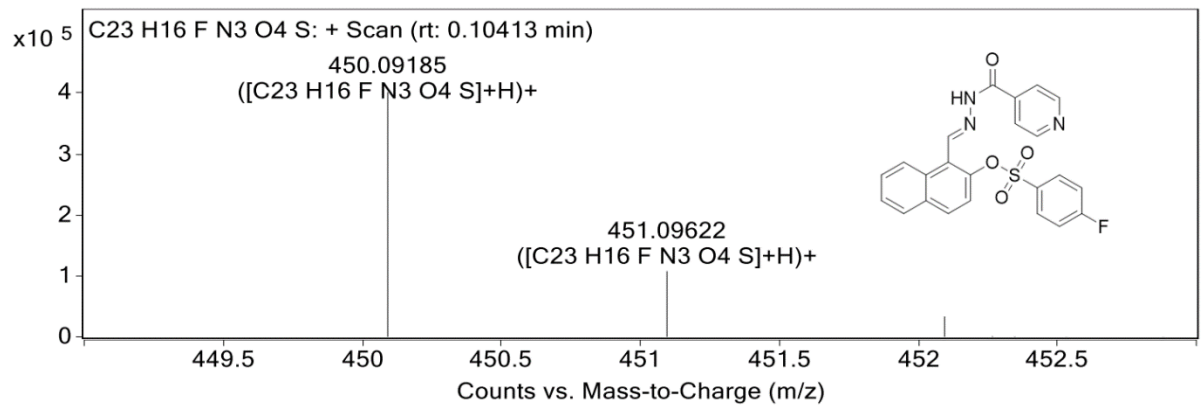




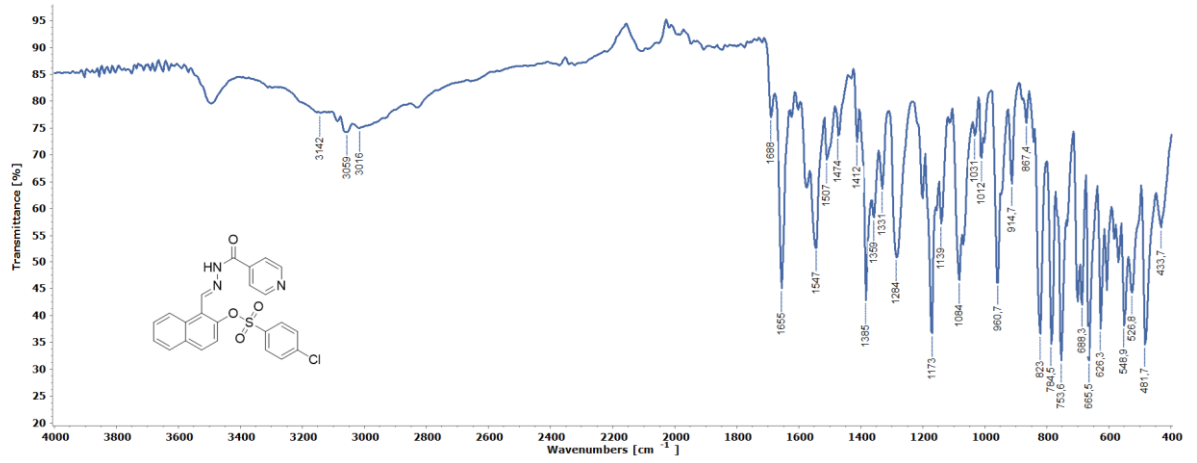
### Bileşik **3b**'nin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu



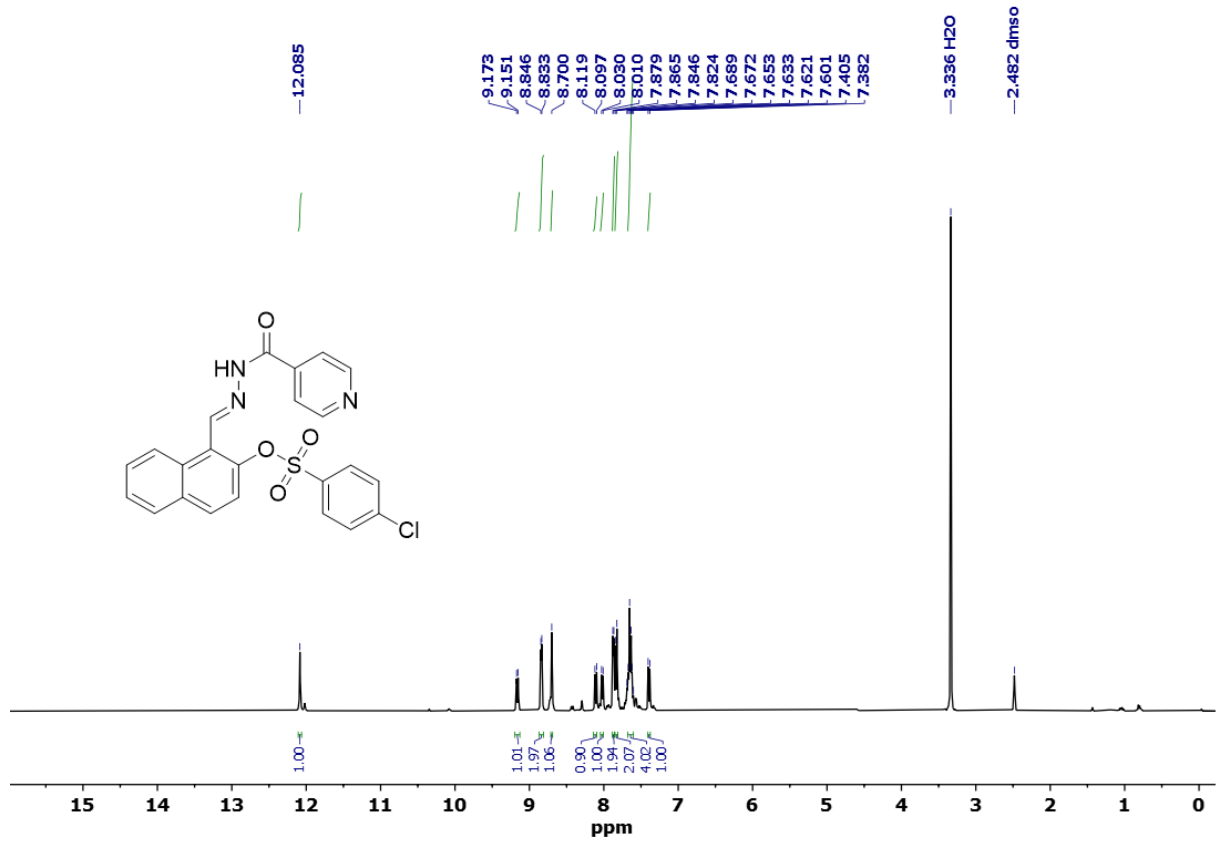
### Bileşik **3b**'nin MS spektrumu



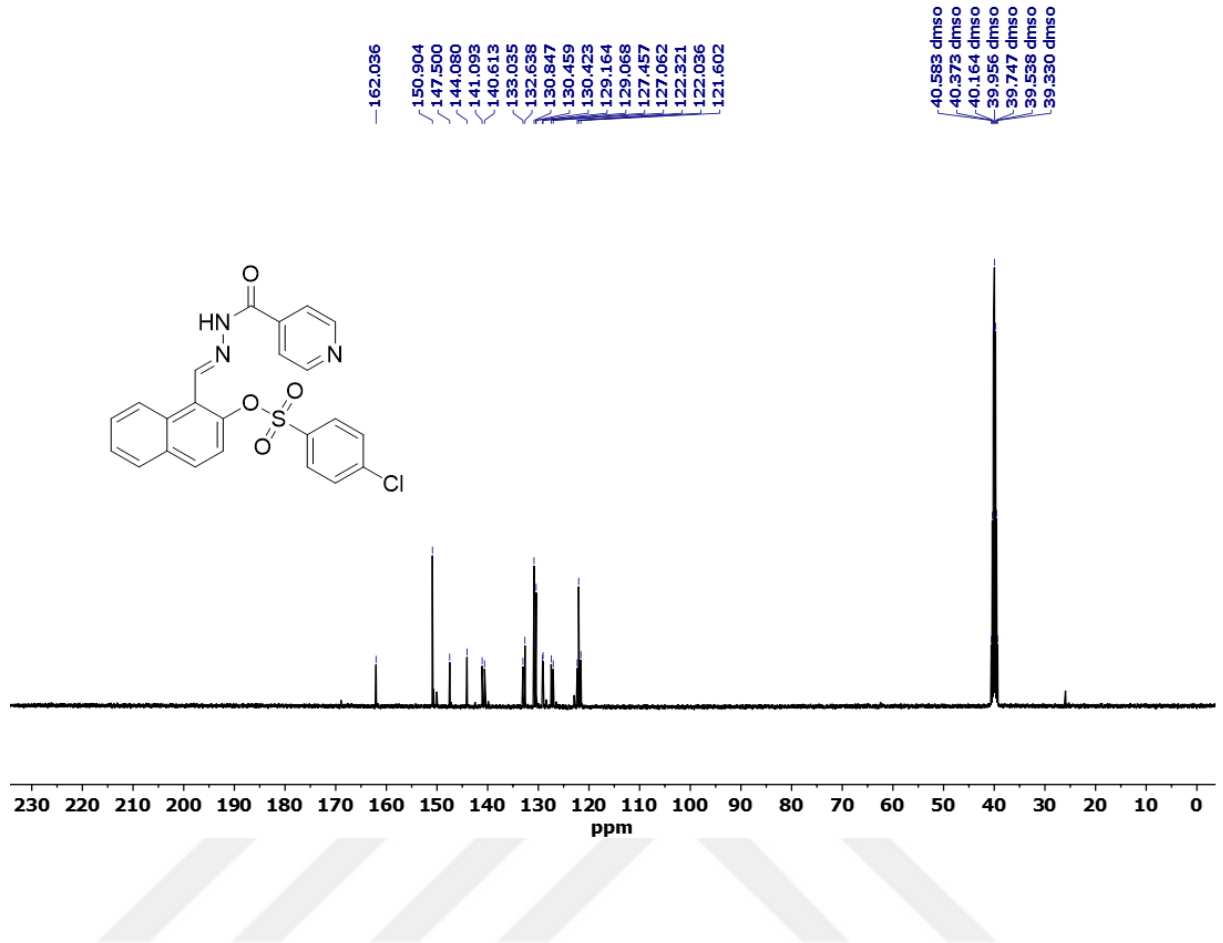
Bileşik 3c'nin FT-IR spektrumu



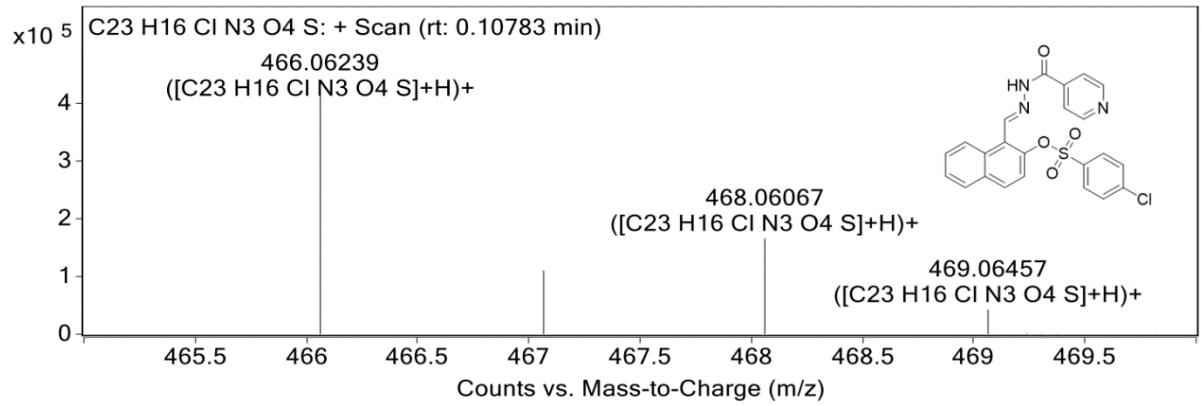
Bileşik 3c'nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



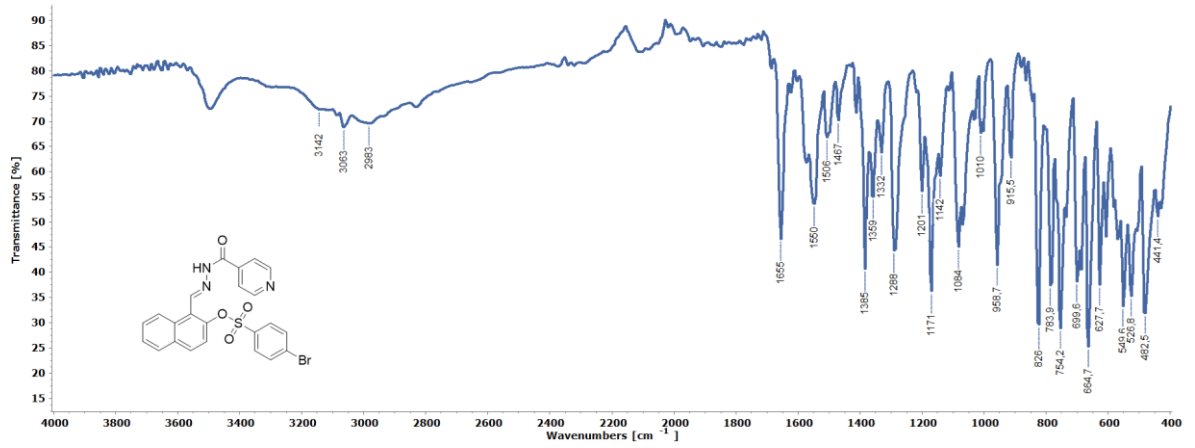
### Bileşik 3c'nin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu



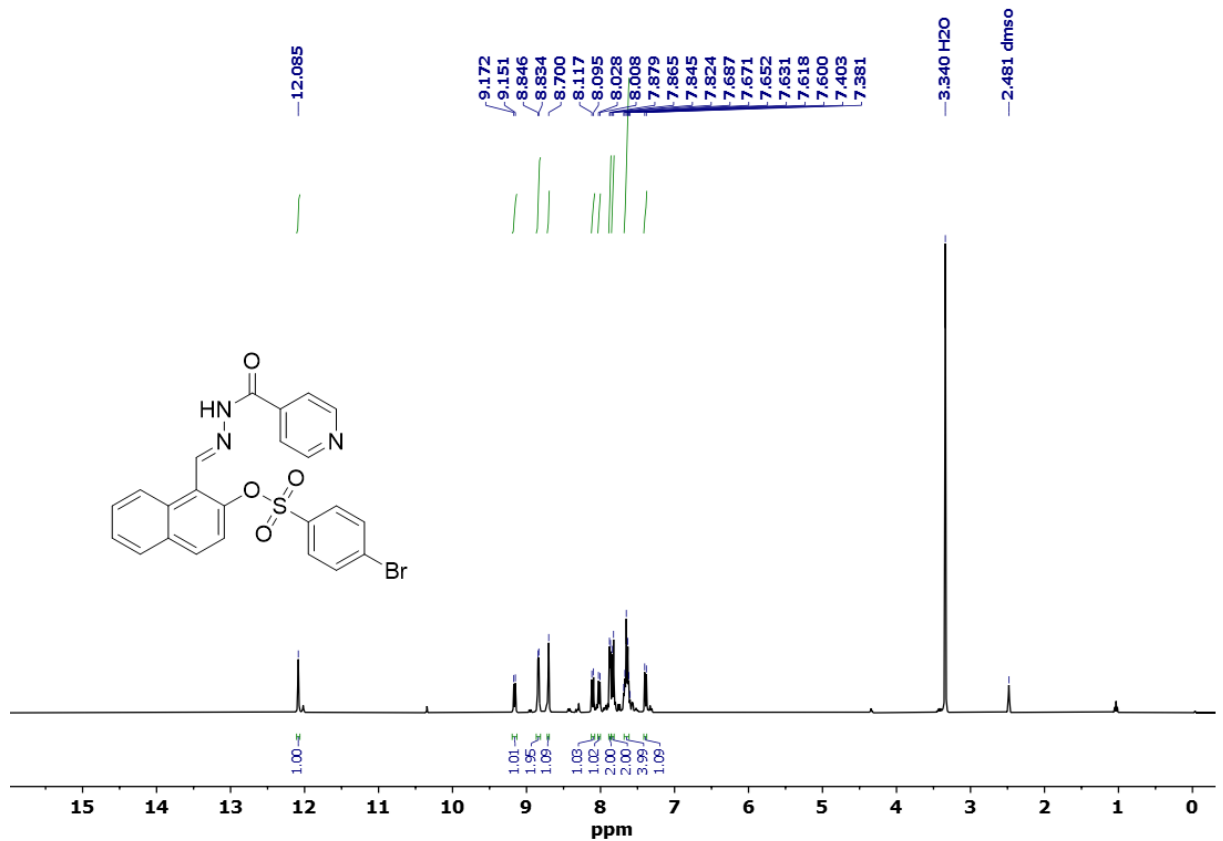
### Bileşik 3c'nin MS spektrumu



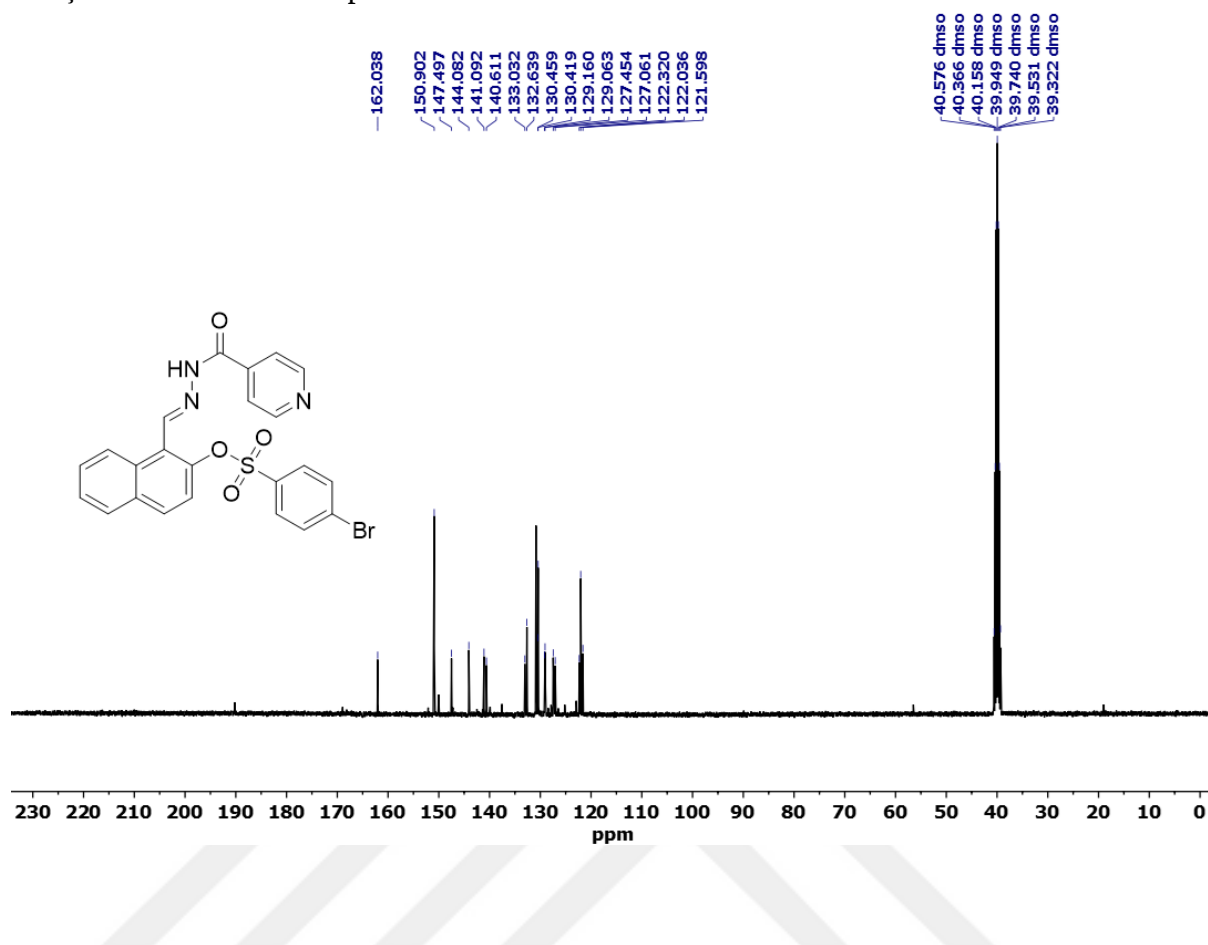
Bileşik **3d**'nin FT-IR spektrumu



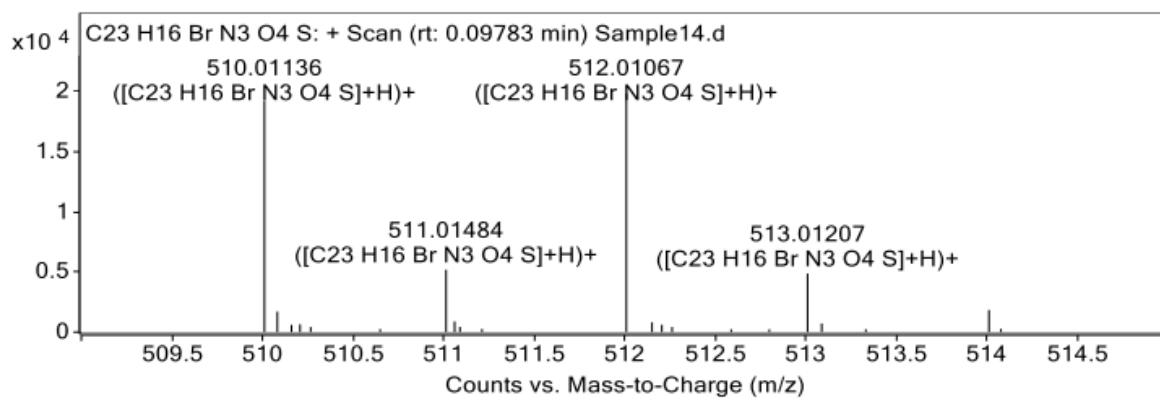
Bileşik **3d**'nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



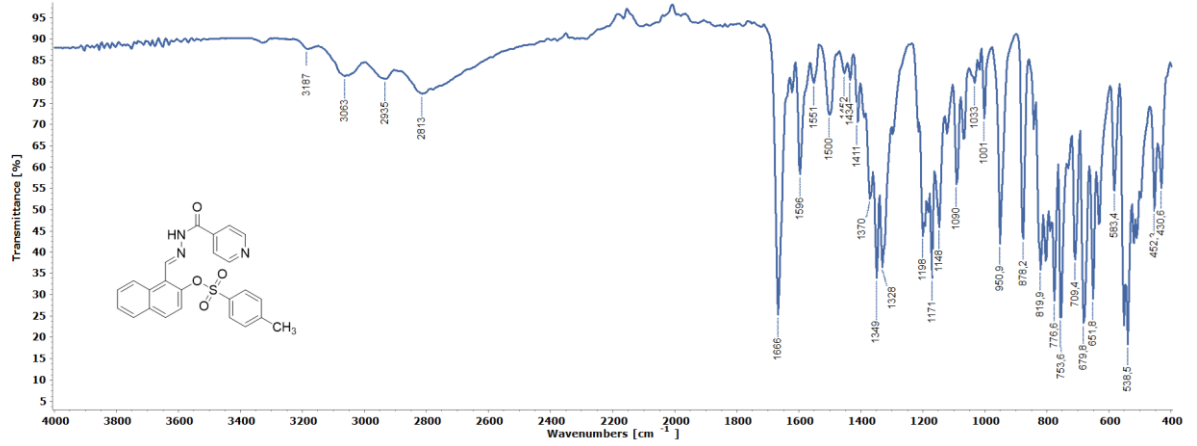
Bileşik **3d**'nin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



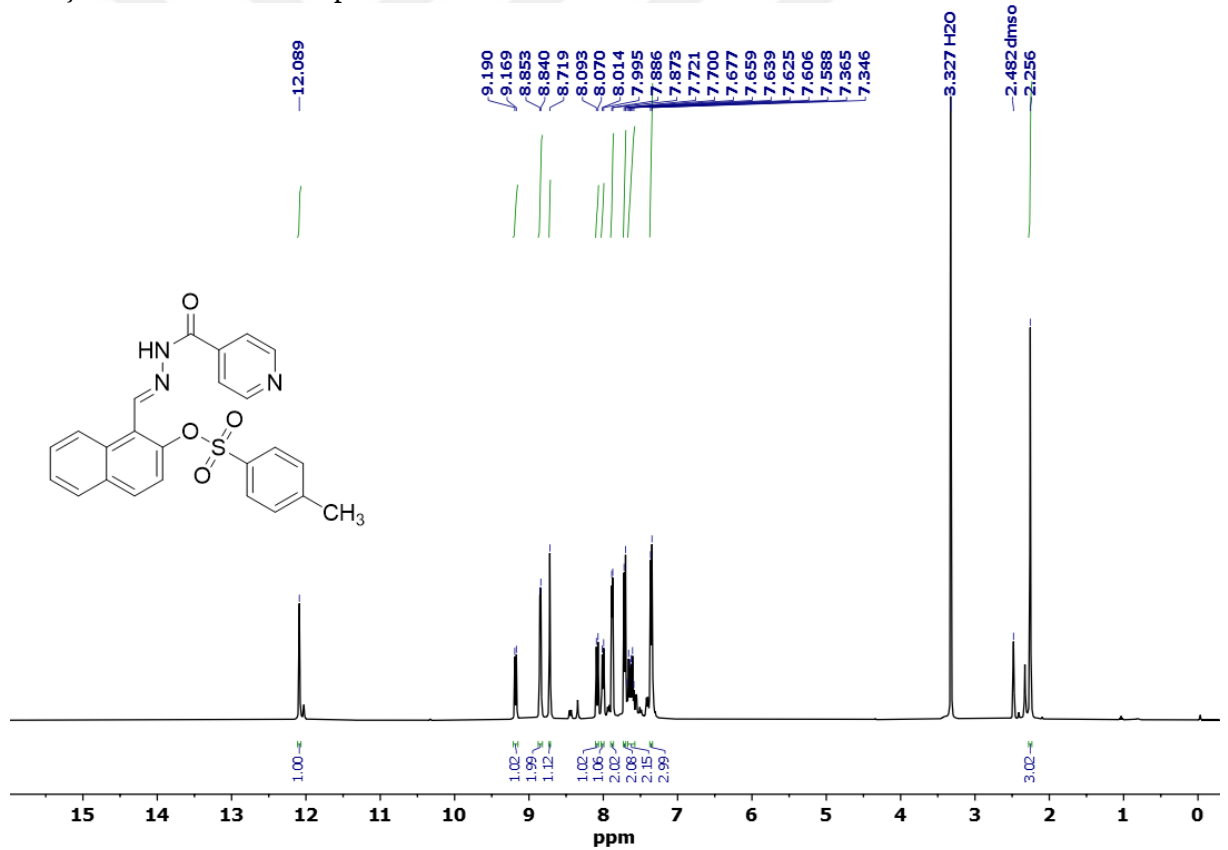
Bileşik **3d**'nin MS spektrumu



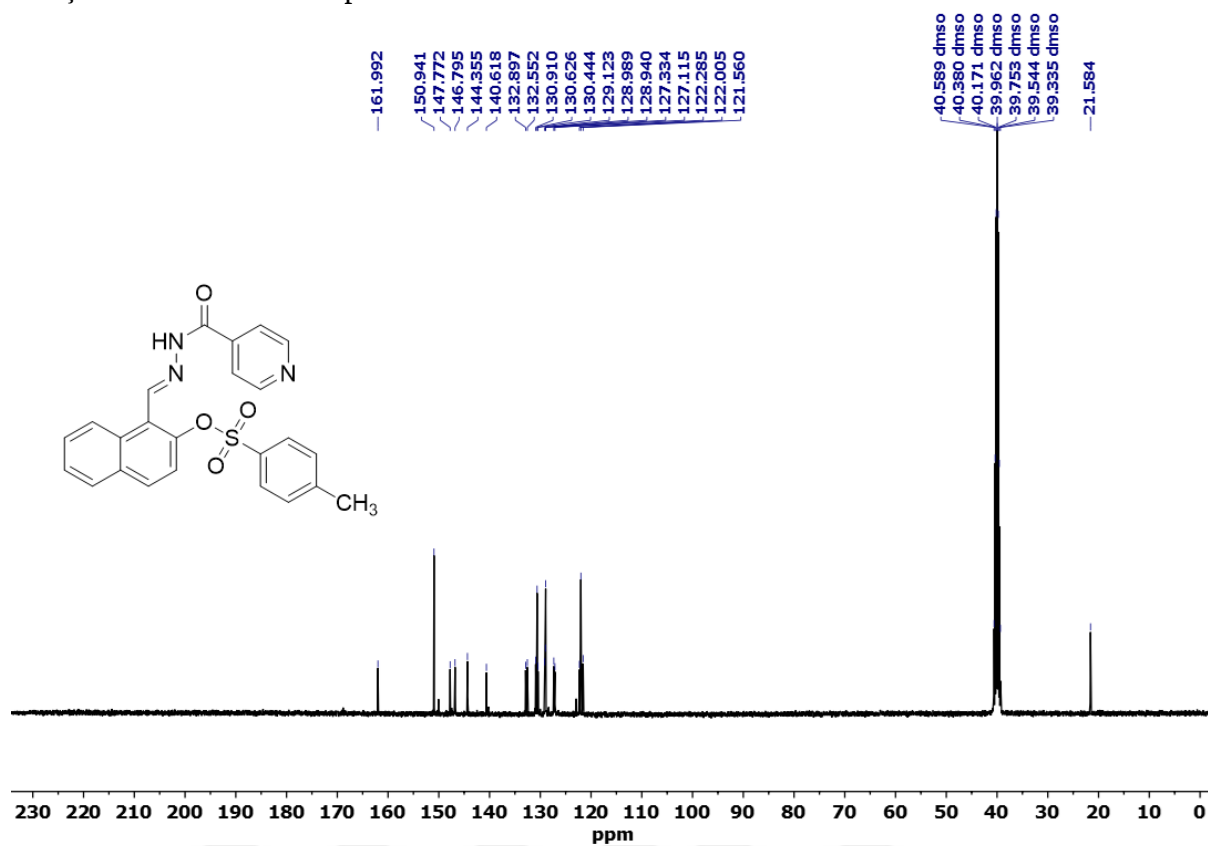
Bileşik 3e'nin FT-IR spektrumu



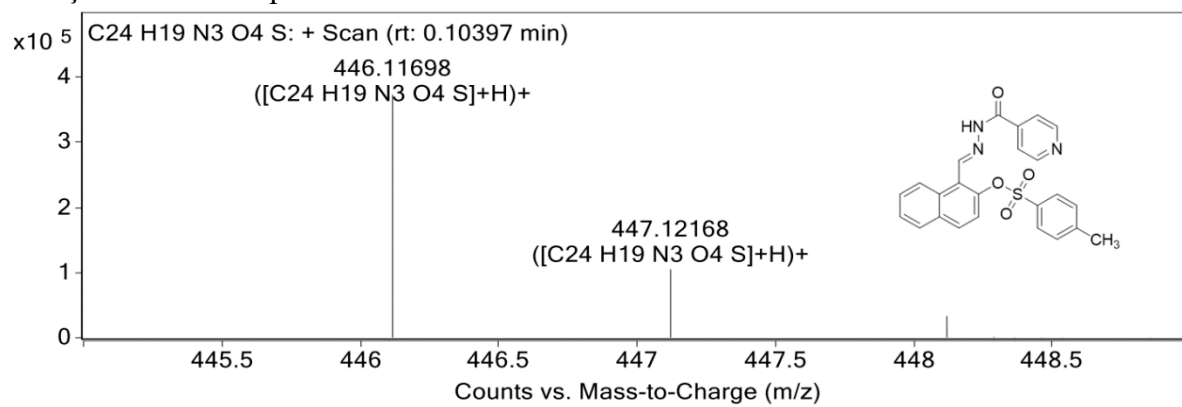
Bileşik 3e'nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



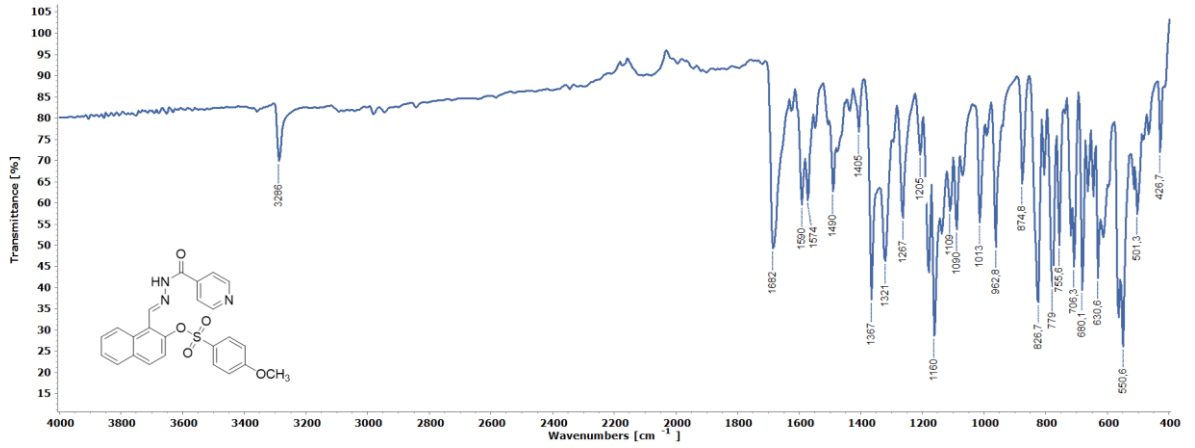
### Bileşik 3e'nin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu



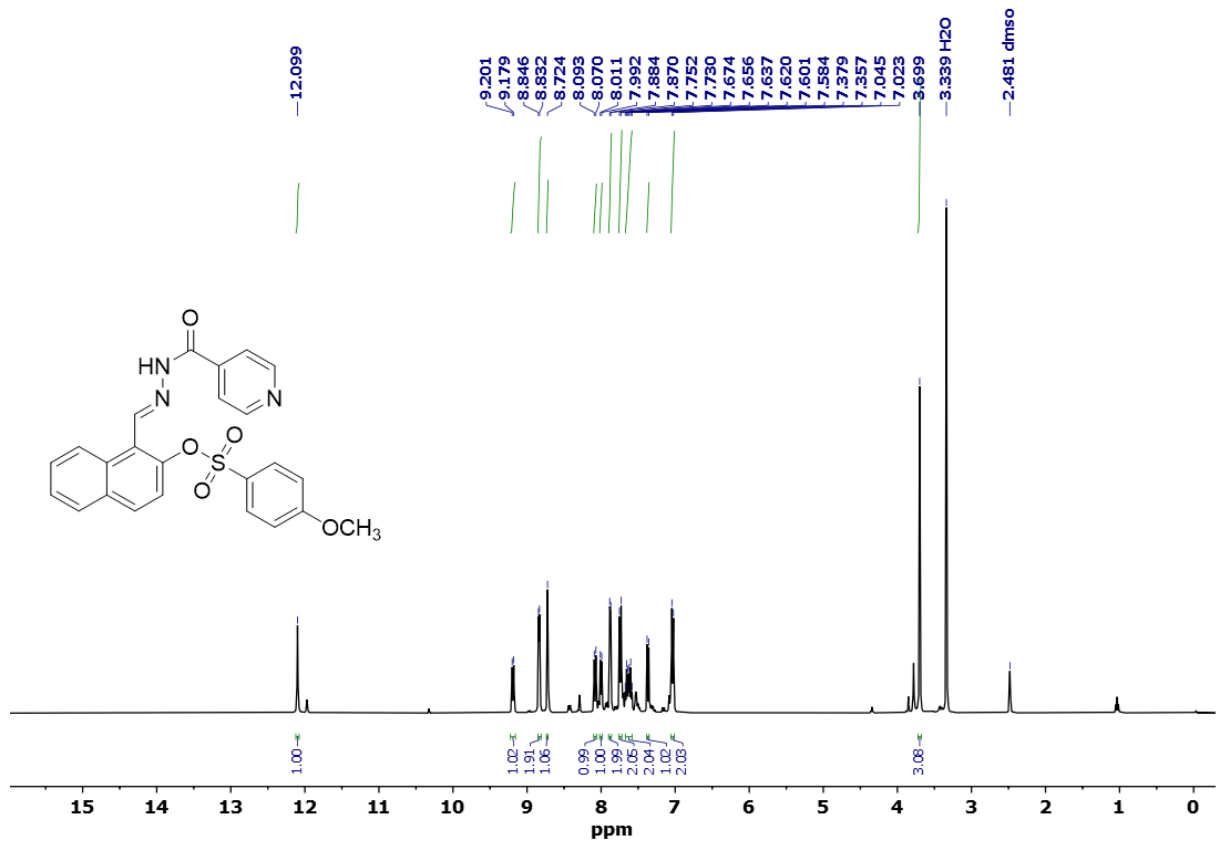
### Bileşik 3e'nin MS spektrumu



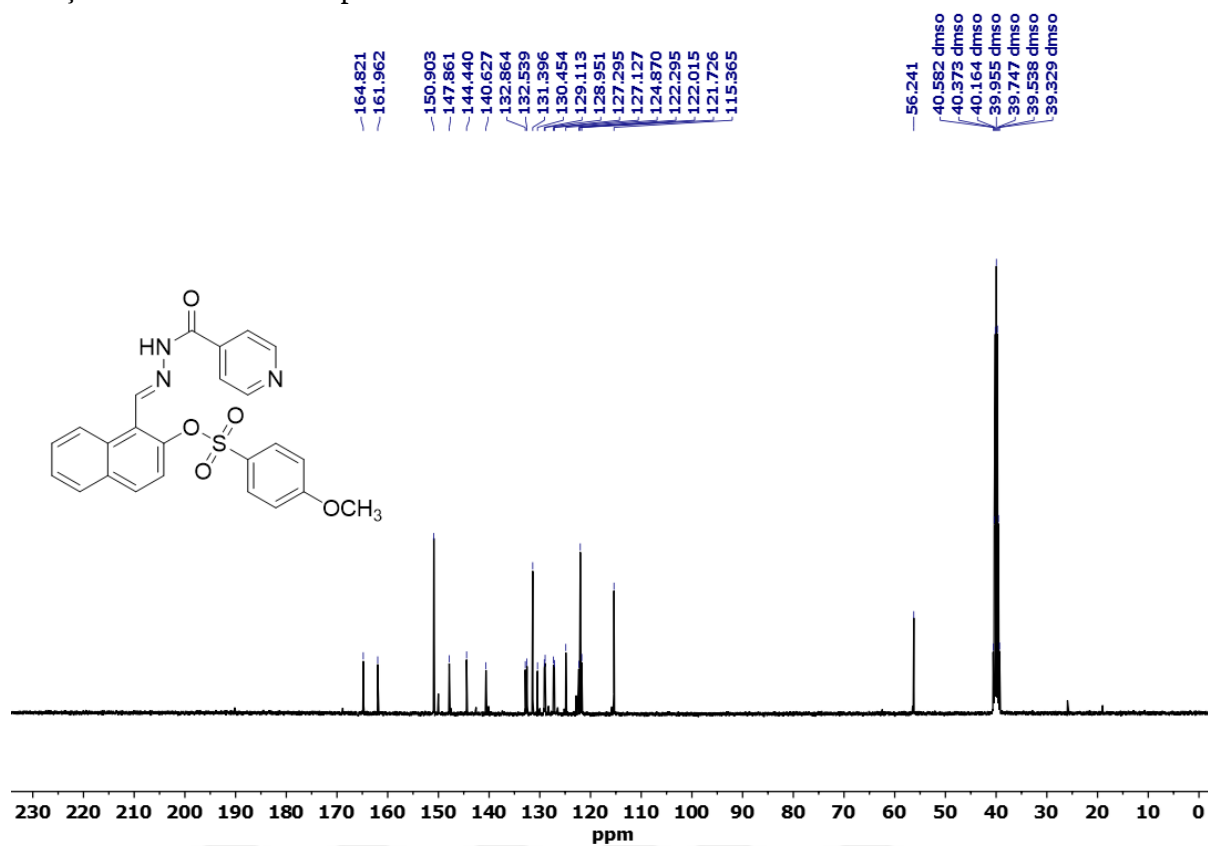
Bileşik 3f'nin FT-IR spektrumu



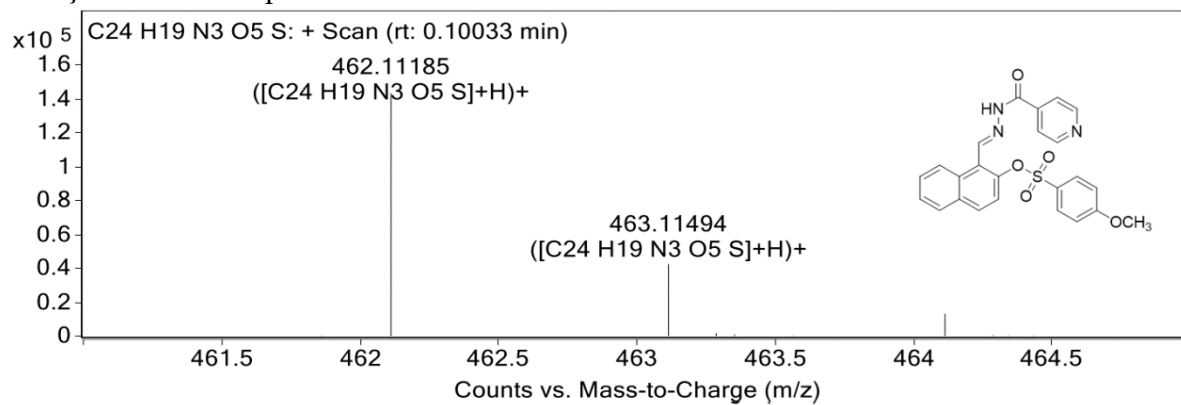
Bileşik 3f'nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



### Bileşik 3f'nin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu

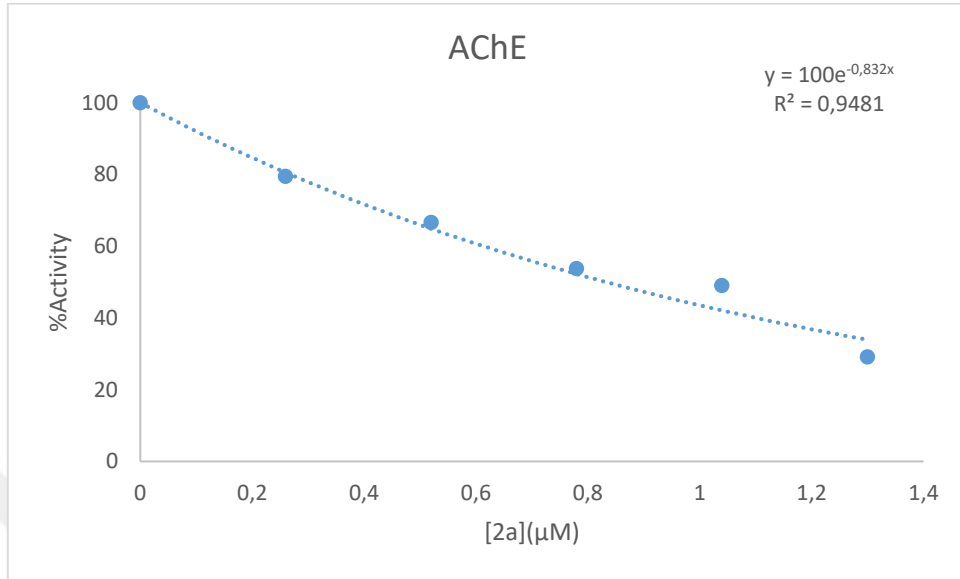


### Bileşik 3f'nin MS spektrumu

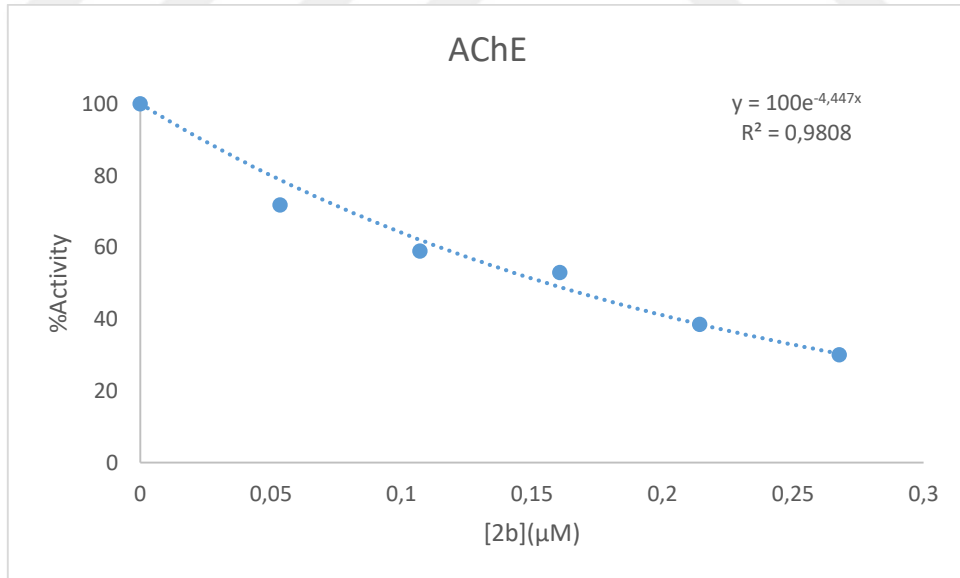


## EK-2 Aktivite Grafikleri

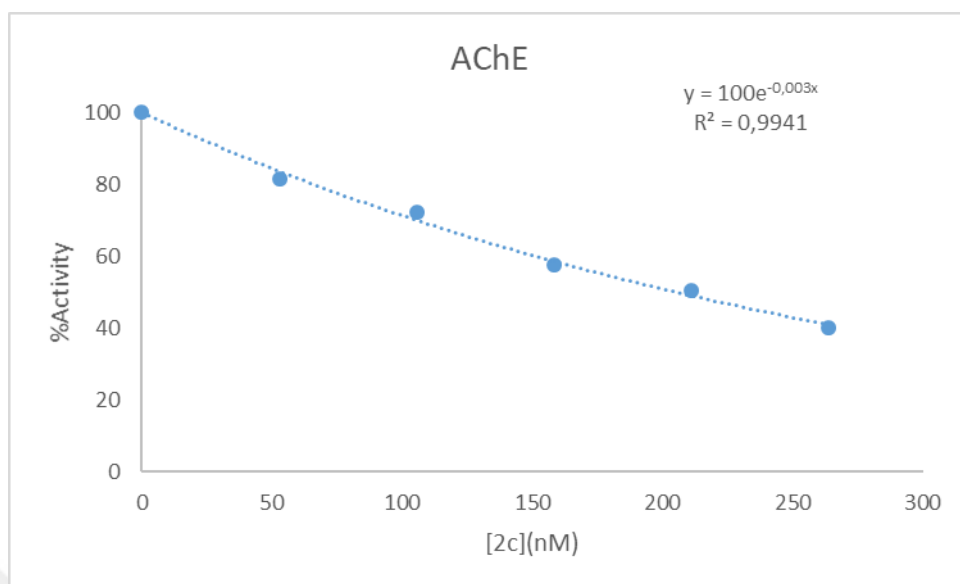
Bileşik **2a**'nın AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



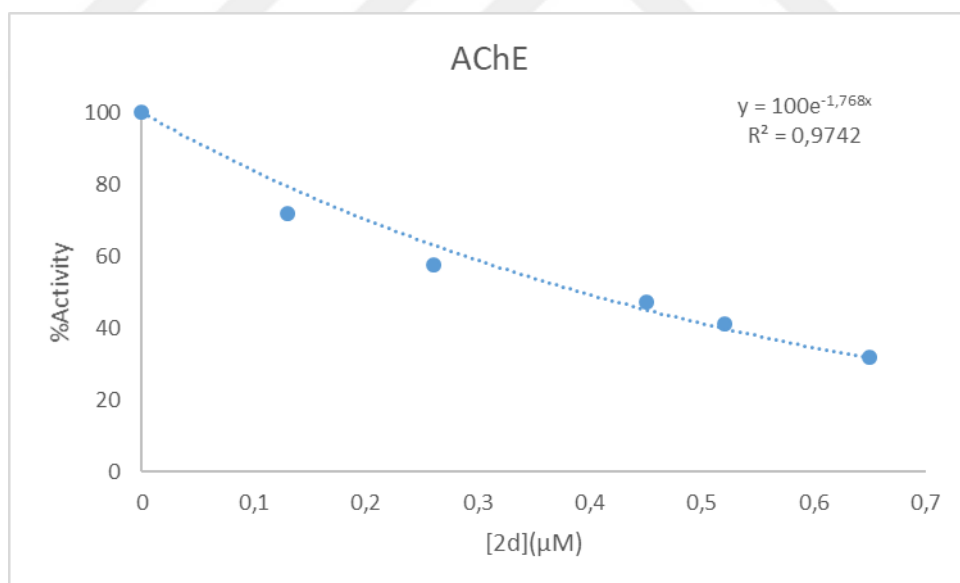
Bileşik **2b**'nin AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



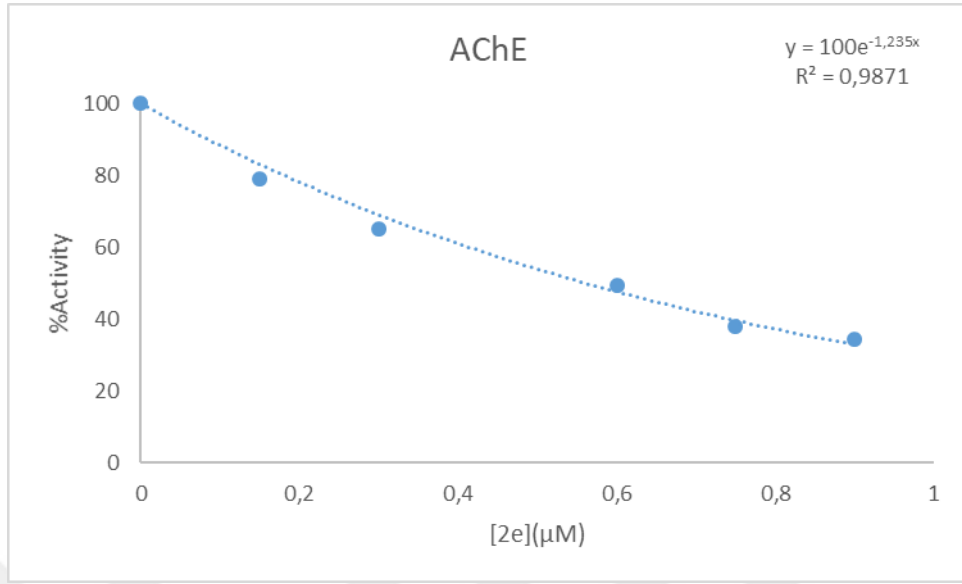
Bileşik **2c**'nin AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



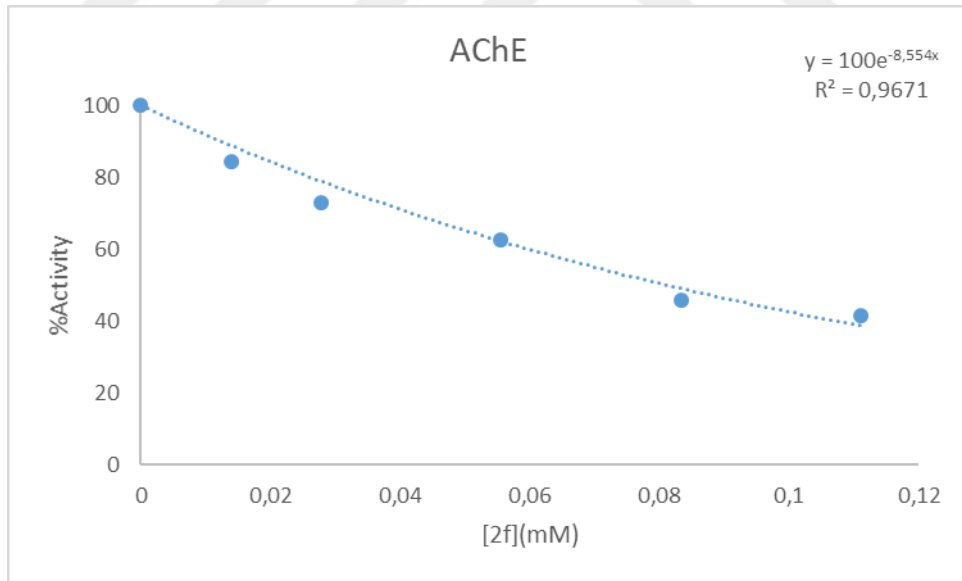
Bileşik **2d**'nin AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



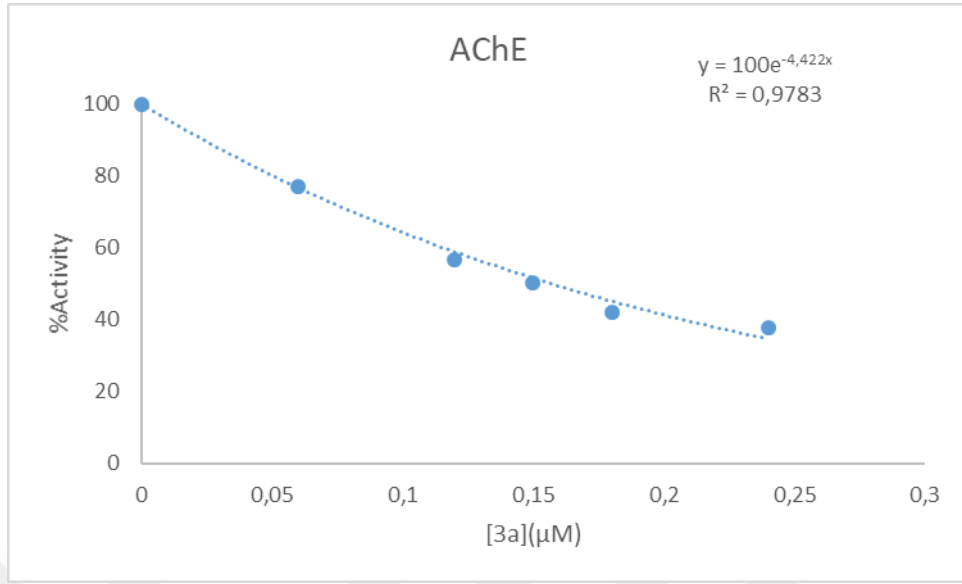
Bileşik **2e**'nin AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



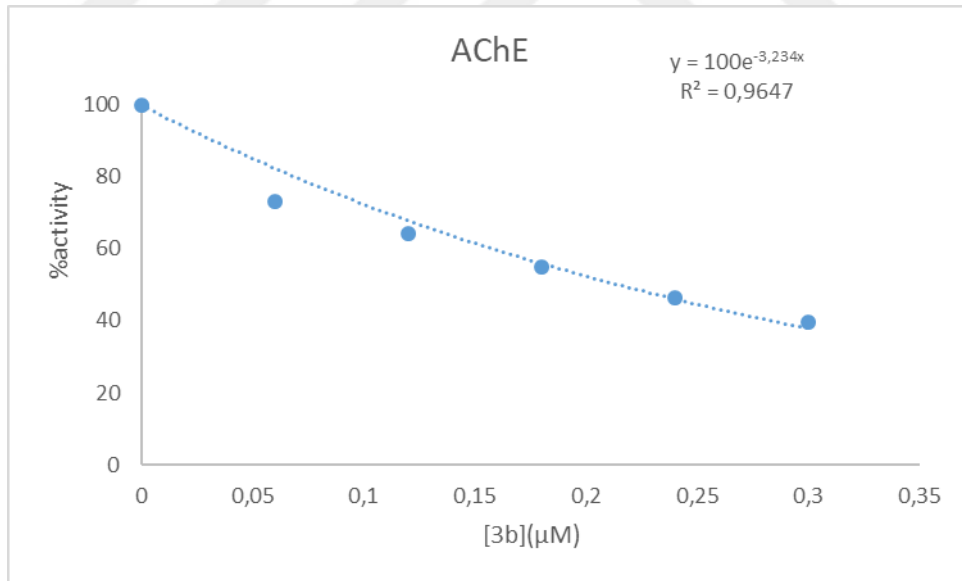
Bileşik **2f**'nin AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



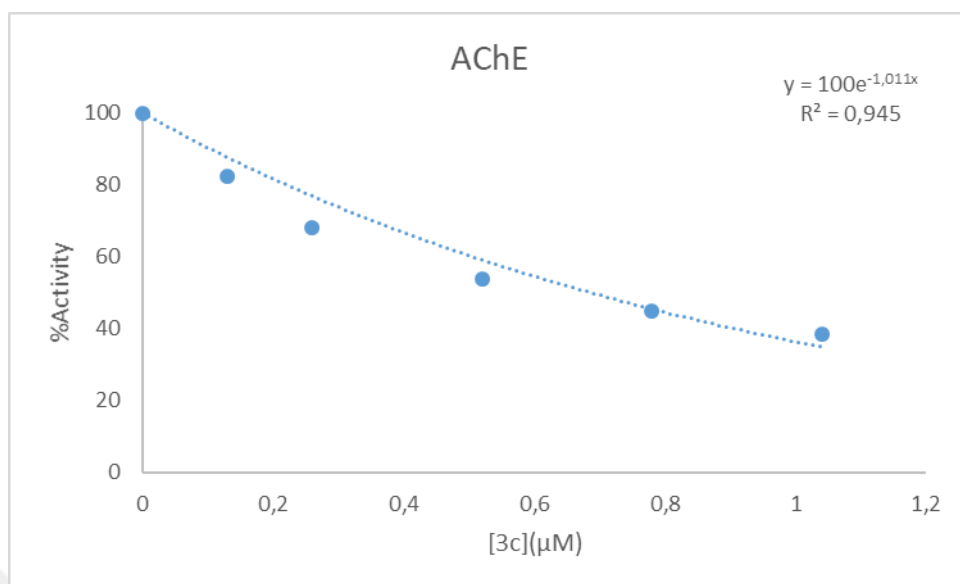
Bileşik **3a**'nın AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



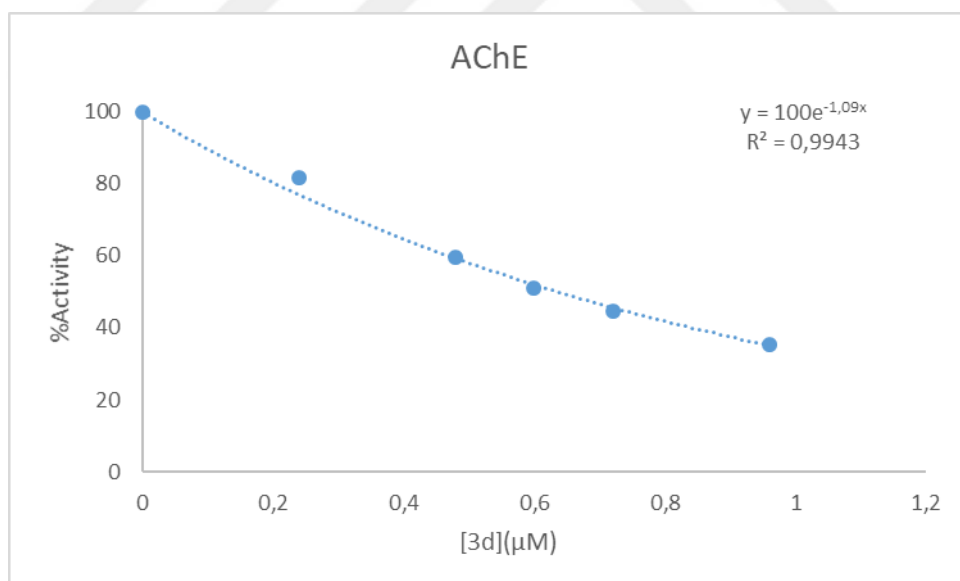
Bileşik **3b**'nin AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



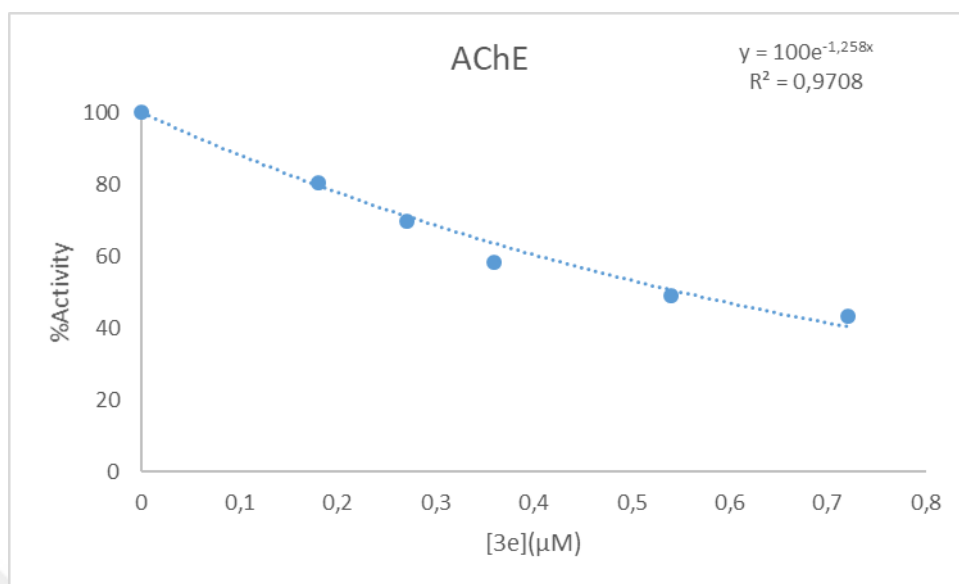
Bileşik **3c**'nin AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



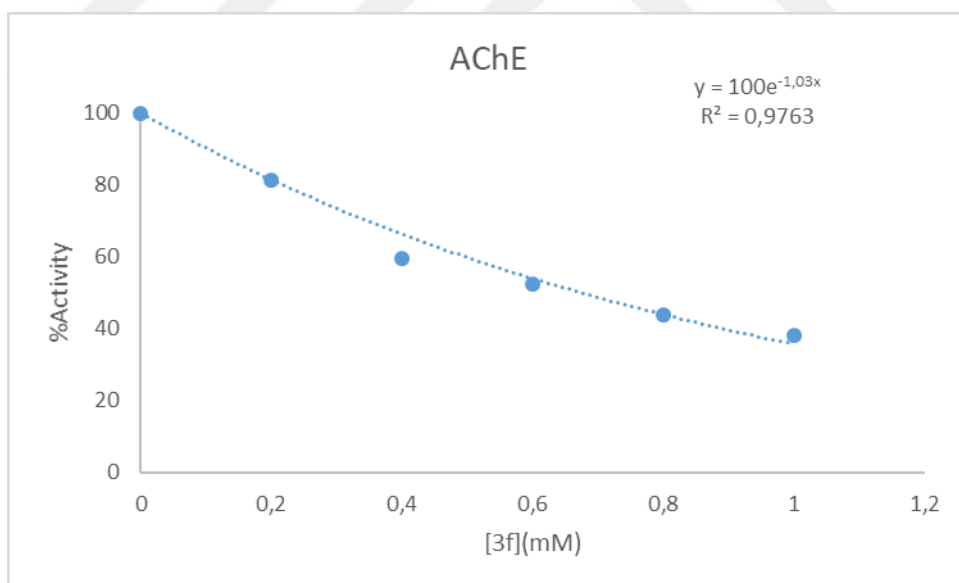
Bileşik **3d**'nin AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



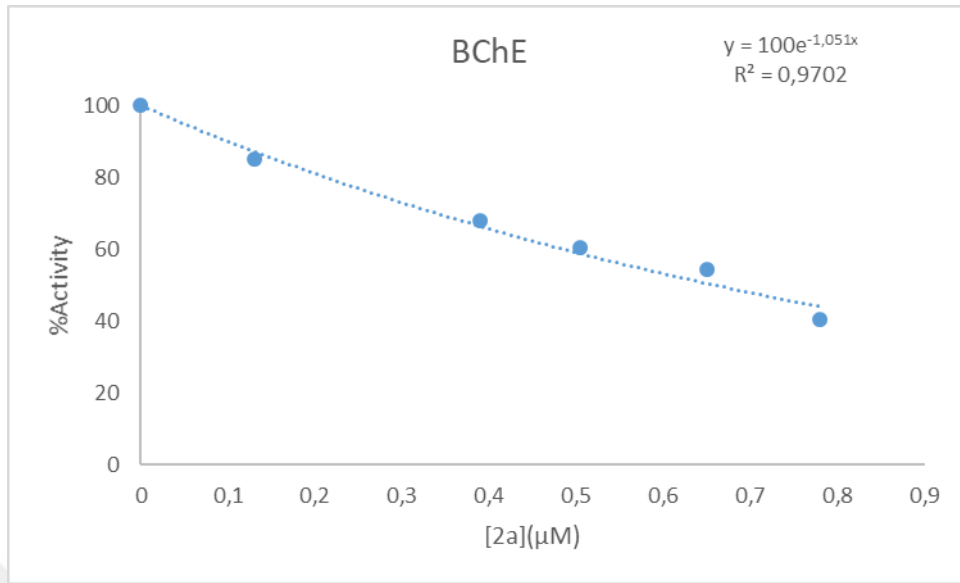
Bileşik **3e**'nin AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



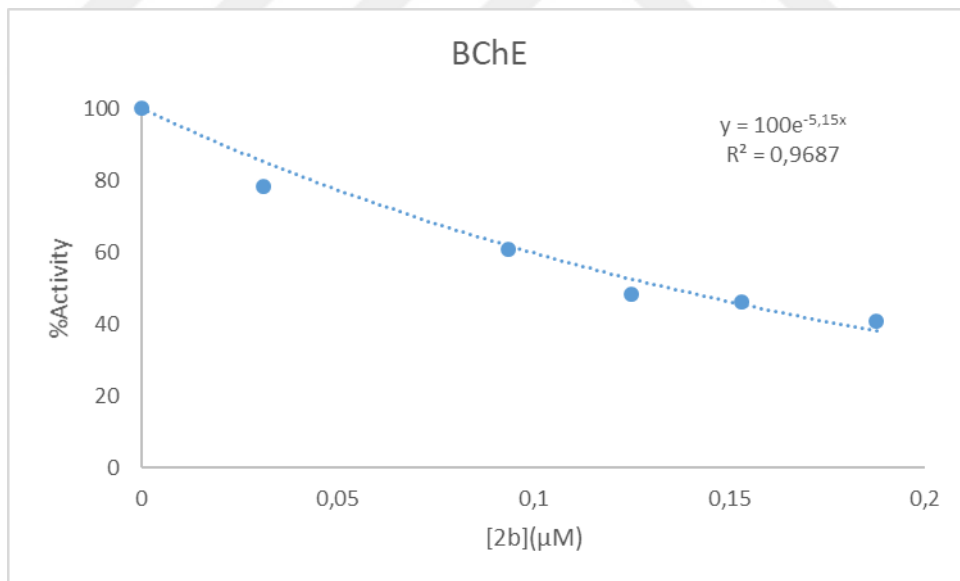
Bileşik **3f**'nin AChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



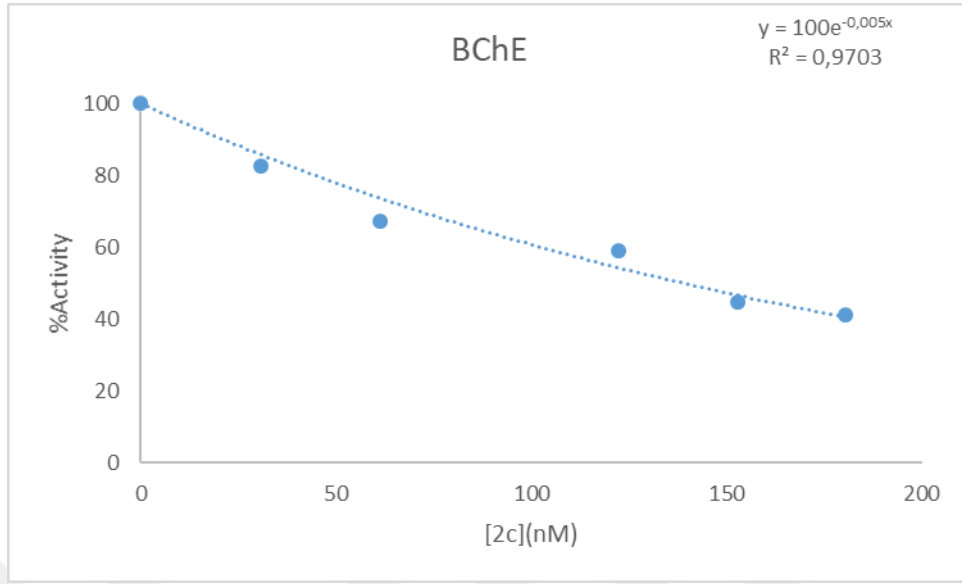
Bileşik **2a**'nın BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



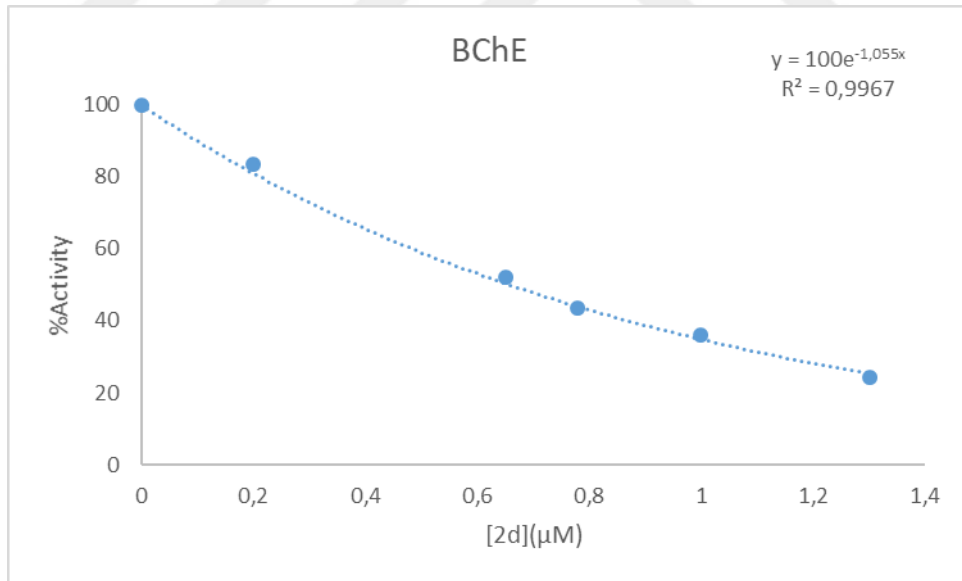
Bileşik **2b**'nin BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



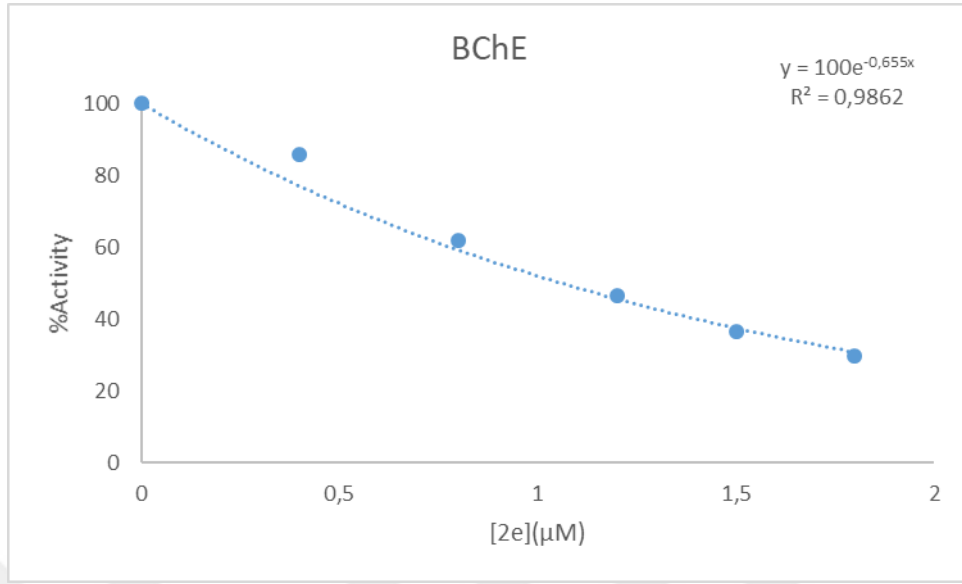
Bileşik **2c**'nin BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



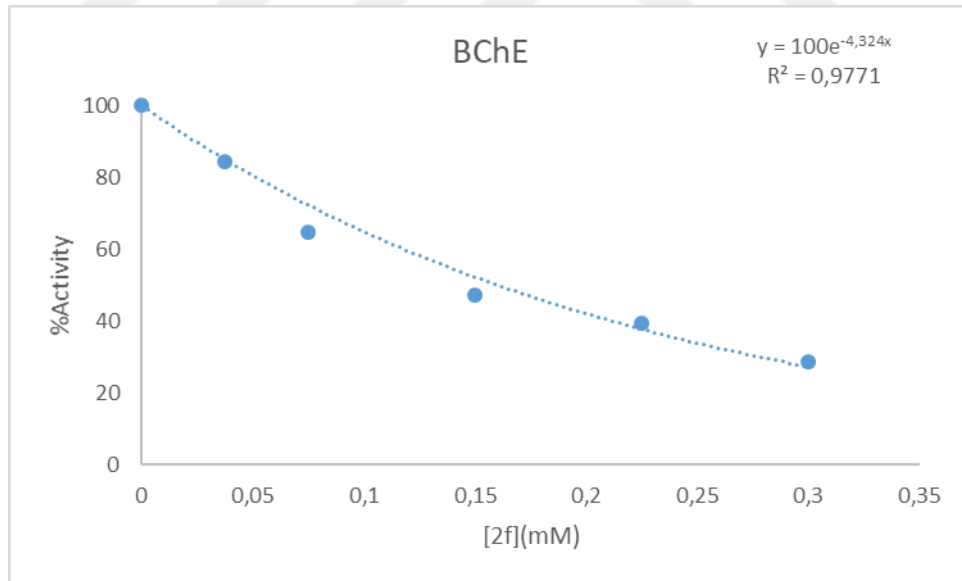
Bileşik **2d**'nin BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



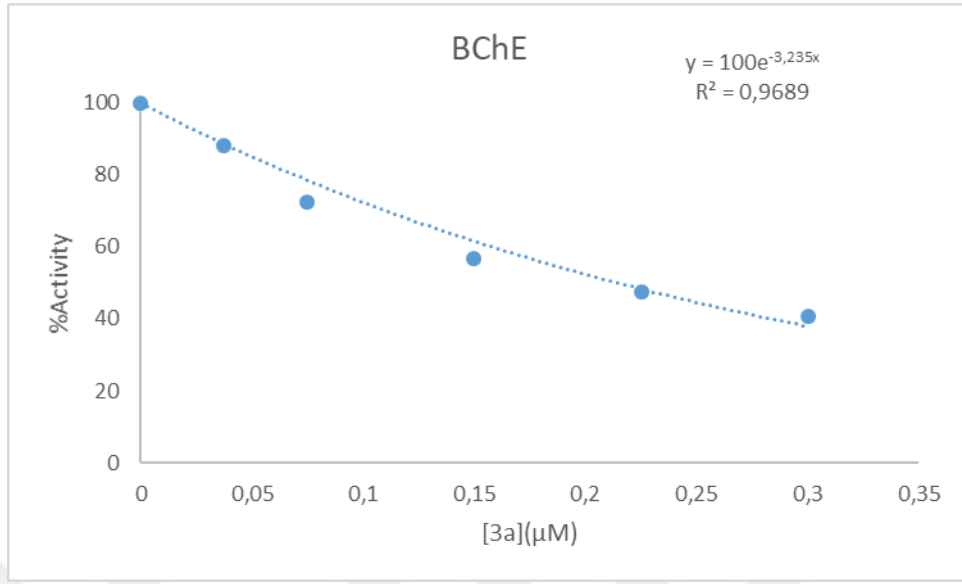
Bileşik **2e**'nin BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



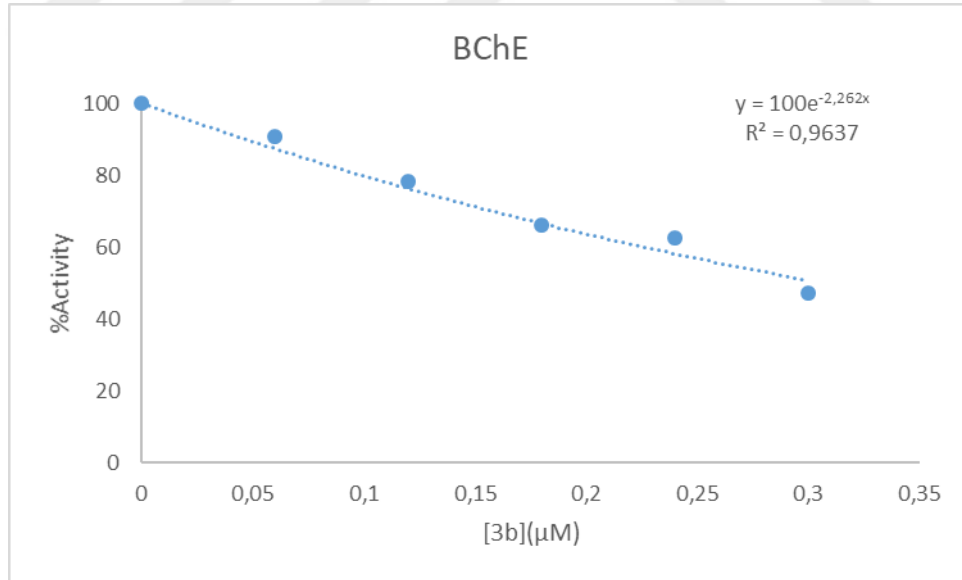
Bileşik **2f**'nin BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



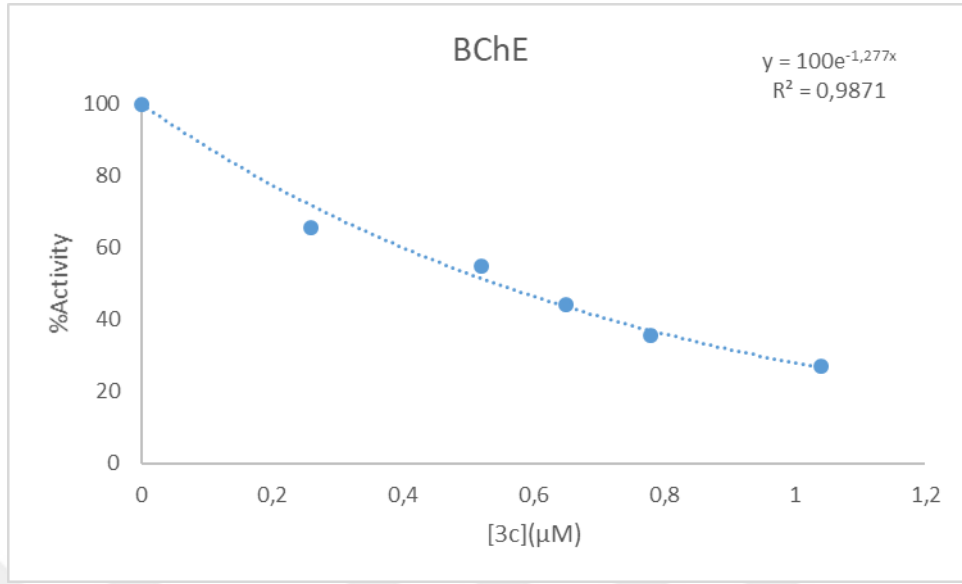
Bileşik **3a**'nın BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



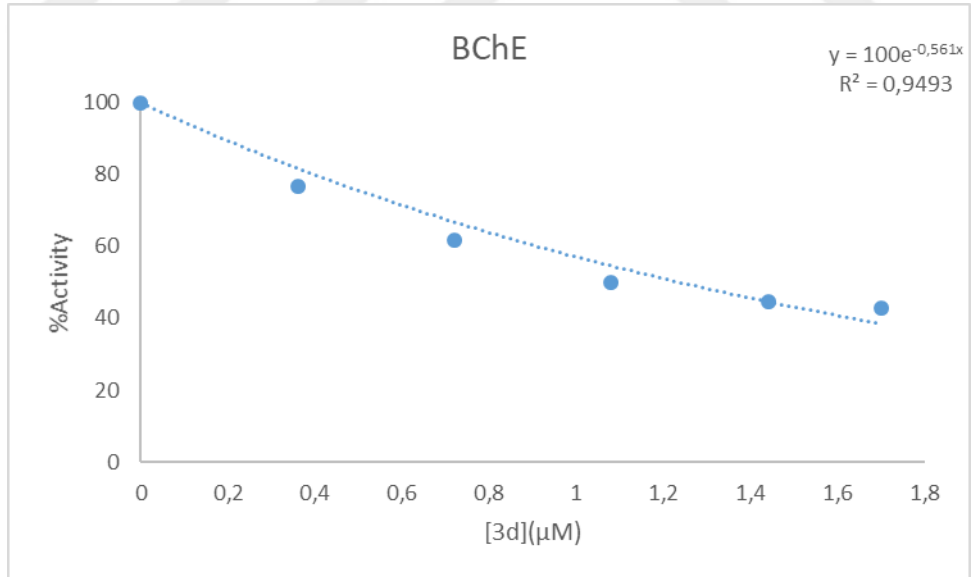
Bileşik **3b**'nin BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



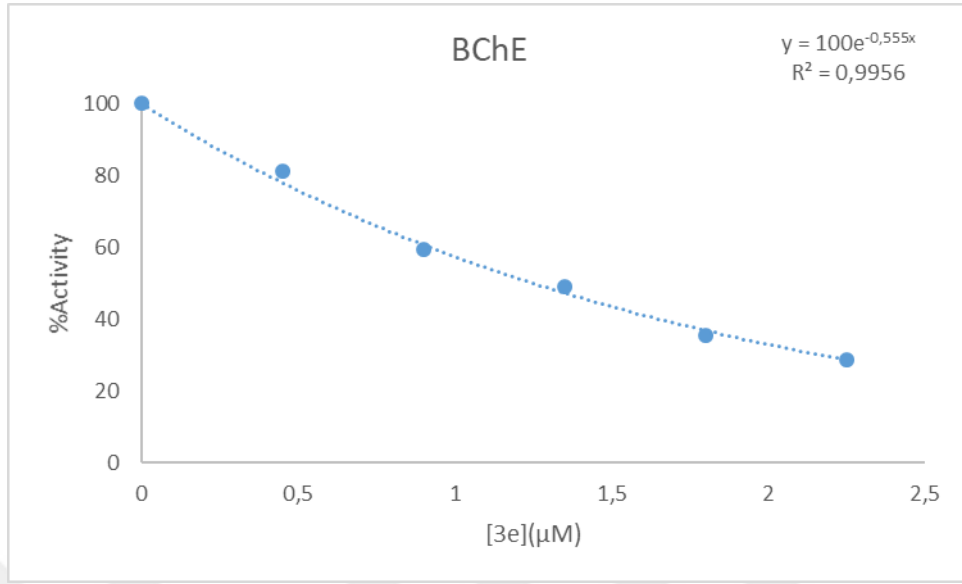
Bileşik **3c**'nin BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



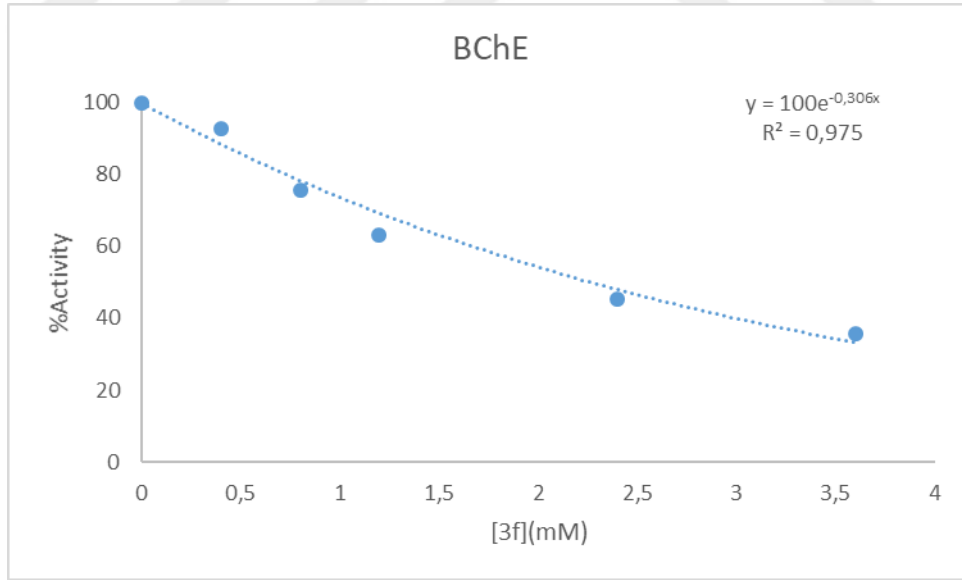
Bileşik **3d**'nin BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



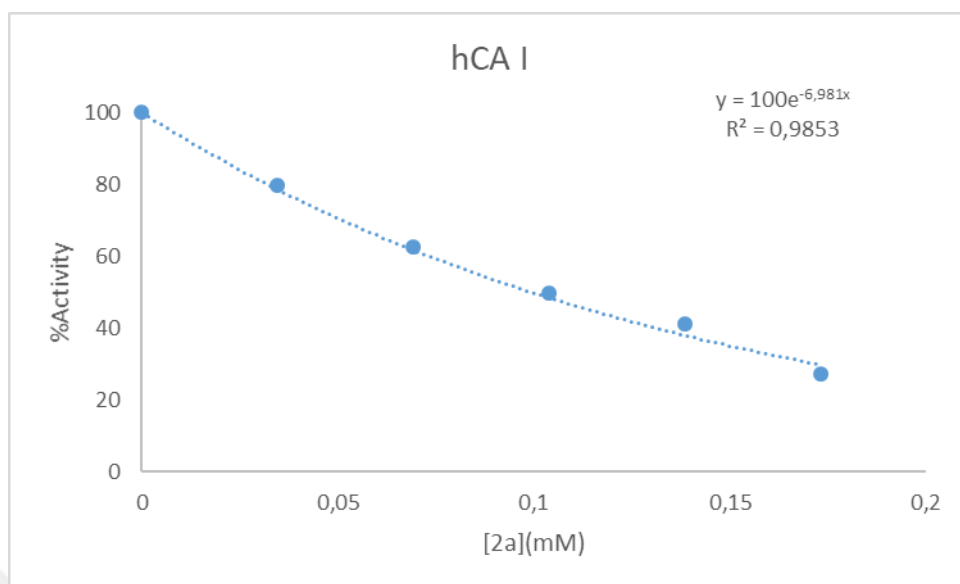
Bileşik **3e**'nin BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



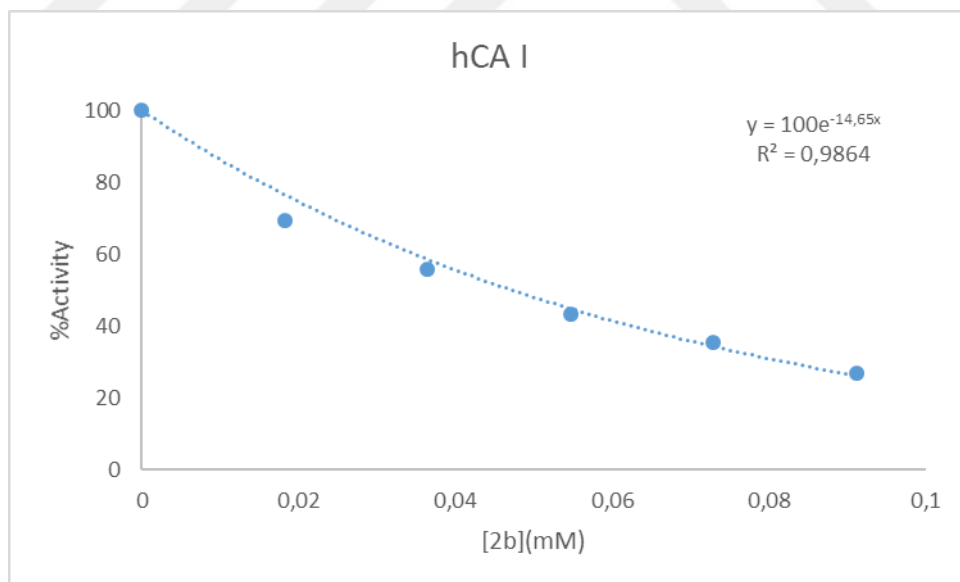
Bileşik **3f**'nin BChE üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



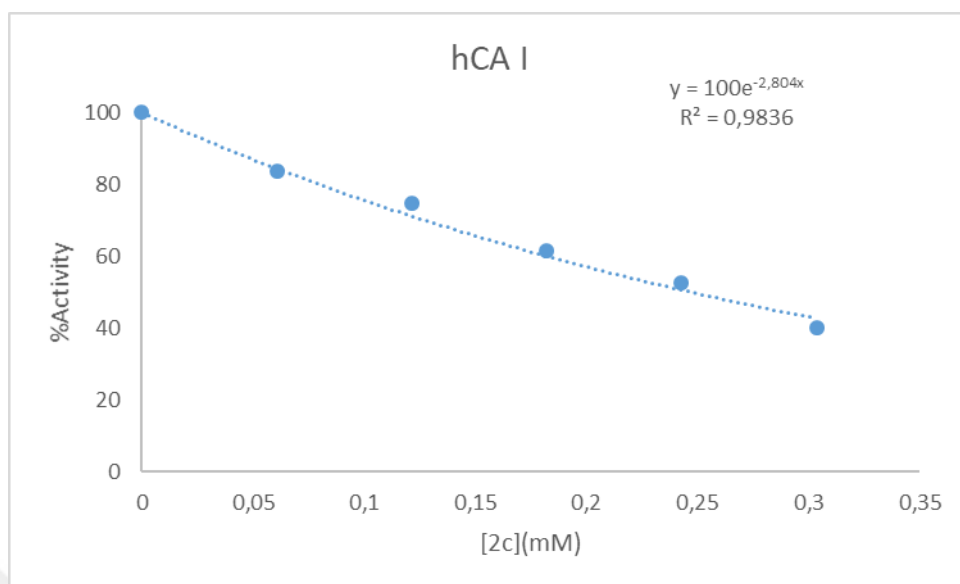
Bileşik **2a**'nın hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



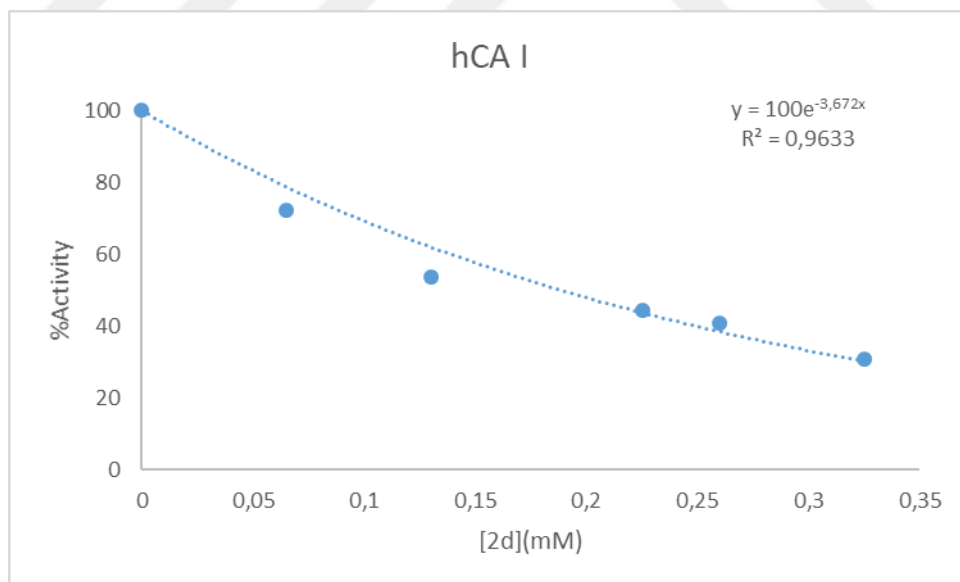
Bileşik **2b**'nin hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



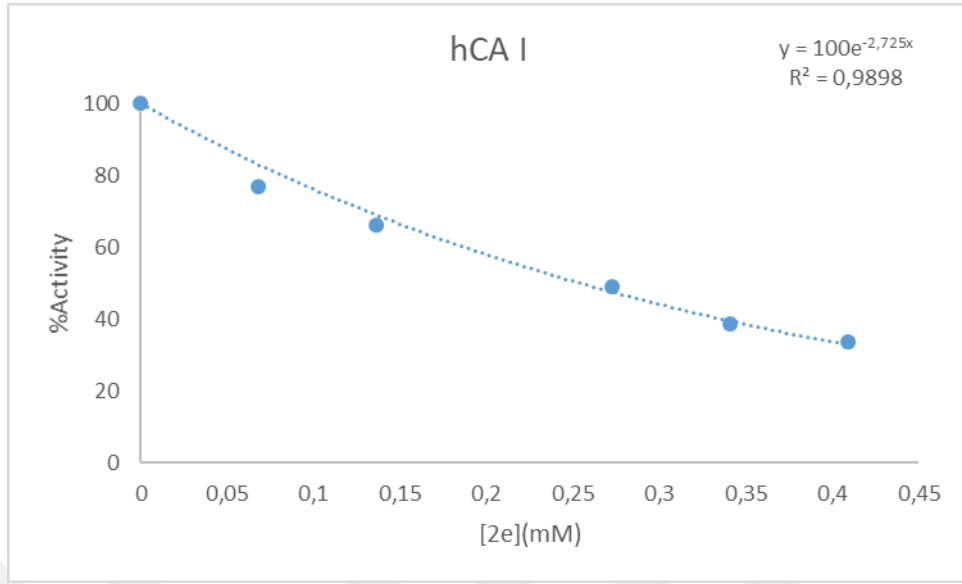
Bileşik **2c**'nin hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



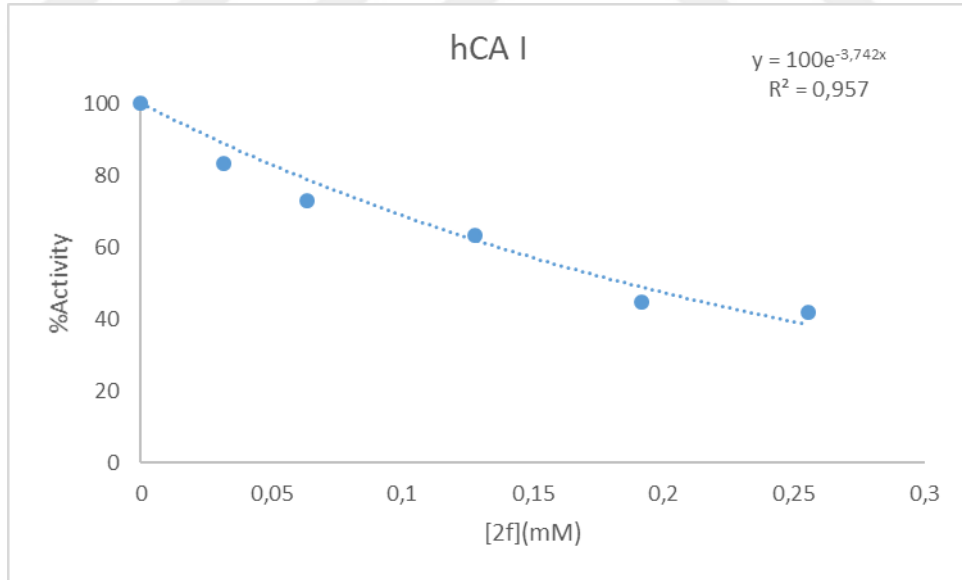
Bileşik **2d**'nin hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



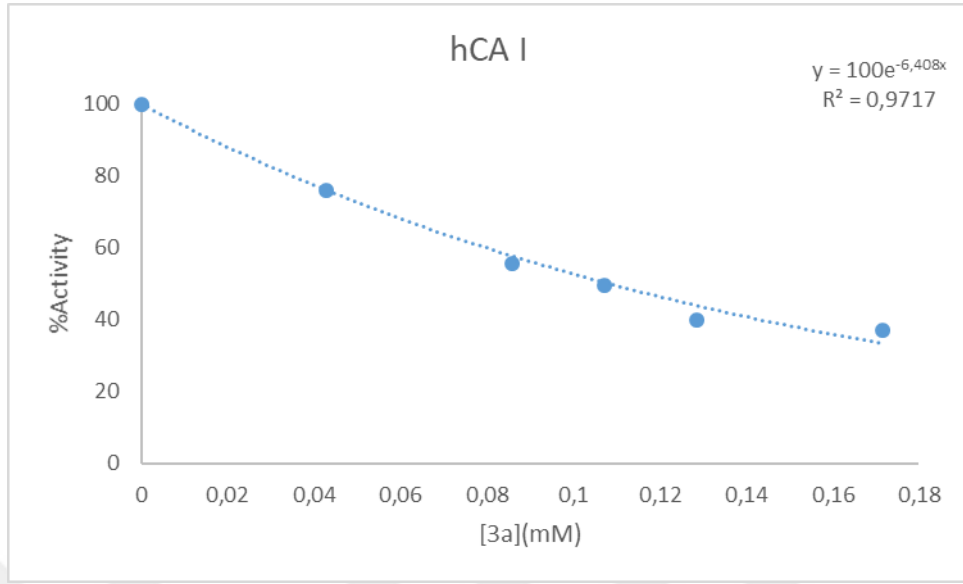
Bileşik 2e'nin hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



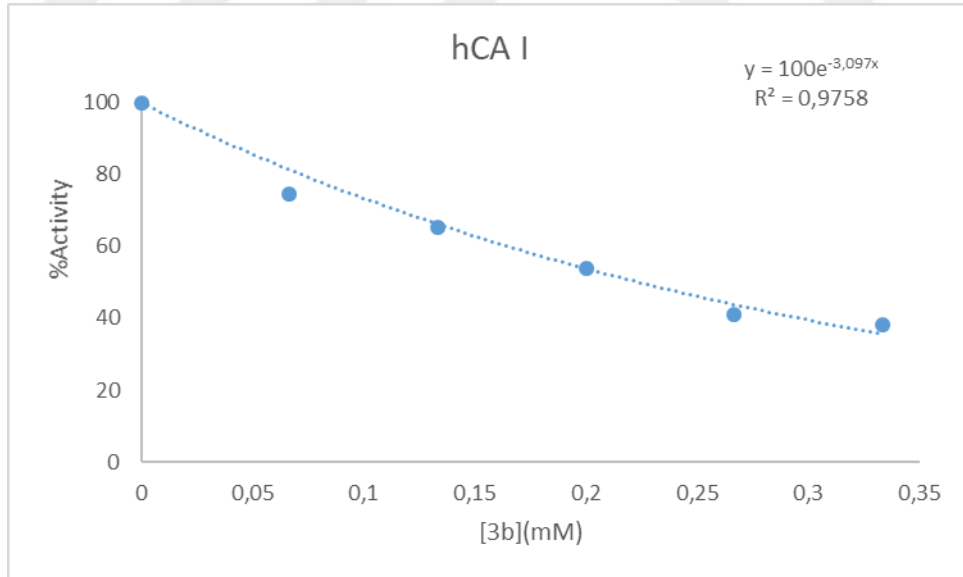
Bileşik 2f'nin hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



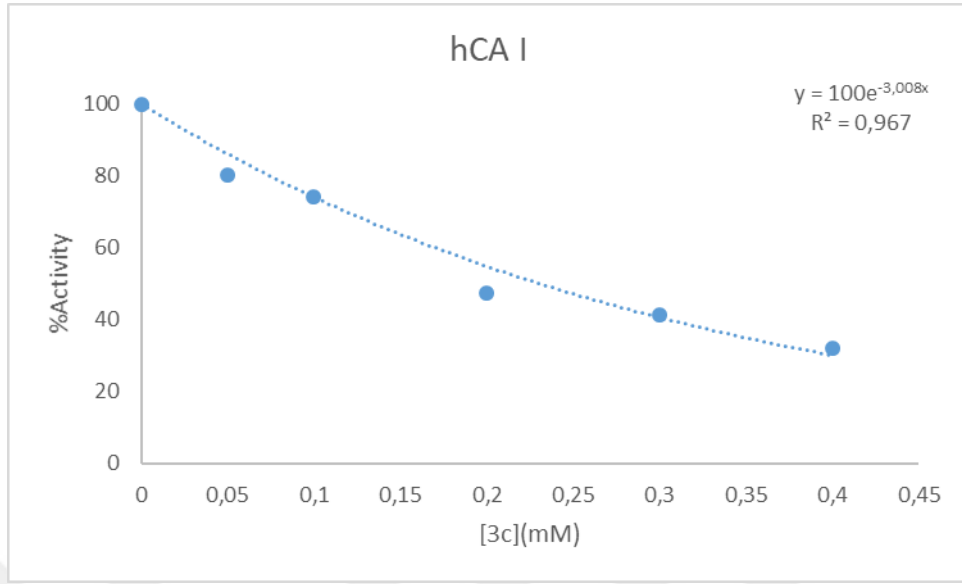
Bileşik **3a**'nın hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



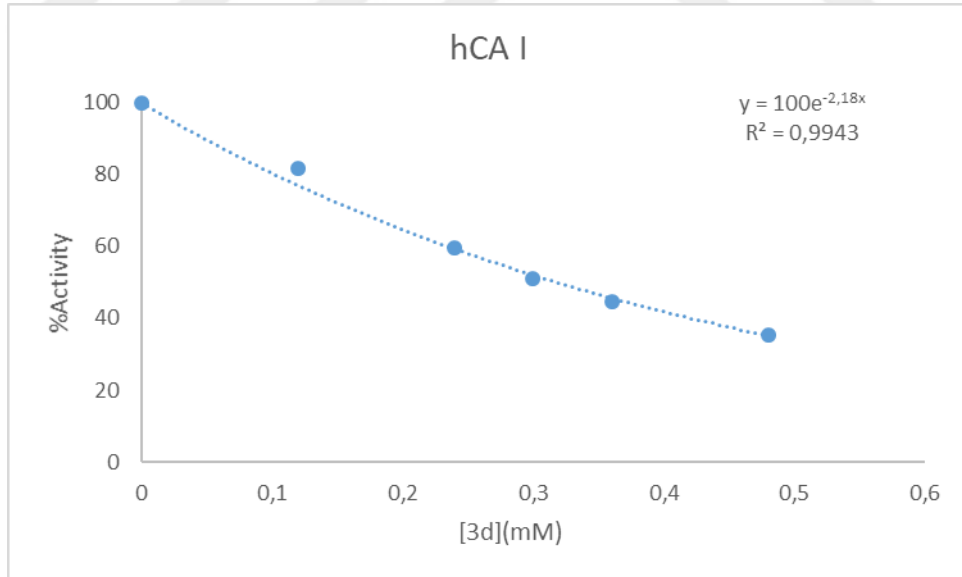
Bileşik **3b**'nin hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



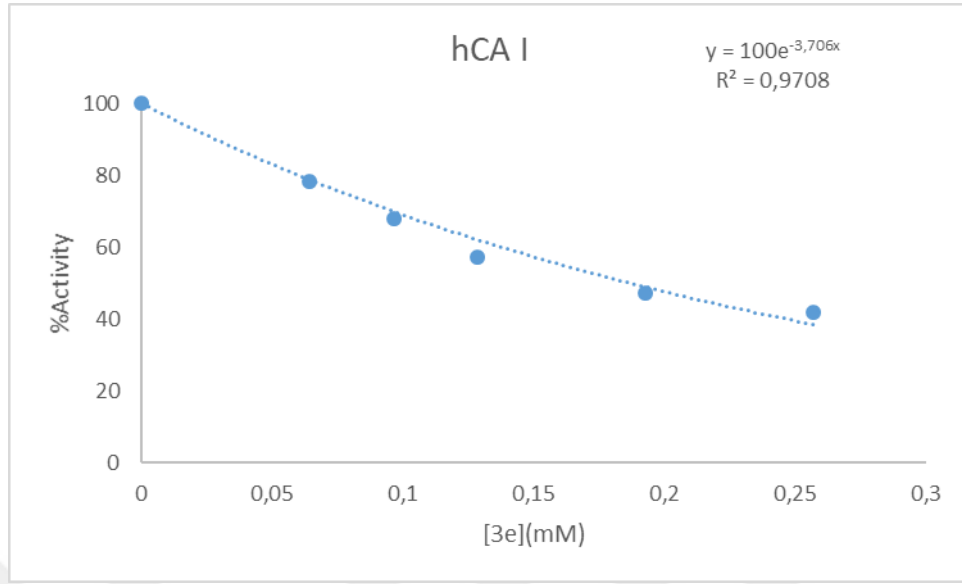
Bileşik **3c**'nin hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



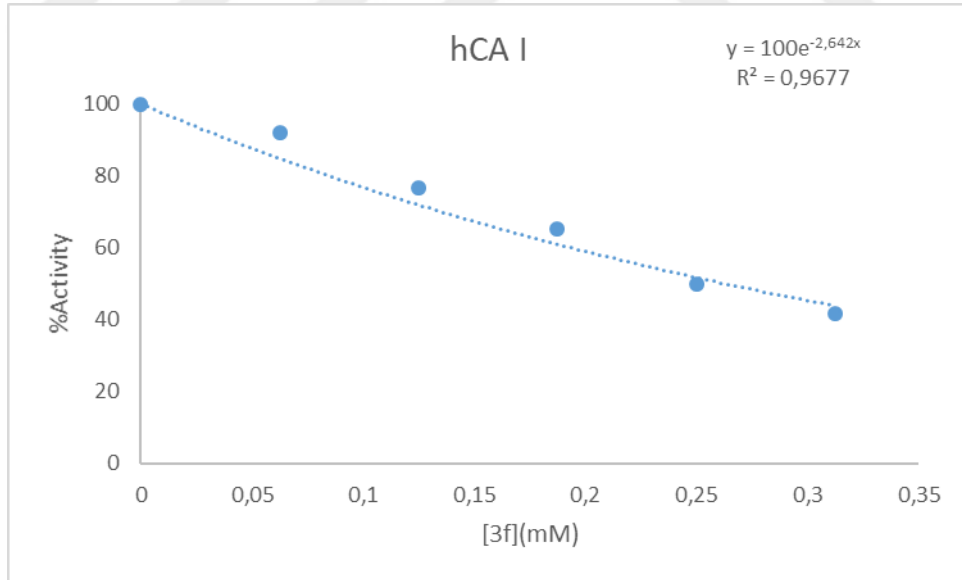
Bileşik **3d**'nin hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



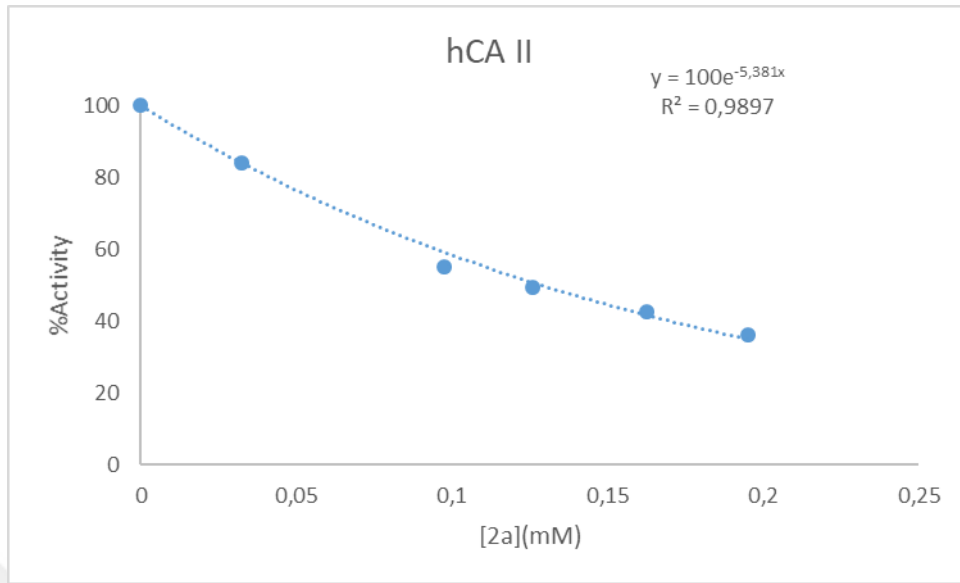
Bileşik **3e**'nin hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



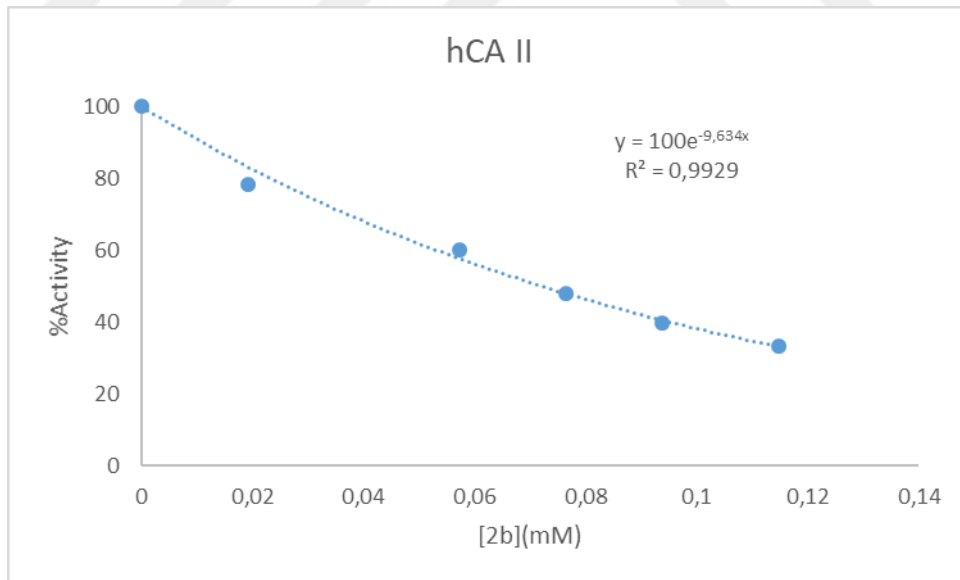
Bileşik **3f**'nin hCA I üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



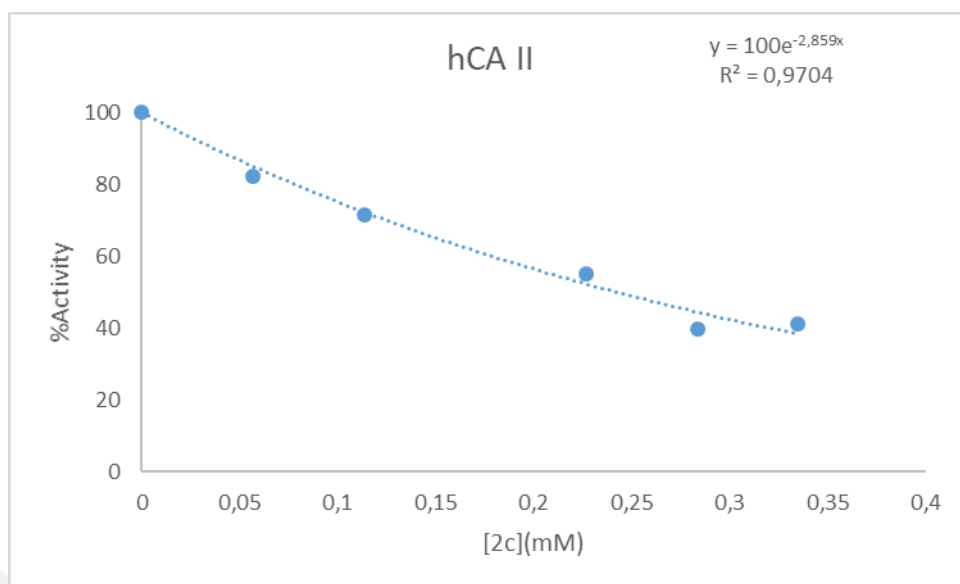
Bileşik **2a**'nın hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



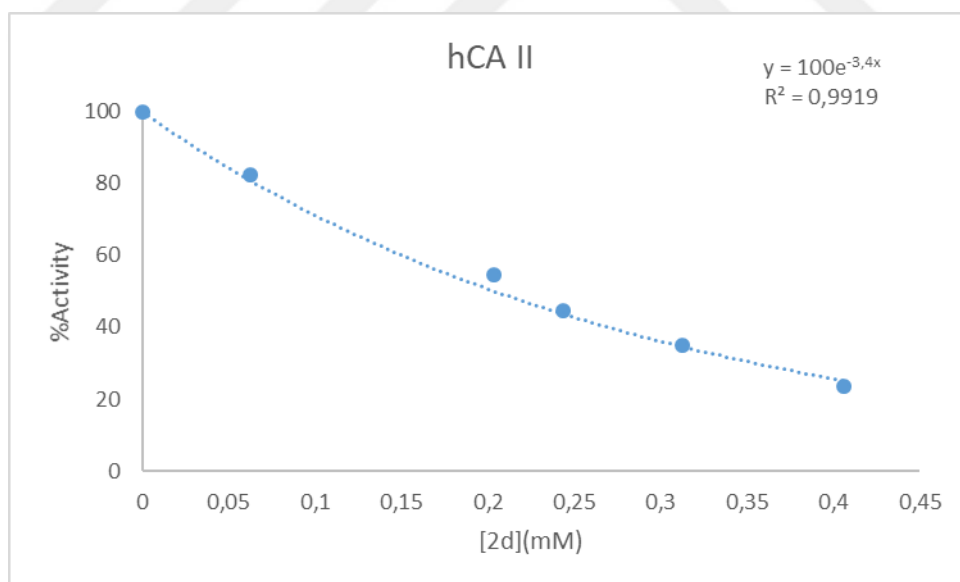
Bileşik **2b**'nin hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



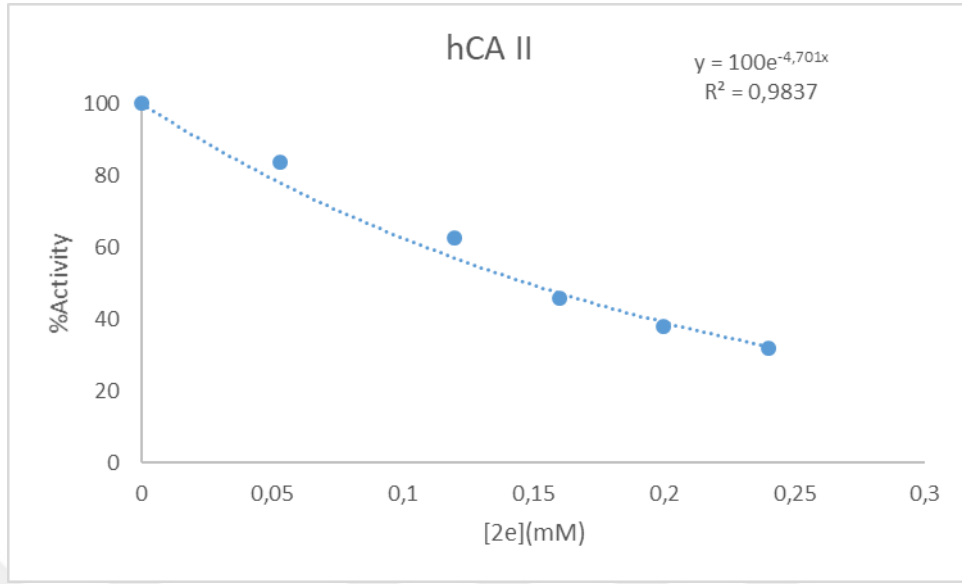
Bileşik **2c**'nin hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



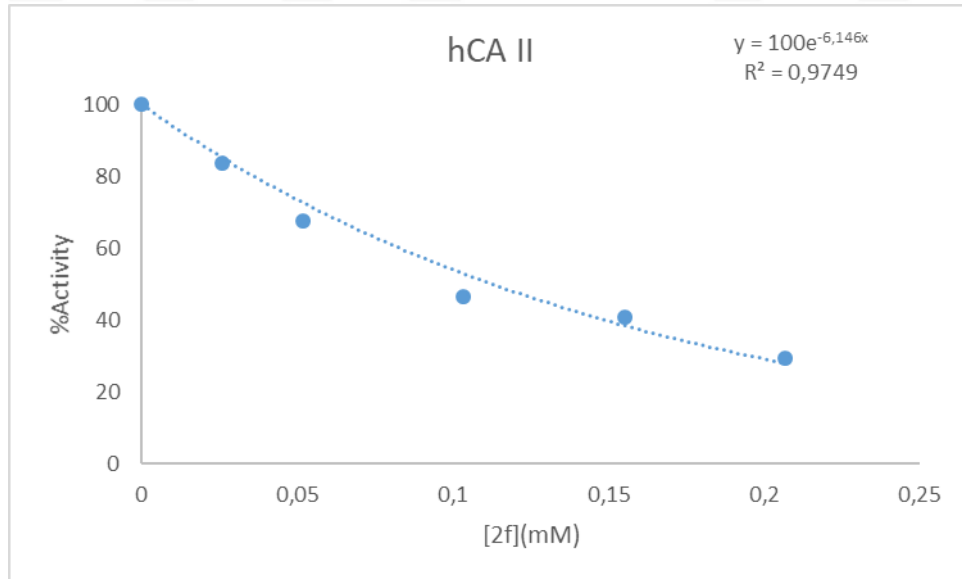
Bileşik **2d**'nin hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



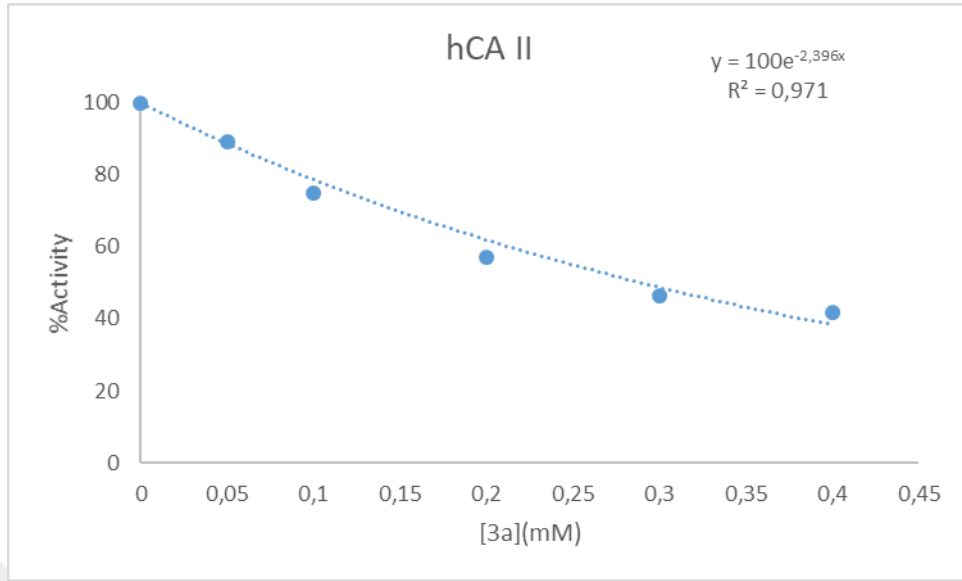
Bileşik 2e'nin hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



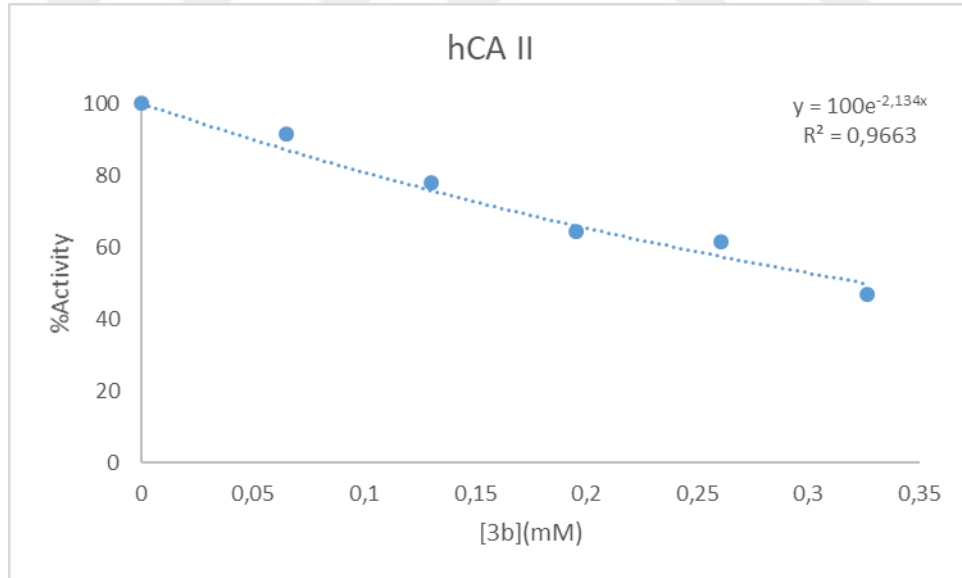
Bileşik 2f'nin hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



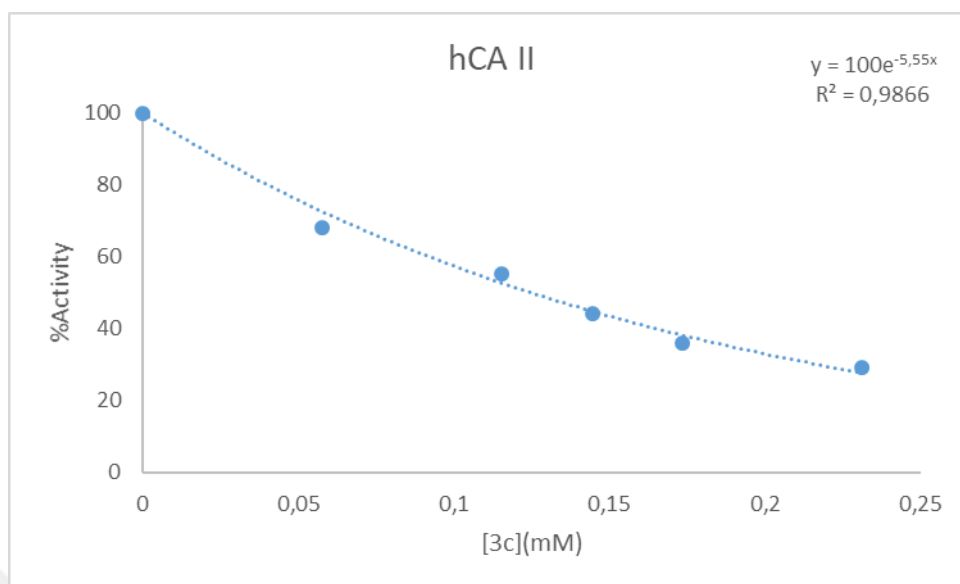
Bileşik **3a**'nın hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



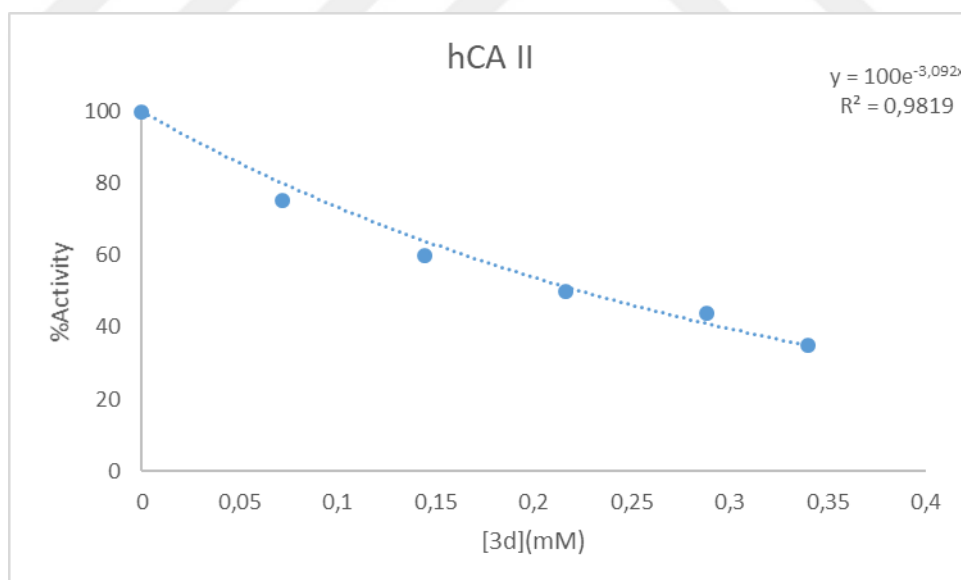
Bileşik **3b**'nin hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



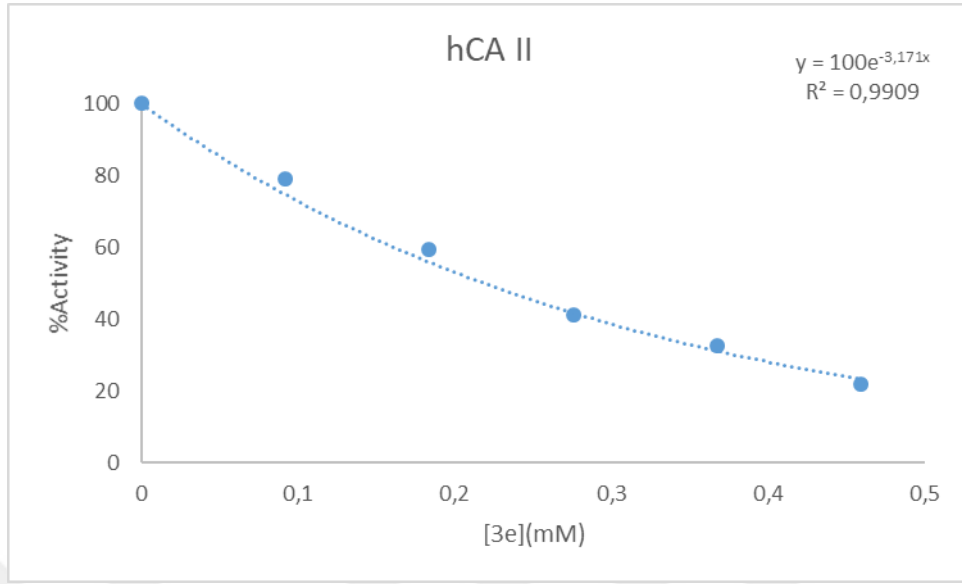
Bileşik **3c**'nin hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



Bileşik **3d**'nin hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



Bileşik **3e**'nin hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği



Bileşik **3f**'nin hCA II üzerindeki IC<sub>50</sub> grafiği

