



**YENİ TİYOSEMİKARBAZON TÜREVLERİNİN SENTEZLERİ VE DUAL
AChE ve MAO-B İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

AYŞE NUR UYTUN

Eskişehir, 2022

**YENİ TİYOSEMİKARBAZON TÜREVLERİNİN SENTEZLERİ VE DUAL
AChE ve MAO-B İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYŞE NUR UYTUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe Nur UYTUN'un "Yeni Tiyosemikarbazon türevlerinin sentezleri ve Dual AchE ve MAO-B inhibitör etkilerinin araştırılması" başlıklı tezi 24. 06. 2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI	
Üye	: Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY	
Üye	: Doç. Dr. Kaan KÜÇÜKOĞLU	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

YENİ TİYOSEMİKARBAZON TÜREVLERİNİN SENTEZLERİ VE DUAL ACHE VE MAO-B İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe Nur UYTUN

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI

Alzheimer hastalığı genellikle davranışsal semptomlar ile bilişsel ve fiziksel işlev kaybı ile karakterize ilerleyici ve patofizyolojisi tam olarak bilinmeyen ölümcül kronik bir hastalıktır. Demansın en yaygın nedenidir. Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu, β amiloid protein agregasyonu, nörotransmitterlerin azalması ve oksidatif stres mekanizmaları Alzheimer hastalığının nöropatolojik bulguları olarak tahmin edilmektedir ve semptomatik tedavisinde AChE inhibitörleri kullanılmaktadır.

Bu çalışmada; tiyosemikarbazon türevi 15 bileşik sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin analizi; $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve Mass spektroskopik yöntemleri analiz bulguları ile aydınlatılmıştır. Elde edilen bileşiklerin kolinesteraz ve monoaminoksidaz (MAO) enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin hiçbirisi butirilkolinesteraz (BChE) enzimi üzerinde önemli bir aktivite göstermemiştir. **3b**, **3c**, **3e**, **3k**, **3l**, **3m**, **3n** ve **3o** kodlu bileşikler; Asetikolinesteraz (AChE) ve **3f**, **3i**, **3k**, **3l**, **3m**, **3n**, **3o** kodlu bileşikler de MAO-B enzimleri üzerinde kayda değer inhibitör etki göstermişlerdir.

Tez kapsamında AChE ve MAO-B enzim aktif bölgelerinin yapısı moleküler modelleme çalışmaları ile aydınlatılmıştır. Seçilen bileşikler için *docking* çalışmaları yapılarak enzim aktif bölgesi ile bağlanma noktaları tespit edilmiştir. AChE ve MAO-B enzim aktif bölgeleri ile en güçlü etkileşim **3k** kodlu bileşikte gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Tiyosemikarbazon, Alzheimer, Monoaminoksidaz, Asetilkolinesteraz, Doking.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF NEW THIOSEMICARBAZONE DERIVATIVES AND INVESTIGATION OF DUAL ACHE AND MAO-B INHIBITORY EFFECTS

Ayşe Nur UYTUN

Department of Pharmaceutical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, Jun 2022

Supervisor: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI

Alzheimer's disease is a progressive and fatal chronic disease characterized by behavioral symptoms and loss of cognitive and physical function. It is the most common cause of dementia. Hyperphosphorylation of tau proteins, β amyloid protein aggregation, reduction of neurotransmitters and oxidative stress mechanisms are predicted as neuropathological findings of Alzheimer's disease and AChE inhibitors are used in the symptomatic treatment.

In this study; 15 thiosemicarbazone derivative compounds were synthesized. Analysis of the obtained compounds; ^1H -NMR, ^{13}C -NMR and Mass spectroscopic methods are illuminated by the analysis findings. The inhibition effect of the obtained compounds on cholinesterase and monoaminoxidase (MAO) enzymes was investigated. None of the synthesized compounds showed significant activity on butyrylcholinesterase (BChE) enzyme. **3b**, **3c**, **3e**, **3k**, **3l**, **3m**, **3n** and **3o** coded compounds; Acetylcholinesterase (AChE) and **3f**, **3i**, **3k**, **3l**, **3m**, **3n**, **3o** coded compounds also showed remarkable effects on MAO-B enzymes.

Within the scope of the thesis, the structure of AChE and MAO-B enzyme active sites has been clarified by molecular modeling studies. For the selected compounds, docking studies were performed and the enzyme active site and binding points were determined. It was revealed that the strongest interaction with AChE and MAO-B enzyme active sites was observed with the **3k** coded compound.

Keywords: Thiosemicarbazone, Alzheimer, Monoaminoxidase, Acetylcholinesterase, Docking.

TEŞEKKÜR

24 / 06 /2022

Hazırlamış olduğum bu yüksek lisans tezinin her aşamasında değerli bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşıp, yardım ve yönlendirmeleriyle desteğini esirgemeyen tez danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI'ya

Her zaman sevgisini hissettiğim tezimi tamamlamamda büyük emeği olan, laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olup bilgisini ve birikimlerini benimle paylaşan hem mesleki hem de özel hayatımda desteğini, ilgisini her zaman hissettiğim değerli hocam Araş. Gör. Dr. Derya OSMANİYE'ye

Yüksek lisans çalışmalarım süresince her türlü desteklerini hissettiğim sevgili hocalarım Doç. Dr. Ulviye ACAR ÇEVİK'e, Doç. Dr. Begüm Nurpelin SAĞLIK'a, Öğr. Gör. Serkan LEVENT'e ve Öğr. Gör. Asaf Evrim EVREN'e,

Hayatımın her evresinde ve her koşulda yanımda olan, sevgi ve inançlarıyla beni bugüne getiren canım annem Sedef UYTUN'a ve babam Ayhan UYTUN'a, her zaman sevgi ve bağlılıklarıyla yanımda olan kardeşlerim Orhun Kani UYTUN ve Zeynep Eda UYTUN'a teşekkür ederim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

24. 06. 2022

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”nda tarandığını beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkabilecek tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ayşe Nur UYTUN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BAŞLIĞI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	3
2.1.1. Alzheimer hastalığının tanımı.....	3
2.1.2. Alzheimer hastalığının belirtileri.....	3
2.1.3. Alzheimer hastalığının nedenleri ve tedavisi	4
2.1.4. Kolinesteraz enzimi ve inhibitörleri	7
2.1.5. AChE enziminin kristal yapısı ve tedavide kullanılan AChE inhibitörleri	8
2.1.5.1. Donepezil	8
2.1.5.2. Rivastigmin	9
2.1.5.3. Galantamin.....	9
2.1.5.4. Takrin	10
2.1.6. MAO enzimi ve inhibitörleri.....	10
2.1.6.1. Selejilin	11

2.1.7. NMDA reseptör antagonistleri	11
2.1.7.1. Memantin	12
2.2. Antikolinesteraz ve MAO-B İnhibitör Aktivite Çalışmalarına Konu Olmuş Tiyosemikarbazon Türevleri.....	12
2.3. Antikolinesteraz Aktivite Çalışmalarına Konu Olmuş Piperazin Türevleri.....	13
3. GEREÇLER.....	16
3.1. Kullanılan Maddeler.....	16
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	1
4. YÖNTEMLER	2
4.1. Sentez Çalışmaları.....	2
4.1.1. 4-Sübstitüe benzaldehit türevlerinin sentezi (1a-1c) (Yöntem A).....	2
4.1.2. Tiyosemikarbazid türevlerinin sentezi (2a-2e) (Yöntem B)	2
4.1.3. Tiyosemikarbazon türevlerinin sentezi (3a-3o) (Yöntem C).....	2
4.2. İTK Çalışmaları	3
4.3. Erime Noktalarının Tespiti	4
4.4. ¹ H-NMR Spektrumlarının Alınması.....	4
4.5. ¹³ C-NMR Spektrumlarının Alınması.....	4
4.6. Kütle Spektrumlarının Alınması	4
4.7. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	4
4.7.1. Antikolinesterazaktivite çalışmaları.....	5
4.7.1.1. AChE ve BChEenzim solüsyonunun hazırlanması	5
4.7.1.2. Asetiltiyokolinodür (ATC) çözeltisinin hazırlanması (0.075 M).....	5
4.7.1.3. Bütiriltiyokolinodür (BTC) çözeltisinin hazırlanması (0.075 M).....	5
4.7.1.4. 5-5-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) solüsyonunun hazırlanması (0.01 M)	5

4.7.1.5. Fosfat tamponunun hazırlanması (pH=8.0)	6
4.7.1.6. Test bileşiklerin çözeltilerinin hazırlanması	6
4.7.2. AChE ve BChE inhibisyon çalışması	6
4.7.3. Monoamin oksidaz enzim aktivite çalışmaları	7
4.8. Moleküler Modelleme Çalışmaları	8
5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR	9
5.1. Sentez Çalışmaları.....	9
5.1.1. <i>N</i> -Etil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1- karbotiyoamid (3a)	9
5.1.2. <i>N</i> -Alil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1- karbotiyoamid (3b)	13
5.1.3. <i>N</i> -fenil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazine-1- karbotiyoamid (3c)	17
5.1.4. <i>N</i> -(4-Metoksifenil)-2-(4-(4-fenilpiperazin-1- il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3d)	21
5.1.5. <i>N</i> -(4-Klorofenil)-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin- 1-karbotiyoamid (3e)	25
5.1.6. <i>N</i> -Etil-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1- karbotiyoamid (3f)	29
5.1.7. <i>N</i> -Alil-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1- karbotiyoamid (3g)	33
5.1.8. 2-(4-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)benziliden)- <i>N</i> -fenilhidrazin- 1-karbotiyoamid (3h).....	37
5.1.9. 2-(4-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)benziliden)- <i>N</i> -(4- metoksifenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (3i).....	41
5.1.10. <i>N</i> -(4-klorofenil)-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1- il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3j)	45
5.1.11. <i>N</i> -Etil-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin- 1-karbotiyoamid (3k).....	49

5.1.12. <i>N</i> -Alil-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3l)	53
5.1.13. 2-(4-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)- <i>N</i> -fenilhidrazin-1-karbotiyoamid (3m)	57
5.1.14. 2-(4-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)- <i>N</i> -(4-metoksifenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (3n).....	61
5.1.15. <i>N</i> -(4-Klorofenil)-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3o).....	65
5.2. Sentez Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	69
5.3. Spektral Verilerin Değerlendirilmesi	70
5.3.1. ¹ H-NMR spektrumlarının değerlendirilmesi	70
5.3.2. ¹³ C-NMR spektrumlarının değerlendirilmesi.....	71
5.3.3. Kütle spektrumlarının değerlendirilmesi	71
5.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarının Değerlendirilmesi	71
5.4.1. AChE ve BChE enzim aktivite çalışmalarının değerlendirilmesi	71
5.4.2. MAO-A ve MAO-B enzim aktivite çalışmalarının değerlendirilmesi	72
5.5. Moleküler Modelleme Çalışmalarının Değerlendirilmesi	75
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	85
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 5.1. Elde edilen bileşiklerin 10^{-3} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarında AChE, BChE, MAO-A ve MAO-B enzimine karşı % inhibisyon oranları ve IC_{50} (μ M) değerleri.....	73
---	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. AChE inhibitörlerinin fonksiyonları	7
Şekil 2.2. Donepezil İlacının Kimyasal Yapısı.....	8
Şekil 2.3. Rivastigmin'in Kimyasal Yapısı	9
Şekil 2.4. Galantaminin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.5. Takrinin kimyasal yapısı	10
Şekil 2.6. Selejilin'in kimyasal yapısı	11
Şekil 2.7. Memantin'in kimyasal yapısı	12
Şekil 2.8. (E)-2-((4,6-dimetoksi-3-fenil-1 <i>H</i> -indol-7-yl)metilen) - <i>N</i> -metilhidrazin-1-karbotiyoamid	12
Şekil 2.9. 2-(Benzofuran-2-il metilen)- <i>N</i> -(2-metoksietil) hidrazin-1-karbotiyoamid.....	13
Şekil 2.10. 2-((2-Kloro-6-metoksi kinolin-3-il)metilen) - <i>N</i> -(2-morfolinoetil) hidrazinkarbotiyoamid	13
Şekil 2.11. 3-Asetilkumarin tiyosemikarbazon	13
Şekil 2.12. 2,2'-(Piridin-2,5-diildikarbonil)bis[<i>N</i> -(<i>p</i> -metoksifenil) hidrazin karbotiyoamid	13
Şekil 2.13. <i>N</i> -(2-(4-Benzilpiperazin-1-il)etil)-2-(4-kloro-2-nitrofenoksi) asetamid	14
Şekil 2.14. 2-[(3-Kloro-4-florofenil) amino]-2-oksoetil 4-fenilpiperazin-1-karbotiyoat	14
Şekil 2.15. 3-(2-Hidroksi-4,6-dimetoksifenil)-3-oksopropil piperazin-1-karboksilat	14
Şekil 2.16. {4-[2-(Dimetilamino)etil]piperazin-1-il} {4-[1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -benzo[d]imidazol-2-il]fenil}	15
Şekil 2.17. 1-Benzil-4-(2-(4-(4, 5-diphenil-1 <i>H</i> -imidazol-2-il) fenoksi)etil)piperazin	15
Şekil 4.1. 4-Süstitüe benzaldehyt türevlerinin (1a-1c) sentezi.....	2
Şekil 4.2. Tiyosemikarbazid türevlerinin (2a-2e) sentezi.....	2
Şekil 4.3. Tiyosemikarbazon türevlerinin (3a-3o) sentezi	3

Şekil 5.1. <i>N</i> -Etil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1	
-karbotiyoamid (3a).....	9
Şekil 5.2. ¹ H-NMR spektrumu (3a).....	10
Şekil 5.3. ¹³ C-NMR spektrumu (3a).....	11
Şekil 5.4. HRMS spektrumu (3a)	12
Şekil 5.5. <i>N</i> -Allil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)	
hidrazin-1-karbotiyoamid (3b).....	13
Şekil 5.6. ¹ H-NMR spektrumu (3b).....	14
Şekil 5.7. ¹³ C-NMR spektrumu (3b)	15
Şekil 5.8. HRMS spektrumu (3b).....	16
Şekil 5.9. <i>N</i> -fenil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazine	
-1-karbotiyoamid (3c)	17
Şekil 5.10. ¹ H-NMR spektrumu (3c)	18
Şekil 5.11. ¹³ C-NMR spektrumu (3c).....	19
Şekil 5.12. HRMS spektrumu (3c)	20
Şekil 5.13. <i>N</i> -(4-Metoksifenil)-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)	
benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3d).....	21
Şekil 5.14. ¹ H-NMR spektrumu (3d).....	22
Şekil 5.15. ¹³ C-NMR spektrumu (3d)	23
Şekil 5.16. HRMS spektrumu (3d).....	24
Şekil 5.17. <i>N</i> -(4-Klorofenil)-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)	
benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3e)	25
Şekil 5.18. ¹ H-NMR spektrumu (3e)	26
Şekil 5.19. ¹³ C-NMR spektrumu (3e).....	27
Şekil 5.20. HRMS spektrumu (3e)	28
Şekil 5.21. <i>N</i> -Etil-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)	
benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3f)	29
Şekil 5.22. ¹ H-NMR spektrumu (3f)	30
Şekil 5.23. ¹³ C-NMR spektrumu (3f)	31
Şekil 5.24. HRMS spektrumu (3f).....	32
Şekil 5.25. <i>N</i> -Allil-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)	
benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3g).....	33
Şekil 5.26. ¹ H-NMR spektrumu (3g).....	34

Şekil 5.27. ¹³ C-NMR spektrumu (3g).....	35
Şekil 5.28. HRMS spektrumu (3g)	36
Şekil 5.29. 2-(4-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)benziliden) -N-fenilhidrazin-1-karbotiyoamid (3h)	37
Şekil 5.30. ¹ H-NMR spektrumu (3h).....	38
Şekil 5.31. ¹³ C-NMR spektrumu (3h)	39
Şekil 5.32. HRMS spektrumu (3h).....	40
Şekil 5.33. 2-(4-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il) benziliden)-N-(4-metoksifenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (3i)	41
Şekil 5.34. ¹ H-NMR spektrumu (3i).....	42
Şekil 5.35. ¹³ C-NMR spektrumu (3i).....	43
Şekil 5.36. HRMS spektrumu (3i)	44
Şekil 5.37. N-(4-klorofenil)-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il) benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3j)	45
Şekil 5.38. ¹ H-NMR spektrumu (3j)	46
Şekil 5.39. ¹³ C-NMR spektrumu (3j)	47
Şekil 5.40. HRMS spektrumu (3j).....	48
Şekil 5.41. N-Etil-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il) benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3k).....	49
Şekil 5.42. ¹ H-NMR spektrumu (3k).....	50
Şekil 5.43. ¹³ C-NMR spektrumu (3k)	51
Şekil 5.44. HRMS spektrumu (3k).....	52
Şekil 5.45. N-Alil-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il) benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3l).....	53
Şekil 5.46. ¹ H-NMR spektrumu (3l).....	54
Şekil 5.47. ¹³ C-NMR spektrumu (3l).....	55
Şekil 5.48. HRMS spektrumu (3l)	56
Şekil 5.49. 2-(4-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)benziliden) -N-fenilhidrazin-1-karbotiyoamid (3m).....	57
Şekil 5.50. ¹ H-NMR spektrumu (3m)	58
Şekil 5.51. ¹³ C-NMR spektrumu (3m)	59
Şekil 5.52. HRMS spektrumu (3m).....	60

Şekil 5.53. 2-(4-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)	
benziliden)-N-(4-metoksifenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (3n)	61
Şekil 5.54. ¹ H-NMR spektrumu (3n).....	62
Şekil 5.55. ¹³ C-NMR spektrumu (3n)	63
Şekil 5.56. HRMS spektrumu (3n).....	64
Şekil 5.57. N-(4-klorofenil)-2-(4-(4-(4-florobenzil)	
piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3o).....	65
Şekil 5.58. ¹³ C-NMR ait spektrumu (3o).....	67
Şekil 5.59. HRMS spektrumu (3o)	68
Şekil 5.60. Hedef bileşiklerin sentezi	69
Şekil 5.61. Bileşik 3k 'nın iki boyutlu olarak AChE enzim aktif	
yöresiyle etkileşimi.	76
Şekil 5.62. Bileşik 3k 'nın üç boyutlu olarak AchE enzim aktif	
bölgesiyle etkileşimi (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler gri	
renkli, bileşik 3k ise kırmızı renkli gösterilmiştir).	76
Şekil 5.63. Bileşik 3l 'nin iki boyutlu olarak AChE enzim	
aktif yöresiyle etkileşimi.	77
Şekil 5.64. Bileşik 3k 'nın üç boyutlu olarak AchE enzim aktif	
bölgesiyle etkileşimi (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler	
gri renkli, bileşik 3k ise mavi renkli gösterilmiştir).	78
Şekil 5.65. Bileşik 3m 'nin iki boyutlu olarak AChE enzim	
aktif yöresiyle etkileşimi.....	79
Şekil 5.66. Bileşik 3m 'nin üç boyutlu olarak AchE	
enzim aktif bölgesiyle etkileşimi(Enzim aktif bölgesindeki	
amino asitler gri renkli, bileşik 3m ise sarı renkli gösterilmiştir).....	79
Şekil 5.67. Bileşik 3n 'nin iki boyutlu olarak AChE enzim	
aktif yöresiyle etkileşimi.....	80
Şekil 5.68. Bileşik 3n 'nin üç boyutlu olarak AchE enzim	
aktif bölgesiyle etkileşimi (Enzim aktif bölgesindeki amino	
asitler gri renkli, bileşik 3n ise mor renkli gösterilmiştir).	81
Şekil 5.69. Bileşik 3o 'nun iki boyutlu olarak AChE enzim	
aktif yöresiyle etkileşimi.....	82

Şekil 5.70. Bileşik 3o 'nun üç boyutlu olarak AchE enzim aktif bölgesiyle etkileşimi (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler gri renkli, bileşik 3o ise yeşil renkli gösterilmiştir).	82
Şekil 5.71. Bileşik 3k 'nın iki boyutlu olarak MAO-B enzim aktif yoresiyle etkileşimi.	83
Şekil 5.72. Bileşik 3k 'nın üç boyutlu olarak MAO-B enzim aktif bölgesiyle etkileşimi (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler yeşil renkli, bileşik 3k ise kırmızı renkli gösterilmiştir. FAD ise siyah renk ile belirtilmiştir).	84



KISALTMALAR DİZİNİ

A β	: Beta amiloid
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AH	: Alzheimer Hastalığı
ATC	: Asetiltiyokolin iyodür
BChE	: Bütilkolinesteraz
ChE	: Kolinesteraz
¹³ C-NMR	: Karbon nükleer manyetik rezonans
DMF	: Dimetilformamit
DTNB	: 5-5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
E.n.	: Erime noktası
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
¹ H-NMR	: Proton Nükleer Magnetik Rezonans
HRMS	: Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
IC ₅₀	: %50 İnhibisyon konsantrasyonu
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
J	: Eşleşme sabiti
m/z	: Kütle/yük
MAO	: Monoamin oksidaz
MAO-A	: Monoamin oksidaz A
MAO-B	: Monoamin oksidaz B
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
PAS	: Periferik anyonik bölge
TMS	: Tetrametilsilan

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlk olarak 1907'de Alois Alzheimer tarafından karakterize edilen Alzheimer hastalığı (AH), biliş, davranış ve fonksiyonel durumu kademeli olarak etkilemektedir ve demansın en yaygın nedenidir [1]. Alzheimer hastalığının altında yatan patofizyolojik mekanizmalar tam olarak bilinmese de β -amiloid plak oluşumu, oksidatif stres, kolinesteraz miktarının azalması gibi nedenler öne sürülmüştür [2]. AH'nın tedavisi henüz yoktur. İlaçlar bir süre AH semptomlarını azaltabilse de hastalık sonunda ölümcüldür. Yaşlanma AH için en büyük risk faktörü olmasına rağmen, AH'nın yaşlanmanın normal bir parçası olmadığı bilinmektedir. AH'nin kesin etiyojisi bilinmemektedir; bununla birlikte, çeşitli genetik ve çevresel faktörlerin neden olabileceği düşünülmektedir. Genetik faktörler, hem erken hem de geç başlangıçlı AH ile ilişkilendirilmiştir, ancak kalıtsal AH formları vakaların %1'inden daha azını oluşturmaktadır [3]. Yaş, beyinin rezerv kapasitesinde azalma (örneğin, beyin boyutunda azalma, düşük eğitim düzeyi, azalmış zihinsel ve fiziksel aktivite), kafa travması, Down sendromu ve depresyon Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiş çevresel faktörlerdir [4]. Hafıza kaybı AH'nin en önemli belirtisidir ve AH'nin başlangıcında fark edilmeyebilmektedir. AH'nin erken evrelerinde öğrenmede güçlük, hafıza kaybı ve ruh hali değişiklikleri gözlenirken ilerleyen dönemlerde kişilik, muhakeme, konuşma ve mekansal yönelimde değişiklikler yaşayabilmekte ve fonksiyonel düşüş yürüme değişiklikleri, yutma güçlükleri gözlenmektedir [5].

Artan küresel yaşam süresi ve yaşlanan nüfusla birlikte demans insidansı hızla artmaktadır. 2030 yılına kadar demanslı birey sayısının 75,6 milyona yükseleceği ve 2050 yılına kadar 135,5 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir [6]. Artan vakalar ve hastalığın radikal bir tedavisinin mevcut olmaması ülkeler üzerinde sosyal ve ekonomik anlamda önemli bir yük oluşturmaktadır. Günümüzde AH'nin tedavisinde AChE inhibitörleri olan donepezil, rivastigmin, galantamin ve NMDA reseptör antagonisti olan memantin kullanılmaktadır [7]. Bu ilaçlar hastalığın semptomlarını nispeten önlemekte ve hastanın yaşam kalitesini nispeten yükseltmektedir ancak tedavi etmemektedir. AH'nin radikal tedavisinin olmaması, mevcut tedavilerin yetersizliği ve kullanılan ilaçların potansiyel yan etkileri bu alanda yeni ilaç geliştirme çalışmalarına hız ve önem vermektedir. Diğer yandan AH'da gözlenen MAO-B enzim aktivasyonundaki artış, AH tedavisinde MAO inhibitörlerinin alternatif bir tedavi yolağı olabileceği hipotezini doğurmuştur [8].

AH'nin giderek yayılan insidansı mevcut ilaçların sayısının azlığı, bilim insanlarını yeni ve etkili bileşiklerin geliştirilmesine teşvik etmektedir. Yeni ajanlar geliştirirken ise tek hedefe yönelik olmasından ziyade çoklu hedefi olan ajanlar tercih edilmektedir. Böylece hasta birden çok ilaç kullanmak yerine tek ilaç kullanacaktır. Hem hastaya kullanım kolaylığı sunması hem de aynı anda AH'na sebep olduğu düşülen birden fazla yolağı inhibe etmesi yeni dual etkili bileşikleri ön plana çıkarmaktadır.

Bu çalışma kapsamında 15 yeni tiyosemikarbazon türevi bileşik tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bileşiklerin tasarımı sırasında hem AChE hem MAO-B enzim aktif yöreleri ile etkileşebilecek farmakofor ve hacimsel grupların doğru yerleşimlerine dikkat edilmiştir.

AChE enzim yapısı incelendiğinde katyonik anyonik bölge ve periferik anyonik bölge olduğu görülmektedir. Donepezilin yapısı incelendiğinde indanon halkası ve benzilpiperidin yapısı taşıdığı görülmektedir. Donepezilin yapısında bulunan benzil piperidin grubu enzimin katalitik anyonik bölgesi ile etkileşmektedir. Enzimin bu bölgesi ile etkileşmesi için yapımızda fenilpiperazin, 4-florofenilpiperazin ve 4-florobenzilpiperazin yapıları tercih edilmiştir. Böylelikle fenilamin ve benzilamin arasındaki aktivite farkını kıyaslama imkânı oluşmuştur. Tiyosemikarbazon yapısı hem AChE hem de MAO inhibitörü olarak sıklıkla kullanılan bir farmakofor gruptur. Tiyosemikarbazon grubu bu zengin aktivite profili için seçilmiştir. Tiyosemikarbazon kısmının kalıntısına ise periferik anyonik bölge ile etkileşim kurabilecek aromatik ve alifatik yapılar tercih edilmiştir.

Sentez çalışmaları sonucunda elde edilen bileşiklerin yapı tayinleri HRMS, ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektroskopik yöntemleri ile yapılmıştır. Aktivite çalışmaları modifiye Ellman metodu ile *in vitro* olarak gerçekleştirilmiş ve moleküler modelleme çalışmaları Schrödinger programı kullanılarak *in silico* değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Alzheimer Hastalığı

2.1.1. Alzheimer hastalığının tanımı

AH bilişsel ve fiziksel işlevselliğin kademeli olarak kaybolduğu nörodejeneratif bir hastalıktır [8]. AH ilk defa 1907 yılında Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmış olan ve yalnızca hastaları değil hasta yakınlarını da etkileyen kronik bir hastalıktır. AH'nın altında yatan nedenler tam olarak bilinmemektedir ve tedavisi yoktur. Mevcut tedaviler AH'nın semptomlarını önlemek ve azaltmak için kullanılmaktadır. AH'nın nedenleri arasında genetik ve çevresel faktörler de araştırılmıştır ve genetik faktörlerin vakaların %1'inden daha azını oluşturduğu gösterilmiştir. Dünya genelinde 35 milyondan fazla insanı etkileyen bu rahatsızlık 65 yaş üstü bireylerde demansın en yaygın nedenidir [4, 9]. Dünya genelinde demans vakalarının %50-70'ini Alzheimer hastaları oluşturmaktadır. Nöropsikiyatrik semptomlar ile başlayan AH hafıza kaybı ile kendini göstermeye başlamaktadır. Hastalık kademeli olarak ilerler ve bilişsel bozukluklar, günlük işlerde aksama, ruh hali ve davranış değişiklikleri, konuşma esnasında kelimeleri seçememe, fiziksel aktivitede güçlük gibi yaşam kalitesini etkileyen durumlar meydana gelmektedir [10]. Yaşa bağlı bir hastalık olması nedeniyle yaşlı popülasyonun arttığı ülkelerde önemli bir sağlık sorunu haline gelmektedir.

2.1.2. Alzheimer hastalığının belirtileri

Genellikle nöropsikiyatrik belirtilerle başlayan AH bilişsel bozukluğun kademeli ilerlemesi şeklinde gözlemlenmektedir [10]. Hastalarda belirgin bir hafıza kaybı gözlenmektedir ve bu AH'nın en önemli belirtisidir [9]. Nüfusa dayalı çalışmalarda AH tanısı konan hastalara bakıldığında nöropsikiyatrik semptomların genel nüfusa göre çok daha yüksek olduğu görülmüştür. AH'da depresyon ve apati en sık görülen semptomlar arasındadır ve apati hemen hemen AH'nın tüm evrelerinde devam etmektedir. Hastalık ilerledikçe sanrılar ve saldırganlık yaygın hale gelmektedir [10] Başlangıçta hafıza bozukluğu, yakın hafıza kaybı ve öğrenememe şeklinde gözlemlenip uzak hafıza korunmaktadır [11]. Hastalık ilerledikçe beyinde oluşan patolojik değişiklikler nedeniyle sanrılar, kişilik değişiklikleri, sirkadyen ritim ve yeme-içme bozuklukları, görsel-uzaysal becerilerde bozulma ve uzak hafızada da bozulma meydana gelmektedir [12, 13]. Bu durum hastaların yaşam kalitesinde düşüşe neden olmaktadır. AH orta evrelerinde hastalar artık günlük yaşamda sıklıkla gerçekleştirdiği aktiviteleri gerçekleştirmede ve kişileri-yerleri hatırlamada güçlük çekmektedir. Hastalığın ileri evrelerinde ise hastalar

artık günlük aktivitelerini yerine getirememeye başlamakta ve giyinme, yıkanma, yeme-içme gibi temel ihtiyaçları için bakıma ihtiyaç duymaktadır.

İnsülin dengesinin bozulması, vasküler hasar, inflamatuvar süreçler, kalsiyum regülasyon kaybı ve kolesterol metabolizmasındaki bozukluklar AH'nın belirtilerinin kişiye göre değişmesinin nedenidir [4].

2.1.3. Alzheimer hastalığının nedenleri ve tedavisi

AH'nın altında yatan patofizyolojik mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte bu zamana kadar yapılan çalışmalarda başlıca nedenler sunulmuştur [4]. AH'nın nöropatolojik işaretleri arasında beyindeki özellikli nöronların ilerleyici kaybı, çözünmeyen hücre dışı birikintiler olarak amiloid-beta ($A\beta$) fibrillerini içeren senil plakların oluşumu, nörofibriler yumakların intranöral birikimi ve yaygın oksidatif hasar yer almaktadır [14]. İleri yaşlarda gerçekleşen birlikte kafa travması, beyin hacmi ve ağırlığında azalma, amiloid öncü protein ve presenilin genlerinin mutasyonlarını içeren genetik faktörler ve yetersiz beslenme gibi çevresel faktörler de AH'nın nedenleri arasındadır [15].

AH'nın patofizyolojisi başlıca amiloid kaskat ve kolinerjik hipotez olarak ele alınmaktadır [9]. Amiloid kaskat hipotezi, amloid peptidlerin üretimi ve klirensi arasındaki dengesizliğin, birikmesi ve toplanması sonucu plak oluşumunu öne sürmüştür. Bu $A\beta$ peptidlerinin nöronlar için zararlı boyutlarda birikmesi, nöronların ölümüne ve AH'na sebep olmaktadır. Amloid plaklar 36 ile 43 aminoasitten oluşan $A\beta$ peptidleridir. Beyin ve serebral vaskülatürde bulunan hücre dışı lezyonlardır. $A\beta$ peptidleri, amloid öncü proteinlerinin işlenmesi yoluyla üretilmektedir [4]. Bu işlem γ -sekretaz, β -sekretaz ya da α -sekretaz enzim aktiviteleri tarafından sağlanmaktadır. İlk olarak α -sekretaz ya da β -sekretaz enzimi amloid öncü proteini keser ve ikinci kesim γ -sekretaz tarafından gerçekleştirilir. İlk kesilme β -sekretaz tarafından gerçekleşir ise $A\beta$ peptidi oluşur ve bu durumda AH'nda $A\beta$ peptidini oluşturan yolun daha aktif olduğu ya da $A\beta$ temizlenme mekanizmasında bir bozukluk olduğu düşünülmektedir [4, 16]. Bununla birlikte $A\beta$ 'nin varlığının AH'nın birincil patolojik nedenlerinden olup olmadığı veya $A\beta$ 'nin alternatif bir patolojinin sonucu olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir [4, 6].

Kolinerjik hipotez ilk olarak 30 yıl kadar önce ortaya atılan ve AH'ı açıklayan en yaygın teoridir. ACh'nin hidrolizi AChE tarafından gerçekleşmektedir. Kolinerjik hipoteze göre kolinerjik sinapstaki ACh miktarını artırmak için, AChE'nin inhibisyonu gerekmektedir [17]. AH'da meydana gelen nöron kaybına paralel olarak kolinerjik,

nonkolinerjik, serotonerjik, dopaminerjik gibi birçok nörotransmitterin azaldığı gözlemlenmektedir. AH'da gözlemlenen hafıza kaybı, öğrenmede ve kavramada güçlük gibi bilişsel bozuklukların açıklanmasında kolinerjik sistem en çok ilişkili olanıdır, bu nedenle kolinerjik bozukluk ve AH arasında doğrudan ilişki olduğu düşünülmektedir [18].

AH'nın patofizyolojisini ortaya çıkarmak için yapılan çalışmalarda, tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunun da AH'na neden olabileceği öne sürülmüştür. Mikrotübüleri stabilize eden ve hücre iskeletinin bütünlüğünün sağlanmasında rol oynayan tau proteinleri, nörofibriler yumakların ana bileşenini oluşturmaktadır. Merkezi sinir sistemi nöronlarında çok sayıda bulunan bir proteindir. Hiperfosforillenmiş tau proteini, sinir hücrelerinin içinde nörofibriler yumakların oluşmasına ve hücre iskeletinin bozulmasına neden olmaktadır. Hücre iskelet bütünlüğünün bozulması nöronların transport sisteminin çökmesine neden olmaktadır. Sinir iletiminin bozulmasının ardından nöron ölümü gerçekleşmektedir [3, 19].

Günümüzde AH'nın tedavisi, hastalığın semptomlarını iyileştirmeye yönelik olarak yapılmaktadır ve AH'nı tamamen iyileştiren bir tedavi henüz bulunamamıştır. AH'nda görülen hafıza kaybı ve bilişsel bozukluklar kolinerjik sistemde ACh eksikliği ile ilişkilendirilmiş olup tedavide, sinaptik aralıkta asetilkolin miktarının artırılması hedeflenmiştir. Bu ilaçlar ACh'i sinaptik aralıkta hidroliz ederek etkisini sonlandıran kolinesteraz enzimlerini inhibe etmektedir [20]. ACh'in hidrolizinin inhibisyonu ile kolinerjik aktivitenin iyileştirilmesi hastalığın ilerlemesini yavaşlatır ve hastanın yaşam kalitesini artırır ancak meydana gelen nöron kaybını geri döndüremez [21]. Donepezil, galantamin ve rivastigmin AH tedavisinde kullanılan AChE inhibitörleridir. Takrin, AH'nda kullanılmaya başlanan FDA tarafından onaylanan AChE inhibitörlerinin ilkidir [22]. Günümüzde tedavide kullanılan AChE inhibitörlerinin özellikle gastrointestinal yan etkilerinin olması ve semptomatik tedaviye yönelik olmaları AH tedavisi için yeni ilaç araştırmalarının artarak devam etmesinin nedeni olmaktadır. AH tedavisinde MAO inhibitörleri ve *N*-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri diğer tedavi seçeneklerini oluşturmaktadır [4, 8, 12].

Asetilkolinesterazı geri dönüşümlü olarak inhibe eden Huperzine A, Huperzia serrata'dan izole edilen bir alkaloiddir Huperzin A'nın AH'nın semptomatik tedavisinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır ancak tedavideki yerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır [23].

Östrojen replasman tedavisi ile AH insidansının düştüğünü öne süren çalışmalar olmasına rağmen prospektif klinik denemeler bilişsel bozukluğun tedavisinde östrojen kullanımını desteklememektedir. Soya içeren gıdaların ve takviyelerin içinde bununan fitoöstrojenler AH tedavisinde önerilmiştir ancak bu tür kullanımı destekleyen hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda nonsteroid antiinflatuar ilaçların (NSAID) AH'a karşı koruyucu olduğu öne sürülmüştür ancak buna karşılık yapılan prospektif klinik denemelerde nonsteroid antiinflatuar ilaçların ve steroidlerin AH'na karşı önemli düzeyde koruyuculuğunun olmadığı ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda bu ilaçların gastrointestinal yan etkilerinin olması nedeniyle AH tedavisinde kullanılmaları desteklenmemektedir. AH'nın Patofizyolojik nedenleri arasında oksidatif stres yer almaktadır. Bu nedenle AH tedavisinde antioksidanların kullanımına ilişkin çalışmalar yapılmıştır ve E vitamini takviyesinin AH üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Ancak bilişsel fayda gözlemlenmemiştir, bununla birlikte yüksek doz E vitamini mortaliteyi artırmaktadır. Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında AH tedavisinde E vitamini kullanımı da önerilmemektedir. Kan akışını artırma, trombosit aktive edici faktör reseptörlerini antagonize etme, monoamin oksidazı inhibe etme ve bir antioksidan olarak etkinlik gösterme potansiyeli göz önüne alındığında Ginkgo biloba AH tedavisinde kullanımı için incelenmiştir fakat yapılan çalışmalar yetersizdir. Yapılan çalışmalarda bilişsel bozuklukta önemli bir düzelme gözlenmemiştir [4, 24]

Farmakolojik tedavinin yanında AH'nın gelişmesini önlemede özellikle orta yaş grubunda yaşam tarzı değişikliğinin de umut vadettiği düşünülmektedir. Yaşam tarzı değişikliği ilaç tedavisiyle birlikte uygulanmalıdır. Dünya sağlık örgütü AH riskini azaltmak ve hastalığa maruz kalan kişilerde ilerleyişi durdurmak için ilaç tedavisine ek olarak haftalık en az 150 dakika egzersiz önermektedir. Egzersize ek olarak dans, masaj, müzik, sanat terapisi, aile üyelerinin ses ve görüntü kayıtları gibi farmakolojik olmayan tedavilerde AH tedavisinde uygulanan diğer yöntemlerdir [12, 24].

AH tanısı konulduktan sonra hasta yakınları hastalığın seyri ve mevcut tedaviler hakkında bilgilendirilmelidir. Hastanın yaşam kalitesini artırmak, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak amacıyla gürültü, televizyon gibi arka planda çok fazla dikkat dağınıklığına sebep olan tetikleyicilerden hasta uzak tutulmalı, bunun yanında ağrı, açlık, susuzluk, kabızlık, yorgunluk, enfeksiyonlar, kişisel bakım, sıcaklık, korku ve hayal kırıklıkları gibi kişisel etkenler de hasta için tetikleyici olabilmektedir. Bu nedenle hasta yakını bu tetikleyicilere karşı dikkatli olmalıdır [24].

2.1.4. Kolinesteraz enzimi ve inhibitörleri

AH'nın nedenleri tam olarak bulunamamakla birlikte AH'na neden olabilecek hipotezler öne sürülmüştür. Kolinerjik hipotez bunlardan biridir. AH'da meydana gelen nöron ve nörotransmitter kaybı sinapslardaki ACh miktarı ile ilişkilendirilmiştir. Kolinerjik hipotez, AChE'nin inhibisyonunun, ACh'nin hidrolizini önleyeceği ve böylece kolinerjik sinaptaki ACh seviyesinin artacağı varsayımına dayanmaktadır [17]. Yapılan çalışmalarda, AChE inhibisyonu ile ACh miktarının artması, AH'nın erken evrelerindeki kognitif yetmezliği yavaşlatabildiği gösterilmiştir [9].

Kolinesteraz enzimleri omurgalılarda AChE ve bütirilkolinesteraz (BChE) olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu iki izoform arasındaki en önemli farklardan biri yerleşim bölgeleridir. AChE en yüksek konsantrasyonlarda eritrositler ve beyinde bulunurken; BChE santral sinir sistemi, pankreas, karaciğer ve serumda bulunmaktadır [22]. ChE inhibitörlerinin geliştirilmesinde ise asıl önemli enzim AChE'dir. Bunun sebebinin AChE enziminin başka enzimlerde bulunmayan aktif bölge ve katalitik bölgeden oluştuğunun düşünülmesidir [17].



Şekil 2.1. AChE inhibitörlerinin fonksiyonları

Beyindeki ACh'nin sinaptaki varlığı AChE enziminin etkinliğine bağlıdır. Üretilen ACh presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve ACh veziküllerden sinaptik aralığa salınır. Sinaptik aralığa salınan ACh molekülü yüksek oranda postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanamayan ACh molekülleri AChE tarafından hidrolize uğrar. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer

nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır ve AChE tarafından hidroliz edilir. Açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir [9]. AChE inhibitörleri bu döngüde sinapslardaki ACh'nin miktarını artırmak için AChE'ı inhibe ederek ACh'nin hidrolizini önlemekle sorumludur.

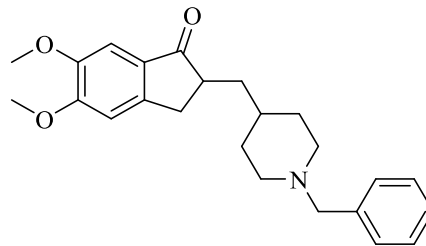
2.1.5. AChE enziminin kristal yapısı ve tedavide kullanılan AChE inhibitörleri

AChE'in aktif bölgesi iki ayrı ligand bağlanma bölgesi taşımaktadır. Bu aktif bölgede yaklaşık 20 Å uzunluğunda ve en dar yerinin çapı 4,5 Å olan dar ve uzun enzim çukurunun dip kısmında, Ser200, His440 ve Glu327 olmak üzere üç amino asit ve 14 aromatik amino asit artığından oluşan bir esteratik bölge bulunmaktadır. AChE aktif yöreni, serin amino asidi taşıyan bir esteratik bölge, bu bölgeye 14.7 Å mesafede bulunan anyonik bölge ve hidrofobik bölge olmak üzere üç majör bölgeden meydana gelmektedir. Ser200, His440, Glu327 amino asitleri katalitik üçlü denilen, derin ve dar boğazın tabanını oluşturmaktadır ve bu yapıdaki serin aminoasidinin hidroksil grubu, histidin aminoasidinin imidazol grubu ve glutamat aminoasidinin karboksil grubu katalitik üçlünün önemli noktalarıdır [19].

Perifrik anyonik bölge (PAS), katalitik çukurun giriş kısmında ve esteratik bölgeye 14 Å uzaklığındadır. Periferik anyonik bölge, allosterik aktivatörler ve inhibitörler için örtüşen bağlanma bölgelerini kapsar. PAS inhibitörlerinin, vadiye giren veya çıkan ligandlar için sterik blokaj ve katalitik merkez konformasyonunun ve verimliliğinin allosterik değişiminin bir kombinasyonu yoluyla katalizi etkilediği gösterilmiştir [25].

Aβ peptidin periferik anyonik yöre ile etkileşimi AChE-Aβ stabil kompleksi ile amiloid plakların oluşmasına ve kolinerjik nöronlarda hasara neden olmaktadır. Bu nedenle PAS umut vadeden ilaçların hedefleri arasındadır ve AChE enziminin kristal yapısının çözümlenmesinin ardından PAS'ın kesin yapısını ve işleyişini anlamak için birçok girişimde bulunulmuştur.

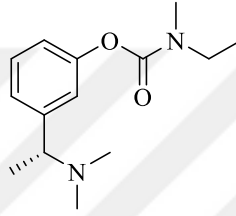
2.1.5.1. Donepezil



Şekil 2.2. Donepezil İlacının Kimyasal Yapısı

Donepezil, 1997 yılından itibaren AH tedavisinde kullanılmaya başlanan selektif ve reversible AChE inhibitörüdür. Kimyasal olarak indanonbenzilpiperidin türevidir. Donepezil hafif ve orta dereceli AH'nın tedavisinde, yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle günde bir kere kullanılabilir olması, yiyeceklerle birlikte kullanıldığında emiliminin önemli düzeyde etkilenmemesi ve diğer ilaçlarla etlikeşiminin az olması nedeniyle diğer AChE inhibitörleri arasında en çok tercih edilen ilaçtır [26].

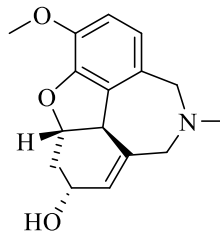
2.1.5.2. Rivastigmin



Şekil 2.3. Rivastigmin'in Kimyasal Yapısı

Rivastigmin nonselektif ve irreversible AChE inhibitörüdür. Hafif ve orta dereceli AH tedavisinde kullanılan, karbamat türevi bir ilaçtır. Hem AChE'ı hem de BChE'ı inhibe etme özelliğine sahiptir. Kan-beyin bariyerini aşma yeteneğinin kısıtlı olması ve ilk geçiş etkisi nedeniyle oral formunun yeterince etkili olduğu düşünülmemektedir [21].

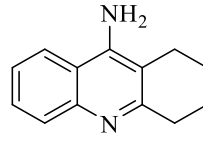
2.1.5.3. Galantamin



Şekil 2.4. Galantaminin kimyasal yapısı

Galantamin seçici ve reversible AChE inhibitörü olan tersiyer bir alkaloiddir. AChE enzimini inhibe ederek ACh'in hidrolizini reversible olarak engellemektedir ve bu nedenle düşünme öğrenme ve hafızadaki bozuklukların ilerlemesini önlediği düşünülmektedir. Ancak hastalık ilerledikçe, kolinerjik nöronların sayısı azaldıkça Galantamin'in etkisi giderek zayıflayabilmektedir [27].

2.1.5.4. Takrin



Şekil 2.5. Takrinin kimyasal yapısı

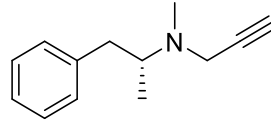
Takrin orta ve ileri evre AH tedavisinde kullanılan AChE ve BChE enzimlerinin reversibl inhibitörüdür. AH tedavisinde kullanılan ilk AChE inhibitörüdür. Kan-beyin bariyerini aşabilmesine rağmen hepatoksisite gibi ciddi yan etkileri nedeniyle günümüzde klinik olarak kullanılmamaktadır. Ciddi yan etkilerinin yanında günlük doz miktarının fazla olması da günümüzde kullanılmamasının bir diğer sebebidir. Takrin AChE inhibisyonuna ek olarak, H₂O₂ tarafından indüklenmiş apoptotik yolağı antagonize etme, reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltma, Aβ tarafından indüklenmiş oksidatif stresi azaltma ve tau proteinin fosforilasyonunun önleme gibi etkilere de sahiptir [28].

2.1.6. MAO enzimi ve inhibitörleri

MAO, hem merkezi sinir sisteminde, hem de periferel nöronlarda ve dokularda bulunan ve oksidatif deaminasyon reaksiyonunu katalizleyen flavoenzimlerdir [29]. MAO'lar, substrat özgüllüğüne ve duyarlılığına bağlı olarak dopamin, adrenalin ve noradrenalin gibi katekolamin nörotransmitterleri ve serotonin katabolizmasından sorumlu iki izoform MAO-A ve MAO-B'den meydana gelmektedir. Bu iki izoformun aktif bölgeleri aynı olmasına rağmen substrat, enzim gibi ligand tanıma bölgeleri birbirinden farklıdır ve aynı substrat ve inhibitörlerle farklı etkileşim göstermelerinin sebebi MAO-A ve MAO-B'nin üç boyutlu yapısının farklı olmasıdır. 2002 yılında MAO'ların kristal yapılarının keşfedilmesinin ardından MAO-A ve MAO-B'nin nörotransmitterlerin oksidasyonundan sorumlu olduğu ortaya çıkmıştır [18]. MAO-A, MSS'de serotonin ve noradrenalinin deaminasyonundan sorumludur. MAO-B ise dopamin, norepinefrin ve epinefrin dahil olmak üzere monoaminlerin oksidatif deaminasyonunda işlev görmektedir [30]. Farklı MSS hastalıkları için ilaç hedefi haline gelmişlerdir. MSS'indeki MAO'lar AH'da görülen nörolojik ve psikiyatrik bozukluklarla ilişkili olmaktadır ve MAO-B aktivitesinin yaşla orantılı arttığı ve bu artışın, glial hücre proliferasyonu ile bağlantılı nöron kaybından kaynaklanabileceği düşünülmektedir [31].

MAO-B inhibitörleri nörotransmitterleri düzenleme ve oksidatif hasarı inhibe etme kapasitesine sahip olduğundan, AH'na karşı etkili olabilecek potansiyel ilaçlar olarak düşünülmektedir [32, 33].

2.1.6.1. Selejilin



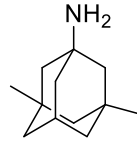
Şekil 2.6. Selejilin'in kimyasal yapısı

Deprenilin R(-)-izomeri olan selejilin, Jôsef Knoll tarafından yetmişli yıllarda bulunmuştur [31]. Deprenil molekülünün ilk sentezlenme amacı enerji verici olarak kullanımı olmuştur. Daha sonra bu molekülün antidepresan etkileri test edilmiştir. MAO-B inhibitörü (irreversibl) olarak nitelendirilmesi ise 1960'lı yıllarda olmuştur. Enzime karşı olan yüksek afinitesi ve seçiciliği ile dikkat çekmiştir [29]. Selejilin, beyindeki dopamin miktarını MAO-B'yi inhibe ederek artırması sebebiyle Parkinson hastalığında da kullanılmaktadır.

2.1.7. NMDA reseptör antagonistleri

Mevcut tedavide kullanılan ve NMDA (N-metil-d-aspartat) reseptörünü antagonize ederek glutaminerjik sinir iletimini bloke eden tek ilaç memantindir. Glutamat glutaminden glutaminaz enzimi ile sentezlenen beyinde, öğrenme ve hafızayı güçlendirmede önemli rol oynayan önemli bir nörotransmitterdir. NMDA reseptör antagonistleri, NMDA reseptörlerinin glutamat ile aşırı etkinliğine karşı etkili olmakta ve nöronal hücre ölümüne ve bilişsel işlev bozukluğuna neden olabilecek anormal glutamat etkilerini bloke etmektedir. Hafızayı koruyup ve güçlendirmesi NMDA reseptör antagonistlerinin AH'da kullanılmasını sağlamaktadır [24, 34].

2.1.7.1. Memantin

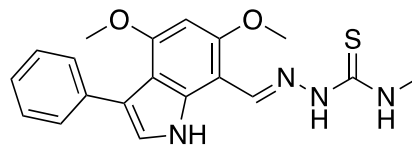


Şekil 2.7. Memantin'in kimyasal yapısı

Memantin günümüzde orta ile şiddetli Alzheimer tedavisinde kullanılan mevcut tek NMDA antagonistidir. Memantin düşük afiniteli ve nonkompetitiftir. NMDA reseptörlerini antagonize ederek glutamaterjik sinir iletimini bloke etmektedir. NMDA reseptörlerinin ve glutamaterjik sistemin morfin bağımlılığıyla ilişkisi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle memantin morfin bağımlılığında da kullanılmakta ve yoksunluk sendromunu azaltmada endikedir [34]. Donepezil ile kombinasyon halinde kullanıldığında biliş ve işlev bozuklukları üzerinde olumlu sonuçlar gözlenmiştir. Genel olarak, memantin klinik çalışmalarda iyi tolere edilmiş olsa da baş ağrısı, kabızlık, kafa karışıklığı ve baş dönmesi gibi yan etkileri gözlenmektedir [4].

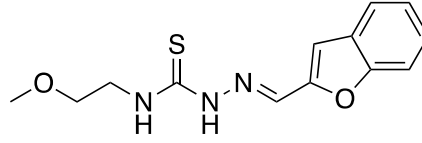
2.2. Antikolinesteraz ve MAO-B İnhibitör Aktivite Çalışmalarına Konu Olmuş Tiyosemikarbazon Türevleri

Yıldız ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada yeni tiyosemikarbazon türevleri sentezlenmiş ve AChE'ye karşı etkileri incelenmiştir. Yapılan aktivite çalışmaları sonucunda (E)-2-((4,6-dimetoksi-3-fenil-1H-indol-7-yl)metilen)-N-metilhidrazin-1-karbotiyoamid bileşiği $IC_{50}=30.39\pm0.24$ μ M değeri ile AChE enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermiştir [35].



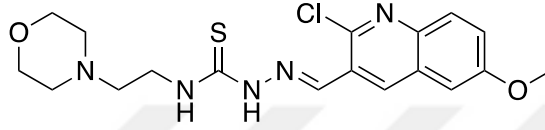
Şekil 2.8. (E)-2-((4,6-dimetoksi-3-fenil-1H-indol-7-yl)metilen)-N-metilhidrazin-1-karbotiyoamid

Osmaniye ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada yeni tiyosemikarbazon türevleri sentezlenmiş ve AChE inhibitör etkileri incelenmiştir. Yapılan aktivite çalışmaları sonucunda 2-(Benzofuran-2-il metilen)-N-(2-metoksietil)hidrazin-1-karbotiyoamid bileşiği $IC_{50}=0.042 \pm 0.002$ μ M değeri ile AChE enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermiştir [36].



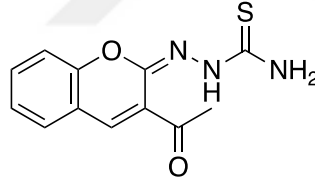
Şekil 2.9. 2-((Benzofuran-2-il metilen)-N-(2-metoksietil) hidrazin-1-karbotiyoamid

Yeni tiyosemikarbazon türevleri sentezi ve AChE inhibitör etkileri incelendiği Zaib ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada 2-((2-kloro-6-metoksi kinolin-3-il)metilen)-N-(2-morfolinoetil) hidrazinkarbotiyoamid bileşiği $IC_{50}=0.12 \pm 0.02\mu M$ değeri ile AChE enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermiştir [37].



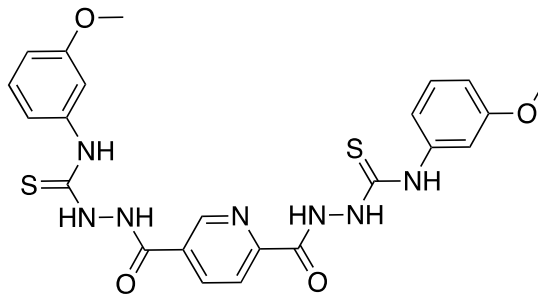
Şekil 2.10. 2-((2-Kloro-6-metoksi kinolin-3-il)metilen)-N-(2-morfolinoetil) hidrazinkarbotiyoamid

Tiyosemikarbazon türevleri üzerine yapılan başka bir çalışmada Varma ve diğerleri sentezledikleri 3-asetilkumarin tiyosemikarbazon bileşiği $IC_{50}=11.02 \mu M$ değeri ile AChE enzimine karşı inhibitör etkinlik gözlemişlerdir [38].



Şekil 2.11. 3-Asetilkumarin tiyosemikarbazon

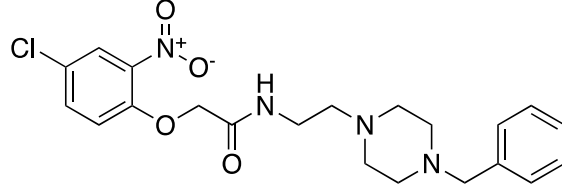
Bulut ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada yeni 2,2'-(Piridin-2,5-diildikarbonil) bis[N-(p-metoksifenil) hidrazin karbotiyoamid bileşiği $IC_{50}=3.07\pm 0.76 \mu M$ değeri ile AChE enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermiştir [39].



Şekil 2.12. 2,2'-(Piridin-2,5-diildikarbonil)bis[N-(p-metoksifenil)hidrazin karbotiyoamid

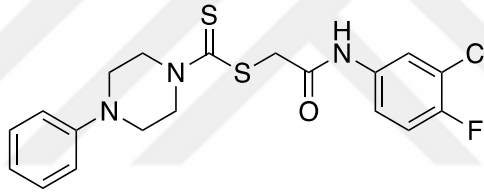
2.3. Antikolinesteraz Aktivite Çalışmalarına Konu Olmuş Piperazin Türevleri

Brunetti ve diğeri tarafından yapılan çalışmada yeni piperazin türevleri sentezlenmiş ve AChE'ye karşı etkileri incelenmiştir. Yapılan aktivite çalışmaları *N*-(2-(4-Benzilpiperazin-1-il)etil)-2-(4-kloro-2-nitrofenoksi)asetamid bileşiği $IC_{50}=0.0008 \pm 0.0002 \mu M$ değeri ile AChE enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermiştir [40].



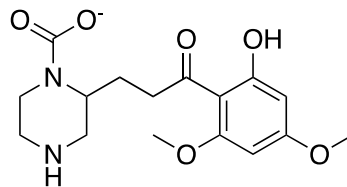
Şekil 2.13. *N*-(2-(4-Benzilpiperazin-1-il)etil)-2-(4-kloro-2-nitrofenoksi)asetamid

Mohammadi-Khanaposhtani ve diğeri tarafından yapılan çalışmada piperazin içeren yeni bileşikler sentezlenmiş ve AChE enzim inhibitör etkinlikleri incelenmiştir. Elde edilen aktivite sonuçlarına göre 2-[(3-kloro-4-florofenil) amino]-2-oksoetil 4-fenilpiperazin-1-karboditiyoat bileşiği $IC_{50}=10.63 \pm 1.73 \mu M$ değeri ile AChE enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermiştir [41].



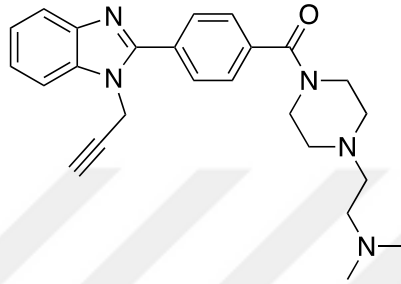
Şekil 2.14. 2-[(3-Kloro-4-florofenil) amino]-2-oksoetil 4-fenilpiperazin-1-karboditiyoat

Yeni piperazin türevleri üzerine Kaur ve diğeri tarafından yapılan çalışmada piperazin içeren bir seri bileşik sentezlenmiştir. Spektroskopik yöntemler ile yapıları aydınlatılan bileşiklerin aktivite potansiyelleri *in vitro* yöntemler ile test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 3-(2-Hidroksi-4,6-dimetoksifenil)-3-oksopropilpiperazin-1-karboksilat bileşiği $IC_{50}=13.86 \pm 0.65 \mu M$ değeri ile AChE enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermiştir [42].



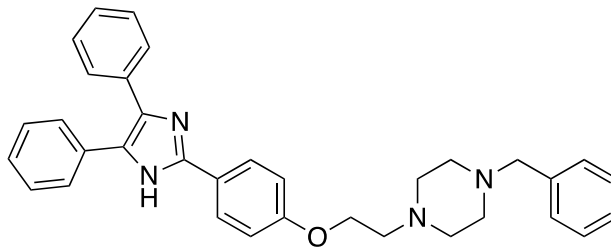
Şekil 2.15. 3-(2-Hidroksi-4,6-dimetoksifenil)-3-oksopropilpiperazin-1-karboksilat

Osmaniye ve diğerleri tarafından yeni piperazin türevleri üzerine yapılan çalışmada piperazin içeren yeni türevler sentezlenmiş ve AChE-MAO-B dual inhibitör etkileri incelenmiştir. Spektroskopik yöntemler ile yapıları aydınlatılan bileşikler arasından {4-[2-(Dimetilamino)etil]piperazin-1-il}{4-[1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-il]fenil}metanon bileşiği $IC_{50}=0.024\pm0.001$ μ M değeri ile AChE enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermiştir. Bileşiğin doking çalışmaları ile enzim aktif bölgesinde donepezil gibi davrandığı ve piperazin kısmının enzim aktif bölgesindeki katalitik anyonik bölge ile etkileştiği görülmüştür [43].



Şekil 2.16. {4-[2-(Dimetilamino)etil]piperazin-1-il}{4-[1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-il]fenil}

Ramrao ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada bir seri yeni piperazin türevi bileşik sentezlenmiş ve AChE inhibitör etkinlikleri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Yapılan aktivite çalışmaları sonucunda 1-benzil-4-(2-(4-(4, 5-difenil-1*H*-imidazol-2-il)fenoksi)etil)piperazin bileşiği $IC_{50}=0.416 \pm 0.018$. μ M değeri ile AChE enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermiştir [44].



Şekil 2.17. 1-Benzil-4-(2-(4-(4, 5-diphenil-1*H*-imidazol-2-il)fenoksi)etil)piperazin

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

4-Fenilpiperazin	: Merck, Almanya
4-Florofenilpiperazin	: TCI, Japonya
4-Florobenzilpiperazin	: Acros Organics, Almanya
4-Florobenzaldehit	: TCI, Japonya
Etil izotiyosiyonat	: TCI, Japonya
Allil izotiyosiyonat	: TCI, Japonya
Fenil izotiyosiyonat	: TCI, Japonya
4-Metoksifenil izotiyosiyonat	: TCI, Japonya
4-Klorofenil izotiyosiyonat	: TCI, Japonya
Hidrazin hidrat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Etanol	: VWR Chemicals, Fransa
Dimetil formamit	: VWR Chemicals, Fransa
Potasyum karbonat	: Sigma-Aldrich, Almanya
DİMETİLSÜLFOKSİT- d_6	: Euroisotop, Almanya
AChE-E.C.3.1.1.7, electric eel	: Sigma, Almanya
BChE-E.C. 3.1.1.8, equine serum	: Sigma, Almanya
Jelatin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Asetiltiyokolin iyodür (ATC)	: Fluka, Almanya
Bütiriltiyokolin iyodür (BTC)	: Fluka, Almanya
5,5'-Ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	: Merck, Almanya
Sodyum bikarbonat	: Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	: Merck, Almanya
Dimetilsülfoksit	: Merck, Almanya
Donepezil	: Merck, Almanya

Takrin	: Merck, Almanya
Monoamine Oxidase-A human	: Biovision, Almanya
Monoamine Oxidase-B human	: Biovision, Almanya
Horseradish Peroksidaz	: Sigma, Almanya
Ampliflu TM Red	: Sigma, Almanya
Triamin	: Sigma, Almanya
Moklobemid	: Sigma, Almanya
Selejilin	: Sigma, Almanya
PBS	: Gibco, Birleşik Krallık
Etanol	: Merck, Almanya
Etil asetat	: Carlo Erba Reagents, Fransa
Petrol eteri	: VWR Chemicals, Fransa
Potasyum karbonat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Silikajel 60 F254 kaplı alüminyum İTK plağı	: Merck, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

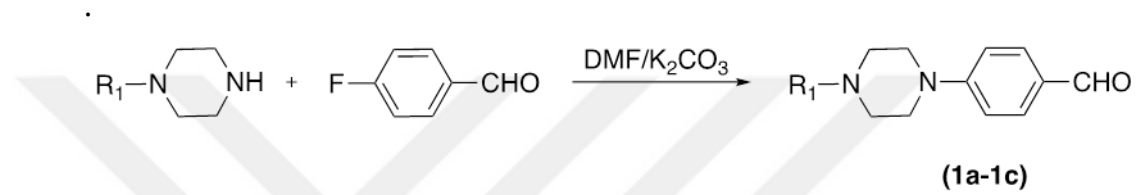
Elektronik terazi	: Shimadzu, Libror EB-330 HU, Japonya
Erime derecesi tayin cihazı	: Mettler Toledo-MP90 Melting Point System
Kütle spektrometresi	: Shimadzu, LCMS-IT-TOF, Japonya
Manyetik tabanlı ısıtıcı karıştırıcı	: Heidolph, MR 3003, Almanya
Nükleer manyetik rezonans spektrometresi	: Bruker, UltraShield 300 MHz, ABD
Ultraviyole lambası	: Camag, Cabinet, İsviçre
Mikroplate okuyucu	: BioTek-Synergy H1 ABD
Robotik pipetleme tablası	: BioTek-Preccision XS, ABD

4. YÖNTEMLER

4.1. Sentez Çalışmaları

4.1.1. 4-Sübstitüe benzaldehit türevlerinin sentezi (1a-1c) (Yöntem A)

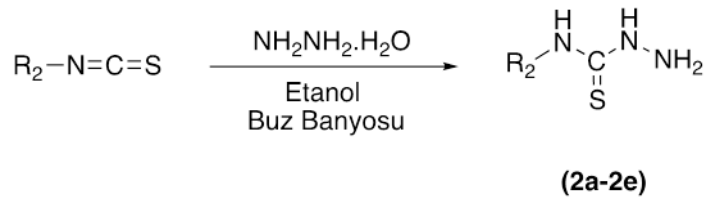
Sekonder amin türevleri (0.01 mol) ve 4-Floro benzaldehit (0.01 mol, 0.88 mL) DMF içerisinde çözündürülmüştür. Reaksiyon ortamına katalizör olarak potasyum karbonat (0.01 mol, 1.38 g) ilave edilmiştir. 36 saat boyunca geri çeviren soğutucu altında kaynatılan reaksiyon içeriği İTK kontrolü ile sonlandırılmıştır. Sonlandırma aşamasında reaksiyon içeriği buzlu suya dökülmüş ve çöken ürün süzülerek alınıp kurutulmuştur. Kuruyan ham ürün etanolden kristallendirilmiştir.



Şekil 4.1. 4-Sübstitüe benzaldehit türevlerinin (1a-1c) sentezi

4.1.2. Tiyosemikarbazid türevlerinin sentezi (2a-2e) (Yöntem B)

Etanol içerisinde çözündürülen izotiyosiyanat türevleri (0.01 mol) buz banyosuna alınarak karıştırılmaya başlanmıştır. Başka bir kaptaki hidrazin hidrat (0.03 mol, 1.20 mL) etanol içerisinde çözündürülmüş ve elde edilen çözelti ayırma hunisine alınmıştır. Ayırma hunisi yardımı ile damla damla izotiyosiyanat çözeltisi içerisine ilave edilmiştir. Damlatma işlemi bittikten sonra İTK kontrolü sağlanmış ve çöken ürün süzülerek alınmıştır. Hidrazin hidratın fazlasını uzaklaştırmak amacıyla ürün soğuk etanol ile yıkanmıştır.

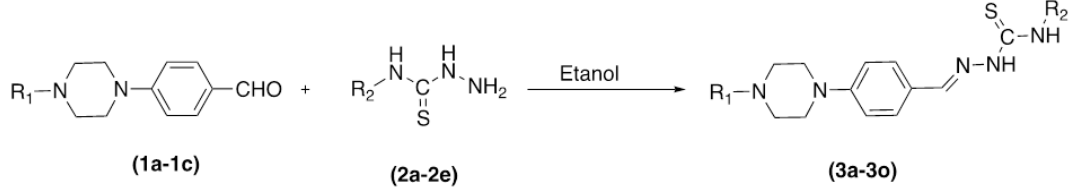


Şekil 4.2 Tiyosemikarbazid türevlerinin (2a-2e) sentezi

4.1.3. Tiyosemikarbazon türevlerinin sentezi (3a-3o) (Yöntem C)

Sentezlenen N-sübstitüetiyosemikarbazit türevleri (2a-2e) (0.001 mol) ve 4-sübstitüe benzaldehit türevleri (1a-1c) (0.001mol) etanol içerisinde çözündürülmüş ve

karışım geri çeviren soğutucu altında 6 saat boyunca kaynatılmıştır. Bu süre boyunca belirli aralıklar ile İTK kontrolü sağlanmıştır. İTK uygulaması ile reaksiyon bitimine karar verildikten sonra reaksiyon içeriği oda ısısına soğutulmuş ve çöken ürün süzülerek alınmıştır.



Bileşik	R ₁	R ₂
3a	Fenil	Etil
3b	Fenil	Allil
3c	Fenil	Fenil
3d	Fenil	4-Metoksifenil
3e	Fenil	4-Klorofenil
3f	4-Florofenil	Etil
3g	4-Florofenil	Allil
3h	4-Florofenil	Fenil
3i	4-Florofenil	4-Metoksifenil
3j	4-Florofenil	4-Klorofenil
3k	4-Florobenzil	Etil
3l	4-Florobenzil	Allil
3m	4-Florobenzil	Fenil
3n	4-Florobenzil	4-Metoksifenil
3o	4-Florobenzil	4-Klorofenil

Şekil 4.3 Tiyosemikarbazon türevlerinin (3a-3o) sentezi

4.2. İTK Çalışmaları

Bütün sentez çalışmalarında reaksiyonun tamamlanıp tamamlanmadığı İTK ile kontrol edilmiştir. Deney ortamında belirli zaman aralıklarında alınan numunelerin ve başlangıç maddelerinin etanoldeki çözeltisi ile adsorban olarak kullanılan silikajel 60 F254 kaplı, önceden uygun çözücü karışımlarıyla doyurulmuş alüminyum plaklara kılcal borular yardımı ile uygulanıp Petrol eteri-etil asetat (3:1) çözücü sisteminin kullanıldığı hareketli faz içerisinde sürüklenmiştir. Ultraviyole (254 nm ve 366 nm) ışığı altında absorpsiyon noktaları saptanmıştır. İTK sonucuna göre reaksiyon süreci yönlendirilmiştir.

4.3. Erime Noktalarının Tespiti

Mettler Toledo-MP90 Melting Point System erime derecesi tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilen erime noktası tayininde kapiler boruların ½ cm'i kadar madde konulmuştur.

4.4. ¹H-NMR Spektrumlarının Alınması

Elde edilen bileşiklerin ¹H-NMR spektrumları, Bruker 300 MHz NMR spektrometresi cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Çözücü olarak dimetilsülfoksit-d₆ (Dimetilsülfoksit-d₆) kullanılmıştır.

4.5. ¹³C-NMR Spektrumlarının Alınması

Elde edilen bileşiklerin ¹³C-NMR spektrumları, Bruker 75 MHz NMR spektrometresi cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Çözücü olarak dimetilsülfoksit-d₆ (Dimetilsülfoksit-d₆) kullanılmıştır.

4.6. Kütle Spektrumlarının Alınması

LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto, Japonya) cihazında elektron sprey iyonizasyon (ESI) iyonlaştırma tekniği kullanılarak bileşiklerin kütle spektrumları elde edilmiştir. Çözücü olarak metanol (>99%) kullanılmıştır.

4.7. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Tez çalışmasında sentezi tamamlanan bileşiklerin ChE ve MAO enzimleri üzerinde inhibisyon etkinlikleri araştırılmıştır. Yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan distile suyu Milipor, Milli-Q Synthesis A10 saflaştırma cihazından elde edilmiştir. Çalışmalar zamanı kullanılan tüm çözeltiler yeni hazırlanmış ve 1 hafta içerisinde tüketilmiştir. BioTek-Precision Power (Amerika Birleşik Devletleri) robotik pipetleme sistemi kullanılarak enzim inhibisyon çalışması için hazırlanmış solusyonların porsiyonlar şeklinde ayrılmış, test bileşiklerinin 96 kuyucuklu plakalara uygulanmış, enzim substrat çözeltilerinin ilave edilmiştir. BioTek-Synergy H1 Microplate Reader (Amerika Birleşik Devletleri) cihazı kullanılarak enzim protokolü oluşturulmuş, izlenmiş ve spektrofotometrik ölçümlerin alınması işlemleri yapılmıştır.

4.7.1. Antikolinesterazaktivite çalışmaları

Sentezlenen maddelerin AChE ve BChE enzim inhibitör aktivitelerinin araştırılması modifiye Ellman metodu ile yapılmıştır [2, 17, 45-54].

4.7.1.1. AChE ve BChE enzim solüsyonunun hazırlanması

Liyofilize toz halde olan AChE/BChE enzimini çözmek için 500 U/mL konsantrasyonda %1'lik jelatin çözeltisi hazırlanmıştır. Enzim çözeltisinin 1 mL'i 100 mL'ye tamamlamak için balon joje içinde hacim su kullanılmıştır. Bu işlem sonrasında stok enzim çözeltisi 5 U/mL'ye seyreltilmiştir. Elde edilen stok enzim solüsyonu 0.7 mL'lik porsiyonlar şeklinde -20°C'de muhafaza edilmiştir. Enzim deneyine geçmeden hemen önce enzim çözeltileri oda ısısına getirilmiş ve suyla 1.4 mL'ye tamamlanarak metod konsantrasyonu olan 2.5U/mL'ye seyreltilmiştir.

4.7.1.2. Asetiltiyokolinodür (ATC) çözeltisinin hazırlanması (0.075 M)

Asetiltiyokolinodür (0.217 g) bir miktar suda çözündürüldükten sonra 10 mL'ye tamamlamak için su kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon, kullanılabilecek kadar 0.4 mL'lik hacimler şeklinde -20°C'de muhafaza edilmiştir (163).

4.7.1.3. Bütiltiyokolinodür (BTC) çözeltisinin hazırlanması (0.075 M)

Bütiltiyokolinodür (0.237 g) bir miktar suda çözündürüldükten sonra 10 mL'ye tamamlamak için su kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon, kullanılabilecek kadar 0.4 mL'lik hacimler şeklinde -20°C'de muhafaza edilmiştir (163).

4.7.1.4. 5-5-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) solüsyonunun hazırlanması (0.01 M)

5-5-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (0.396 g) tartılmış ve bir miktar suyla çözündürüldükten sonra sodyum bikarbonat (0.15 g) eklenmiştir. Toplam hacim suyla 100 mL'e tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon, 3 mL'lik hacimler şeklinde 20°C'de muhafaza edilmiştir.

4.7.1.5. Fosfat tamponunun hazırlanması (pH=8.0)

Potasyum dihidrojen fosfatın (13.61 g) suda çözülmesi için 1 L su kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyonun pH'sı pH metre kullanılarak 0.1 N potasyum hidroksit solüsyonu ile kontrollü biçimde 8.0±0.1'e ayarlanmıştır. Ayarlı tampon solüsyonunu süzmek için çapı 0.22 µm por olan tek kullanımlık filtreler kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon, kullanıma kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

4.7.1.6. Test bileşiklerin çözeltilerinin hazırlanması

Test edilecek bileşiklerin ön tarama niteliğindeki enzim inhibitör aktivite çalışmaları %2'lik dimetilsülfoksit içinde hazırlanmış 10^{-3} ve 10^{-4} M'lık iki konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnhibisyon oranları %0-100 aralığında değerlendirilmiştir. İkinci aşama enzim inhibisyon deneyinde ise 10^{-4} M konsantrasyonda %50 ve daha fazla oranda inhibitör aktivite gösteren bileşiklerin seri seyreltmelerle 10^{-9} M konsantrasyona kadar konsantrasyonları hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Böylelikle seçilen bileşiklerin 10^{-3} - 10^{-9} M konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları belirlenmiş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

4.7.2. AChE ve BChE inhibisyon çalışması

Elde edilen tüm bileşikler öncelikle ön tarama testine tabi tutulmuştur. Ön tarama testi bileşiklerin 10^{-3} ve 10^{-4} M'lık konsantrasyonda test çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin çözeltilerini hazırlamada çözücü olarak %2'lik dimetilsülfoksit kullanılmıştır. Aktivite değerleri %0-100 aralığında inhibisyon şeklinde değerlendirilmiştir.

Kolorimetrik Ellman metodu modifiye edilerek gerçekleştirilen enzim inhibisyon çalışmalarına başlamadan önce test işlemlerinde kullanılacak bütün çözeltiler 20-25°C'ye getirilmiştir. 96 kuyucuklu plaklar biyolojik aktivite çalışmaları süresince kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 210 µL hacimli çözelti eklenmiştir. Bu çözeltinin içeriğini; 140 µL fosfat tamponu, 20 µL enzim solüsyonu, 20 µL inhibitör çözelti, 20 µL DTNB çözeltisi, 10 µL ATC/BTC çözeltileri oluşturmaktadır. Çözeltiler, 96 kuyucuğa da yetecek miktarlarda iki farklı test çözeltisi meydana getirecek şekilde karıştırılmıştır. Birinci test çözeltisi; 1 kuyucuk için 70 µL fosfat tamponu, 20 µL enzim çözeltisi ve 20 µL DTNB çözeltisi, ikinci çözelti ise; 1 kuyucuk için 70 µL fosfat tamponu ve 10 µL ATC/BTC çözeltisi içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Biotek Precision XS robotik sistemi kullanılarak birinci test çözeltisi ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış test bileşiği çözeltileri (20 µL) 96 kuyucuklu plakalara eklenmiştir. Bu aşamada her bir bileşik için dört tekrar olacak şekilde deney prosedürü planlanmıştır. Hazırlanan plakalar BioTek-Synergy H1 mikroparka okuyucusuna yerleştirilerek 5 dk süre ile karıştırılmış ve hemen arkasından 25°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 15 dk'lık inkübasyon süresi sonunda mikro plaka okuyucusu dispenser haznesinde bulunan ikinci test çözeltisi her kuyucuğa 80 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Bu ekleme işleminden sonra 30 sn'lik bir karıştırma işlemi daha yapılmıştır. 30 sn sonunda 412 nm'de birinci absorbans okuması gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun devam etmesini sağlamak adına mikro plakalar 5 dk daha karışmaya bırakılmış ve bu süre sonunda ikinci absorbans okunmuştur.

İki okuma arasındaki absorbans farkları alınarak % inhibisyon oranları hesaplanmıştır.

4.7.3. Monoamin oksidaz enzim aktivite çalışmaları

Fluorometrik metod ile araştırılan MAO-A ve MAO-B enzim inhibitör aktiviteleri için tez kapsamında elde edilen bileşiklerin çözeltileri hazırlanmıştır [33, 53-64].

Enzim inhibisyon çalışmaları sırasında kullanılan üç farklı çözelti günlük olarak hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden ilki tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen bileşikler ve referans bileşiklerin çözeltileridir. İkinci olarak kullanılan çözelti için rekombinant hMAO-A (0.5 U/mL) ve rekombinant hMAO-B (0.64 U/mL) enzimleri fosfat tamponu içerisinde çözündürülerek 10 mL hacimli çözelti haline getirilmiştir. Son çözelti ise Ampliflu™ Red (20 mM, 200 µL), Horseradish Peroksidaz (200 U/mL, 100 µL) ve tiramin (100 mM, 200 µL), fosfat tamponu içinde çözündürülerek hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Birinci çözeltilerden 20 µL, ikinci çözeltilerden 100 µL alınarak siyah renkli düz tabanlı 96 kuyucuklu plakalara eklenmiştir. Çözeltileri içeren plakalar 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra üçüncü çözeltilerden 100 µL ilave edilerek reaksiyonun başlaması sağlanmıştır. Bu karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve 30 dk sonrasında her 5 dakikada floresans ölçüm yapılmıştır. Floresans ölçümün dalga boyu Ex/Em=535/587 nm'dir. Blank kontrol olarak inhibitör bileşikler çözmede kullanılan %2'lik DİMETİLSÜLFOKSİT kullanılmıştır. İnhibitörlerin horseradish peroksidaz üzerine inhibitör etkisini kontrol etmek için enzim solüsyonu

yerine %3 H₂O₂ (20 mM) kullanılarak paralel okuma yapılmıştır. Blank, kontrol ve tüm inhibitör konsantrasyonları dörütlü tekrar şeklinde yapılmış ve yüzde inhibisyonları hesaplanmıştır.

4.8. Moleküler Modelleme Çalışmaları

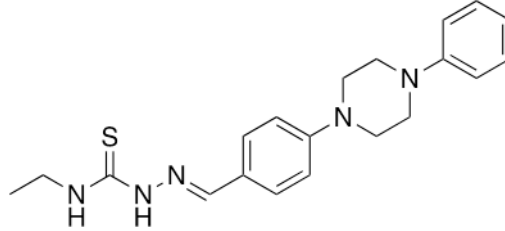
Aktif bileşiklerin moleküler modelleme çalışmaları AChE (PDB: 4EY7 [65]) ve MAO-B (PDB: 2V5Z [66]) enzimlerinin kristalleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Doking çalışmaları *Schrödinger Suite 2020 Update 2* [67] programı kullanılarak standart prosedürler ile gerçekleştirilmiştir. *LigPrep 3.8* [68], *Glide 7.1* [69] ara yüzleri kullanılarak single precision (SP) ile docking işlemi gerçekleştirilmiştir.

Standart prosedürler kullanılarak hem AChE (PDB:4EY7) hem de MAO-B (PDB:2V5Z) emzimleri için grid dosyaları hazırlanmıştır. Sentez çalışmaları sonucunda elde edilen türevlerin (**3a-3o**) molekül şekilleri ChemDrawn programı ile çizilmiş ve Ligprep ara yüzü kullanılarak pH=7.4±1 değerlerine göre ligand formları hazırlanmıştır. Elde edilen dosyalar ile doking prosedürü başlatılmış ve elde edilen pozlar iki boyutlu ve üç boyutlu olarak alınarak sunulmuştur.

5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR

5.1. Sentez Çalışmaları

5.1.1. *N*-Etil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3a)



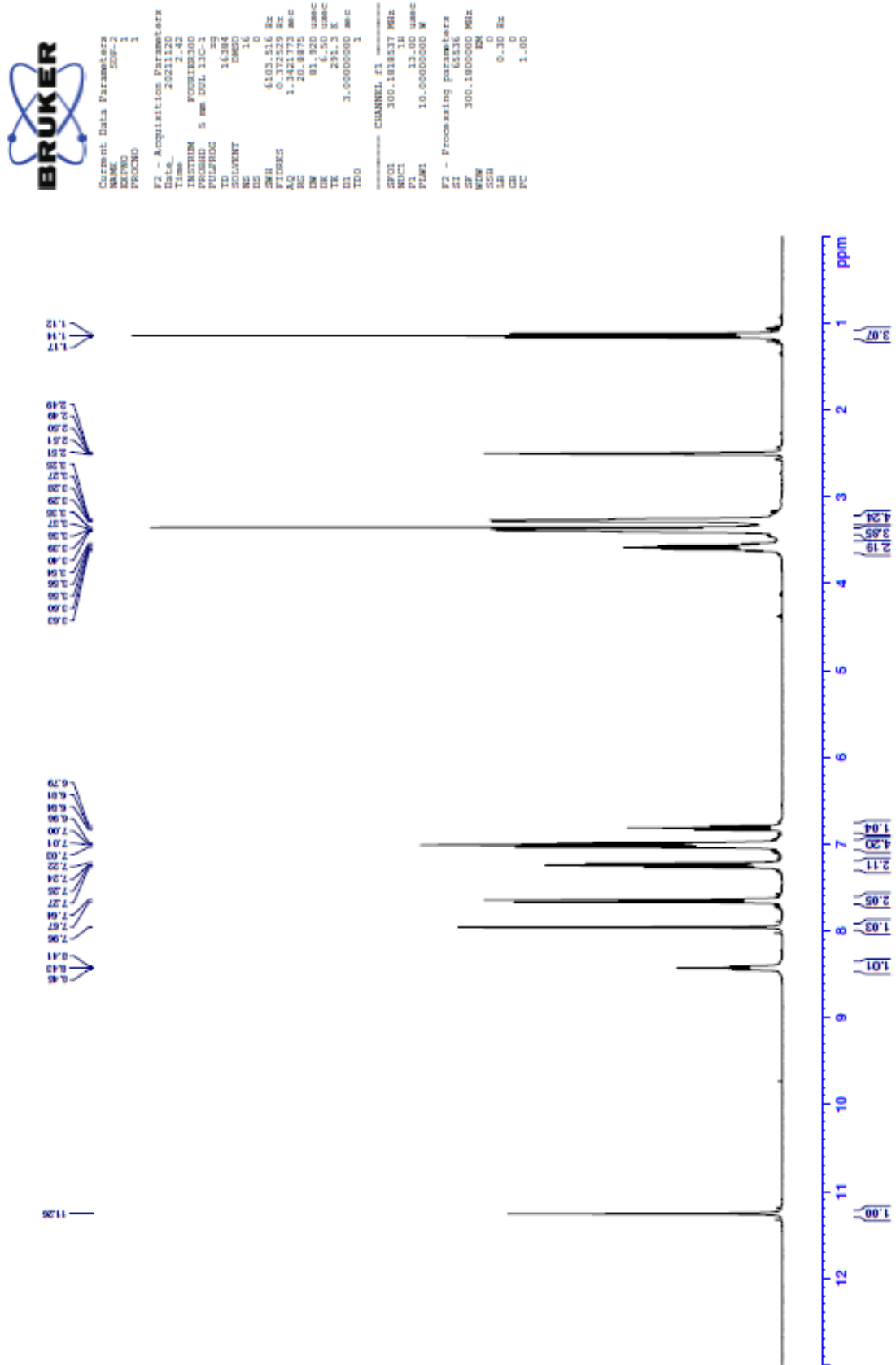
Şekil 5.1. *N*-Etil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3a)

Verim: %79.

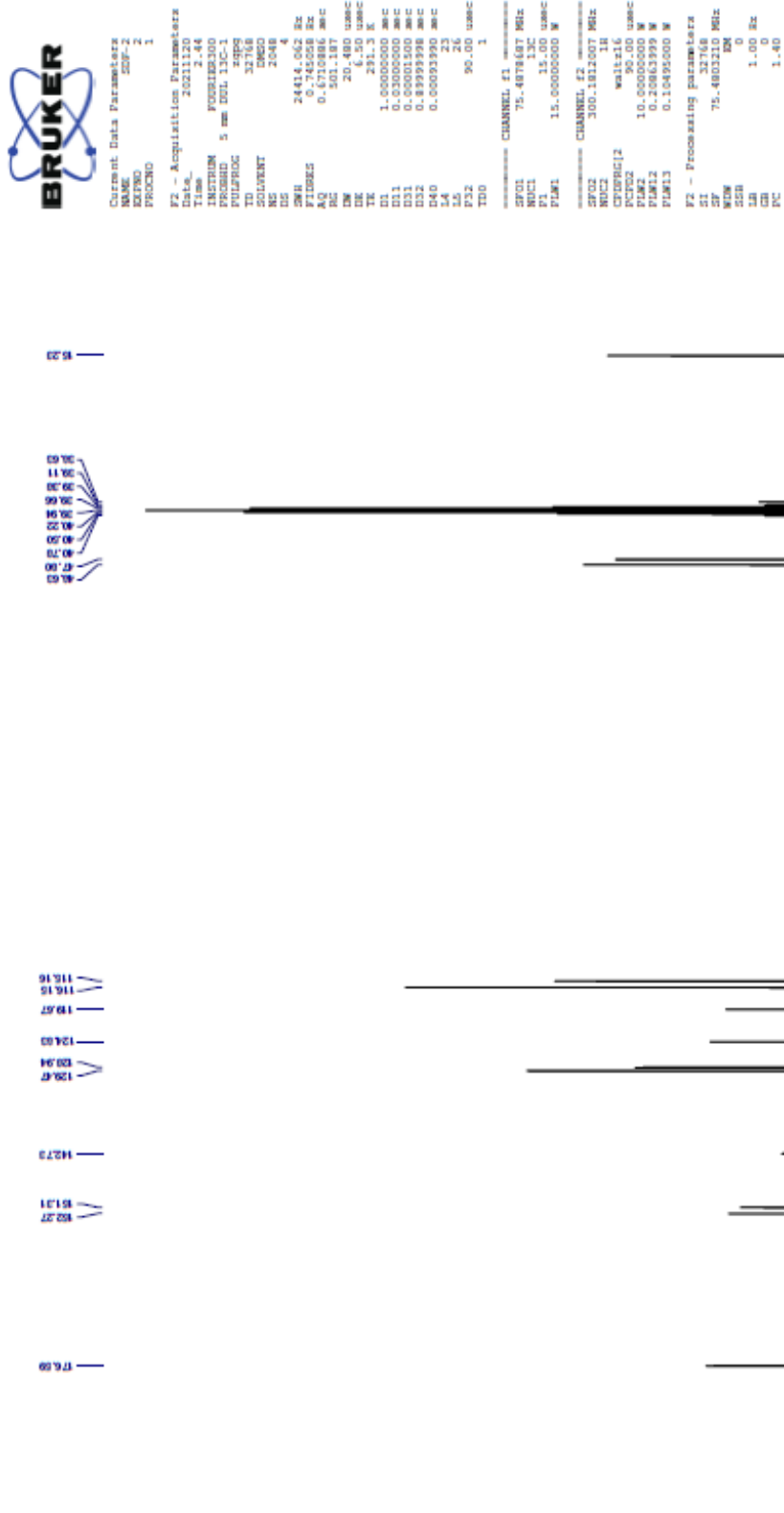
HRMS (m/z): $[M+H]^+$ hesaplanan $C_{20}H_{25}N_5S$: 368.1903; bulunan: 368.1894.

1H -NMR (Dimetilsülfoksit-*d*₆toro, 300 MHz): δ = 1.14 (CH₃, 3H, t, J =7.1 Hz), 3.25-3.29 (piperazin, 4H, m), 3.37-3.40 (piperazin, 4H, m), 3.54-3.63 (-CH₂-, 2H, m), 6.81 (Ar-H, 1H, t, J =7.2 Hz), 6.98-7.03 (Ar-H, 4H, m), 7.21-7.27 (Ar-H, 2H, m), 7.65 (Ar-H, 2H, d, J =8.8 Hz), 7.96 (-CH=N-, 1H, s), 8.43 (-NH, 1H, t, J =5.9 Hz), 11.26 (-NH, 1H, s).

^{13}C -NMR (Dimetilsülfoksit-*d*₆toro, 75 MHz): δ = 15.23, 38.63, 47.79, 48.63, 115.16, 116.15, 119.67, 124.83, 128.94, 129.47, 142.73, 151.31, 152.27, 176.59.



Şekil 5.2. ^1H -NMR spektrumu (3a)



Şekil 5.3. ^{13}C -NMR spektrumu (3a)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analysis\5DF-2_2 lod

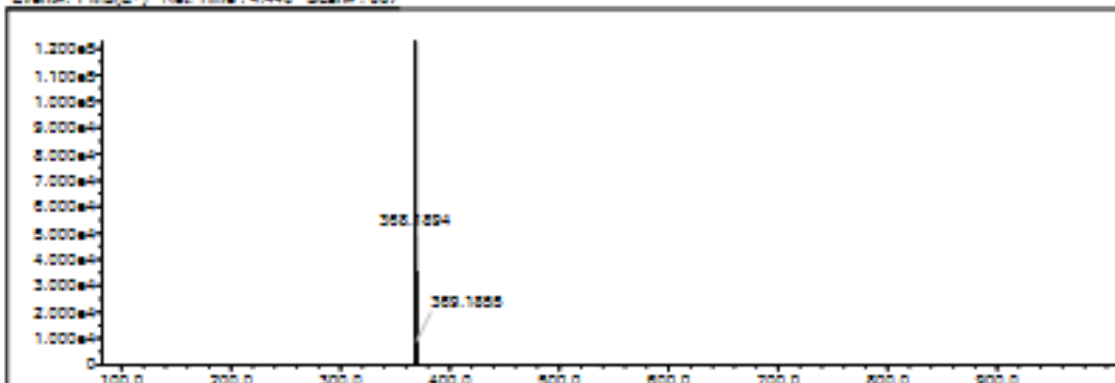
Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	10	40	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

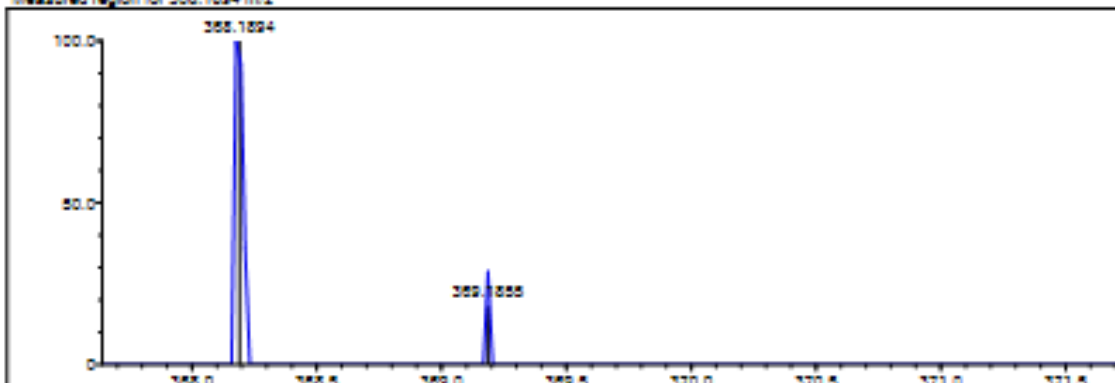
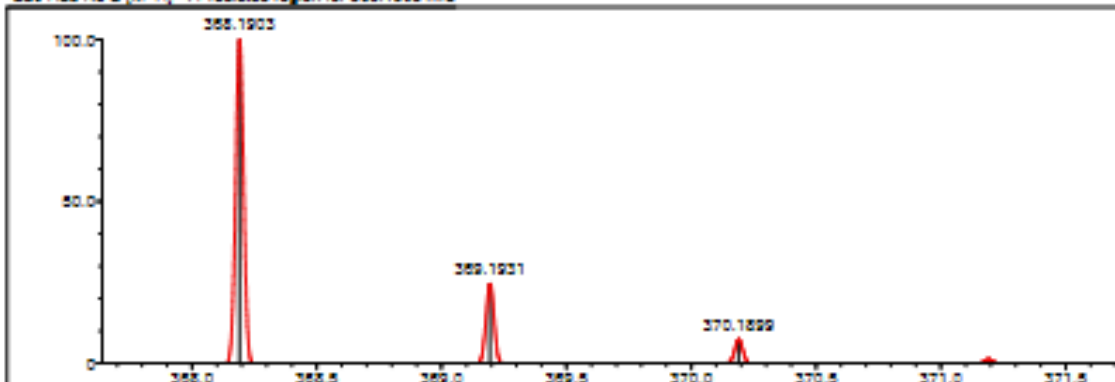
DBE Range: 5.0 - 15.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ion: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Max: 9000
 Max Results: 150

Event#: 1 MS(E+) Rel. Time : 4.440 Scan#: 557



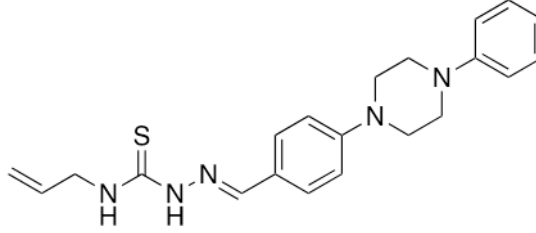
Measured region for 368.1894 m/z

C20 H25 N5 S [M+H]⁺ : Predicted region for 368.1903 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	DE (mDa)	DE (ppm)	Is	DBE
1	0.00	C20 H25 N5 S	[M+H] ⁺	368.1894	368.1903	-0.9	-2.44	0.00	11.0

Şekil 5.4. HRMS spektrumu (3a)

5.1.2. *N*-Allil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3b)



Şekil 5.5. *N*-Allil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3b)

Verim: %80.

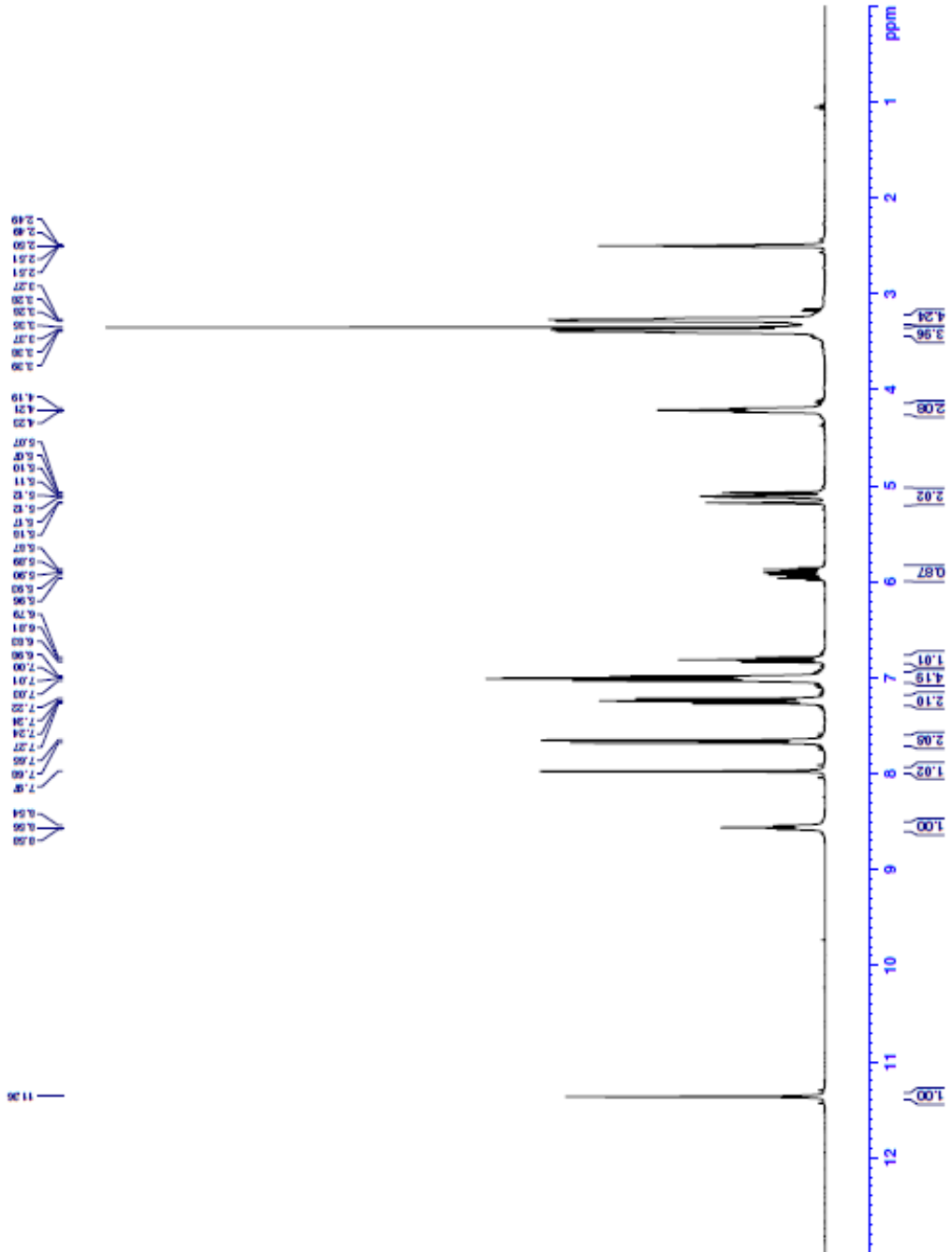
HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₁₄H₁₈N₂O₃S₃: 359.0552; bulunan: 359.0546.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-*d*ötoro, 300 MHz): δ = 3.27-3.28 (piperazin, 4H, m), 3.37-3.39 (piperazin, 4H, m), 4.21 (Allil-H, 2H, t, *J*=5.6 Hz), 5.06-5.18 (Allil-H, 2H, m), 5.87-5.96 (Allil-H, 1H, m), 6.81 (Ar-H, 1H, t, *J*=7.2 Hz), 6.98-7.03 (Ar-H, 4H, m), 7.22-7.27 (Ar-H, 2H, m), 7.67 (Ar-H, 2H, d, *J*=8.9 Hz), 7.97 (-CH=N-, 1H, s), 8.56 (-NH, 1H, t, *J*=5.9 Hz), 11.36 (-NH, 1H, s).

¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-*d*ötoro, 75 MHz): δ = 46.15, 47.79, 48.62, 115.15, 115.89, 116.15, 119.67, 124.76, 128.99, 129.47, 135.77, 143.00, 151.31, 152.31, 177.11.



Current Data Parameters
NAME 55P-1
EXPNO 3
PROCNO 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 2021122
Time 11.51
INSTRUM 5 mm QNP 13C-1
PROBHD 5 mm QNP 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 16384
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 0
SWH 6105.516 Hz
FIDRES 0.373539 Hz
AQ 1.3421775 sec
RG 21.2412
DM 81.920 umsec
DE 6.50 umsec
TE 300.2 K
U3 3.00000000 sec
TD0 1
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.00 umsec
PL1 10.00000000 W
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1406000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



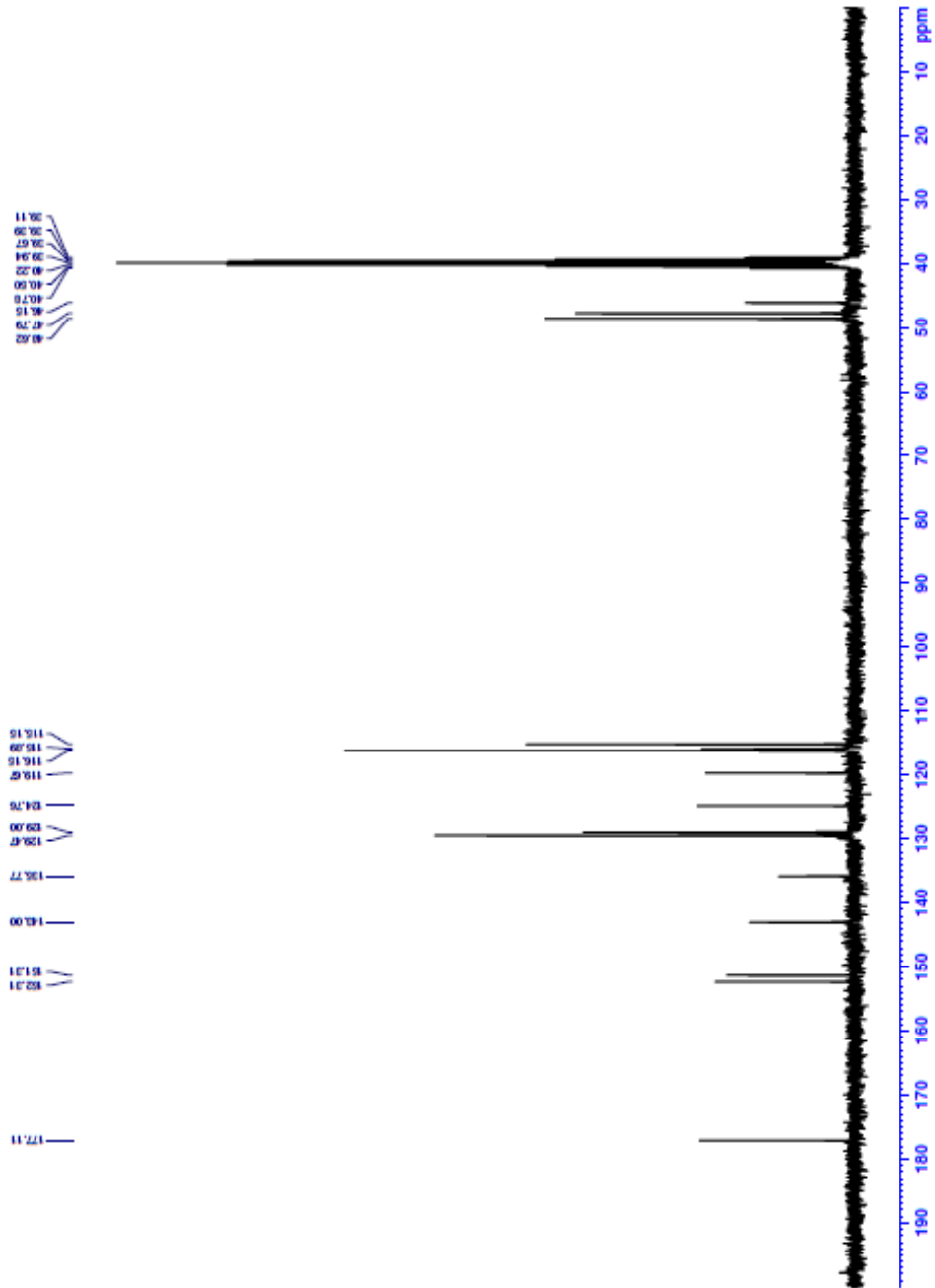
BRUKER

Current Data Parameters
NAME 3b
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 2011122
Time 11.53
INSTRUM FOCUS300
PROBHD 5 mm DOL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 2048
DS 4
SWH 2444.502 Hz
FIDRES 0.745026 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DM 20.480 usec
DE 1.500 usec
TE 300.2 K
D1 1.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00001500 sec
D13 0.00001500 sec
D14 0.89999999 sec
SFO1 75.4878487 MHz
NUC1 13C
P1 15.00 usec
PL1 15.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.1312007 MHz
NUC2 1H
P2 1.00 usec
PL2 0.00000000 W
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4878487 MHz
NUC1 13C
P1 15.00 usec
PL1 15.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4803210 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



Şekil 5.7. ^{13}C -NMR spektrumu (3b)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analysis\1\SDF-1_1.lcd

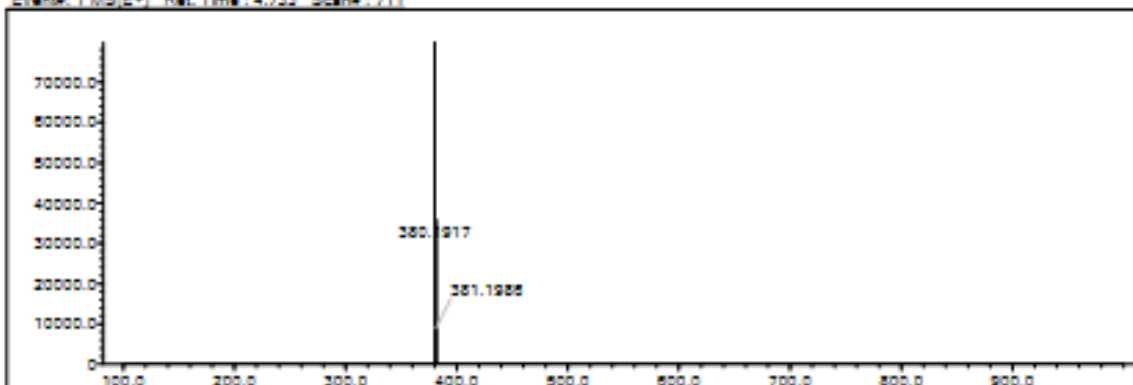
Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Added
H	1	9	25	O	2	0	4	Cl	1	0	0	I	3	0	0	H
S	3	0	0	P	1	0	0	Br	1	0	0					
C	4	7	37	P	3	0	0	Ru	2	0	0					
N	3	2	5	S	2	0	2	Pd	2	0	0					

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

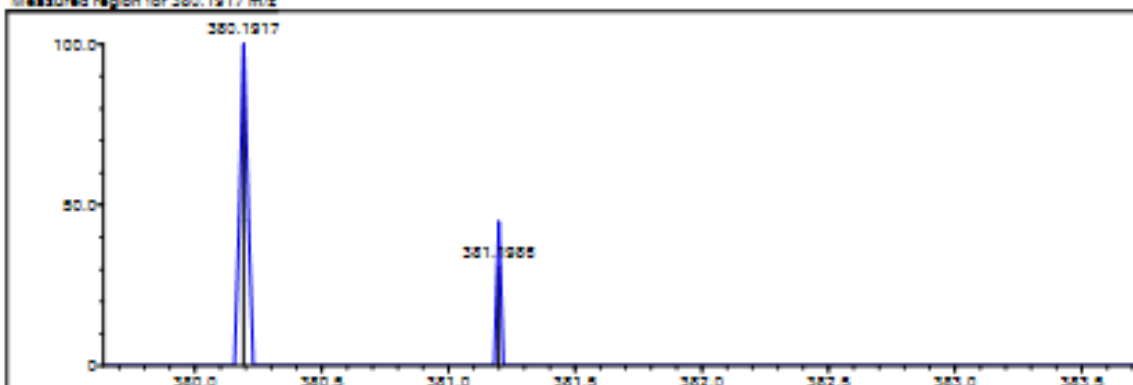
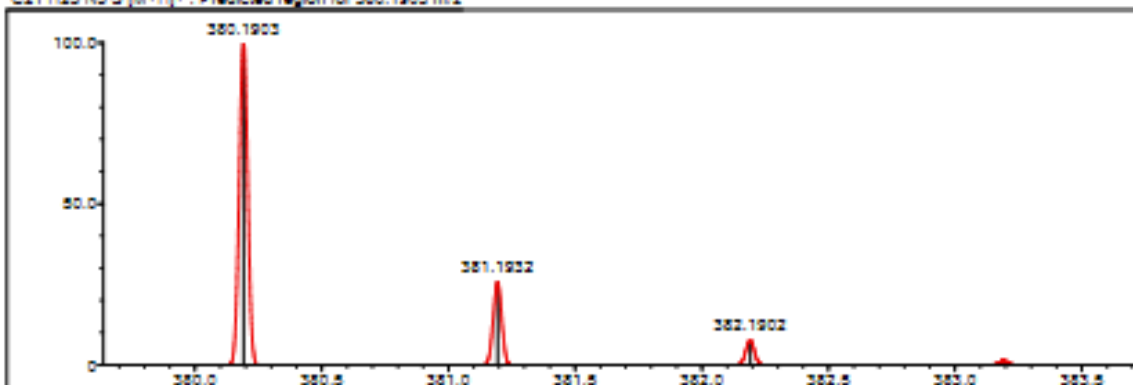
DSE Range: 5.0 - 20.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Max: 5000
 Max Results: 50

Event#: 1 MS(E+), Ret. Time: 4.733, Scan#: 711



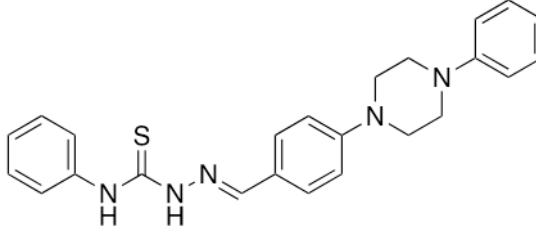
Measured region for 380.1917 m/z

C21 H25 N5 S [M+H]⁺: Predicted region for 380.1903 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass. m/z	Pred. m/z	DE (mDa)	DE (ppm)	Isot	DSE
1	0.00	C21 H25 N5 S	[M+H] ⁺	380.1917	380.1903	1.4	3.68	0.00	12.0

Şekil 5.8. HRMS spektrumu (3b)

5.1.3. *N*-fenil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazine-1-karbotiyoamid (3c)



Şekil 5.9. *N*-fenil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazine-1-karbotiyoamid (3c)

Verim: %77.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₄H₂₅N₅S: 416.1903; bulunan: 416.1877.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-*d*₆toro, 300 MHz): δ = 3.27-3.29 (piperazin, 4H, m), 3.39-3.41 (piperazin, 4H, m), 6.81 (Ar-H, 1H, t, *J*=7.2 Hz), 6.98-7.04 (Ar-H, 4H, m), 7.19-7.22 (Ar-H, 1H, m), 7.24-7.27 (Ar-H, 2H, m), 7.34-7.39 (Ar-H, 2H, m), 7.57-7.60 (Ar-H, 2H, m), 7.76 (Ar-H, 2H, d, *J*=8.9 Hz), 8.07 (-CH=N-, 1H, s), 10.01 (-NH, 1H, s), 11.68 (-NH, 1H, s).

¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-*d*₆toro, 75 MHz): δ = 47.71, 48.62, 115.05, 116.15, 119.67, 124.48, 125.58, 126.21, 128.46, 129.41, 129.47, 139.65, 143.86, 151.30, 152.46, 175.68.

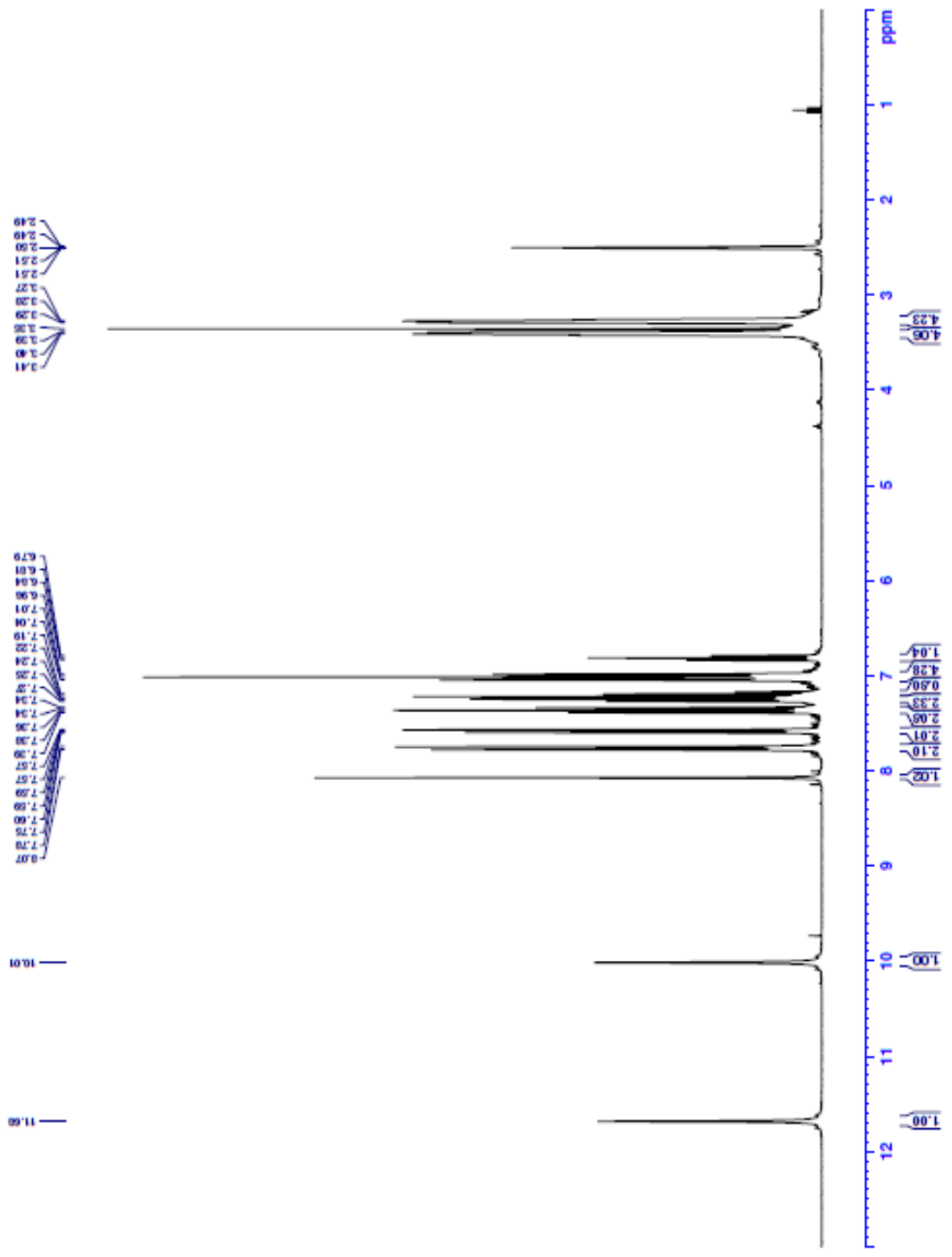
BRUKER

Current Data Parameters
 NAME: 3c
 EXPNO: 2
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 2021120
 Time: 4.46
 INSTRUM: PUCKER300
 PULPROG: zgpg30
 TO: 16.384
 SOLVENT: DMSO
 NS: 16
 DS: 0
 SWH: 6105.516 Hz
 FIDRES: 0.342173 Hz
 AQ: 1.342173 sec
 RG: 21.7706
 INW: 81.320 ussec
 DE: 6.50 ussec
 TE: 291.3 K
 D1: 3.00000000 sec
 D11: 1

===== CHANNEL f1 =====
 SF01: 300.1318137 MHz
 NUC1: 1H
 P1: 13.00 ussec
 PL1: 10.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI: 65536
 SF: 300.1300000 MHz
 WDW: EM
 SSB: 0
 LB: 0.00 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00



Şekil 5.10. ^1H -NMR spektrumu (3c)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analysis\50P-3_3.lcd

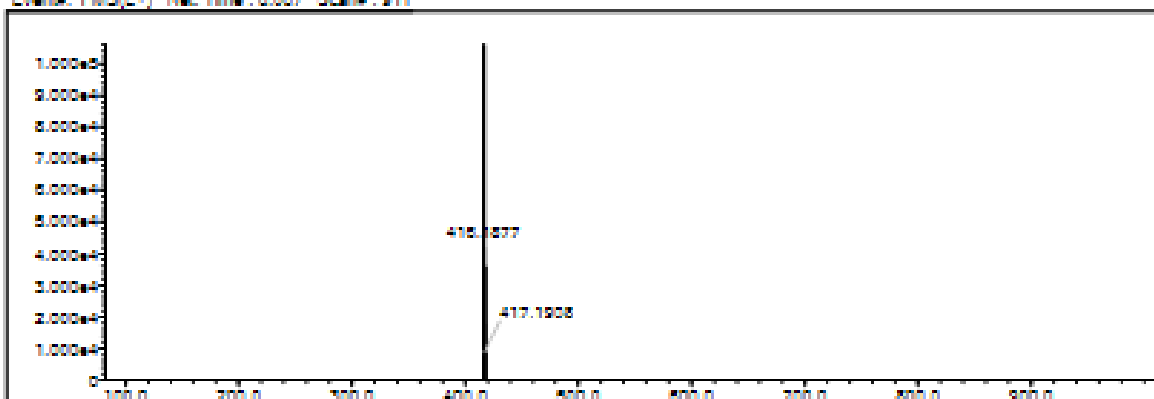
Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	10	40	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Ps	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 7
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotope: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

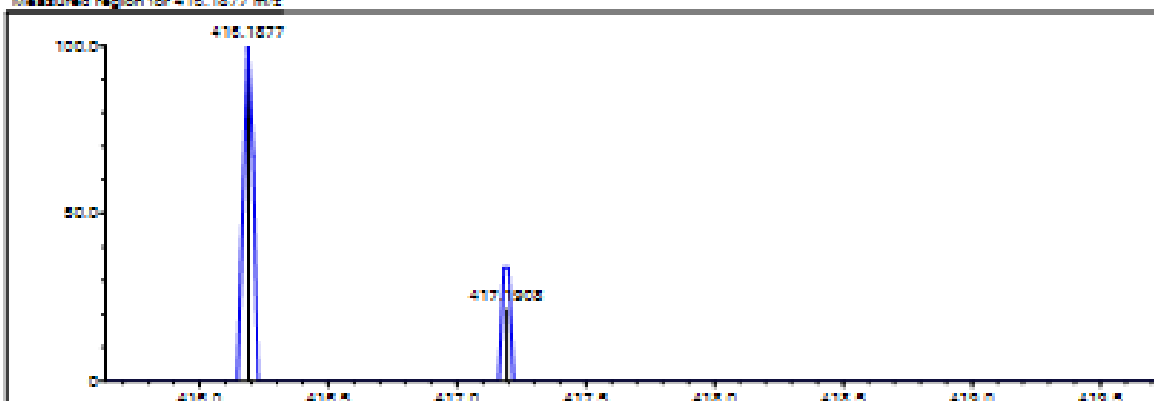
DBE Range: 5.0 - 15.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ion: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 5000
 Max Results: 150

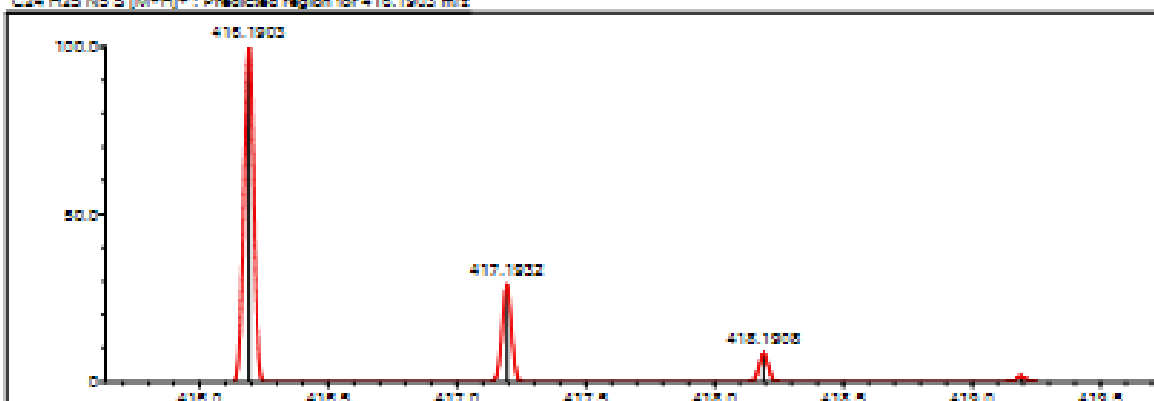
Event#: 1 MS(E+) Rel. Time : 5.057 Scan#: 911



Measured region for 415.1877 m/z



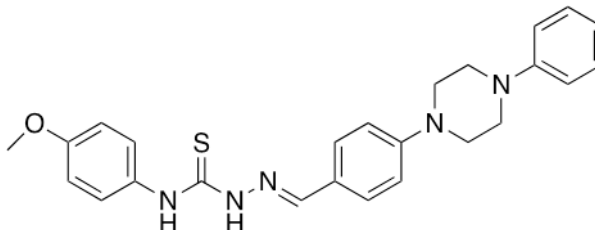
C24 H25 N5 S (M+H)+ : Predicted region for 415.1903 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	DL (mDa)	DL (ppm)	bci	DBE
1	0.00	C24 H25 N5 S	[M+H] ⁺	415.1877	415.1903	-2.6	-6.25	0.00	15.0

Şekil 5.12. HRMS spektrumu (3c)

5.1.4. N-(4-Metoksifenil)-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3d)



Şekil 5.13. N-(4-Metoksifenil)-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3d)

Verim: %81.

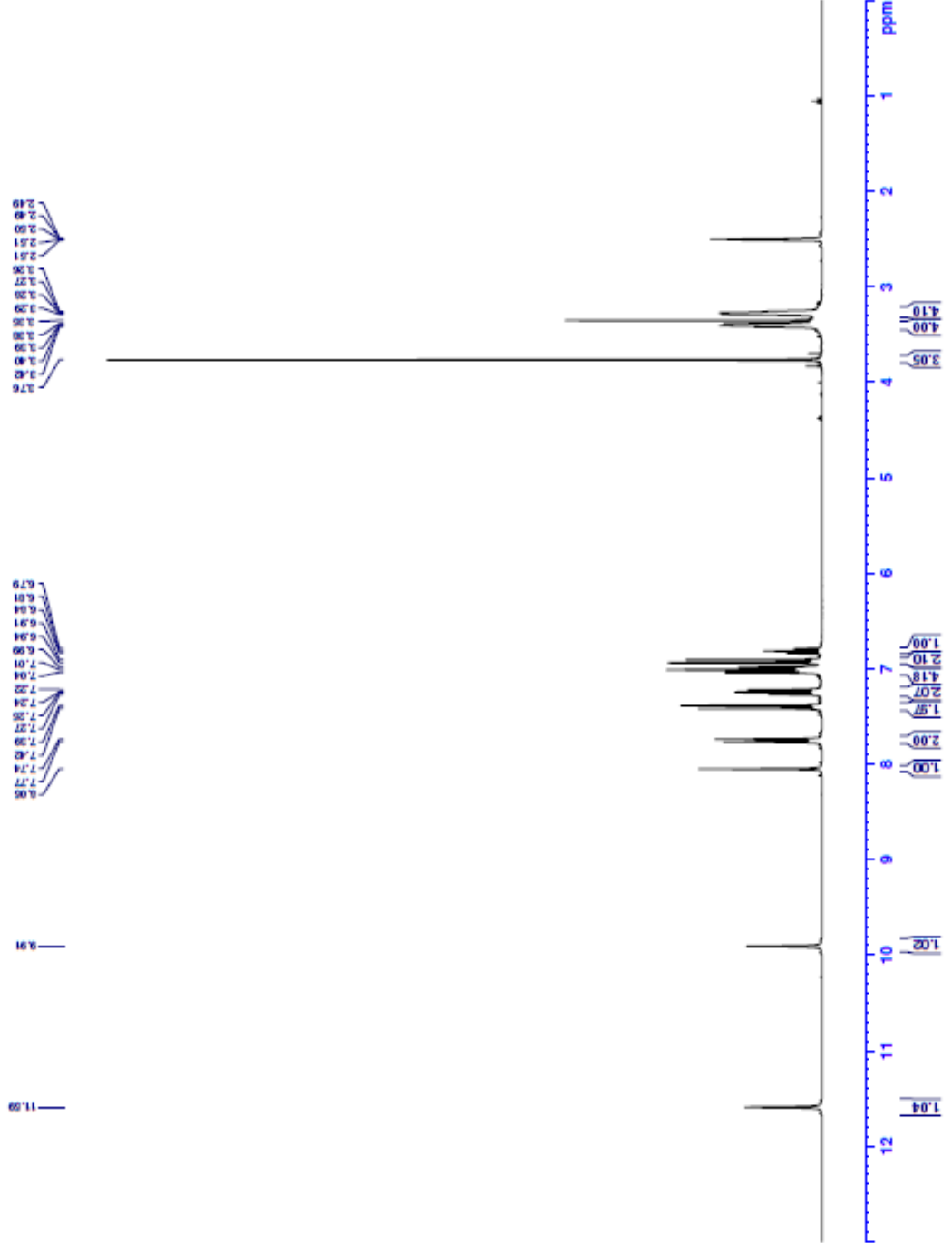
HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₅H₂₇N₅OS: 446.2009; bulunan: 446.2007.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 300 MHz): δ = 3.26-3.29 (piperazin, 4H, m), 3.38-3.42 (piperazin 4H, m), 3.76 (-OCH₃, 3H, s), 6.81 (Ar-H, 1H, t, J=7.3 Hz), 6.92 (Ar-H, 2H, d, J=8.9 Hz), 6.98-7.04 (Ar-H, 4H, m), 7.21-7.27 (Ar-H, 2H, m), 7.40 (Ar-H, 2H, d, J=8.9 Hz), 7.75 (Ar-H, 2H, d, J=8.9 Hz), 8.05 (-CH=N-, 1H, s), 9.91 (-NH, 1H, s), 11.59 (-NH, 1H, s).

¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 75 MHz): δ = 47.73, 48.62, 55.65, 113.64, 115.07, 116.15, 119.67, 124.61, 127.98, 129.34, 129.47, 132.54, 143.52, 151.31, 152.40, 157.27, 176.12.



Current Data Parameters
NAME: 5DF-4
EXPNO: 1
PROCNO: 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 2021120
Time: 5.48
INSTRUM: PDSX300
PROBHD: 5 mm DOL 13C-1
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: DMSO
NS: 16
DS: 0
SWH: 6103.516 Hz
FIDRES: 0.32259 Hz
AQ: 1.3421773 sec
RG: 26.2228
DW: 81.920 usec
DE: 6.50 usec
TE: 291.5 K
D1: 3.00000000 sec
D11: 1
===== CHANNEL f1 =====
NUC1: 13C
P1: 13.00 usec
PL1: 0.00000000 W
===== CHANNEL f2 =====
F2 - Processing parameters
SI: 65536
SF: 300.1800000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
GB: 0.30 Hz
PC: 1.00



Şekil 5.14. ^1H -NMR spektrumu (**3d**)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analysis\sdf-4_4.lcd

Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Pu	2	0	0	H
C	4	10	40	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 15.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

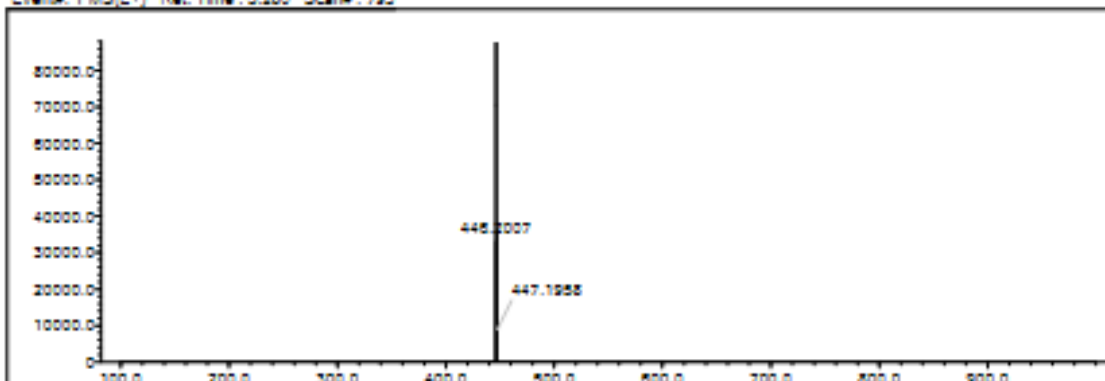
Electron Ion: both

Use MSn Info: yes

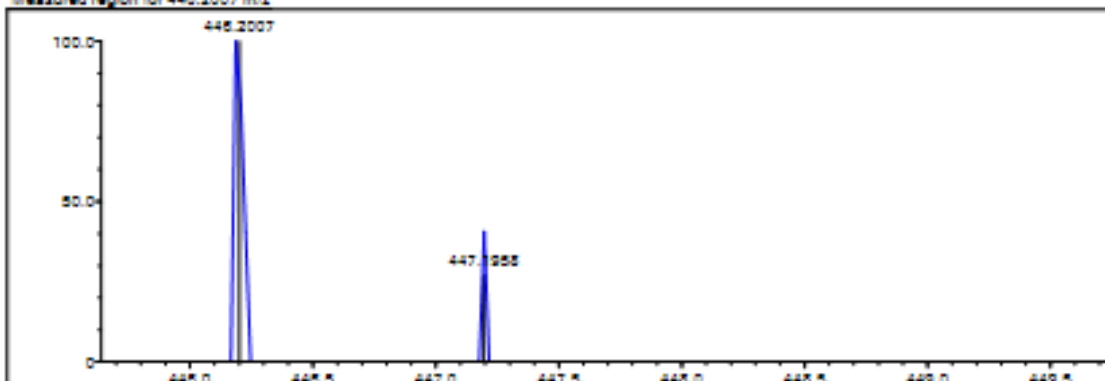
Isotope Max: 5000

Max Results: 150

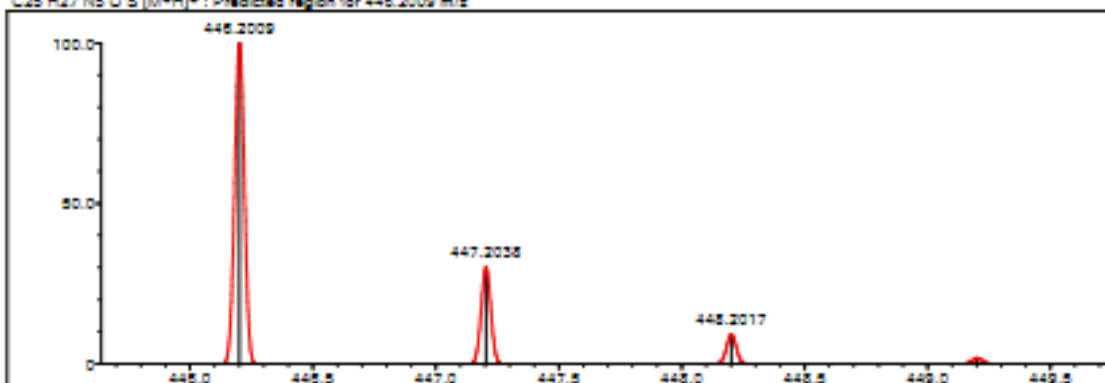
Event#: 1 MS(E+) Rel. Time: 5.280 Scan#: 723



Measured region for 445.2007 m/z



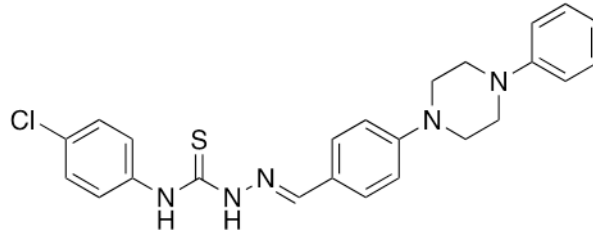
C25 H27 N5 O 5 [M+H]+ : Predicted region for 445.2009 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	DK, (mDa)	DK, (ppm)	bci	DBE
1	0.00	C25 H27 N5 O 5	[M+H] ⁺	445.2007	445.2009	-0.2	-0.45	0.00	15.0

Şekil 5.16. HRMS spektrumu (3d)

5.1.5. N-(4-Klorofenil)-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3e)



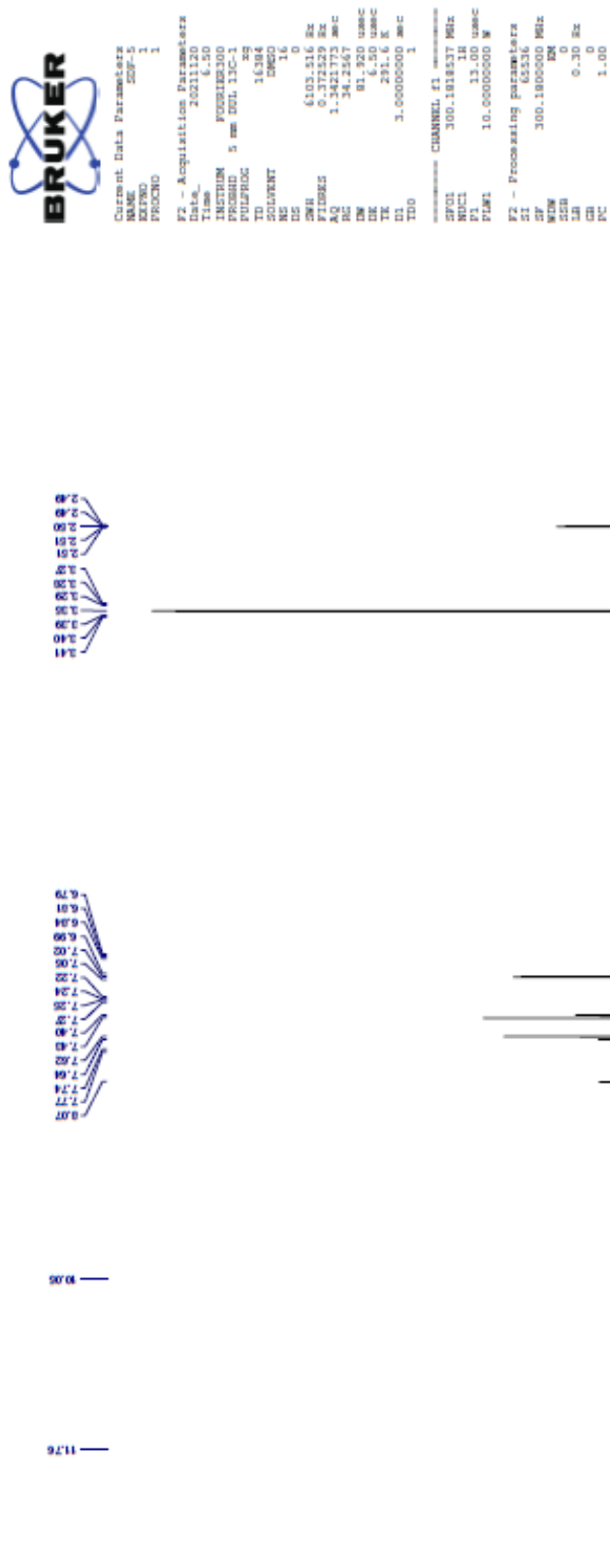
Şekil 5.17. N-(4-Klorofenil)-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3e)

Verim: %78.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₄H₂₄N₅SCl: 450.1514; bulunan: 450.1500.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 300 MHz): δ = 3.27-3.29 (piperazin, 4H, m), 3.39-3.41 (piperazin, 4H, m), 3.76 (-OCH₃, 3H, s), 6.81 (Ar-H, 1H, t, J=7.3 Hz), 6.98-7.05 (Ar-H, 4H, m), 7.22-7.27 (Ar-H, 2H, m), 7.41 (Ar-H, 2H, d, J=8.8 Hz), 7.63 (Ar-H, 2H, d, J=8.8 Hz), 7.76 (Ar-H, 2H, d, J=8.9 Hz), 8.07 (-CH=N-, 1H, s), 10.05 (-NH, 1H, s), 11.76 (-NH, 1H, s).

¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 75 MHz): δ = 47.68, 48.61, 115.02, 116.15, 119.67, 124.36, 127.82, 128.33, 129.47, 129.52, 138.65, 144.15, 144.19, 151.30, 152.51, 175.63.



Şekil 5.18. ^1H -NMR spektrumu (**3e**)



Current Data Parameters
NAME: 3e
EXPNO: 2
PROCNO: 1

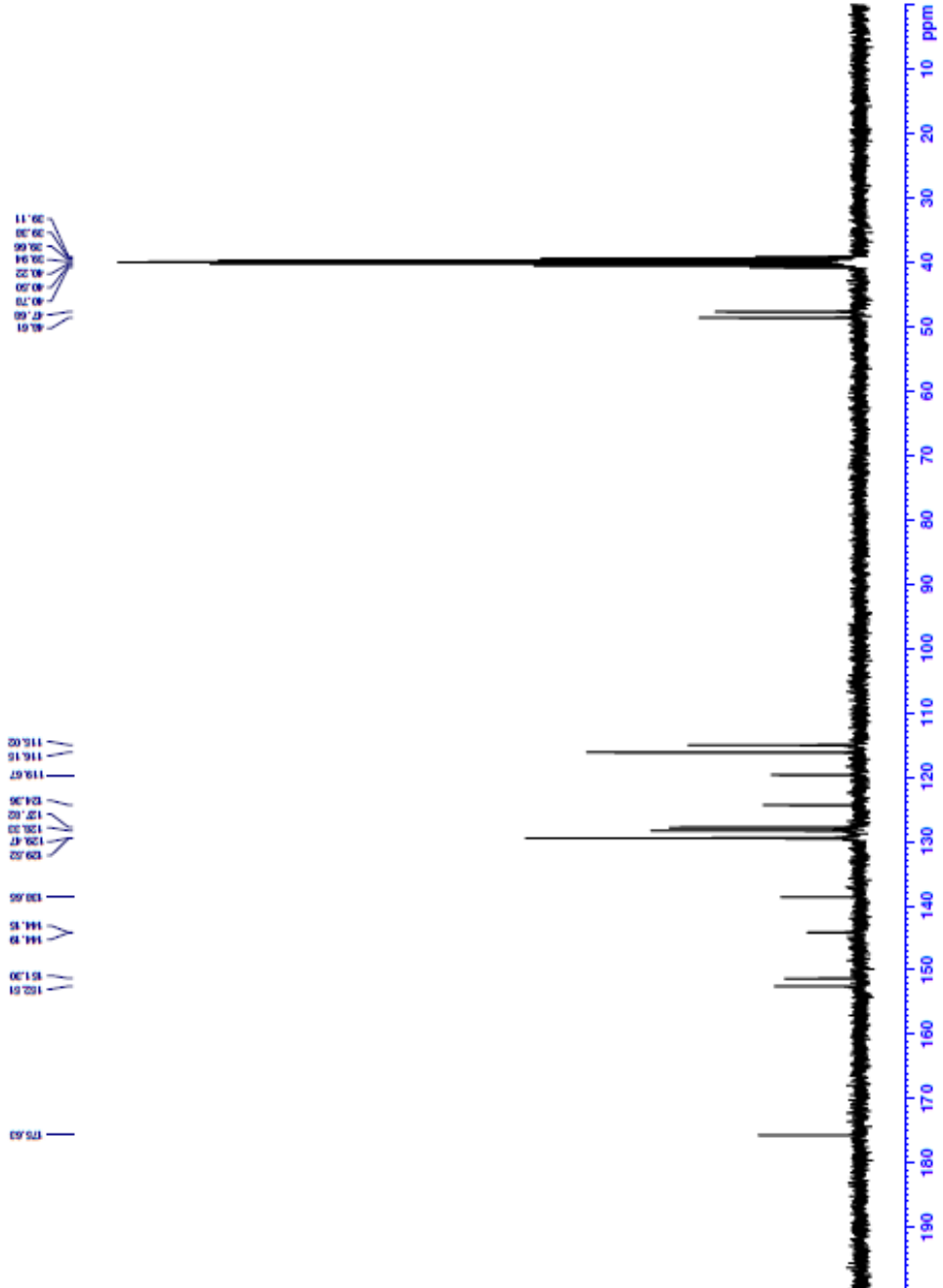
F2 - Acquisition Parameters
Date_ : 2016.02.02
Time : 6.52
INSTRUM: PULPROG
PROBHD: 5 mm DEL 113-1
PULPROG: zgpg30
TD: 32768
SOLVENT: DMSO
NS: 2048
DS: 4
SWH: 24414.042 Hz
FIDRES: 0.745058 Hz
AQ: 0.101018 sec
RG: 511.187
DM: 20.480 usec
DE: 6.150 usec
TE: 291.5 K
D1: 1.0000000 sec
D11: 0.0000000 sec
D31: 0.0000000 sec
D32: 0.8399998 sec
D40: 0.0002320 sec
L4: 1.4 sec
F2: 12 sec
F32: 90.00 usec
TD0: 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1: 13C
P1: 15.00 usec
PL1: 15.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
NUC2: 1H
P2: 1.00 usec
PL2: 0.00000000 W

===== CHANNEL f3 =====
NUC3: 1H
P3: 1.00 usec
PL3: 0.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 75.480318 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 1.00 Hz
GB: 0
PC: 1.40



Şekil 5.19. ^{13}C -NMR spektrumu (3e)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analysis\5DF-5_5.lcd

Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	10	40	P	1	0	0	Cl	1	1	1	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 15.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

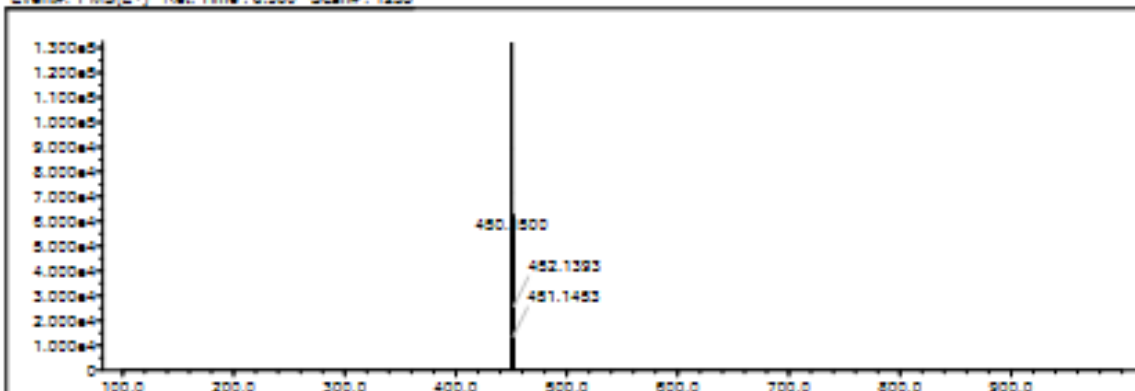
Electron Ion: both

Use MSn Info: yes

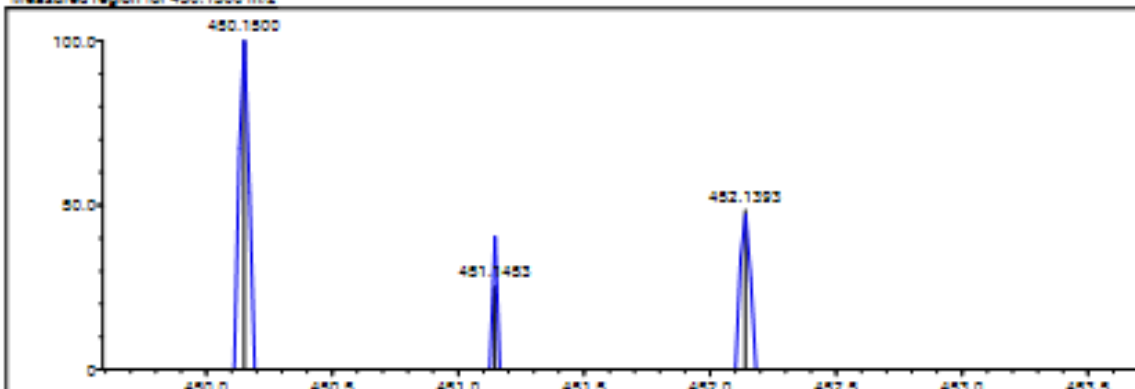
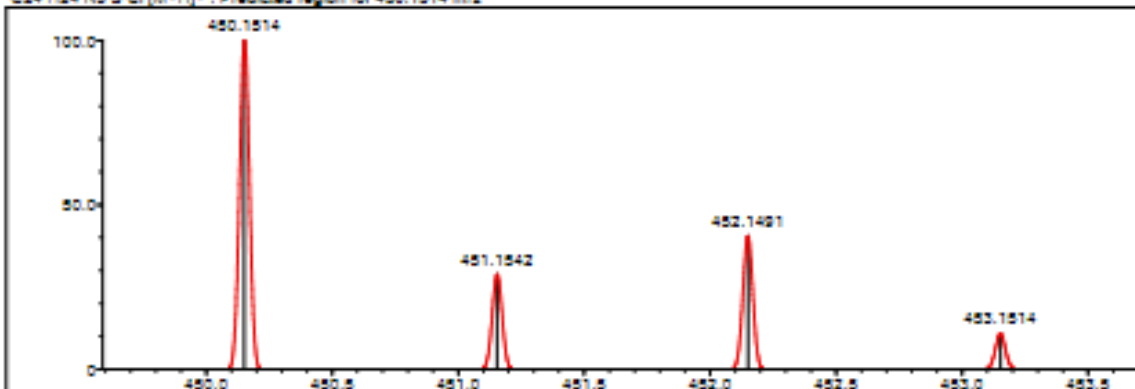
Isotope Max: 9000

Max Result: 150

Event#: 1 MS(E+) Rel. Time: 5.350 Scan#: 1255



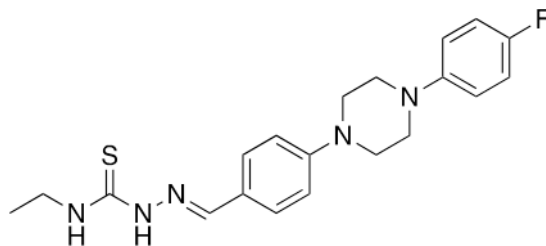
Measured region for 450.1500 m/z

C24 H24 N5 S Cl [M+H]⁺ : Predicted region for 450.1514 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	DE, (mDa)	DE, (ppm)	Iso	DBE
1	52.40	C24 H24 N5 S Cl	[M+H] ⁺	450.1500	450.1514	-1.4	-3.11	55.32	15.0

Şekil 5.20. HRMS spektrumu (3e)

5.1.6. N-Etil-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3f)



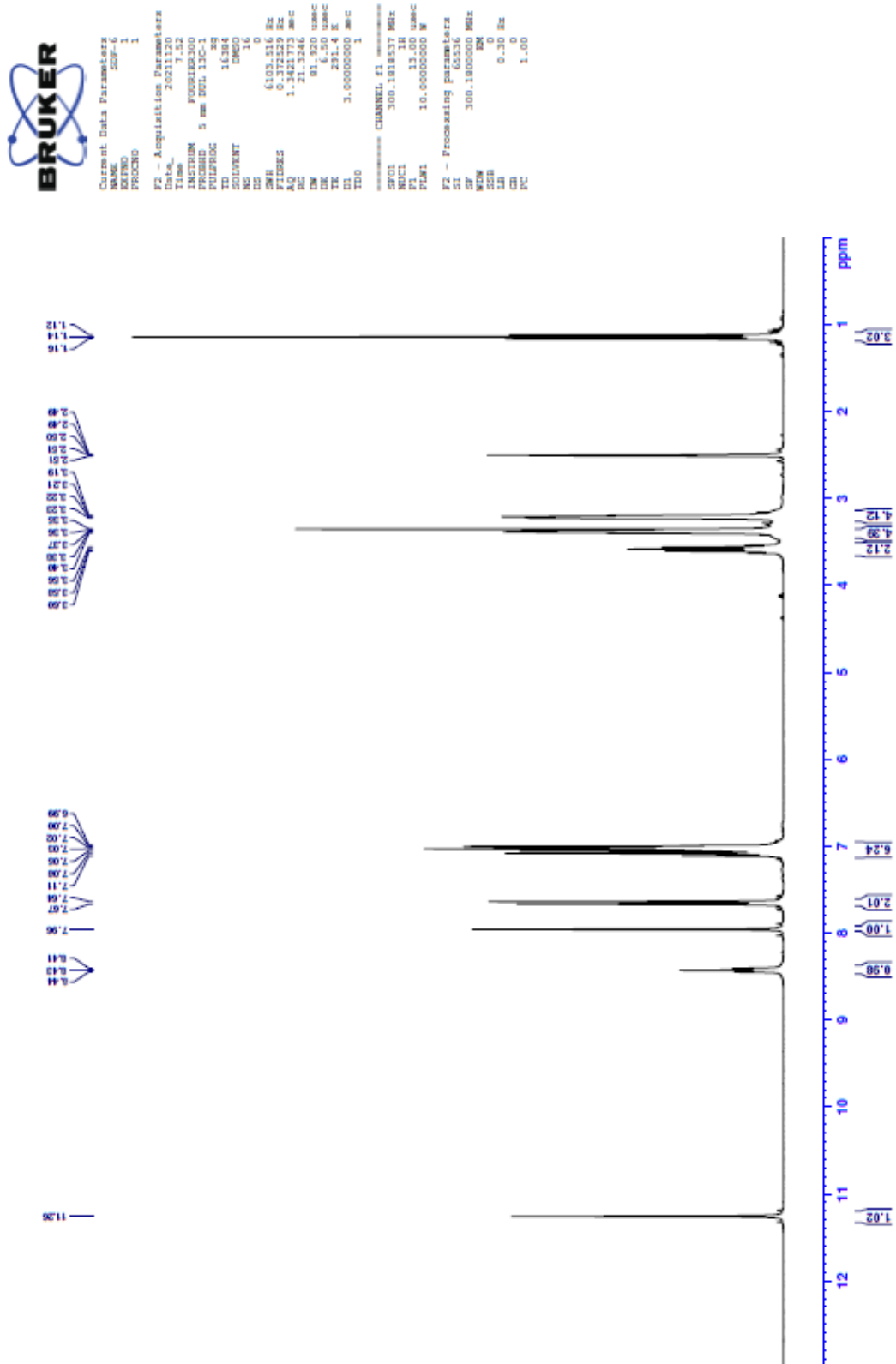
Şekil 5.21. N-Etil-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3f)

Verim: %80.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₀H₂₄N₅FS: 386.1809; bulunan: 386.1798.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 300 MHz): δ = 1.14 (-CH₃, 3H, t, J=7.1 Hz), 3.19-3.23 (piperazin, 4H, m), 3.37-3.40 (piperazin, 4H, m), 3.56-3.60 (-CH₂-, 2H, m), 6.99-7.11 (Ar-H, 6H, m), 7.65 (Ar-H, 2H, d, J=8.9 Hz), 7.96 (-CH=N-, 1H, s), 8.43 (-NH, 1H, t, J=5.9 Hz), 11.26 (-NH, 1H, s).

¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 75 MHz): δ = 15.23, 38.63, 47.82, 49.43, 115.18, 115.82 (d, J=21.8 Hz), 117.97 (d, J=7.6 Hz), 124.85, 128.93, 142.69, 148.22 (d, J=1.8 Hz), 152.24, 156.67 (d, J=235.9 Hz), 176.59



Şekil 5.22. ^1H -NMR spektrumu (3f)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analz\data\l\SDF-6_5.lcd

Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	10	40	F	1	1	1	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 15.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

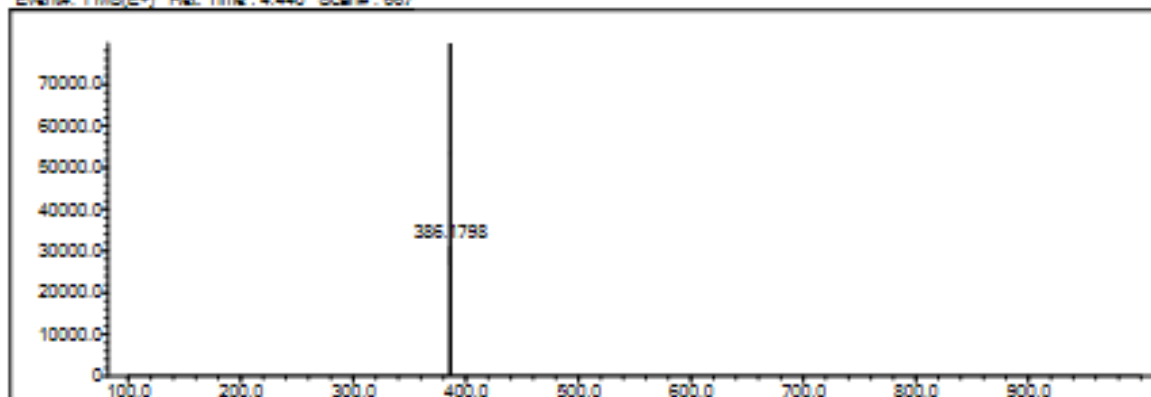
Electron Ions: both

Use MSn Info: yes

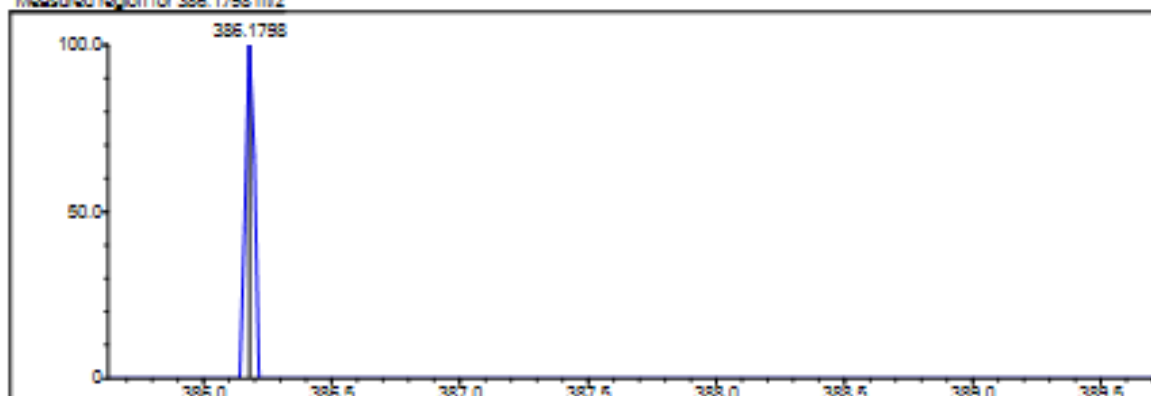
Isotope Bias: 9000

Max Results: 150

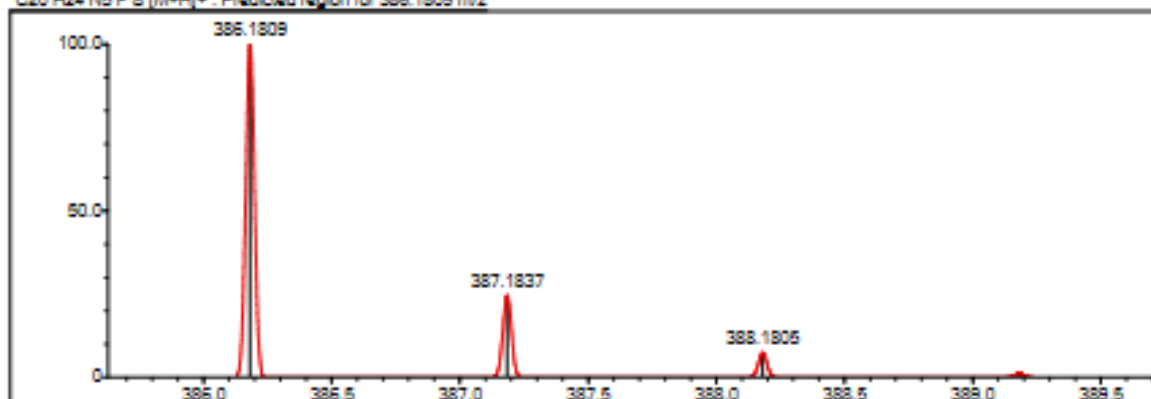
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 4.440 Scan#: 667



Measured region for 386.1798 m/z



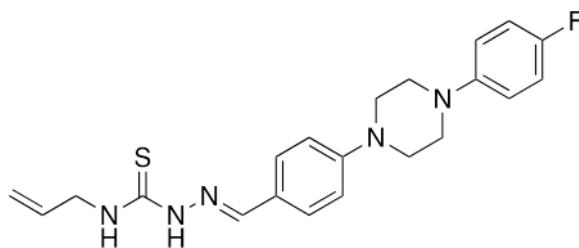
C20 H24 N5 F 8 [M+H]+ : Predicted region for 386.1809 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	Diff. (mDa)	Diff. (ppm)	Iso	DBE
1	0.00	C20 H24 N5 F 8	[M+H]+	386.1798	386.1809	-1.1	-2.85	0.00	11.0

Şekil 5.24. HRMS spektrumu (3f)

5.1.7. N-Allil-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3g)



Şekil 5.25.. N-Allil-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3g)

Verim: %77.

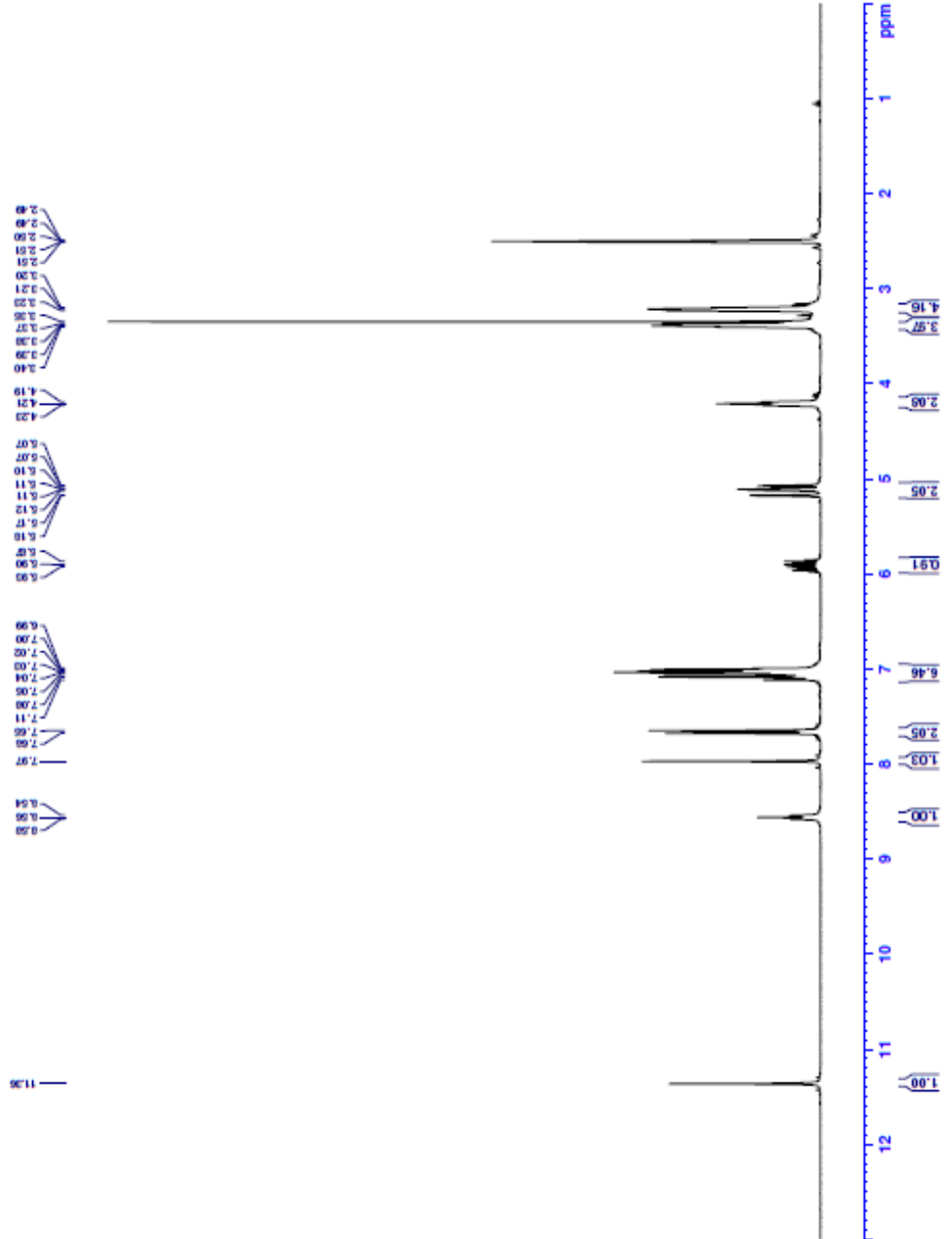
HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₁H₂₄N₅FS: 398.1809; bulunan: 398.1788.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 300 MHz): δ = 3.19-3.23 (piperazin, 4H, m), 3.37-3.40 (piperazin, 4H, m), 4.21 (Allil-H, 2H, t, J=5.6 Hz), 5.07-5.18 (Allil-H, 2H, m), 5.87-5.93 (Allil-H, 1H, m), 6.99-7.11 (Ar-H, 6H, m), 7.66 (Ar-H, 2H, d, J=8.8 Hz), 7.97 (-CH=N-, 1H, s), 8.56 (-NH, 1H, t, J=5.9 Hz), 11.36 (-NH, 1H, s).

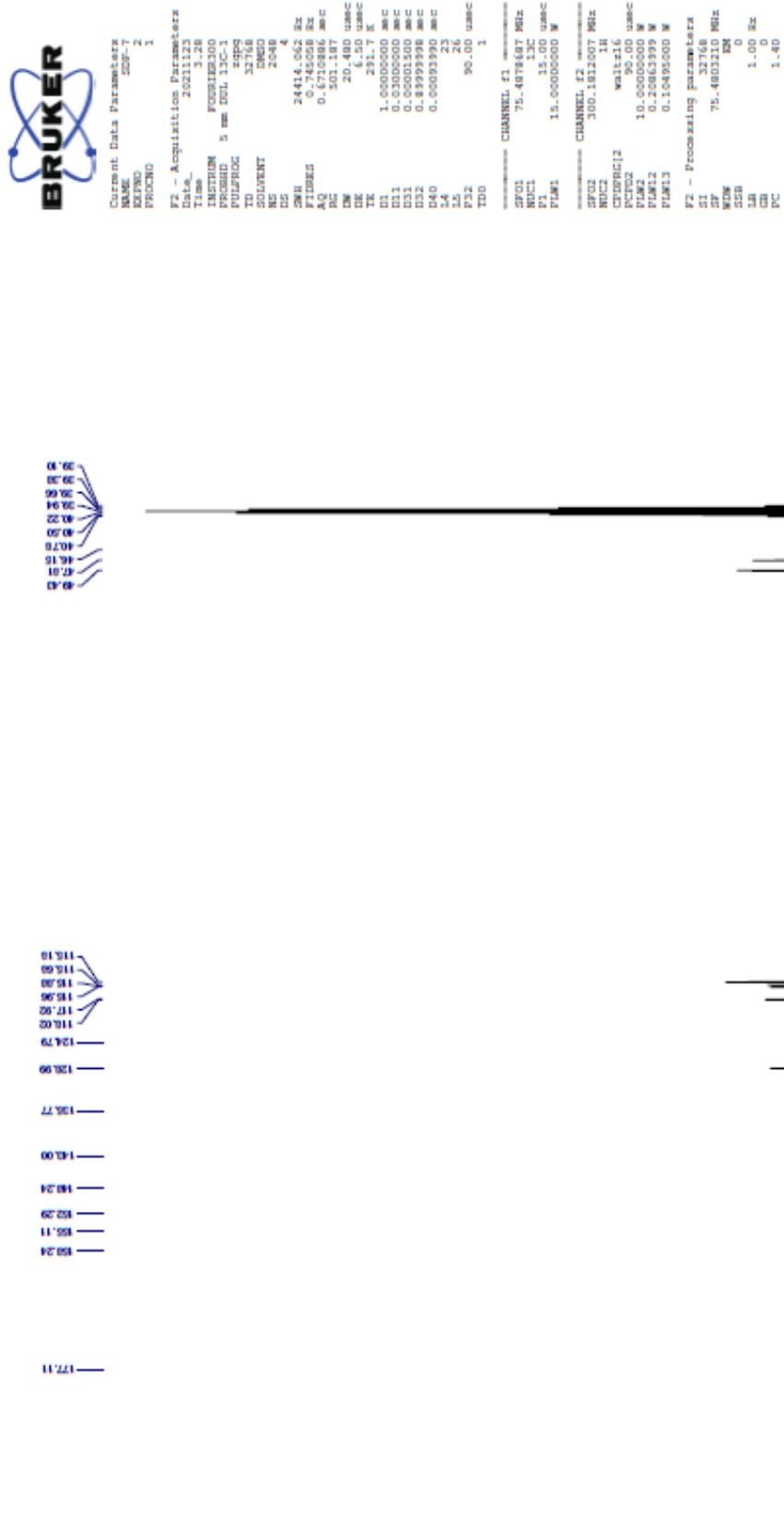
¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 75 MHz): δ = 46.14, 47.81, 49.43, 115.18, 115.81 (d, J=21.6 Hz), 115.88, 117.97 (d, J=7.6 Hz), 124.79, 128.99, 135.77, 143.00, 148.24, 152.29, 156.68 (d, J=235.9 Hz), 177.11.



Current Data Parameters
 Name: 3g
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ : 20211227
 Time : 3.26
 INSTRUM: FOCUS500
 PROBHD: 5 mm DOL 13C-1
 PULPROG: zgpg30
 CH1NUC: 13C
 SOLVENT: DMSO
 NS: 16
 DS: 4
 SWH: 6105.314 Hz
 FIDRES: 0.091
 AQ: 1.343173 sec
 RG: 36.4248
 DW: 81.320 usec
 DE: 6.50 usec
 TE: 300.2 K
 D1: 2.00 usec
 T2: 3.0000000 sec
 T20: 1
 ===== CHANNEL f1 =====
 NUC1: 13C
 P1: 13.00 usec
 PL1: 0.0000000 W
 F2 - Processing parameters
 SI: 32768
 SF: 300.1360000 MHz
 WDW: EM
 SSB: 0
 LB: 0.30 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00

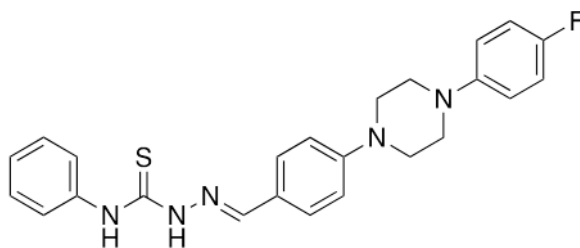


Şekil 5.26. ^1H -NMR spektrumu (3g)



Şekil 5.27. ^{13}C -NMR spektrumu (3g)

5.1.8. 2-(4-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)benziliden)-N-fenilhidrazin-1-karbotiyoamid (3h)



Şekil 5.29. 2-(4-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)benziliden)-N-fenilhidrazin-1-karbotiyoamid (**3h**)

Verim: %90.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₄H₂₄N₅FS: 434.1809; bulunan: 434.1794.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 300 MHz): δ = 3.20-3.23 (piperazin, 4H, m), 3.39-3.40 (piperazin, 4H, m), 6.99-7.11 (Ar-H, 6H, m), 7.17-7.22 (Ar-H, 1H, m), 7.36 (Ar-H, 2H, t, J=7.8 Hz), 7.56-7.59 (Ar-H, 2H, m), 7.75 (Ar-H, 2H, d, J=8.9 Hz), 8.07 (-CH=N-, 1H, s), 10.01 (-NH, 1H, s), 11.67 (-NH, 1H, s).

¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 75 MHz): δ = 47.74, 49.42, 115.08, 115.82 (d, J=21.9 Hz), 117.97 (d, J=7.6 Hz), 124.51, 125.58, 126.22, 128.46, 129.41, 139.64, 143.84, 148.22 (d, J=1.8 Hz), 152.43, 156.67 (d, J=235.67), 175.69.

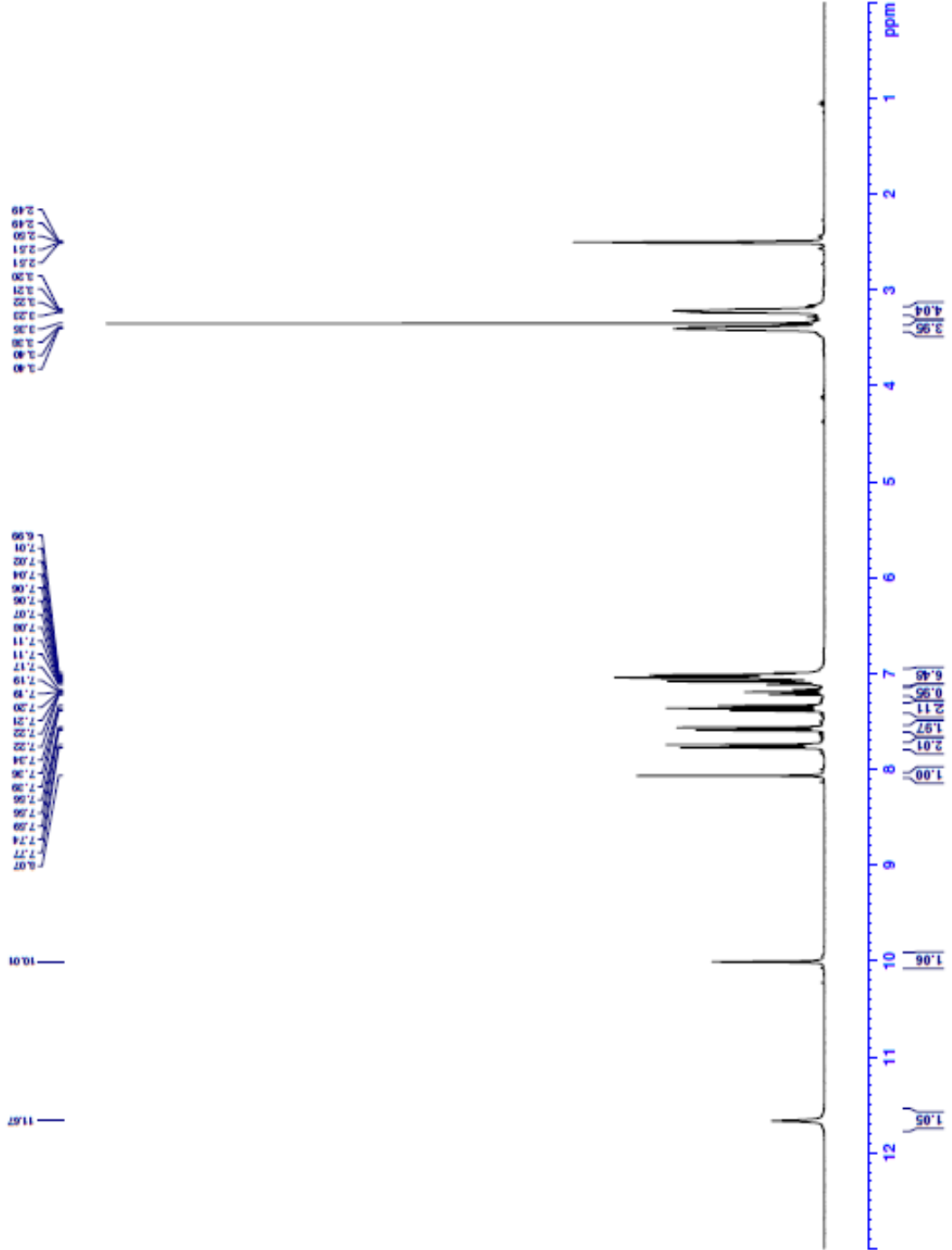
BRUKER

Current Data Parameters
 Name: 2021123
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 2021123
 Time: 14.22
 PULPROG: zgpg30
 PRGSHD: 5 mm zgpg30-1
 PULPROG: zg
 TD: 65536
 SOLVENT: DMSO
 NS: 16
 DS: 4
 SWH: 6103.516 Hz
 FIDRES: 0.372529 Hz
 AQ: 1.5421773 sec
 PC: 38.3976
 DM: 81.920 usec
 DE: 39.50 usec
 TE: 300.2 K
 D1: 3.00000000 sec
 D11: 1

===== CHANNEL f1 =====
 SFOL: 300.1818537 MHz
 NUCL: 1H
 PULP: 13.00 usec
 PL1: 10.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI: 65536
 SF: 300.1800000 MHz
 WDW: EM
 SSB: 0
 LB: 0.30 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00



Şekil 5.30. ¹H-NMR spektrumu (3h)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analysis\MSDF-S_3.tcd

Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	2	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	10	40	P	1	1	1	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	8	Br	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5

DBE Range: 5.0 - 15.0

Electron Ioniz: both

HC Ratio: unlimited

Apply N Rule: yes

Use MSn Infor: yes

Max Isotopes: 5

Isotope RI (%): 1.00

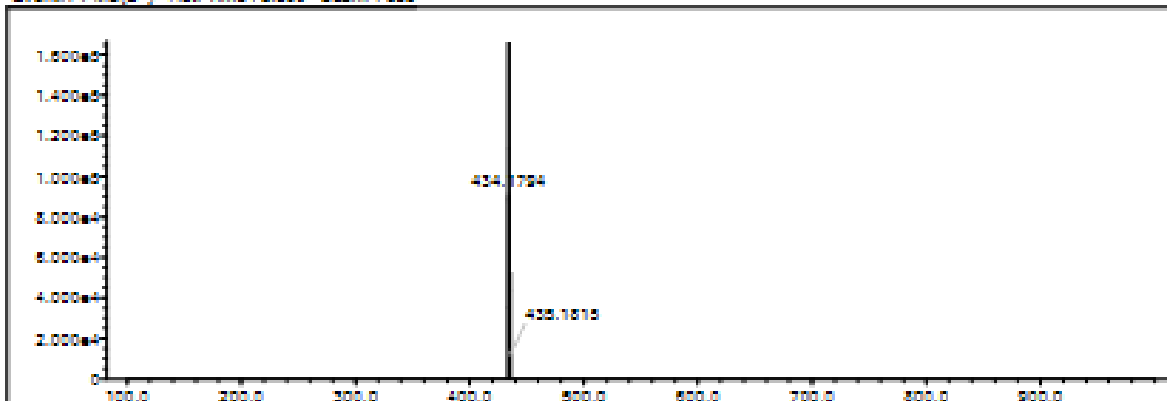
Isotope Mass: 9000

MSn Isot RI (%): 10.00

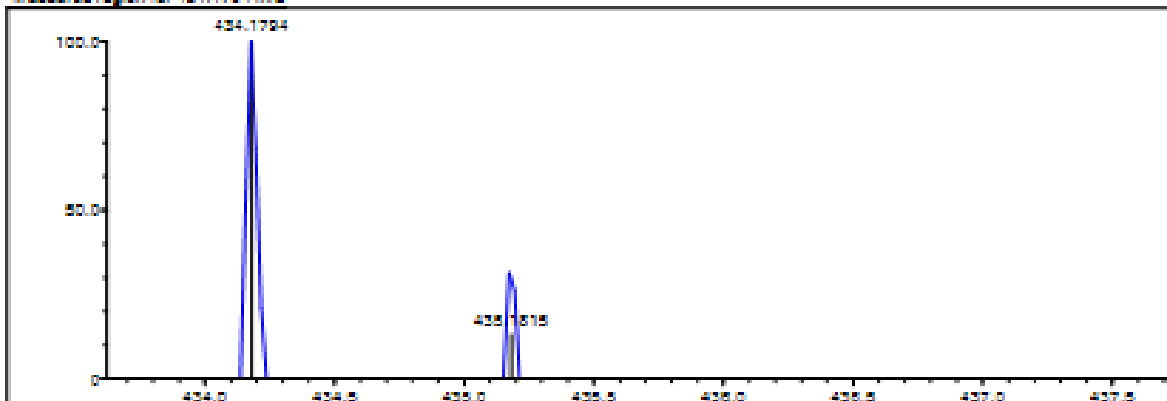
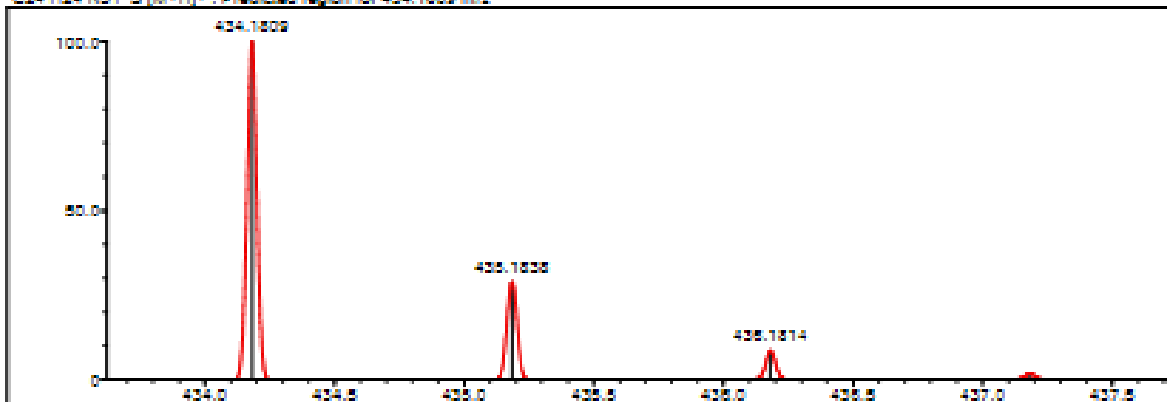
MSn Logic Mode: AND

Max Results: 150

Event#: 1 MS(E+) Rel. Time : 8.860 Scan#: 835



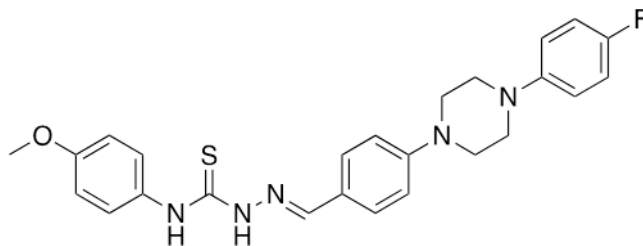
Measured region for 434.1794 m/z

C24 H24 N3 P S [M+H]⁺ : Predicted region for 434.1809 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass. m/z	Pred. m/z	DE (mDa)	DE (ppm)	Isot	DBE
1	0.00	C24 H24 N3 P S	[M+H] ⁺	434.1794	434.1809	-1.5	-3.45	0.00	15.0

Şekil 5.32. HRMS spektrumu (3h)

5.1.9. 2-(4-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)benziliden)-N-(4-metoksifenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (3i)



Şekil 5.33. 2-(4-(4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)benziliden)-N-(4-metoksifenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (3i)

Verim: %91.

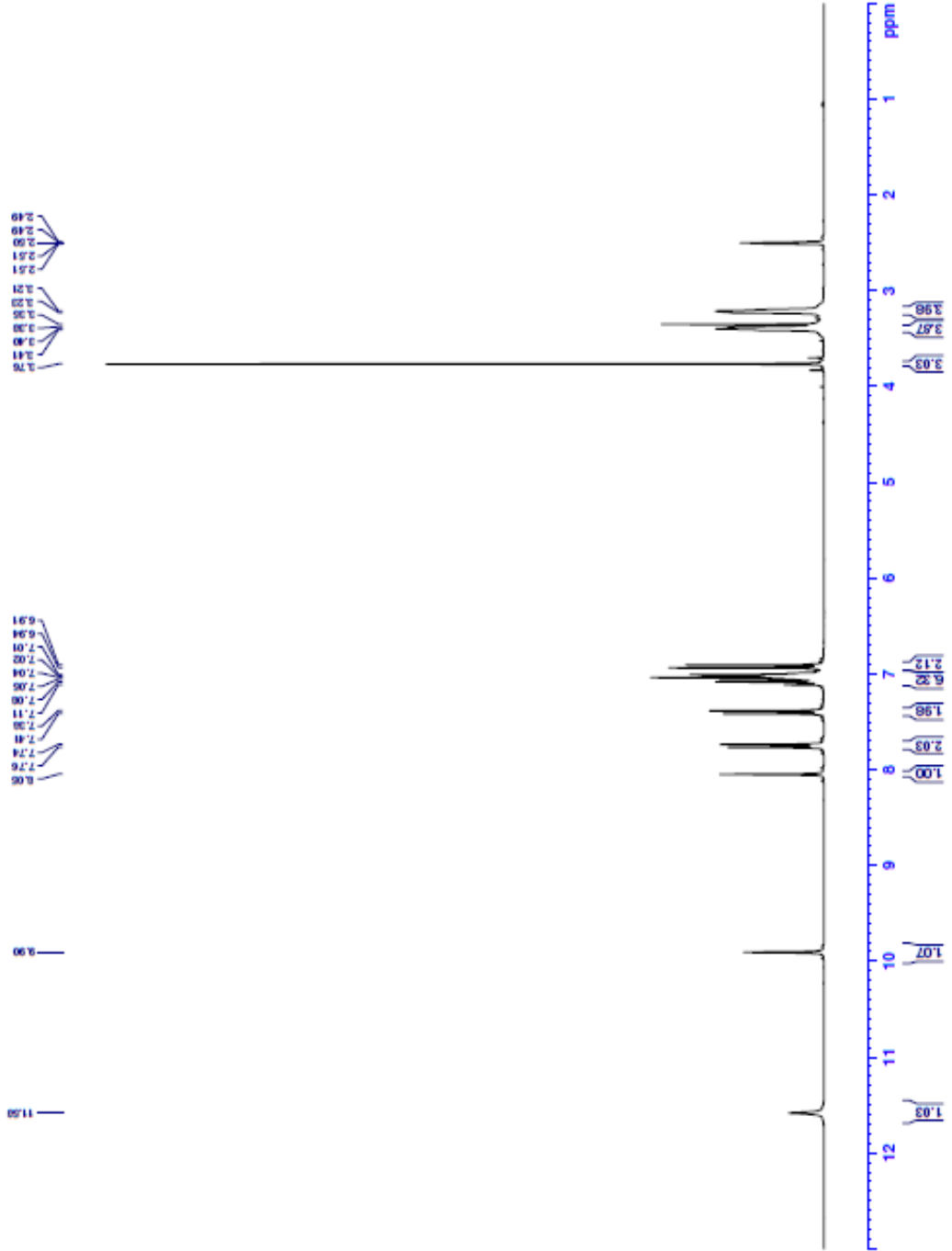
HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₂H₂₆N₄O₂S: 411.1849; bulunan: 411.1854.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 300 MHz): δ = 3.21-3.23 (piperazin, 4H, m), 3.38-3.41 (piperazin, 4H, m), 3.76 (-OCH₃, 3H, s), 6.92 (Ar-H, 2H, d, J =8.9 Hz), 7.01-7.11 (Ar-H, 6H, m), 7.39 (Ar-H, 2H, d, J =8.9 Hz), 7.75 (Ar-H, 2H, d, J =8.8 Hz), 8.05 (-CH=N-, 1H, s), 9.91 (-NH, 1H, s), 11.58 (-NH, 1H, s).

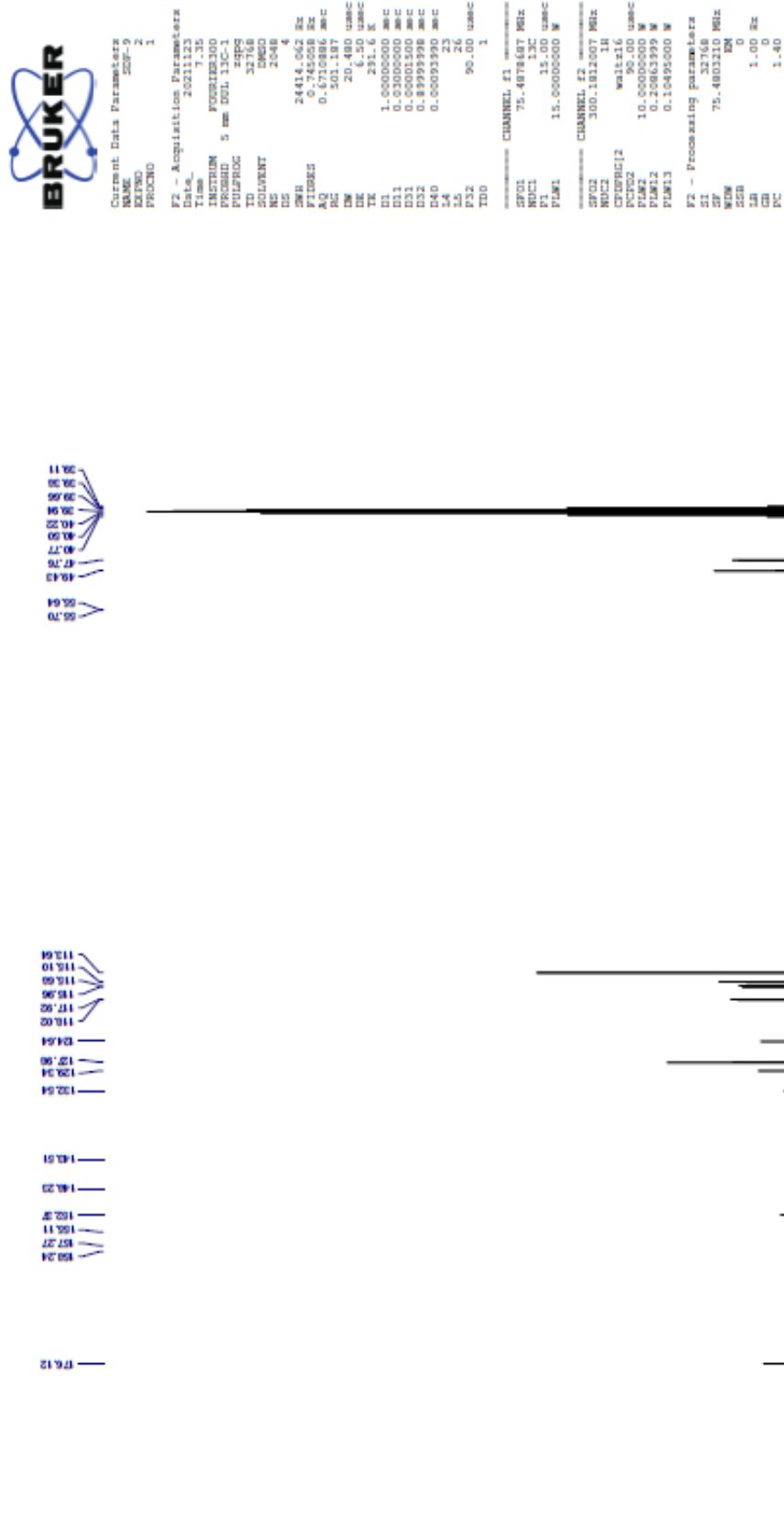
¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 75 MHz): δ = 47.76, 49.43, 55.64, 113.64, 115.09, 115.82 (d, J =21.9 Hz), 117.96 (d, J =7.6 Hz), 124.64, 127.98, 129.34, 132.54, 143.51, 148.23, 152.37, 155.11, 156.67 (d, J =234.4 Hz), 157.27, 176.12.



Current Data Parameters
 NAME: 20211215
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20211215
 Time 7.34
 INSTRUM: PUSHD300
 PROBHD: 5 mm DOL 13C-1
 PULPROG: zg30
 TD: 65536
 SFO: 125.761 MHz
 AQC: 0.372529 Hz
 RG: 327.6847 Hz
 HE: 81.2500000 MHz
 HX: 6.50 uMsec
 YF: 231.6 K
 U1: 3.00000000 sec
 TDO: 1
 ===== CHANNEL f1 =====
 SFO1: 300.1362517 MHz
 NUC1: 1H
 P1: 13.00 uMsec
 PL1: 10.00000000 M
 F2 - Processing parameters
 SI: 65536
 SF: 300.1362517 MHz
 WDW: EM
 SSB: 0
 LB: 0.30 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00



Şekil 5.34. ^1H -NMR spektrumu (3i)



Şekil 5.35. ^{13}C -NMR spektrumu (3i)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Anal\cderya\SOP-9_S1cd

Elem	Val	Min	Max	Elem	Val	Min	Max	Elem	Val	Min	Max	Elem	Val	Min	Max	Use Added
H	1	10	40	O	2	1	3	S	2	0	2	Pu	2	0	0	H
C	4	10	40	P	1	0	1	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	F	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Isc RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 15.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

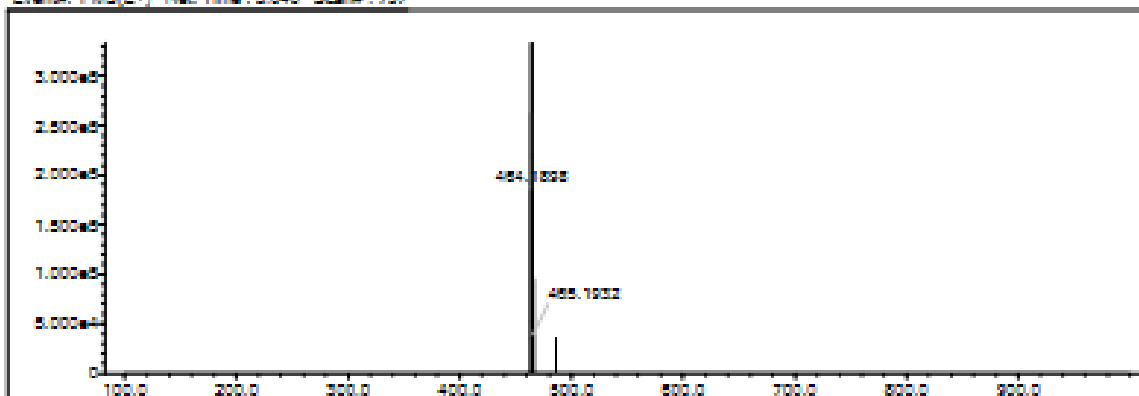
Electron Ion: both

Use MSn Info: yes

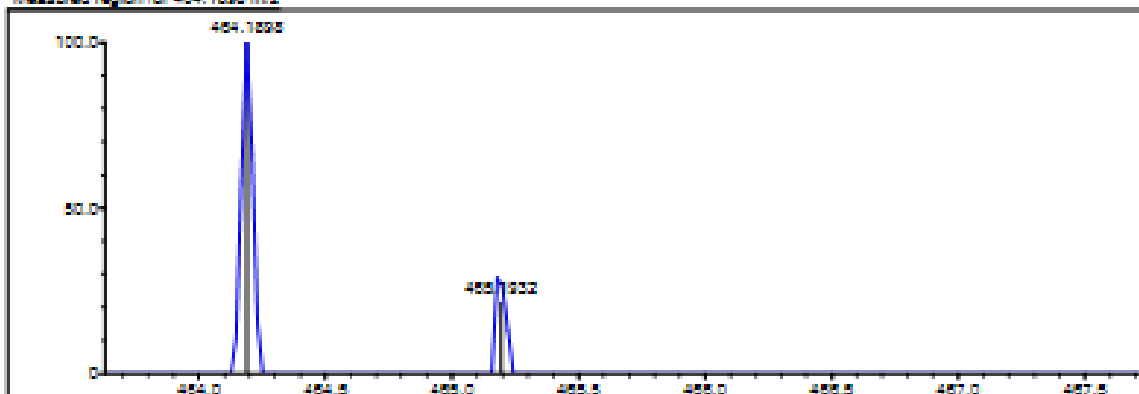
Isotope Res: 9000

Max Results: 150

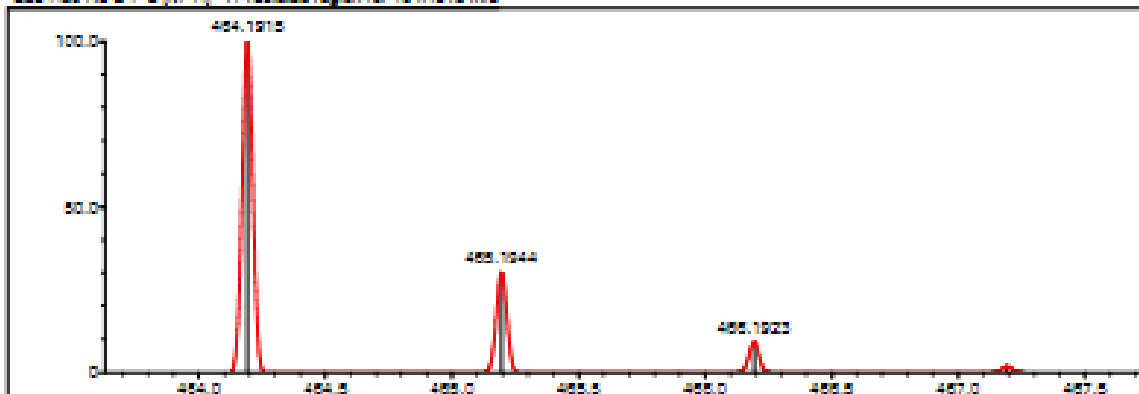
Event#: 1 MS(E+) Rel. Time : 5.040 Scan#: 757



Measured region for 484.1205 m/z



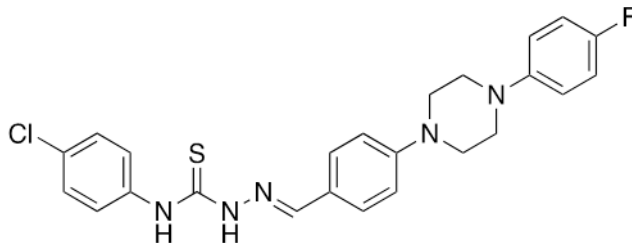
C25 H25 N5 O P S (M+H)+ : Predicted region for 484.1215 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	Diff. (mDa)	Diff. (ppm)	Isc	DBE
1	0.00	C25 H25 N5 O P S	[M+H] ⁺	484.1205	484.1215	-1.7	-3.55	0.00	15.0

Şekil 5.36. HRMS spektrumu (3i)

5.1.10. *N*-(4-klorofenil)-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3j)



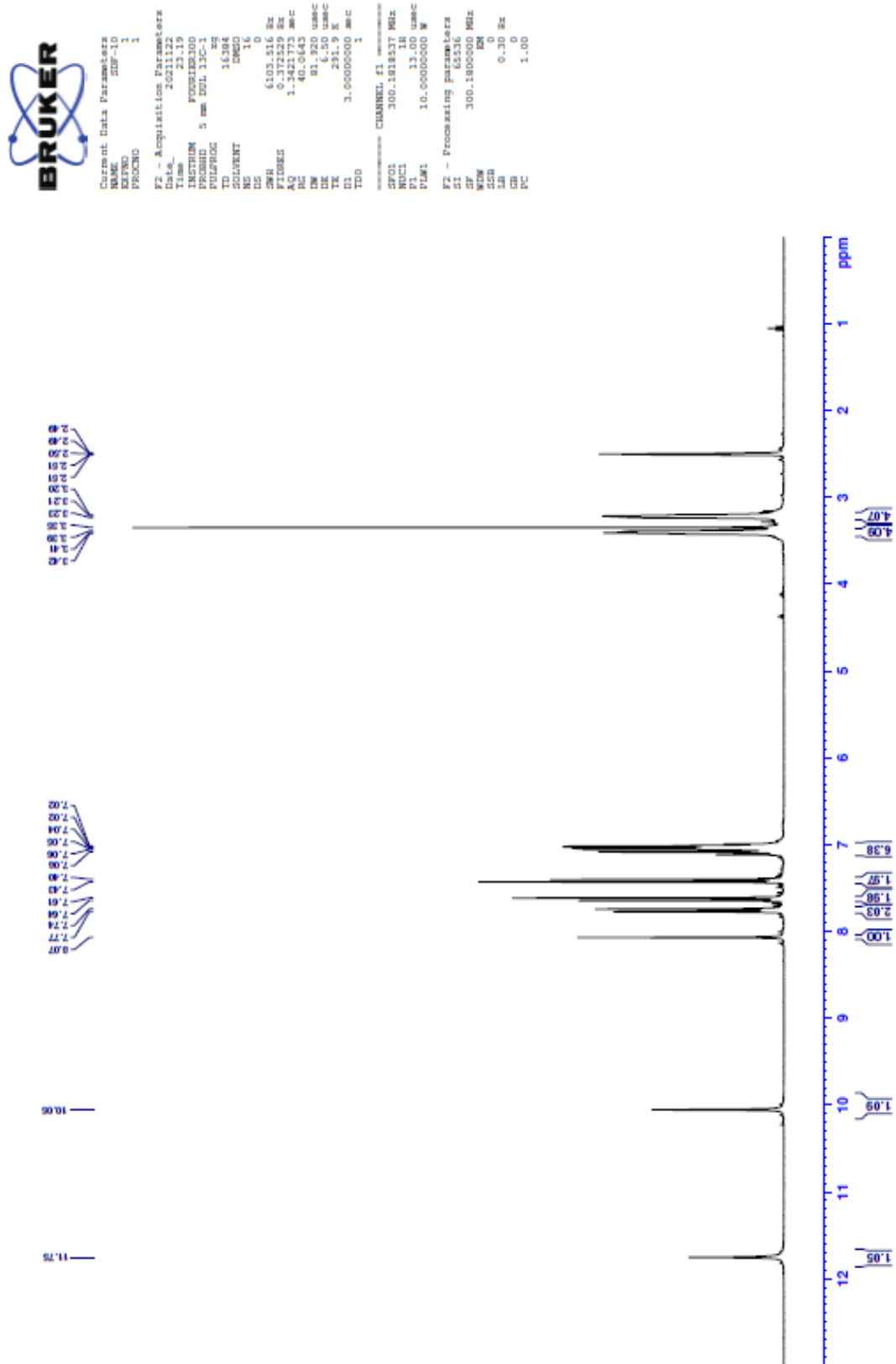
Şekil 5.37. *N*-(4-klorofenil)-2-(4-(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3j)

Verim: %79.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₄H₂₃N₅FSCl: 468.1419; bulunan: 468.1400.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-*d*₆toro, 300 MHz): δ = 3.20-3.23 (piperazin, 4H, m), 3.39-3.42 (piperazin, 4H, m), 7.02-7.08 (Ar-H, 6H, m), 7.41 (Ar-H, 2H, d, *J*=8.8 Hz), 7.63 (Ar-H, 2H, d, *J*=8.8 Hz), 7.76 (Ar-H, 2H, d, *J*=8.9 Hz), 8.07 (-CH=N-, 1H, s), 10.05 (-NH, 1H, s), 11.75 (-NH, 1H, s).

¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-*d*₆toro, 75 MHz): δ = 47.11, 49.42, 115.05, 115.82 (d, *J*=21.8 Hz), 117.97 (d, *J*=7.7 Hz), 124.39, 127.82, 128.33, 129.49 (d, *J*=3.5 Hz), 138.65, 144.15, 148.23, 152.48, 156.68 (d, *J*=236.0 Hz), 175.64.



Şekil 5.38. ^1H -NMR spektrumu (3j)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analysis\SDF-10_10.jcd

Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	10	40	F	1	1	1	Cl	1	1	1	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 15.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

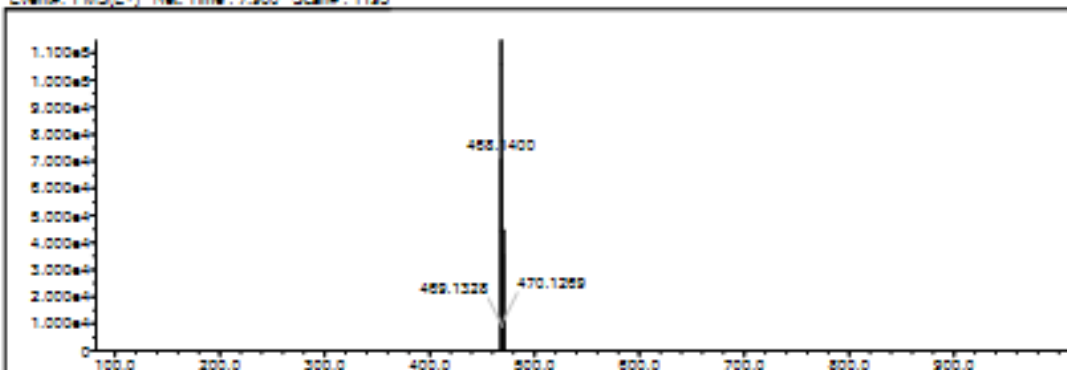
Electron Ion: both

Use MSn Info: yes

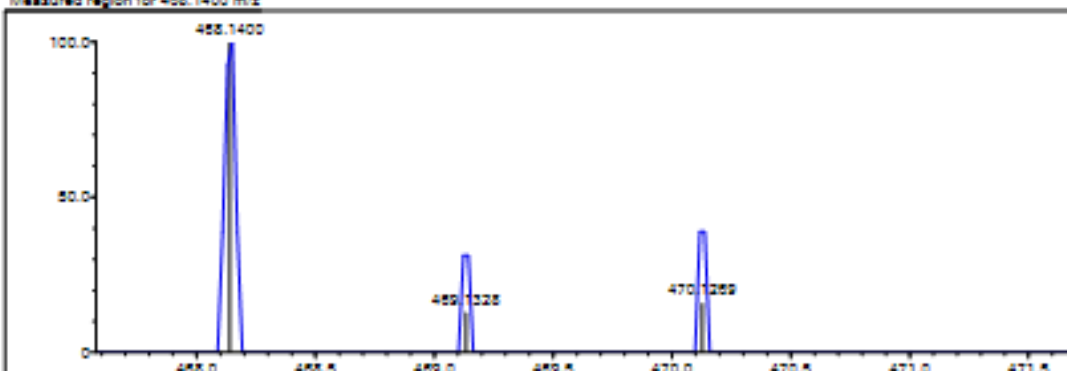
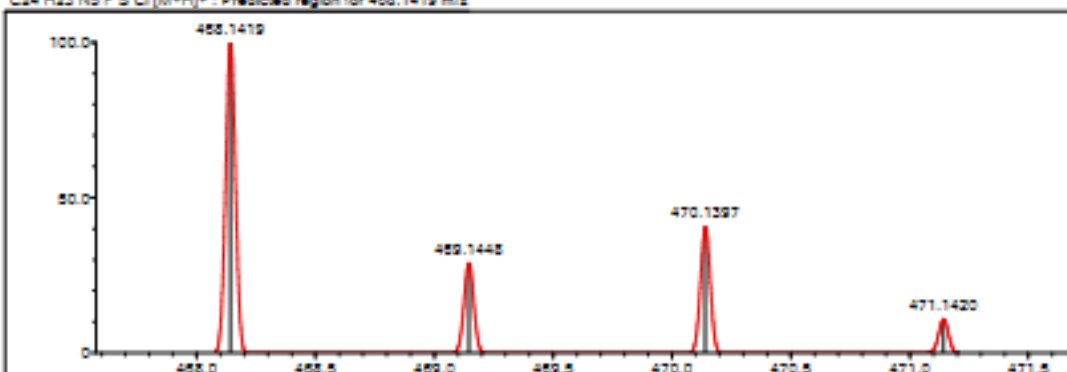
Isotope Max: 9000

Max Results: 150

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 7.950 Scan#: 1195



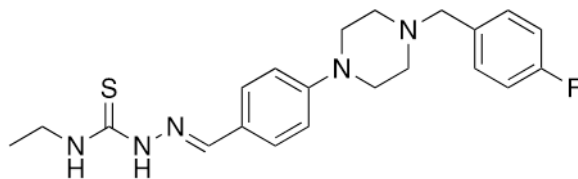
Measured region for 455.1400 m/z

C24 H23 N5 F5 Cl [M+H]⁺ Predicted region for 455.1419 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	OK (mDa)	OK (ppm)	Is	DBE
1	44.41	C24 H23 N5 F5 Cl	[M+H] ⁺	455.1400	455.1419	-1.9	-4.05	48.05	15.0

Şekil 5.40. HRMS spektrumu (3f)

5.1.11. N-Etil-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3k)



Şekil 5.41. N-Etil-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3k)

Verim: %86.

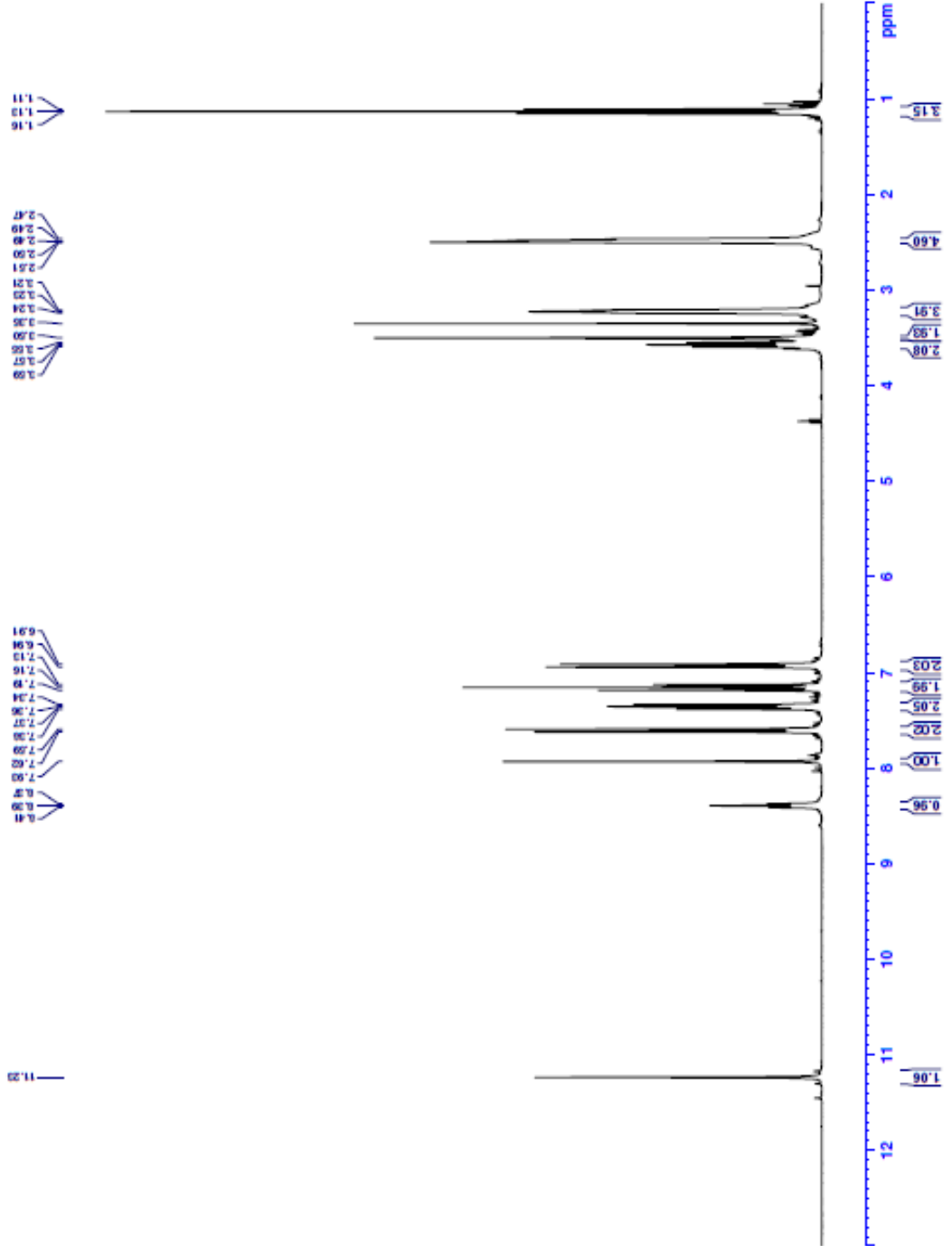
HRMS (m/z): $[M+H]^+$ hesaplanan $C_{21}H_{26}N_5FS$: 400.1966; bulunan: 400.1957.

1H -NMR (Dimetilsülfoksit-*dötoro*, 300 MHz): δ = 1.13 (-CH₃, 3H, t, J =7.1 Hz), 2.46-2.50 (piperazin, 4H, m), 3.21-3.24 (piperazin, 4H, m), 3.50 (-CH₂-, 2H, s), 3.55-3.59 (-CH₂-, 2H, m), 6.93 (Ar-H, 2H, d, J =8.9 Hz), 7.13-7.19 (Ar-H, 2H, m), 7.34-7.38 (Ar-H, 2H, m), 7.61 (Ar-H, 2H, d, J =8.9 Hz), 7.93 (-CH=N-, 1H, s), 8.39 (-NH, 1H, t, J =5.9 Hz), 11.23 (-NH, 1H, s).

^{13}C -NMR (Dimetilsülfoksit-*dötoro*, 75 MHz,): δ = 15.22, 38.61, 47.75, 52.71, 61.49, 114.91, 115.39 (d, J =21.0 Hz), 124.51, 128.88, 131.19 (d, J =7.9 Hz), 134.61 (d, J =2.9 Hz), 142.74, 152.36, 161.74 (d, J =242.5 Hz), 176.56.



Current Data Parameters
 Name: 3k
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 2021123
 Time: 13.00
 INSTRUM: PULPROG
 PROGRAM: 5 mm ZGT 13C-1
 PULPROG: zg
 TD: 65536
 SOLVENT: DMSO
 NS: 16
 DS: 4
 SWH: 6103.516 Hz
 FIDRES: 0.372529 Hz
 AQ: 1.3421773 sec
 RG: 17.3163
 DW: 91.920 usec
 DE: 391.50 usec
 TE: 300.2 K
 D1: 3.00000000 sec
 TDO: 1
 CHANNEL: f1
 ZFOL: 300.136237 MHz
 NUCL1: 13C
 P1: 13.00 usec
 PL1: 0.00000000 M
 F2 - Processing Parameters
 SI: 65536
 SF: 300.1360000 MHz
 WDW: EM
 SSB: 0
 LB: 0.30 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00



Şekil 5.42. ^1H -NMR spektrumu (3k)



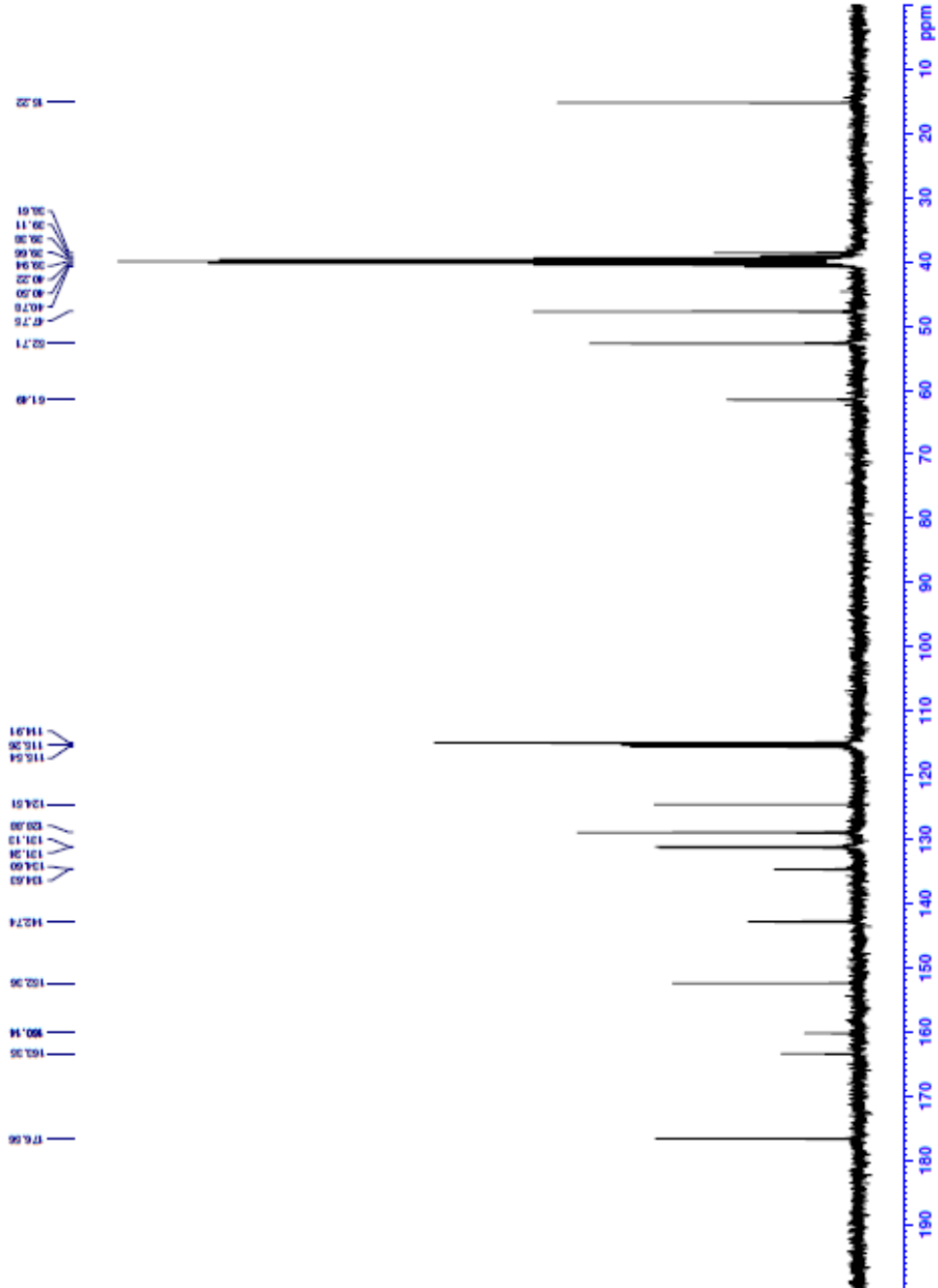
Current Data Parameters
NAME: 3k
EXPNO: 1
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 2021123
Time: 14.00
INSTRUM: PULPROG
PROBHD: 5 mm DOL 13C-1
PULPROG: zgpg30
TD: 32768
SOLVENT: DMSO
NS: 256
DS: 4
SWH: 24414.062 Hz
FIDRES: 0.745056 Hz
AQ: 0.571386 sec
RG: 327.68
DM: 20.480 umsec
DE: 6.50 umsec
TE: 291.7 K
D1: 1.00000000 sec
D11: 0.20000000 sec
D12: 0.00000000 sec
D32: 0.83999998 sec
D40: 0.00000000 sec
L4: 23
L5: 26
PC: 90.00 umsec
TD0: 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1: 13C
P1: 15.00 umsec
PL1: 15.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
NUC2: 1H
P2: 300.1812007 MHz
PL2: 0.00000000 W
PCYCLE2: waltz16
PCPD2: 90.00 umsec
PLA2: 10.00000000 W
PLM2: 0.20863999 W
PLM3: 0.10432000 W

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 75.4803210 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 1.00 Hz
GB: 0
PC: 1.40



Şekil 5.43. ^{13}C -NMR spektrumu (3k)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Anal\cderya\SDF-15_15.lcd

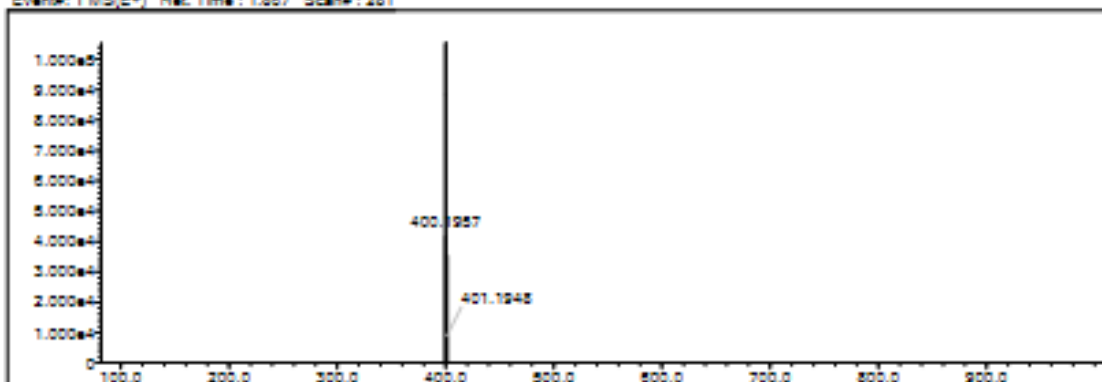
Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	10	40	F	1	1	1	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

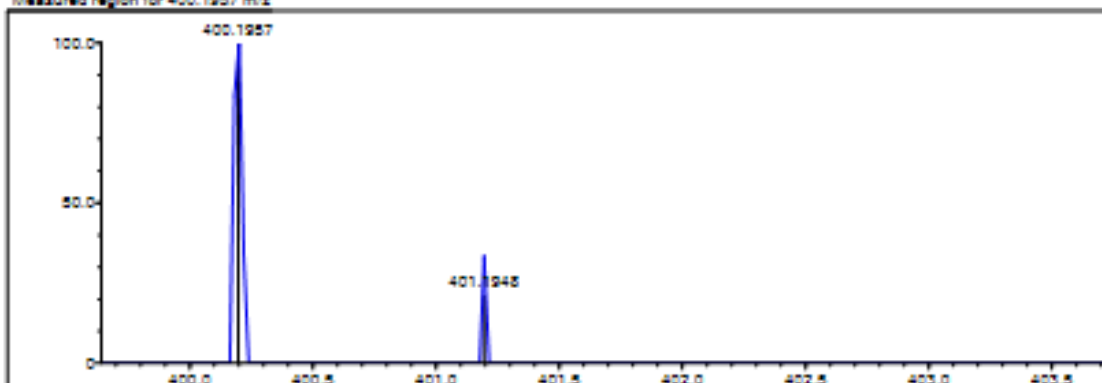
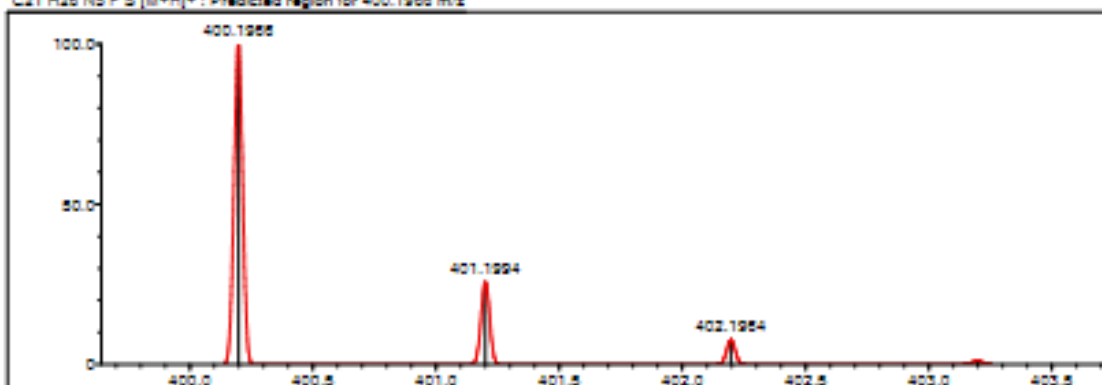
DBE Range: 5.0 - 15.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ion: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Max: 9000
 Max Results: 150

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 1.857 Scan#: 251



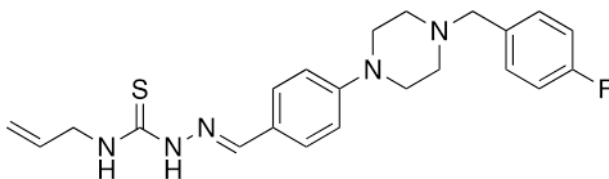
Measured region for 400.1957 m/z

C21 H25 N5 F 5 [M+H]⁺: Predicted region for 400.1955 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	DK (mDa)	DK (ppm)	bci	DBE
1	0.00	C21 H25 N5 F 5	[M+H] ⁺	400.1957	400.1955	-0.2	-2.25	0.00	11.0

Şekil 5.44. HRMS spektrumu (3k)

5.1.12. *N*-Allil-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3I)



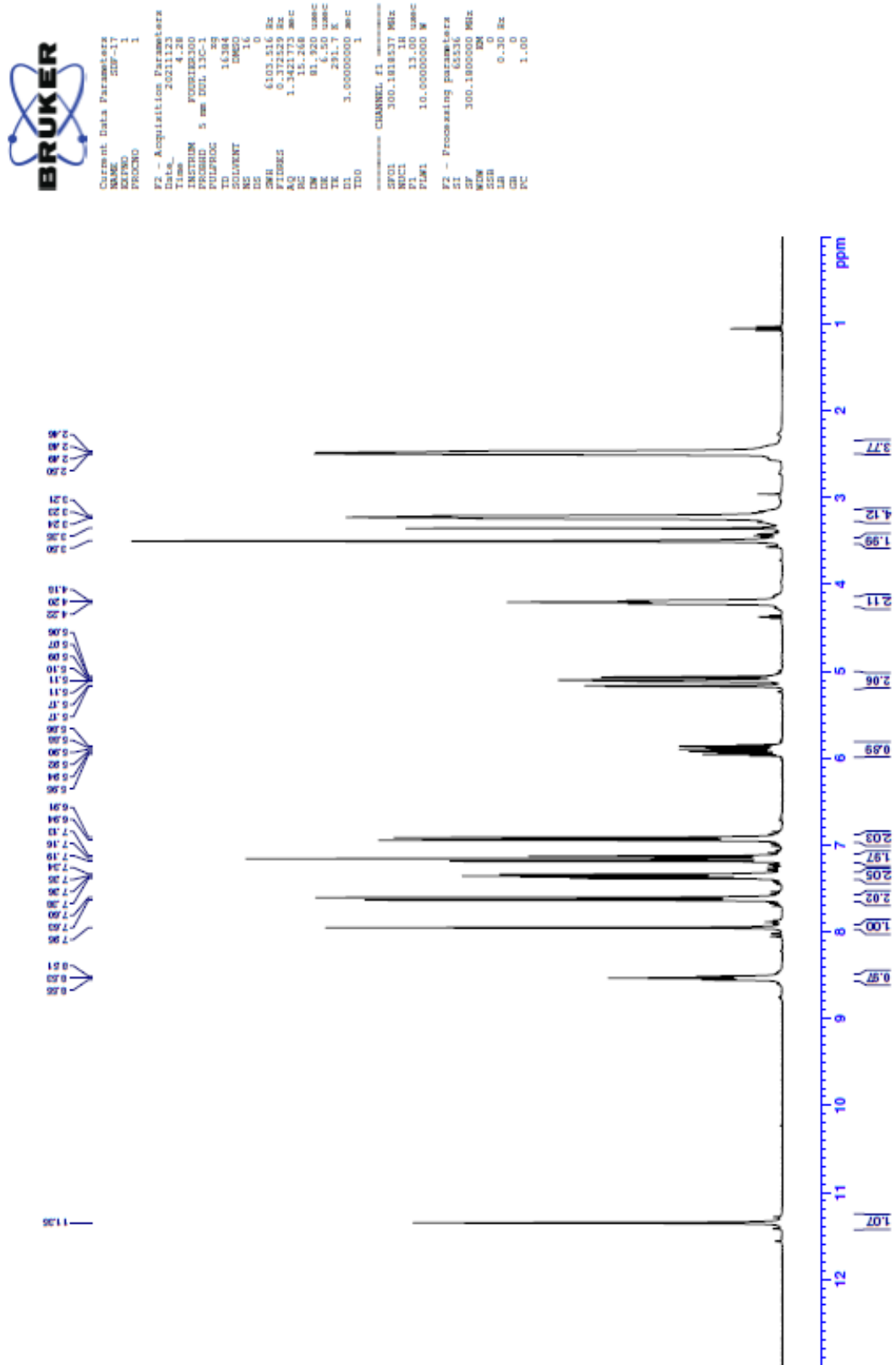
Şekil 5.45. *N*-Allil-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3I)

Verim: %81.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₂H₂₆N₅FS: 412.1966; bulunan: 412.1949.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-*d*₆toro, 300 MHz): δ = 2.46-2.49 (piperazin, 4H, m), 3.21-3.24 (piperazin, 4H, m), 3.50 (-CH₂-, 2H, s), 4.20 (Allil-H, 2H, t, *J*=5.6 Hz), 5.06-5.17 (Allil-H, 2H, m), 5.86-5.95 (Allil-H, 1H, m), 6.93 (Ar-H, 2H, d, *J*=8.9 Hz), 7.13-7.19 (Ar-H, 2H, m), 7.33-7.38 (Ar-H, 2H, m), 7.62 (Ar-H, 2H, d, *J*=8.9 Hz), 7.95 (-CH=N-, 1H, s), 8.53 (-NH, 1H, t, *J*=5.9 Hz), 11.35 (-NH, 1H, s).

¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-*d*₆toro, 75 MHz): δ = 46.14, 47.74, 52.71, 61.49, 114.90, 115.40 (d, *J*=21.1 Hz), 115.87, 124.45, 128.94, 131.19 (d, *J*=8.0 Hz), 134.61 (d, *J*=2.9 Hz), 135.77, 143.02, 152.41, 161.74 (d, *J*=242.4 Hz), 177.07.



Şekil 5.46. ¹H-NMR spektrumu (3l)



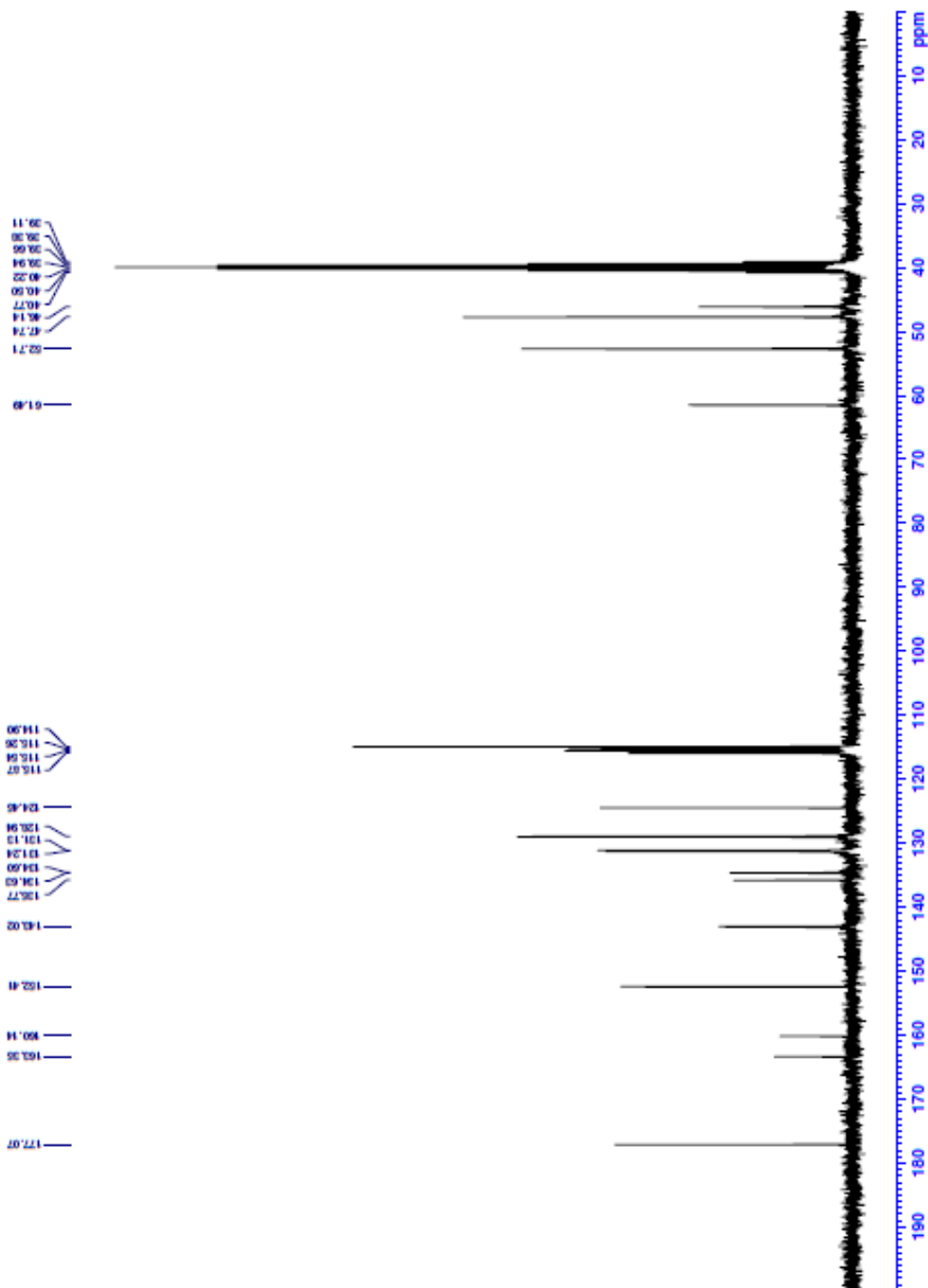
Current Data Parameters
NAME: 50F-17
EXPNO: 2
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 2021123
Time: 4.30
PROCNO: 1
PULPROG: zgpg30
PCPDPRG2: 5 mm zgpg30
PULPROG2: zgpg30
TD: 32768
SOLVENT: DMSO
NS: 2048
DS: 4
SWH: 24414.062 Hz
FIDRES: 0.745058 Hz
AQ: 0.6716886 sec
RG: 501.187
DM: 20.480 usec
DE: 8.15 usec
TE: 300.2 K
D1: 1.00000000 sec
D11: 0.03000000 sec
D31: 0.00001500 sec
D32: 0.83999998 sec
L4: 0.00000000 sec
L5: 26
F32: 96.00 usec
TD0: 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1: 13C
P1: 15.00 usec
PL1: 15.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
NUC2: 1H
PCPDPRG2: zgpg30
P2: 96.00 usec
PL2: 10.00000000 W
PL12: 0.10000000 W
PL13: 0.10000000 W

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 75.4803210 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 1.00 Hz
GB: 0
PC: 1.40



Şekil 5.47. ^{13}C -NMR spektrumu (3l)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Anal\cderya\SDF-17_17.lcd

Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Mu	2	0	0	H
C	4	10	40	F	1	1	1	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	6	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iao RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 15.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Model: AND

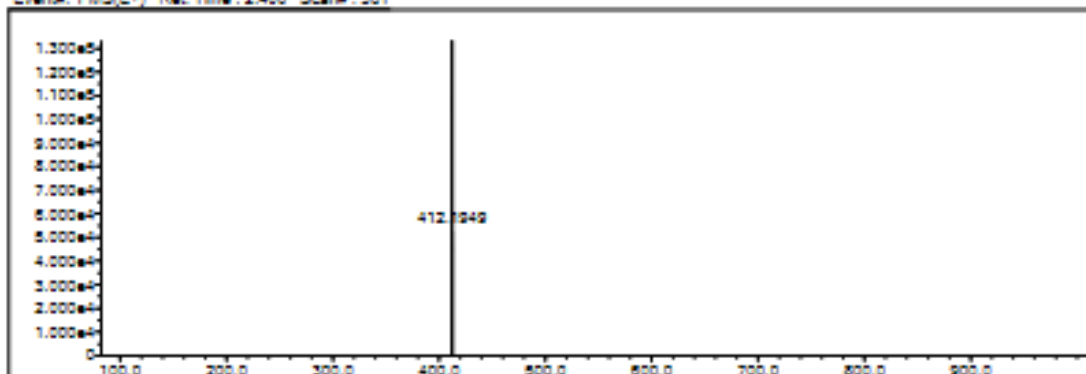
Electron Ion: both

Use MSn Info: yes

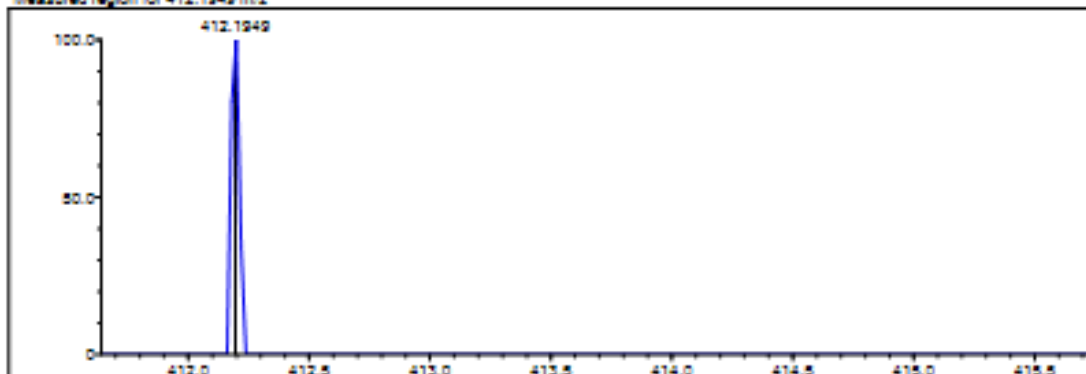
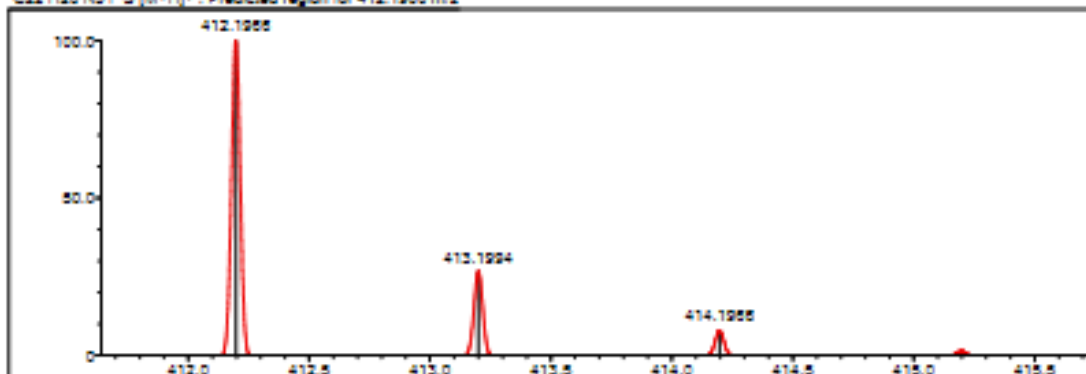
Isotope Max: 5000

Max Results: 150

Event: 1 MS(E+) Rel. Time: 2.400 Scan#: 351



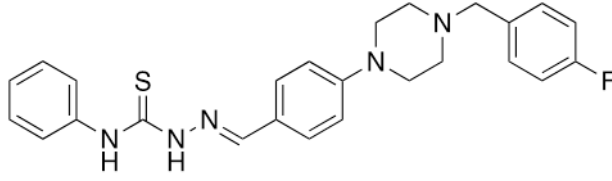
Measured region for 412.1949 m/z

C22 H26 N5 F 5 [M+H]⁺ : Predicted region for 412.1955 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	DK (mDa)	DK (ppm)	Iao	DBE
1	0.00	C22 H26 N5 F 5	[M+H] ⁺	412.1949	412.1955	-1.7	-4.12	0.00	12.0

Şekil 5.48. HRMS spektrumu (31)

5.1.13. 2-(4-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)-N-fenilhidrazin-1-karbotiyoamid (3m)



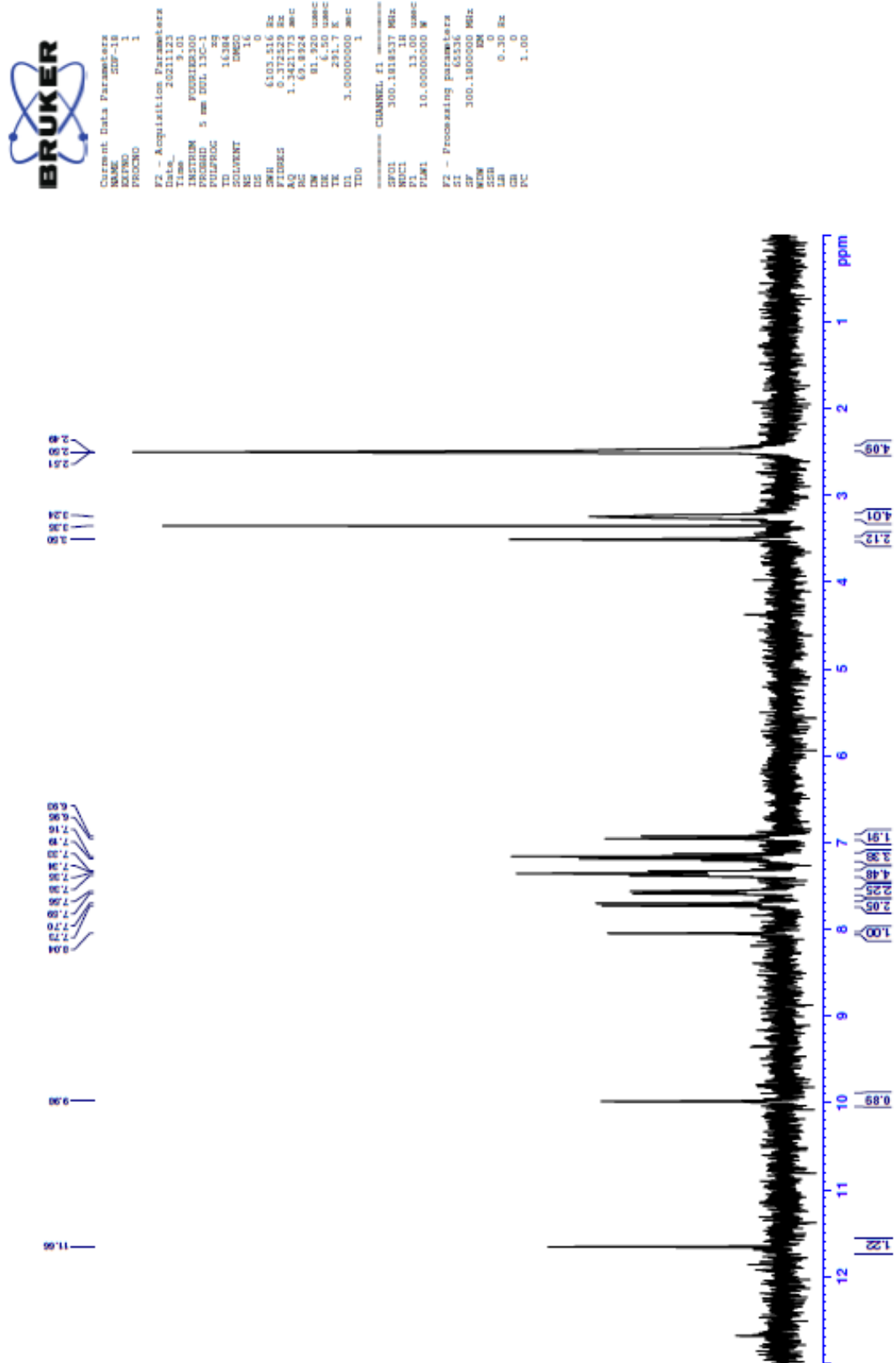
Şekil 5.49. 2-(4-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)-N-fenilhidrazin-1-karbotiyoamid (3m)

Verim: %79.

HRMS (m/z): $[M+H]^+$ hesaplanan $C_{25}H_{26}N_5FS$: 448.1966; bulunan: 448.1964.

1H -NMR (Dimetilsülfoksit-*d*6, 300 MHz): δ = 2.49-2.51 (piperazin, 4H, m), 3.24 (piperazin, 4H, y), 3.50 (-CH₂-, 2H, s), 6.94 (Ar-H, 2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.15-7.19 (Ar-H, 3H, m), 7.33-7.38 (Ar-H, 4H, m), 7.57 (Ar-H, 2H, d, $J=7.8$ Hz), 7.71 (Ar-H, 2H, d, $J=8.8$ Hz), 8.04 (-CH=N-, 1H, s), 9.98 (-NH, 1H, s), 11.66 (-NH, 1H, s).

^{13}C -NMR (Dimetilsülfoksit-*d*6, 75 MHz): δ = 47.67, 52.71, 61.49, 114.82, 115.41 (d, $J=21.1$ Hz), 124.17, 125.56, 126.17, 128.46, 129.36, 131.20 (d, $J=7.9$ Hz, Ar-H), 134.63, 139.63, 143.88, 152.55, 161.75 (d, $J=242.3$ Hz), 175.63.

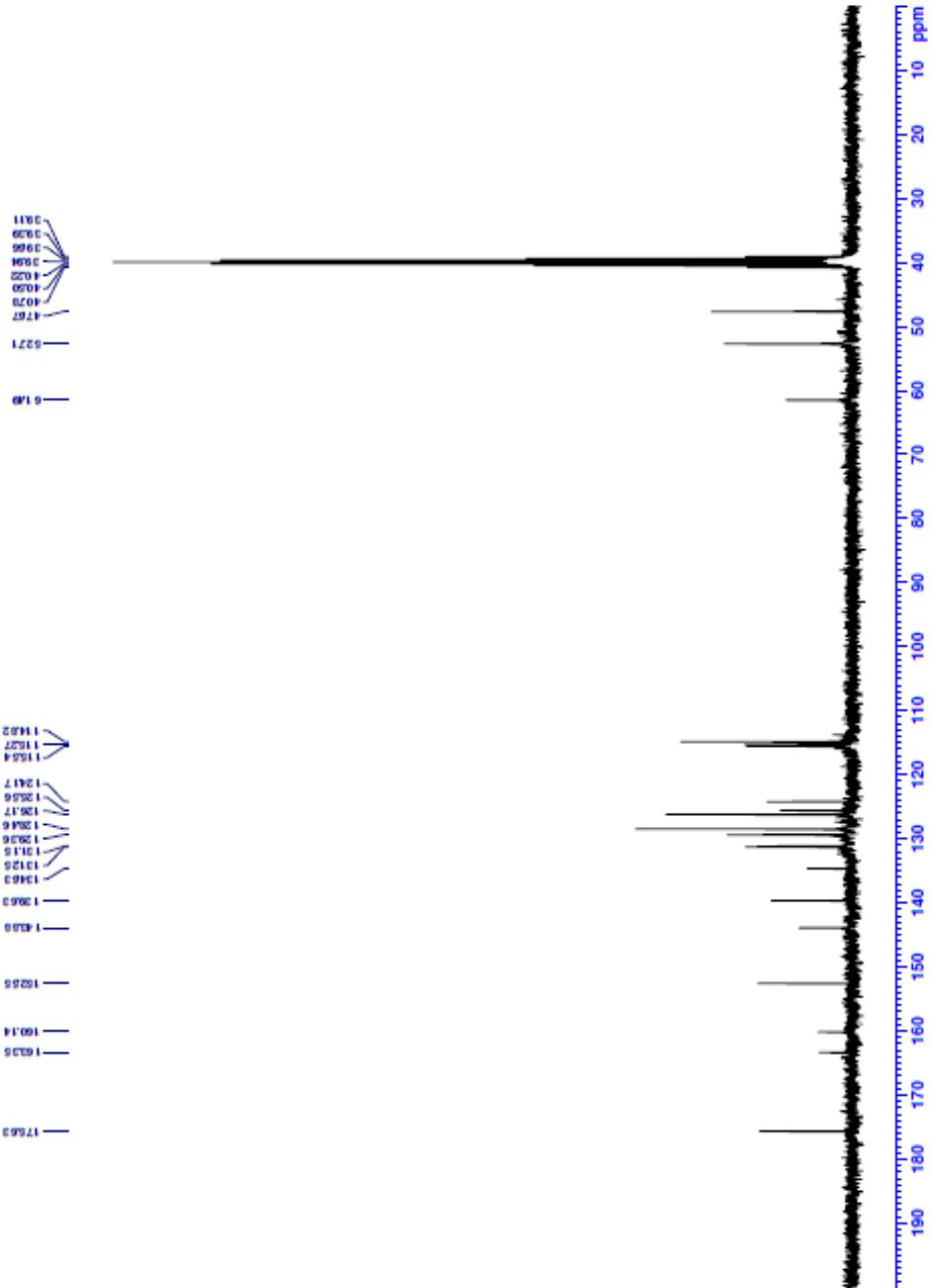


Şekil 5.50. ^1H -NMR spektrumu (3m)



Current Data Parameters
NAME: 3m
EXPNO: 2
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 2011123
Time: 9.03
PROBHD: 5 mm BBO-1
PULPROG: zgpg30
TD: 32768
SOLVENT: DMSO
NS: 4
DS: 4
SWH: 24414.562 Hz
FIDRES: 0.745058 Hz
AQ: 0.018161 sec
RG: 200.481
IN: 20.480 usec
DE: 6.50 usec
TE: 291.6 K
D1: 1.0000000 sec
D11: 0.0000000 sec
D12: 0.0000000 sec
D13: 0.0001500 sec
D14: 0.0000000 sec
D15: 0.0000000 sec
D16: 0.0000000 sec
D17: 0.0000000 sec
D18: 0.0000000 sec
D19: 0.0000000 sec
D20: 0.0000000 sec
D21: 0.0000000 sec
D22: 0.0000000 sec
D23: 0.0000000 sec
D24: 0.0000000 sec
D25: 0.0000000 sec
D26: 0.0000000 sec
D27: 0.0000000 sec
D28: 0.0000000 sec
D29: 0.0000000 sec
D30: 0.0000000 sec
D31: 0.0000000 sec
D32: 0.0000000 sec
D33: 0.0000000 sec
D34: 0.0000000 sec
D35: 0.0000000 sec
D36: 0.0000000 sec
D37: 0.0000000 sec
D38: 0.0000000 sec
D39: 0.0000000 sec
D40: 0.0000000 sec
D41: 0.0000000 sec
D42: 0.0000000 sec
D43: 0.0000000 sec
D44: 0.0000000 sec
D45: 0.0000000 sec
D46: 0.0000000 sec
D47: 0.0000000 sec
D48: 0.0000000 sec
D49: 0.0000000 sec
D50: 0.0000000 sec
D51: 0.0000000 sec
D52: 0.0000000 sec
D53: 0.0000000 sec
D54: 0.0000000 sec
D55: 0.0000000 sec
D56: 0.0000000 sec
D57: 0.0000000 sec
D58: 0.0000000 sec
D59: 0.0000000 sec
D60: 0.0000000 sec
D61: 0.0000000 sec
D62: 0.0000000 sec
D63: 0.0000000 sec
D64: 0.0000000 sec
D65: 0.0000000 sec
D66: 0.0000000 sec
D67: 0.0000000 sec
D68: 0.0000000 sec
D69: 0.0000000 sec
D70: 0.0000000 sec
D71: 0.0000000 sec
D72: 0.0000000 sec
D73: 0.0000000 sec
D74: 0.0000000 sec
D75: 0.0000000 sec
D76: 0.0000000 sec
D77: 0.0000000 sec
D78: 0.0000000 sec
D79: 0.0000000 sec
D80: 0.0000000 sec
D81: 0.0000000 sec
D82: 0.0000000 sec
D83: 0.0000000 sec
D84: 0.0000000 sec
D85: 0.0000000 sec
D86: 0.0000000 sec
D87: 0.0000000 sec
D88: 0.0000000 sec
D89: 0.0000000 sec
D90: 0.0000000 sec
D91: 0.0000000 sec
D92: 0.0000000 sec
D93: 0.0000000 sec
D94: 0.0000000 sec
D95: 0.0000000 sec
D96: 0.0000000 sec
D97: 0.0000000 sec
D98: 0.0000000 sec
D99: 0.0000000 sec
D100: 0.0000000 sec



Şekil 5.51. ^{13}C -NMR spektrumu (3m)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analysis\SDF-15_15.lcd

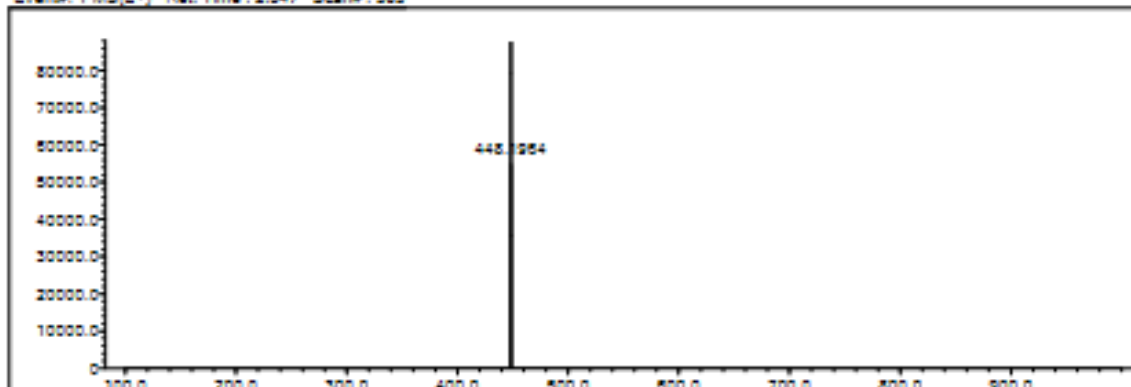
Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	10	40	F	1	1	1	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn (ao RI) (%): 10.00

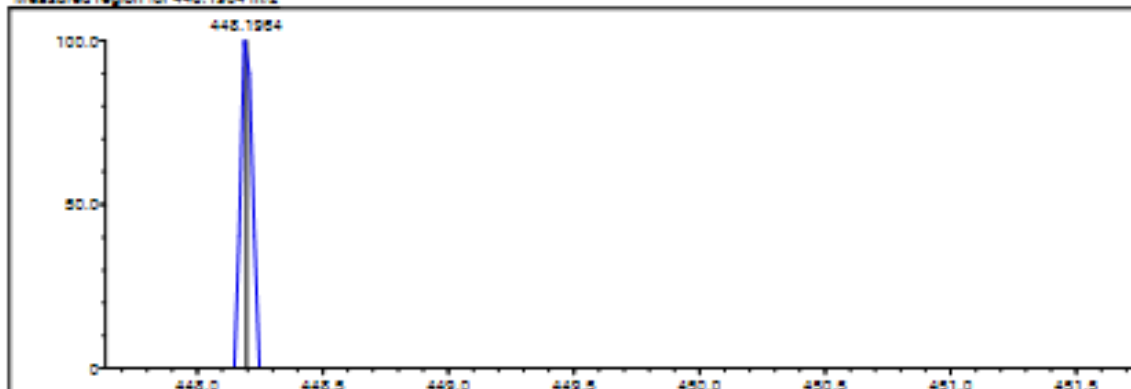
DBE Range: 5.0 - 15.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ion: both
 Use MSn Infor: yes
 Isotope Max: 9000
 Max Result: 150

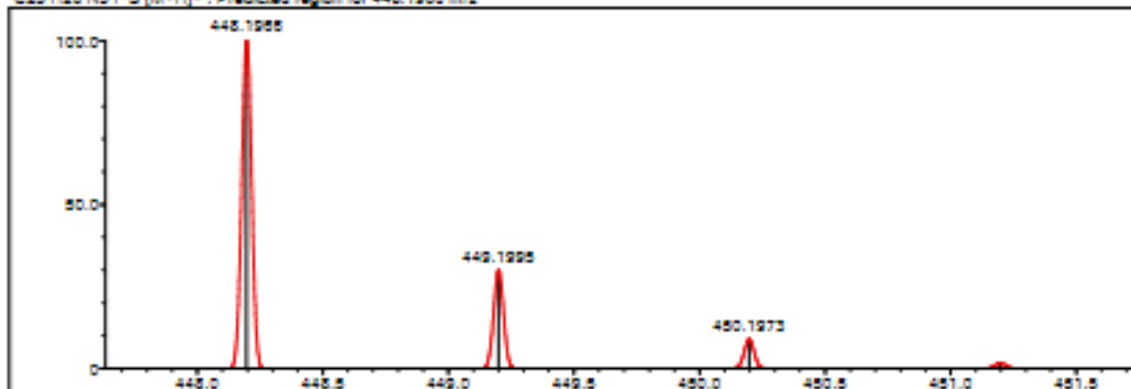
Event#: 1 MS(E+) Rel. Time: 2.547 Scan#: 383



Measured region for 448.1954 m/z



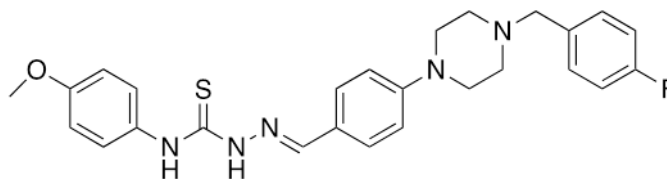
C25 H26 N5 F 5 (M+H)+ : Predicted region for 448.1955 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	DK (mDa)	DK (ppm)	Isol	DBE
1	0.00	C25 H26 N5 F 5	(M+H)+	448.1954	448.1955	-0.2	-0.45	0.00	15.0

Şekil 5.52. HRMS spektrumu (3m)

5.1.14. 2-(4-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)-N-(4-metoksifenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (3n)



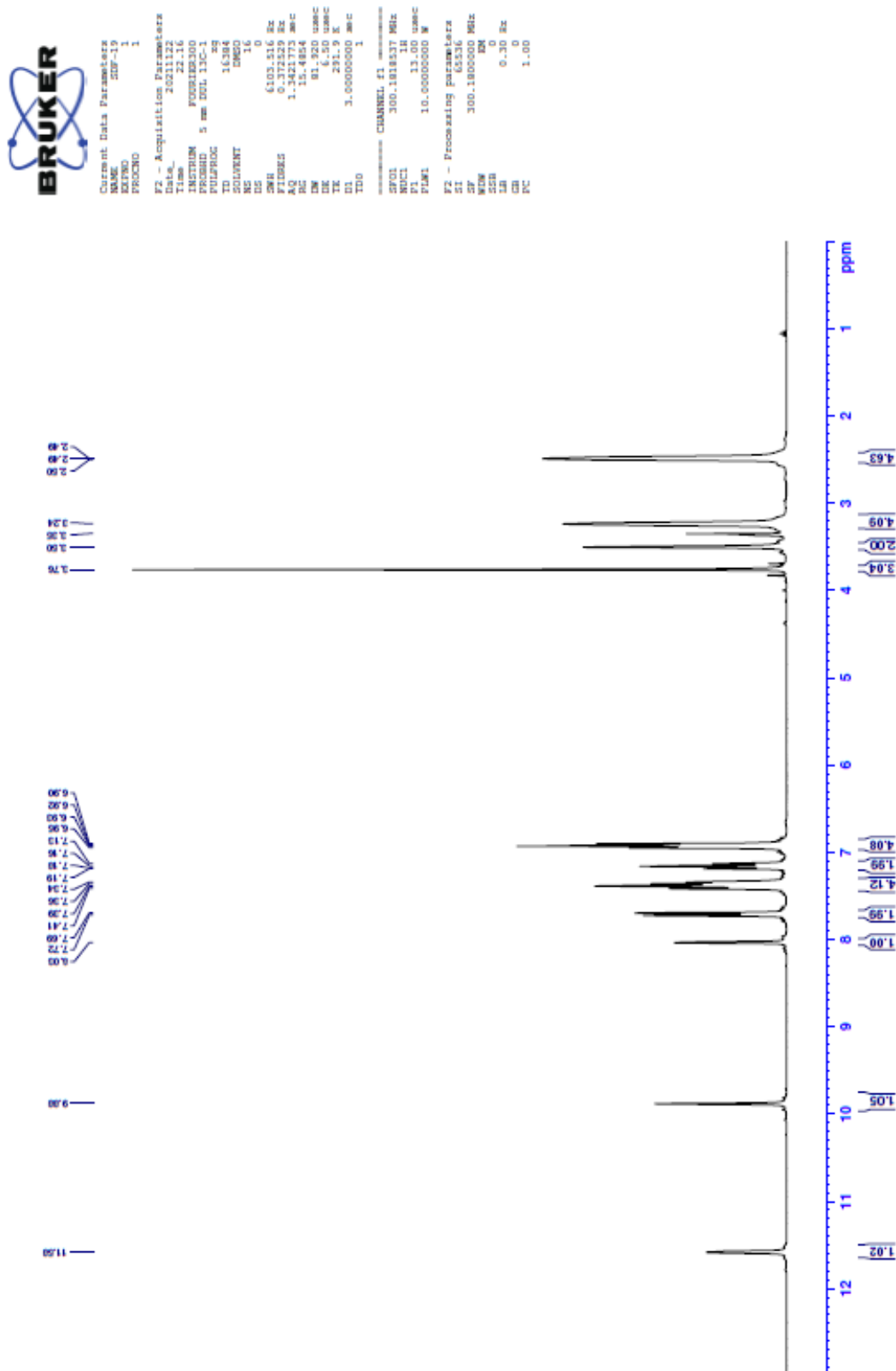
Şekil 5.53. 2-(4-(4-(4-Florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)-N-(4-metoksifenil)hidrazin-1-karbotiyoamid (3n)

Verim: %77.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₆H₂₈N₅OFS: 478.2071; bulunan: 478.2059.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 300 MHz): δ = 2.48-2.49 (piperazin, 4H, m), 3.24 (piperazin, 4H, y), 3.50 (-CH₂-, 2H, s), 3.76 (-OCH₃, 3H, s), 6.90-6.94 (Ar-H, 4H, m), 7.12-7.18 (Ar-H, 2H, m), 7.33-7.41 (Ar-H, 4H, m), 7.71 (Ar-H, 2H, d, J=7.9 Hz), 8.03 (-CH=N-, 1H, s), 9.88 (-NH, 1H, s), 11.58 (-NH, 1H, s).

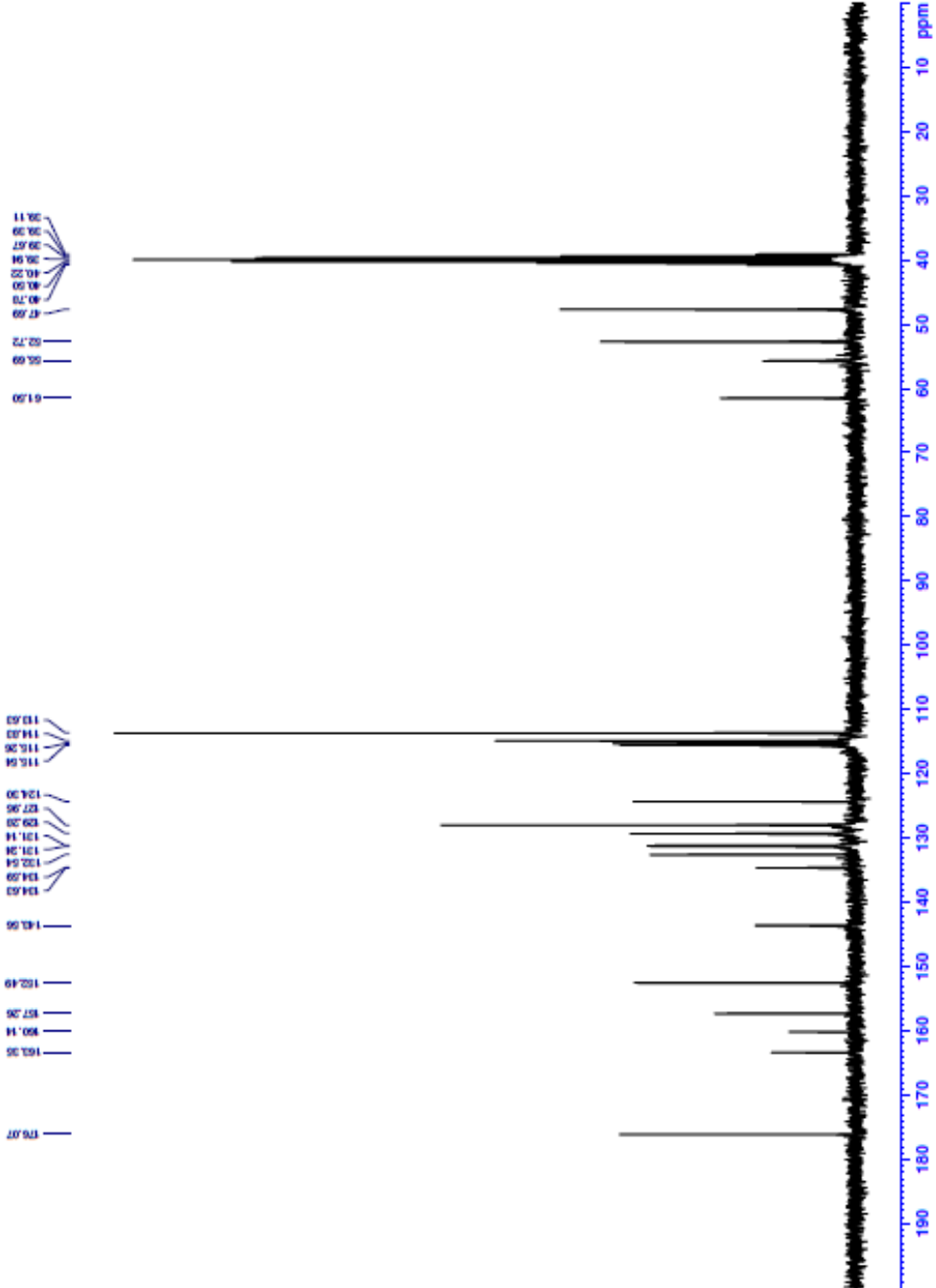
¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 75 MHz): δ = 47.69, 52.72, 55.69, 61.49, 113.63, 114.83, 115.39 (d, J=21.1 Hz), 124.30, 127.95, 129.28, 131.19 (d, J=7.9 Hz), 132.54, 134.61 (d, J=2.8 Hz, Ar-H), 143.57, 152.49, 157.26, 161.75 (d, J=242.4 Hz, Ar-H), 176.07.



Şekil 5.54. ^1H -NMR spektrumu ($3n$)



Current Data Parameters
 NAME: 3n
 EXPNO: 2
 PROCNO: 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 2021122
 Time 11:11
 INSTRUM PULPROG
 PULPROG zgpg30
 FREQH0 5 mm DOL 13C-1
 TD 32768
 SFO 125.761
 NS 2048
 DS 4
 SWH 24414.062 Hz
 FIDRES 0.745058 Hz
 AQ 0.770081 sec
 RG 327.187
 INW 20.480 uMHC
 DE 6.50 uMHC
 TE 293.2 K
 D1 1.00000000 sec
 D11 0.00000000 sec
 D12 0.00000000 sec
 D13 0.00015000 sec
 D14 0.89999998 sec
 D40 0.00031990 sec
 L4 23
 L5 23
 L6 23
 F22 95.00 uMHC
 T20 1
 CHANNEL f1
 NUC1 13C
 PULP1 zgpg30
 FREQ1 125.761 MHz
 SFO1 125.761 MHz
 P1 15.00 uMHC
 PL1 15.00000000 W
 CHANNEL f2
 NUC2 1H
 PULP2 zgpg30
 FREQ2 500.1362707 MHz
 SFO2 500.1362707 MHz
 P1 15.00 uMHC
 PL1 15.00000000 W
 F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.4803210 MHz
 SFO 75.4803210 MHz
 DS 4
 SW 1.00 Hz
 L3 0
 GB 0
 PC 1.40



Şekil 5.55. ^{13}C -NMR spektrumu (3n)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analysis\50F-19_19.lcd

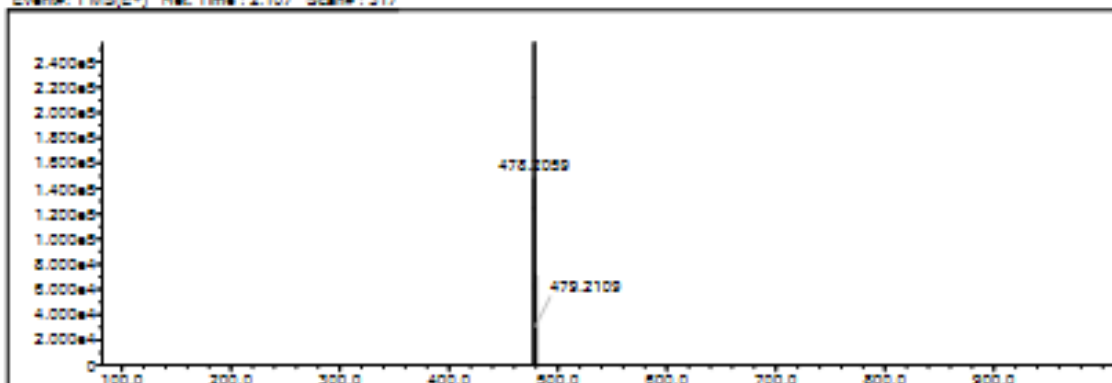
Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	10	40	F	1	1	1	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

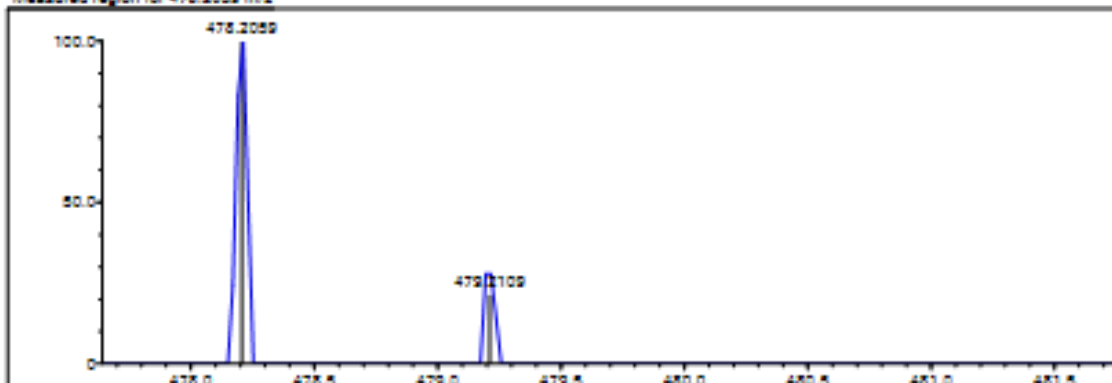
DBE Range: 5.0 - 15.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ion: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 150

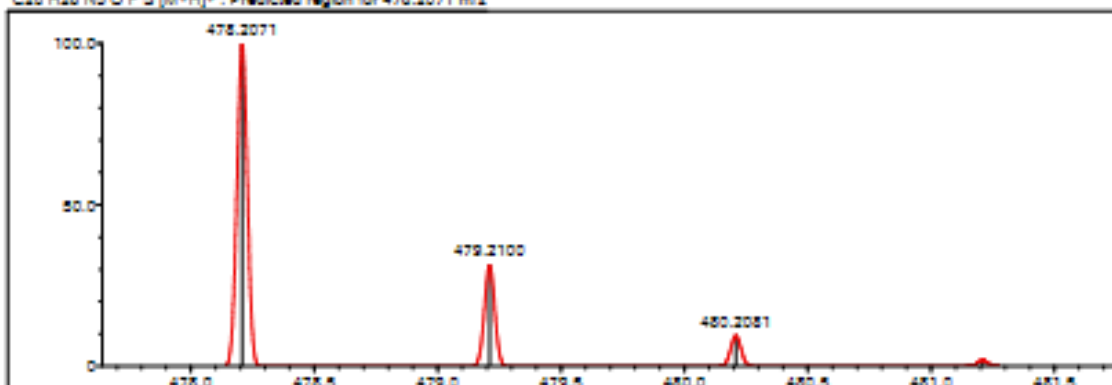
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 2.107 Scan#: 317



Measured region for 478.2059 m/z



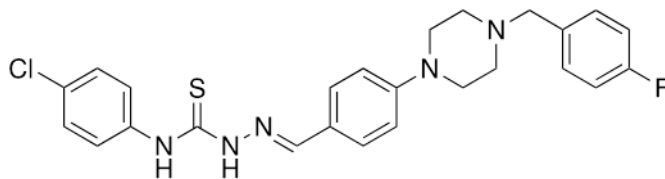
C26 H28 N5 O F S (M+H)+ : Predicted region for 478.2071 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	OK, (mDa)	OK, (ppm)	bc	DBE
1	0.00	C26 H28 N5 O F S	[M+H] ⁺	478.2059	478.2071	-1.2	-2.51	0.00	15.0

Şekil 5.56. HRMS spektrumu (3n)

5.1.15. *N*-(4-Klorofenil)-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3o)



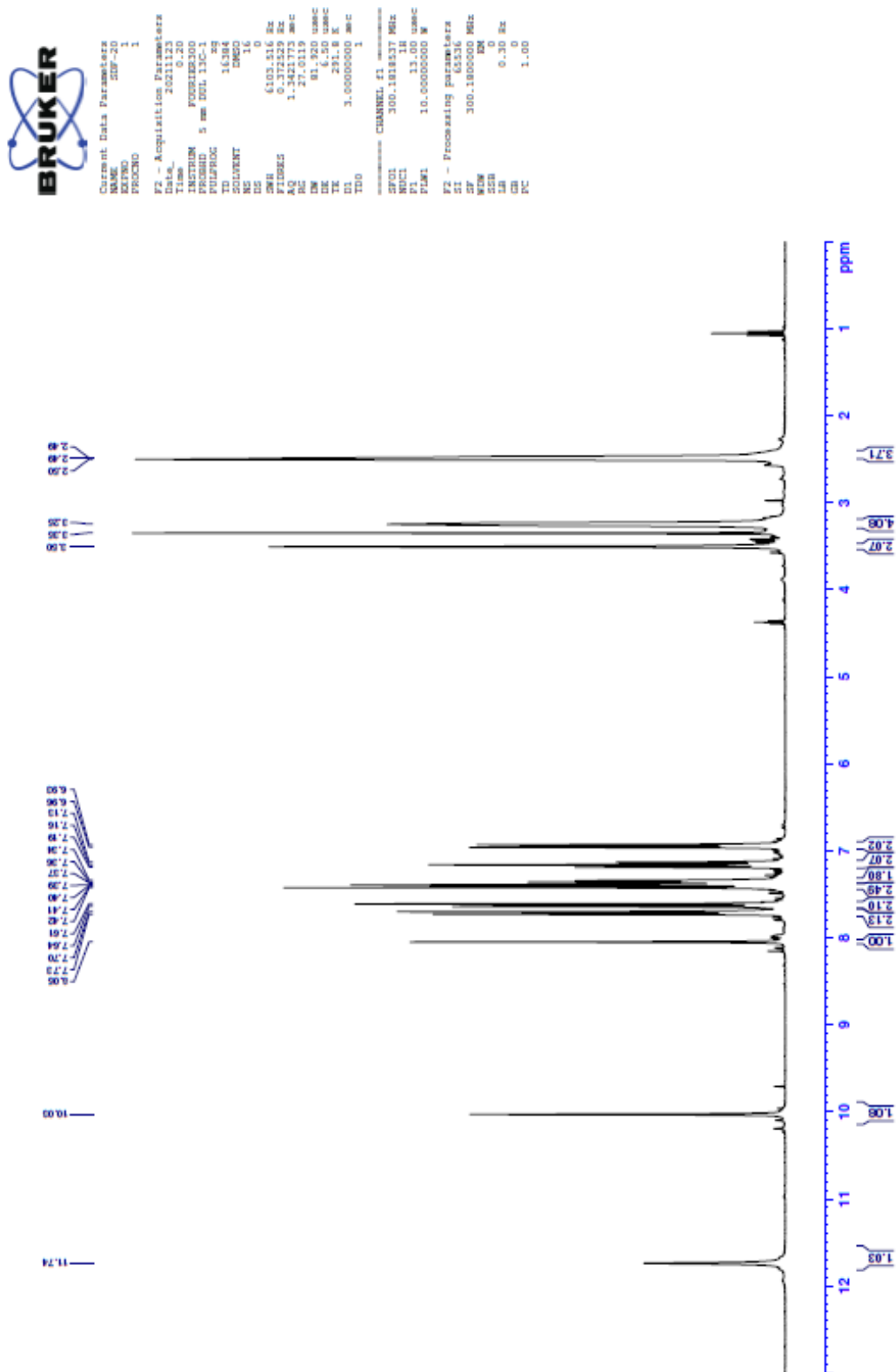
Şekil 5.57. *N*-(4-klorofenil)-2-(4-(4-(4-florobenzil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazin-1-karbotiyoamid (3o)

Verim: %88.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₂₅H₂₅FSCl: 482.1576; bulunan: 482.1566.

¹H-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 300 MHz): δ = 2.49-2.50 (piperazin, 4H, m), 3.24 (piperazin, 4H, y), 3.50 (-CH₂-, 2H, s), 6.94 (Ar-H, 2H, d, *J*=8.8 Hz), 7.16 (Ar-H, 2H, t, *J*=8.8 Hz), 7.33-7.37 (Ar-H, 2H, m), 7.39-7.42 (Ar-H, 2H, m), 7.62 (Ar-H, 2H, d, *J*=8.7 Hz), 7.71 (Ar-H, 2H, d, *J*=8.8 Hz), 8.05 (-CH=N-, 1H, s), 10.03 (-NH, 1H, s), 11.74 (-NH, 1H, s).

¹³C-NMR (Dimetilsülfoksit-dötoro, 75 MHz): δ = 47.65, 52.70, 61.48, 114.79, 115.40 (d, *J*=21.0 Hz), 124.05, 127.78, 128.32, 129.41, 129.49, 131.19 (d, *J*=8.1 Hz), 134.61 (d, *J*=2.9 Hz), 138.64, 144.19, 152.60, 161.74 (d, *J*=242.5 Hz), 175.58.



Şekil 5.56. ^1H -NMR ait spektrumu (30)

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analz\data\SDF-20_20.lcd

Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	10	40	O	2	0	3	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	10	40	F	1	1	1	Cl	1	1	1	Pd	2	0	0	
N	3	0	6	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5

HD Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 15.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

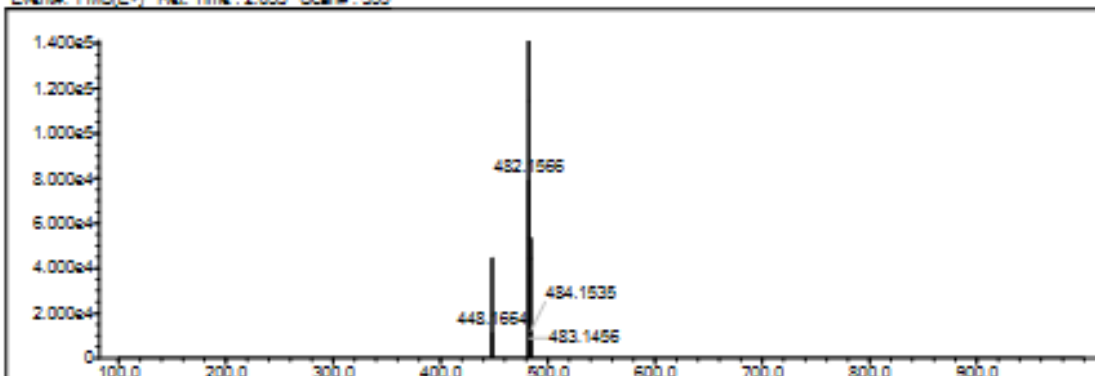
Electron Ion: both

Use MSn Info: yes

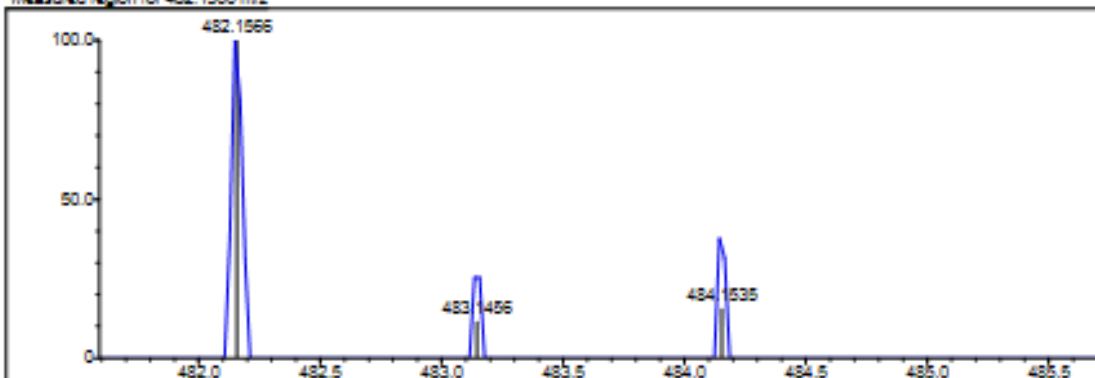
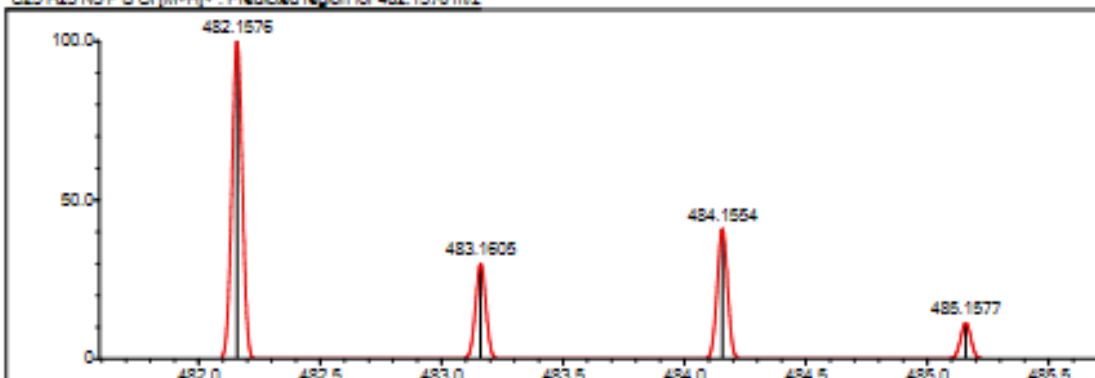
Isotope Res: 9000

Max Results: 150

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 2.653 Scan#: 399



Measured region for 482.1566 m/z

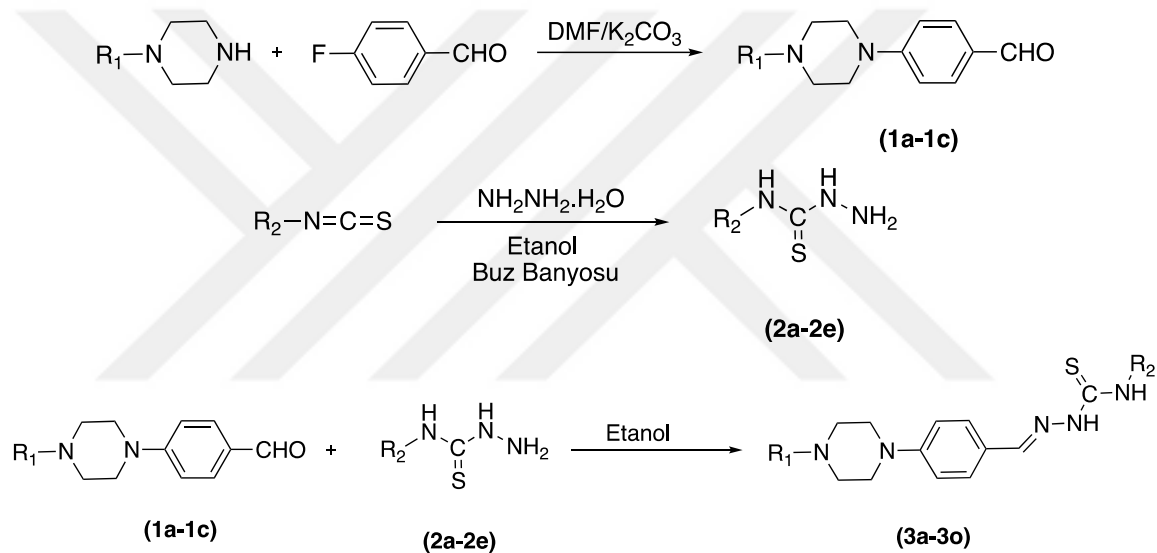
C25 H25 N5 F 8 Cl [M+H]⁺ : Predicted region for 482.1576 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Mass, m/z	Pred. m/z	Diff. (mDa)	Diff. (ppm)	Iso	DBE
1	34.71	C25 H25 N5 F 8 Cl	[M+H] ⁺	482.1566	482.1576	-1.0	-2.07	35.67	15.0

Şekil 5.59. HRMS spektrumu (3o)

5.2. Sentez Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Yürütülen tez kapsamında 15 yeni tiyosemikarabzon türevi bileşik sentezlenmiştir. Bileşiklerin sentezi üç basamaklı bir yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.60). İlk olarak sekonder amin ve 4-floro benzaldehit reaksiyona sokularak 4-süstitüe benzaldehit türevleri sentezlenmiştir. İkinci basamakta İzotiyosiyonat türevleri, hidrazin hidrat ile reaksiyona sokularak tiyosemikarbazit türevleri elde edilmiştir. Son olarak sentezlenen 4-süstitüe benzaldehit ve tiyosemikarbazit türevleri reaksiyona sokularak tiyosemikarbazon türevleri elde edilmiştir. Elde edilen bileşiklerin yapıları, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve HRMS spektroskopik yöntemleri ile aydınlatılmıştır.



Bileşik	R ₁	R ₂
3a	Fenil	Etil
3b	Fenil	Allil
3c	Fenil	Fenil
3d	Fenil	4-Metoksifenil
3e	Fenil	4-Klorofenil
3f	4-Florofenil	Etil
3g	4-Florofenil	Allil
3h	4-Florofenil	Fenil
3i	4-Florofenil	4-Metoksifenil
3j	4-Florofenil	4-Klorofenil
3k	4-Florobenzil	Etil
3l	4-Florobenzil	Allil
3m	4-Florobenzil	Fenil
3n	4-Florobenzil	4-Metoksifenil
3o	4-Florobenzil	4-Klorofenil

Şekil 5.60. Hedef bileşiklerin sentezi

5.3. Spektral Verilerin Değerlendirilmesi

Sentez çalışmaları sonucunda 15 adet yeni tiyosemikarbazon türevi bileşik elde edilmiştir. Bileşiklerin yapılarının aydınlatılması için spektroskopik yöntemlere başvurulmuştur. Bu amaçla HRMS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR teknikleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar tahmin edildiği gibidir. Tez kapsamında tüm bileşiklerin analiz sonuçları ve raporları sunulmuştur.

5.3.1. ^1H -NMR spektrumlarının değerlendirilmesi

Tez kapsamında elde edilen bileşiklerin alifatik ve aromatik protonları beklenildiği şekilde gözlenmiştir. Bileşiklerin genel yapıları incelendiğinde hepsinde ortak olarak piperazin halka sistemi, tiyosemikarbazon yapısı ve 1,4-disüstitüe benzen halkası bulunmaktadır.

Ortak yapılar haricinde bileşik **3a**, **3f** ve **3k** etil süstitüenti içermektedir. Etil yapısına ait protonlar 1.14 ppm de $J=7.1$ Hz değeri ile 3 protonluk triplet şeklinde gözlenmiştir. Etil yapısına ait diğer protonlar ise 3.54-3.63 ppm aralığında 2 protonluk multipler olarak kaydedilmiştir.

Bileşik **3b**, **3g** ve **3l** ise yapılarında allil grubu taşımaktadır. Bu gruba ait protonlar 4.20-4.21 ppm de $J= 5.6$ Hz değeri ile 2 protonluk triplet olarak gözlenmiştir. Allil grubunun diğer protonları ise 5.06- 5.18 ppm değeri aralığında 2 protonluk multipler ve 5.87- 5.96 ppm değeri aralığında 1 protonluk multipler olarak gözlenmiştir.

Bileşiklerin hepsinde ortak olarak bulunan piperazin halkası incelendiğinde bileşikler **3a-3j** 3.19-3.29 ppm değerinde 4 protonluk multipler ve 3.37-3.42 ppm değerinde 4 protonluk multipler olarak gözlenmiştir. Bileşikler **3k-3o**'ya ait piperazin protonları ise 2.46-2.50 ppm değerinde ve 3.21-3.42 ppm değeri aralığında gözlenmiştir. Aradaki bu farkın bileşikler **3k-3o**'nun benzil yapısı taşımasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Bileşiklerin hepsinde ortak olarak bulunan bir diğer yapı ise imin grubuna bağlı metilen protonudur. Bu gruba ait protonlar 7.95-8.07 ppm değerleri arasında 1 protonluk singlet pik şeklinde gözlenmiştir. İmin yapısına yakın olan azot hidrojeni ise 11.26-11.76 ppm değerleri arasında singlet olarak gözlenmiştir.

İzotiyosiyanat kalıntısından gelen amin grubu ise 8.39-10.05 ppm değeri aralığında gözlenmiştir. Etil grubu içeren bileşiklere (**3a**, **3f**, **3k**) ait amin grubu protonları $J=5.9$ Hz

değeri ile triplet olarak gözlenmiştir. Benzer şekilde allil grubu içeren bileşiklere (**3b**, **3g**, **3l**) ait amin protonları $J=5.9$ Hz değeri ile triplet olarak gözlenmiştir.

Bahsi geçen bu protonların dışında kalan diğer sübtitüe benzen protonları literatür verileri ile uyumlu olarak gözlenmiştir.

5.3.2. ^{13}C -NMR spektrumlarının değerlendirilmesi

Tez kapsamında elde edilen bileşiklerin ^{13}C -NMR verileri incelendiğinde yapıdaki tüm alifatik ve aromatik karbonların beklenildiği şekilde elde edildiği görülmüştür. C=S grubuna ait pikler 175.58-177.11 ppm değerleri arasında kaydedilmiştir. Bu grup haricinde kalan alifatik karbonlara ait pikler 15.22-61.49 ppm değerleri arasında gözlenirken; aromatik karbonlara ait pikler ise 113.63-161.75 ppm değerleri arasında gözlenmiştir.

5.3.3. Kütle spektrumlarının değerlendirilmesi

Sentez edilen bileşiklerin kütle spektrumları yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi cihazında, elektron spray iyonizasyon tekniği ile pozitif modda incelenmiştir ve elde edilen kütleler teorik kütlelere en fazla 5 ppm uzaklıkta aranmıştır ve sonuçlar uyumlu olarak elde edilmiştir.

5.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

5.4.1. AChE ve BChE enzim aktivite çalışmalarının değerlendirilmesi

Tez kapsamında 15 adet yeni tiyosemikarbazon türevi bileşik sentezlenmiş ve yapı tayini ile yapıları aydınlatılmıştır. Elde edilen bu bileşiklerin kolinesteraz enzimine karşı inhibitör etkinlikleri incelenmek üzere *in vitro* Ellman metodu kullanılmıştır. Aktivite testlerinde öncelikle tüm bileşiklerin ve referans ilaçların 10^{-3} ve 10^{-4} M konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve AChE ve BChE enzimlerine karşı inhibitör etkileri incelenmiştir. Bu ilk adımda %50 üzeri inhibitör etkinlik gösteren bileşikler ikinci adım aktivite testlerine tabi tutulmuştur. İkinci adımda ise bileşiklerin 10^{-3} - 10^{-9} M konsantrasyonda bileşik çözeltileri hazırlanmış ve aktif bileşiklerin IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar **Tablo-5.1**'de sunulmuştur.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde bileşiklerin hiçbirinin BChE enzimi üzerinde aktivite göstermediği görülmüştür. BChE daha ziyade perifer hücrelerde bulunduğu için AH hedefi AChE enzimi olmuştur. Bu sebeple BChE enzimi üzerinde inhibitör etkinlik

göstermemesi bileşiklerin değerini düşürmemektedir. Tam aksine, seçici inhibitörler sayesinde yan etki görülme oranı azalmaktadır.

AChE enzimi üzerindeki aktivite değerleri incelendiğinde ise bileşikler **3b**, **3c**, **3e**, **3k**, **3l**, **3m**, **3n** ve **3o** önemli aktivite profili sergilemişlerdir. Bu bileşiklerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.250±0.012 µM, 0.378±0.017 µM, 0.192±0.009 µM, 0.033±0.001 µM, 0.092±0.004 µM, 0.046±0.002 µM, 0.077±0.003 µM, 0.115±0.005 µM olarak hesaplanmıştır. Donepezil IC₅₀=0.0201±0.0014 µM değeri ile AChE enzimine karşı aktivite sergilemektedir. Özellikle bileşik **3k** IC₅₀=0.033±0.001 µM değeri ile donepezile yakın bir aktivite potansiyeli sergilemiştir.

Aktivite sonuçlarına bakıldığında benzil piperazin içeren bileşiklerin diğer bileşiklere kıyasla daha aktif oldukları görülmüştür. Bu bileşikler arasından ise tiyosemikarbazon kalıntısında etil süstitüenti taşıyan türev (**3k**) en aktif bulunmuştur. Tiyosemikarbazon kalıntısına bağlı süstitüent hacmi arttıkça aktivitenin azaldığı görülmektedir.

5.4.2. MAO-A ve MAO-B enzim aktivite çalışmalarının değerlendirilmesi

AChE enzimi yanında bileşiklerin bileşiklerin dual etki potansiyellerini incelemek için MAO enzim inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar **Tablo-5.1**'de sunulmuştur. Selejilin ve moklobemid referans ilaçlar olarak kullanılmıştır. Aktivite testleri iki adımda gerçekleştirilmiş ve ilk adımda yine 10⁻³ ve 10⁻⁴ M konsantrasyondaki bileşikler ve referans ilaçlar hazırlanarak aktivite potansiyelleri incelenmiştir. MAO-A enzimi üzerinde elde edilen sonuçlara göre bileşiklerin hiçbirisi %50 üzerinde inhibitör etkinlik gösterememiştir.

MAO-B enzimi üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde selejilin referans molekülünün IC₅₀=0.0374±0.0016 µM değeri ile aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bileşikler **3f**, **3i**, **3k**, **3l**, **3m**, **3n**, **3o** ise sırasıyla IC₅₀=0.336±0.015 µM, 0.428±0.020 µM, 0.062±0.002 µM, 0.143±0.006 µM, 0.094±0.004 µM, 0.183±0.008 µM, 0.241±0.011 µM değeri ile MAO-B enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermiştir. Selejiline en yakın aktivite potansiyelini ise bileşik **3k** sergilemiştir. Bileşik **3k** hem AChE hem de MAO-B enzimlerini önemli düzeyde inhibe ederek dual etkili bileşik profili sergilemiştir. Bileşiklerin yapı-etki ilişkilerinin daha yakından incelenebilmesi için *in silico* çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5.1 Elde edilen bileşiklerin 10⁻³ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarında AChE, BChE, MAO-A ve MAO-B enzimine karşı % inhibisyon oranları ve IC₅₀ (μM) değerleri

Bileşik	AChE % İnhibisyon		AChE IC ₅₀ (μM)	BChE % İnhibisyon		BChE IC ₅₀ (μM)	MAO-A % İnhibisyon		MAO-A IC ₅₀ (μM)	MAO-B % İnhibisyon		MAO-B IC ₅₀ (μM)
	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M		10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M		10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M		10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	
3a	72.634 ±2.164	42.367 ±0.851	>100	31.232 ±0.932	23.532 ±0.748	>1000	42.523 ±1.332	29.241 ±0.882	>1000	55.354 ±1.336	35.633 ±0.857	>100
3b	88.415 ±1.637	85.484 ±1.051	0.250 ±0.012	35.941 ±1.055	30.314 ±0.836	>1000	45.341 ±1.552	26.665 ±0.937	>1000	62.487 ±1.632	42.741 ±0.951	>100
3c	83.174 ±2.337	76.151 ±1.275	0.378 ±0.017	30.469 ±0.962	21.168 ±0.774	>1000	40.257 ±1.074	27.487 ±0.827	>1000	48.762 ±0.928	40.452 ±0.974	>1000
3d	46.898 ±1.023	38.728 ±0.974	>1000	28.157 ±0.889	24.479 ±0.851	>1000	38.189 ±0.921	24.824 ±0.737	>1000	46.518 ±0.839	41.867 ±0.851	>1000
3e	89.562 ±1.855	87.461 ±0.837	0.192 ±0.009	25.748 ±0.731	20.820 ±0.810	>1000	46.464 ±1.315	30.199 ±1.087	>1000	54.996 ±1.057	43.948 ±0.766	>100
3f	81.333 ±2.167	48.934 ±0.928	>100	36.664 ±1.154	31.915 ±0.937	>1000	42.822 ±1.432	31.761 ±0.851	>1000	83.155 ±1.857	78.169 ±1.864	0.336 ±0.015
3g	74.741 ±1.985	44.847 ±0.755	>100	39.528 ±1.121	27.764 ±0.762	>1000	37.734 ±1.039	31.932 ±0.947	>1000	40.232 ±0.962	30.351 ±0.919	>1000
3h	49.928 ±0.874	37.585 ±0.809	>1000	30.399 ±1.074	21.067 ±0.889	>1000	38.651 ±1.231	30.245 ±0.974	>1000	42.841 ±1.003	31.420 ±0.932	>1000
3i	48.564 ±0.961	30.691 ±0.917	>1000	24.858 ±0.809	19.890 ±0.832	>1000	43.978 ±1.634	28.378 ±0.723	>1000	84.678 ±1.557	77.575 ±1.157	0.428 ±0.020
3j	69.054 ±1.864	41.536 ±0.862	>100	28.231 ±0.974	22.389 ±0.737	>1000	47.069 ±0.974	29.510 ±0.957	>1000	70.454 ±2.046	41.289 ±0.822	>100
3k	96.438 ±2.632	93.336 ±1.257	0.033 ±0.001	32.028 ±1.255	21.631 ±0.830	>1000	40.128 ±1.333	24.068 ±0.857	>1000	92.398 ±2.862	88.664 ±1.337	0.062 ±0.002

3l	91.195 ±2.164	87.457 ±1.057	0.092 ±0.004	36.107 ±1.339	26.102 ±0.851	>1000	38.633 ±0.932	32.199 ±0.857	>1000	89.262 ±1.952	87.864 ±2.237	0.143 ±0.006
3m	95.562 ±1.831	91.648 ±2.157	0.046 ±0.002	39.667 ±1.064	32.241 ±0.975	>1000	48.308 ±1.839	36.741 ±0.955	>1000	91.831 ±2.354	89.051 ±1.737	0.094 ±0.004
3n	93.840 ±1.678	89.792 ±1.490	0.077 ±0.003	37.864 ±0.931	30.058 ±0.820	>1000	41.451 ±1.182	34.608 ±0.734	>1000	88.504 ±2.157	84.429 ±1.904	0.183 ±0.008
3o	90.978 ±2.261	87.155 ±1.244	0.115 ±0.005	31.475 ±0.975	26.574 ±0.822	>1000	40.740 ±1.236	30.965 ±0.864	>1000	87.759 ±1.741	81.537 ±1.065	0.241 ±0.011
Donepezil	99.156 ±1.302	97.395 ±1.255	0.0201 ±0.0014	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Takrin	-	-	-	99.827 ±1.378	98.651 ±1.402	0.0064 ±0.0002	-	-	-	-	-	-
Moklobemid	-	-	-	-	-	-	94.121 ±2.760	82.143 ±2.691	6.0613 ±0.2625	-	-	-
Selejilin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98.589 ±2.055	94.850 ±1.114	0.0374 ±0.0016

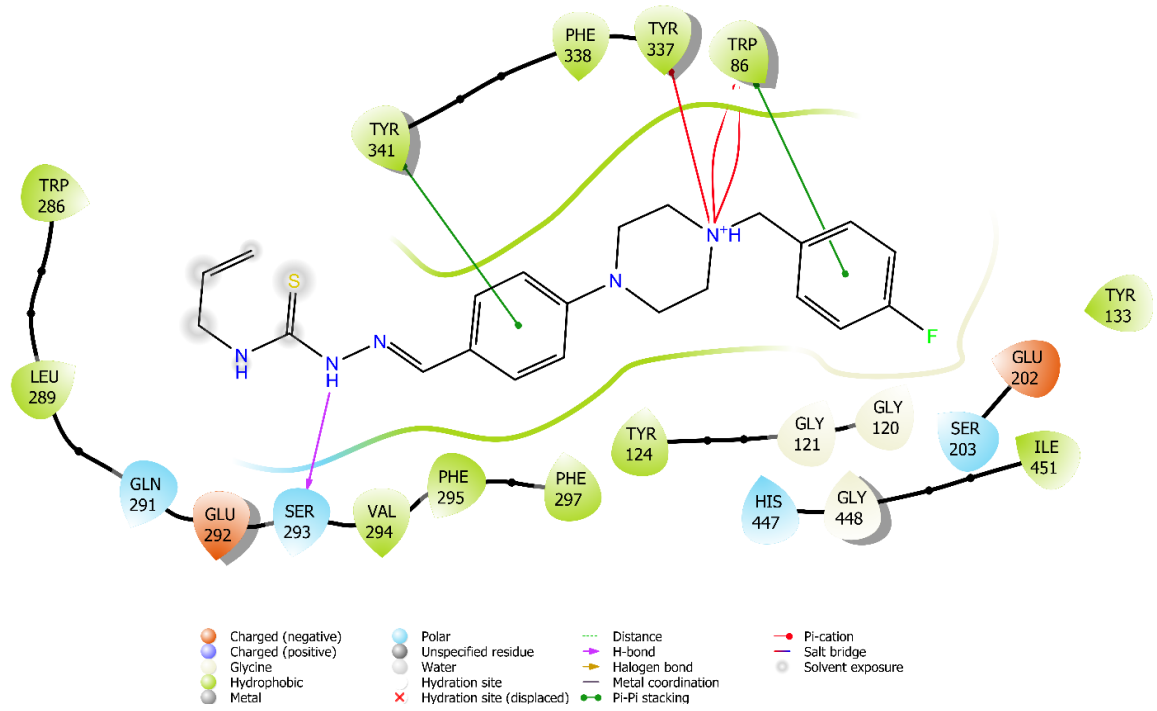
5.5. Moleküler Modelleme Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen, AChE ve MAO-B enzimleri üzerine inhibisyon aktivitesi en yüksek bulunan bileşikler **3k**, **3l**, **3m**, **3n** ve **3o**'nun moleküler modelleme çalışmaları AChE (PDB: 4EY7 [65]) ve MAO-B (PDB: 2V5Z [66]) enzimlerinin kristalleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Doking çalışmaları *Schrödinger Suite 2020 Update 2* [67] programı kullanılarak standart prosedürler ile gerçekleştirilmiştir. *LigPrep 3.8* [68], *Glide 7.1* [69] ara yüzleri kullanılarak single precision (SP) ile docking işlemi gerçekleştirilmiştir.

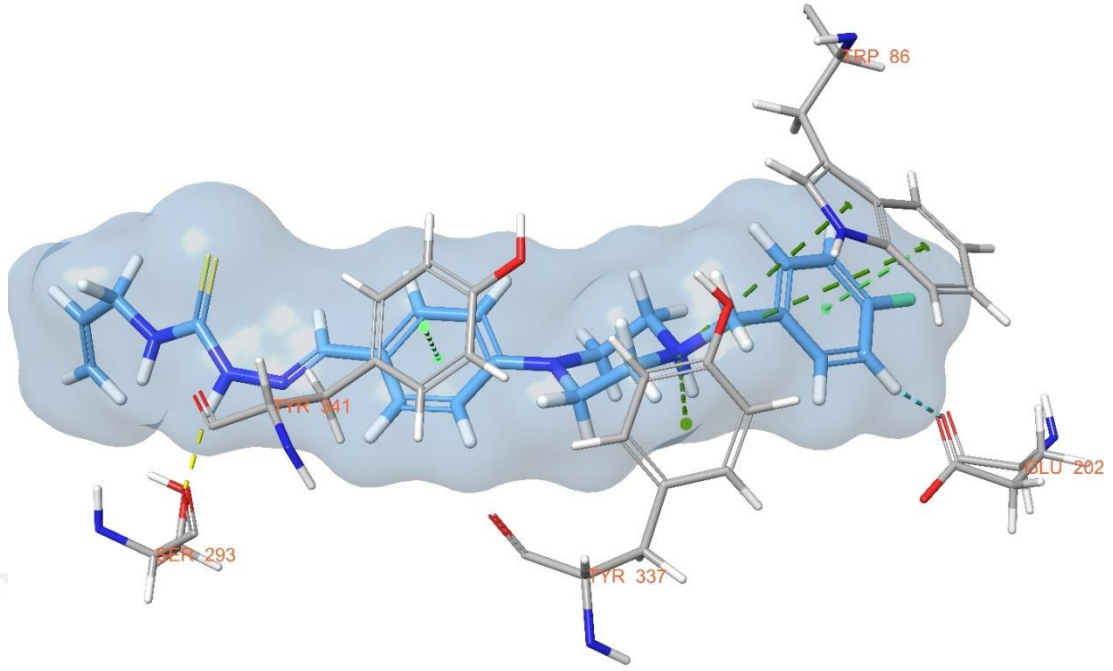
Yapılan birçok modelleme çalışmasında donepezilin çift bağlanma bölgesi özelliği (dualbindingside-DBS) ile AChE enziminin her iki bölgesi ile de etkileşerek geçide çok iyi yerleştiği belirlenmiştir. 2012 yılında Cheung ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada donepezilin AChE enzim aktif bölgelerine bağlanma noktaları analiz edilerek donepezilin aktif bölgelerle olan etkileşimleri açıklanmıştır. Enzim aktif yöreni CAS ve PAS olarak nitelendirilen iki bölümden oluşmaktadır. Donepezilin yapısında yer alan benzil halkası ile Trp86 amino asidinin indol halkası arasında tespit edilen π - π etkileşimi CAS bölgesinde görülen bir etkileşimdir. Kimyasal yapıda bulunan karbonil oksijeni önemli bir etkileşime sahiptir. İndanon halkasında yer alan karbonil oksijeninin Phe338'in amino grubu ile bir hidrojen bağı oluşturduğu tespit edilmiştir. PAS bölgesi incelendiğinde ise indanon halkası ile Trp286'daki indol halkası arasında bir π - π etkileşimi oluşturduğu görülmektedir. Kimyasal yapının orta kısmında bulunan piperidin halkasının hem CAS hem de PAS bölgeleriyle van der Waals etkileşimi yaparak enzim aktif bölgesine bağlanmada katkı sağladığı belirlenmiştir [65].

Şekil 5.60 ve **5.61** incelendiğinde bileşik **3k**'nın AchE enzim aktif yöreni ile etkileşimi görülmektedir. Tiyosemikarbazid kısmının uç amini ile Tyr341 aminoasidinin karbonil grubu arasında bir hidrojen bağı gözlenmektedir. Aynı aminoasidin fenil halkası ise piperazin halkasının azotu ile katyon- π etkileşimi sergilemektedir. Piperazin halkasının azotu aynı zamanda Tyr337 aminoasidinin fenil halkası ile katyon- π etkileşimi oluşturmuştur. Piperazin halkasına bağı 4-florobenzil yapısına ait fenil halkası Tyr337 aminoasidinin fenil halkası ile π - π etkileşimi oluştururken; yapıda bulunan diğer fenil halkası ise Trp286 aminoasidinin indol halkası ile π - π etkileşimi oluşturmuştur.

Şekil 5.62 ve 5.63 incelendiğinde bileşik 3I'nin AchE enzim aktif yoresi ile etkileşimi görülmektedir. Tiyosemikarbazid kısmının amini ile Ser293 aminoasidinin hidroksil grubu arasında bir hidrojen bağı gözlenmektedir. Bileşik 3I'nin fenil halkası ile Tyr341 aminoasidinin fenil halkası arasında π - π etkileşimi görülmektedir. Piperazin halkasının azotu ile Tyr337 aminoasidinin fenil halkası arasında bir tane, Trp86 aminoasidinin indol halkası ile iki tane katyon- π etkileşimi sergilemiştir. Trp86 aminoasidinin indol halkası ile 4-florobenzil halkası arasında da π - π etkileşimi görülmüştür.

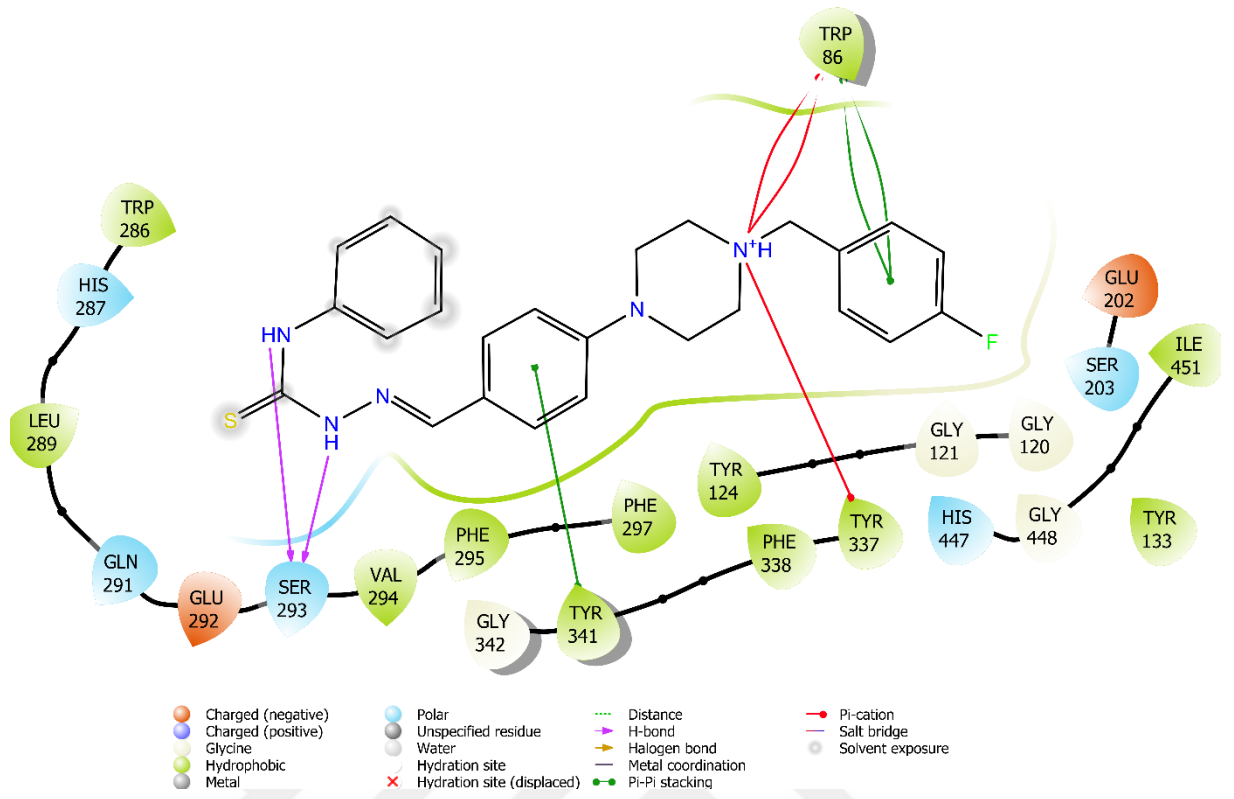


Şekil 5.63. Bileşik 3I'nin iki boyutlu olarak AChE enzim aktif yoresiyle etkileşimi.

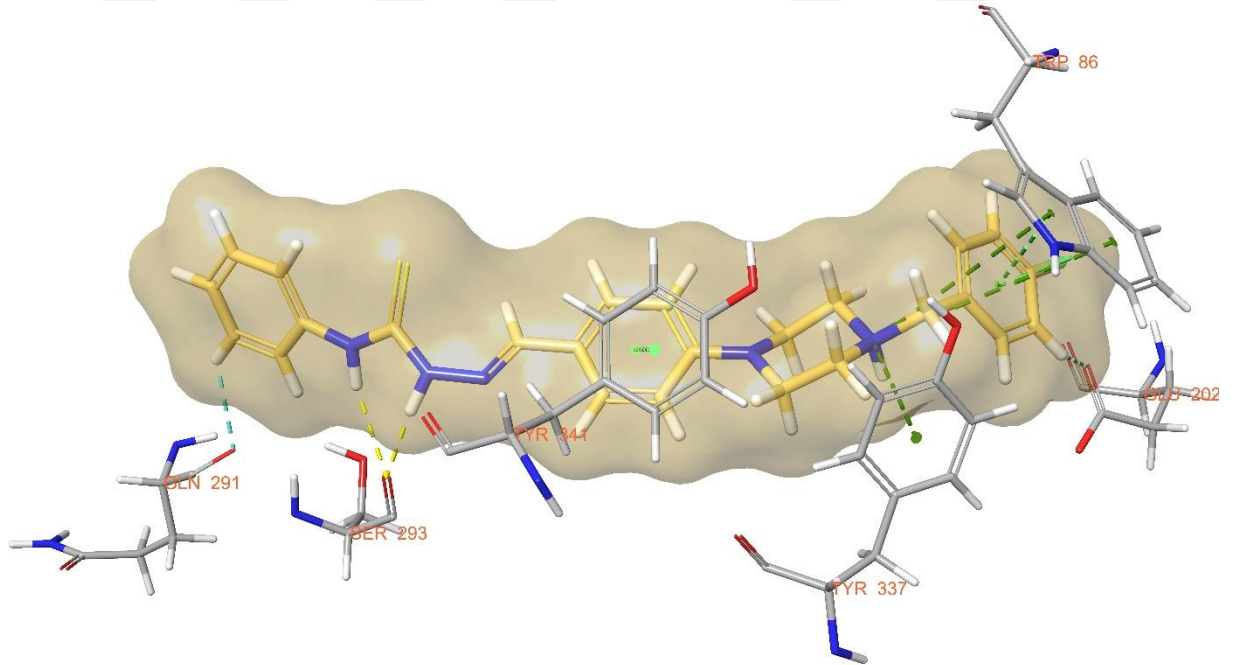


Şekil 5.64. Bileşik **3k**'nin üç boyutlu olarak AchE enzim aktif bölgesiyle etkileşimi (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler gri renkli, bileşik **3k** ise mavi renkli gösterilmiştir).

Şekil 5.64 ve **Şekil 5.65** incelendiğinde bileşik **3m**'nin AChE enzim aktif yöresi ile etkileşimi görülmektedir. Tiyosemikarbazid kısmının her iki amini ile Ser293 aminoasidinin hidroksil grubu arasında ikili hidrojen bağı gözlenmektedir. Tiyosemikarbazid kalıntısına bağlı fenil halkası Gln291 aminoasidinin karbonili ile aromatik hidrojen bağı oluşturmuştur. Bileşik **3m**'nin fenil halkası ile Tyr341 aminoasidinin fenil halkası arasında π - π etkileşimi görülmektedir. Piperazin halkasının azotu ile Tyr337 aminoasidinin fenil halkası arasında bir tane, Trp86 aminoasidinin indol halkası ile iki tane katyon- π etkileşimi gözlenmiştir. Trp86 aminoasidinin indol halkası ile 4-florobenzil yapısı arasında da iki tane π - π etkileşimi görülmüştür. Son olarak 4-florobenzil yapısı ile Glu202 arasında aromatik hidrojen bağı gözlenmektedir.

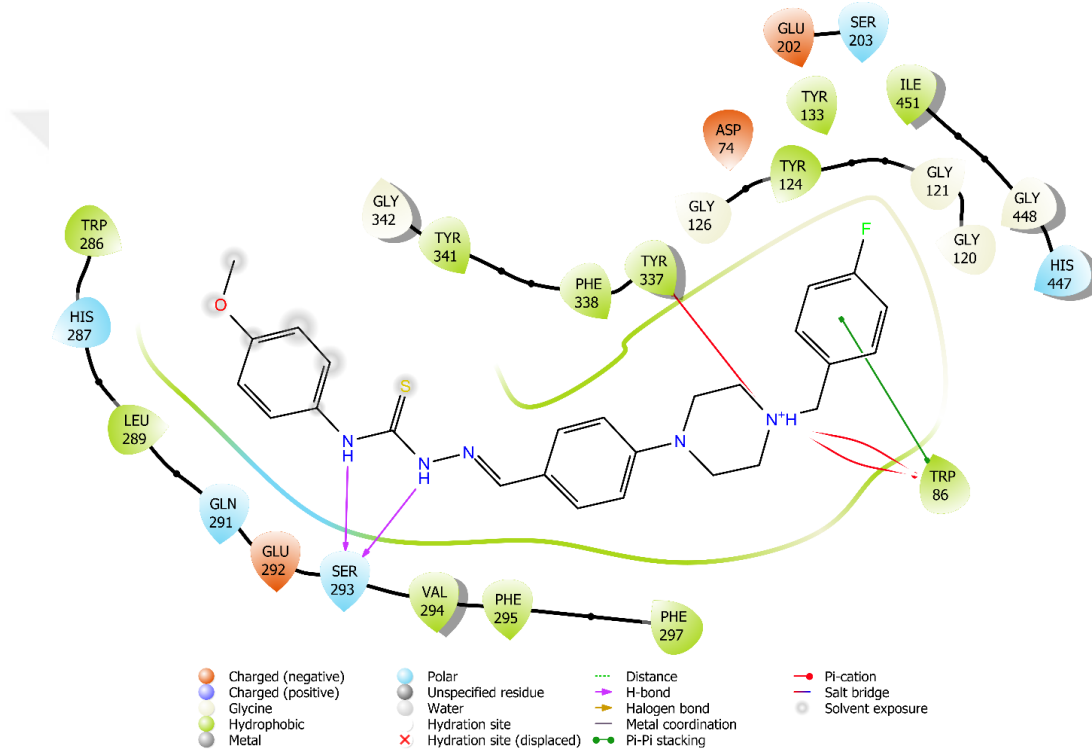


Şekil 5.65. Bileşik 3m'nin iki boyutlu olarak AChE enzim aktif yoresiyle etkileşimi

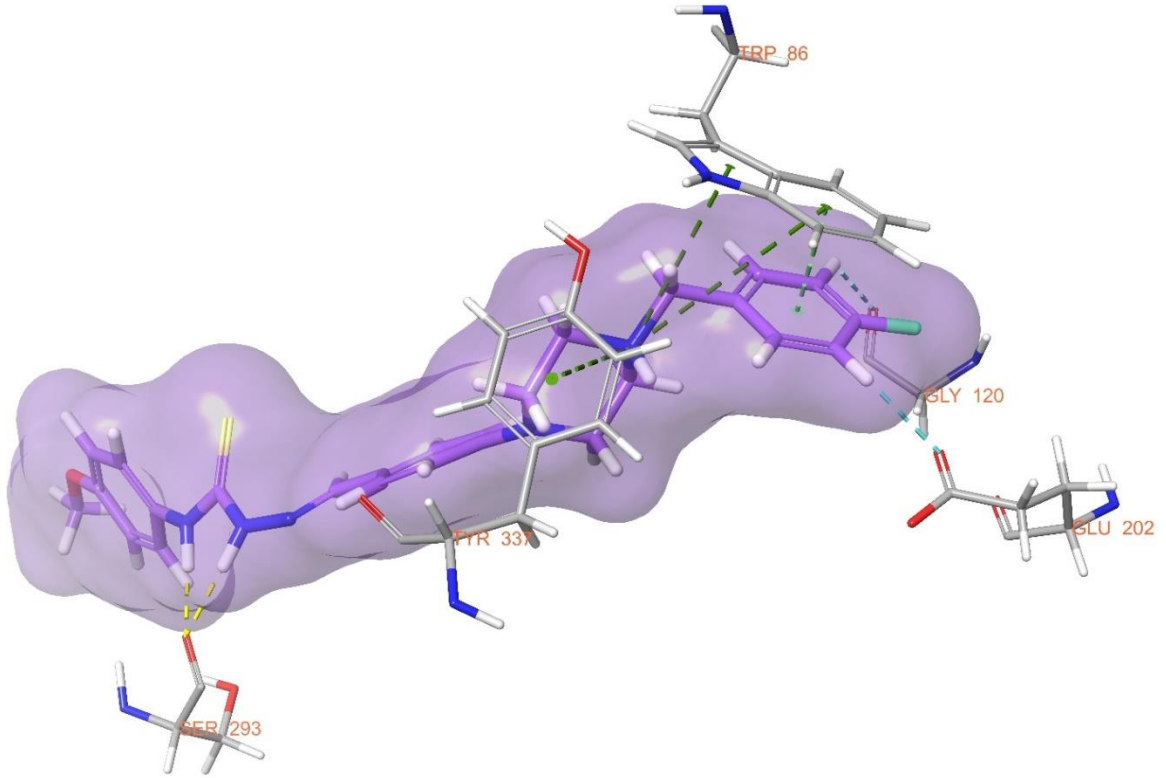


Şekil 5.66. Bileşik 3m'nin üç boyutlu olarak AchE enzim aktif bölgesiyle etkileşimi (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler gri renkli, bileşik 3m ise sarı renkli gösterilmiştir).

Şekil 5.66 ve Şekil 5.67 incelendiğinde bileşik 3n'nin AChE enzim aktif yöresi ile etkileşimi görülmektedir. Tiyosemikarbazid kısmının her iki amini ile Ser293 aminoasidinin hidroksil grubu arasında ikili hidrojen bağı gözlenmektedir. Piperazin halkasının azotu ile Tyr337 aminoasidinin fenil halkası arasında bir tane, Trp86 aminoasidinin indol halkası ile iki tane katyon- π etkileşimi sergilemiştir. Trp86 aminoasidinin indol halkası ile 4-florobenzil halkası arasında da bir tane π - π etkileşimi görülmüştür. 4-Florobenzil halkası aynı zamanda Gly120 ve Glu202 aminoasitlerinin karbonil grupları ile aromatik hidrojen bağı sergilemiştir.

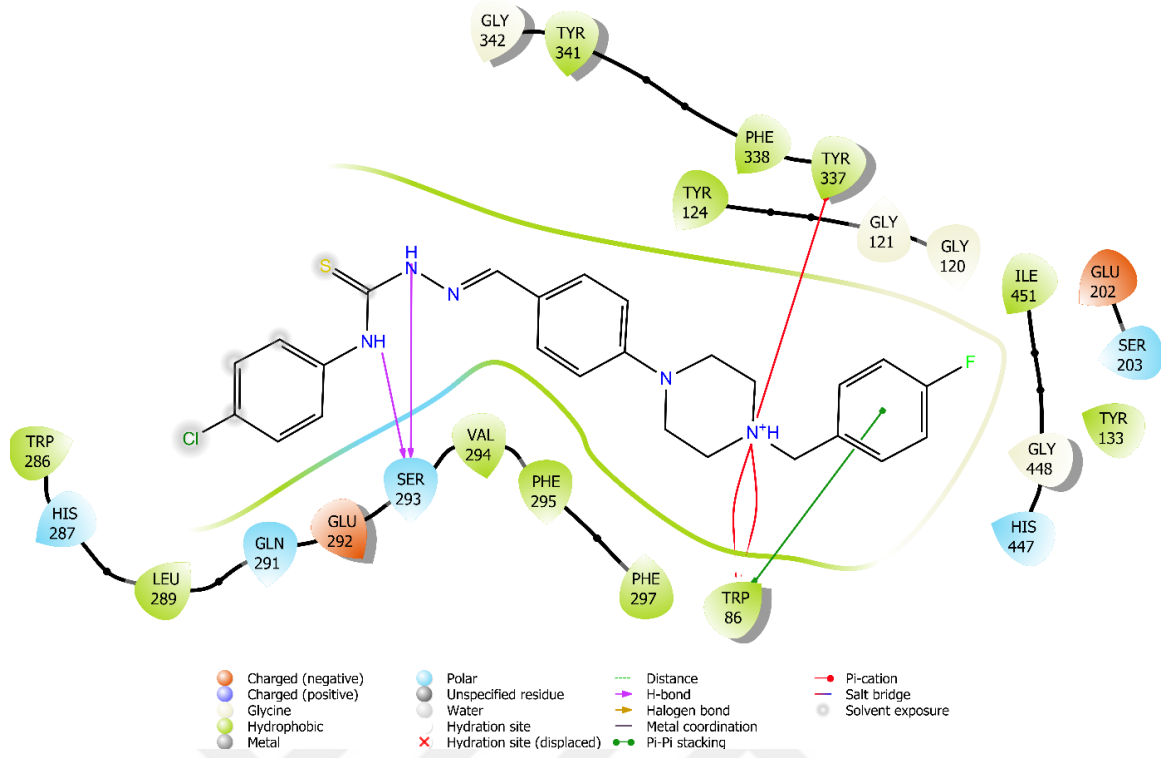


Şekil 5.67. Bileşik 3n'nin iki boyutlu olarak AChE enzim aktif yöresiyle etkileşimi.

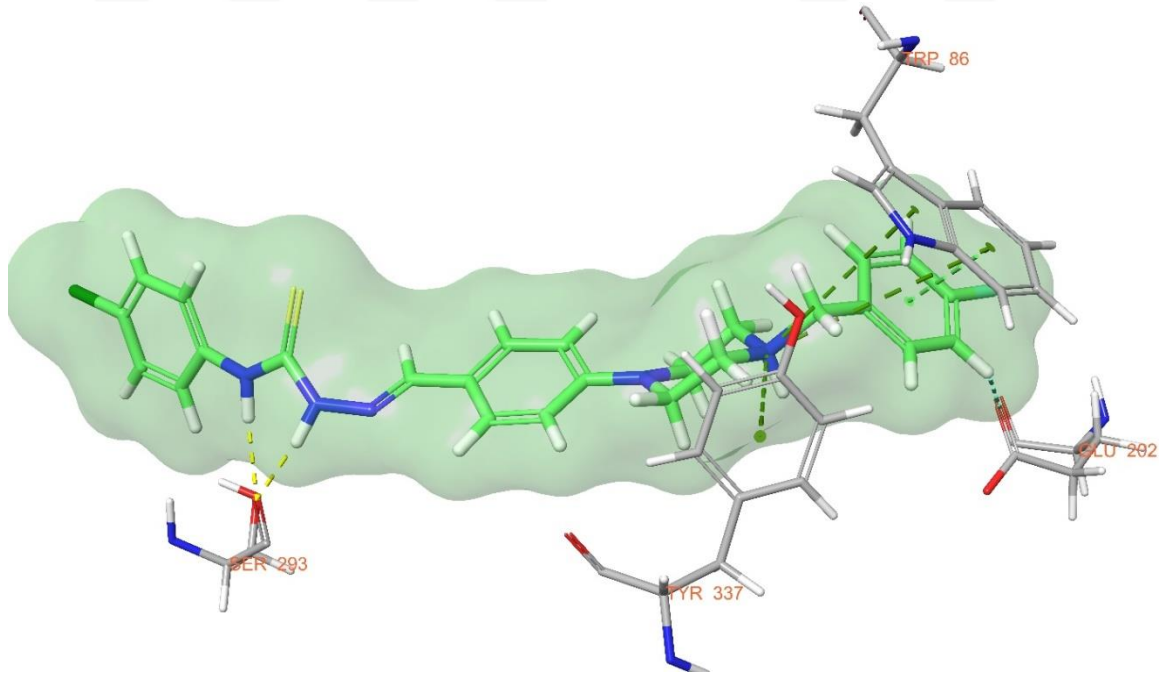


Şekil 5.68. Bileşik 3n'nin üç boyutlu olarak AchE enzim aktif bölgesiyle etkileşimi (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler gri renkli, bileşik 3n ise mor renkli gösterilmiştir).

Şekil 5.68 ve Şekil 5.69 incelendiğinde bileşik 3o'nun AchE enzim aktif yoresi ile etkileşimi görülmektedir. Tiyosemikarbazid kısmının her iki amini ile Ser293 aminoasidinin hidroksil grubu arasında ikili hidrojen bağı gözlenmektedir. Piperazin halkasının azotu ile Tyr337 aminoasidinin fenil halkası arasında bir tane, Trp86 aminoasidinin indol halkası ile iki tane katyon- π etkileşimi sergilemiştir. Trp86 aminoasidinin indol halkası ile 4-florobenzil halkası arasında da bir tane π - π etkileşimi görülmüştür. 4-Florobenzil yapısı aynı zamanda Glu202 aminoasidinin karbonil grubu ile aromatik hidrojen bağı sergilemiştir.

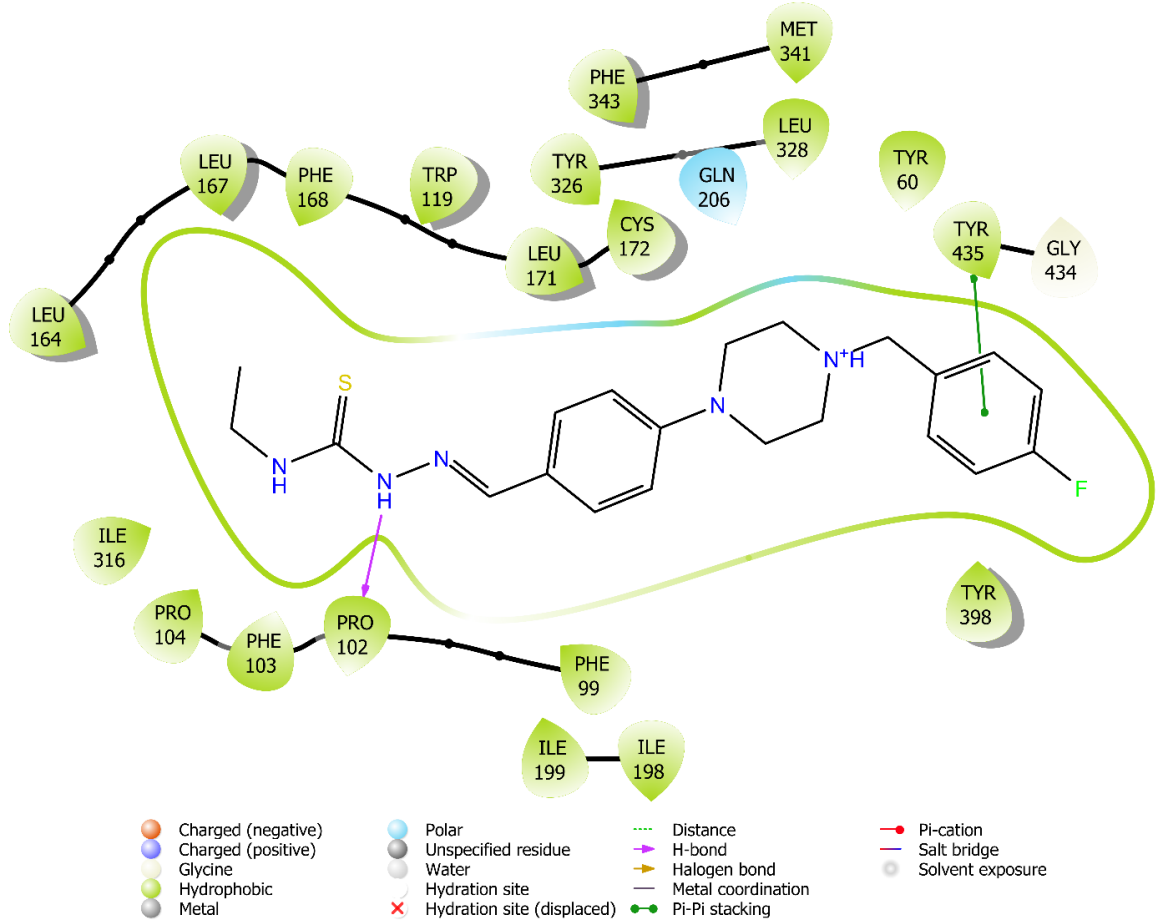


Şekil 5.69. Bileşik 3o'nun iki boyutlu olarak AChE enzim aktif yöresiyle etkileşimi.

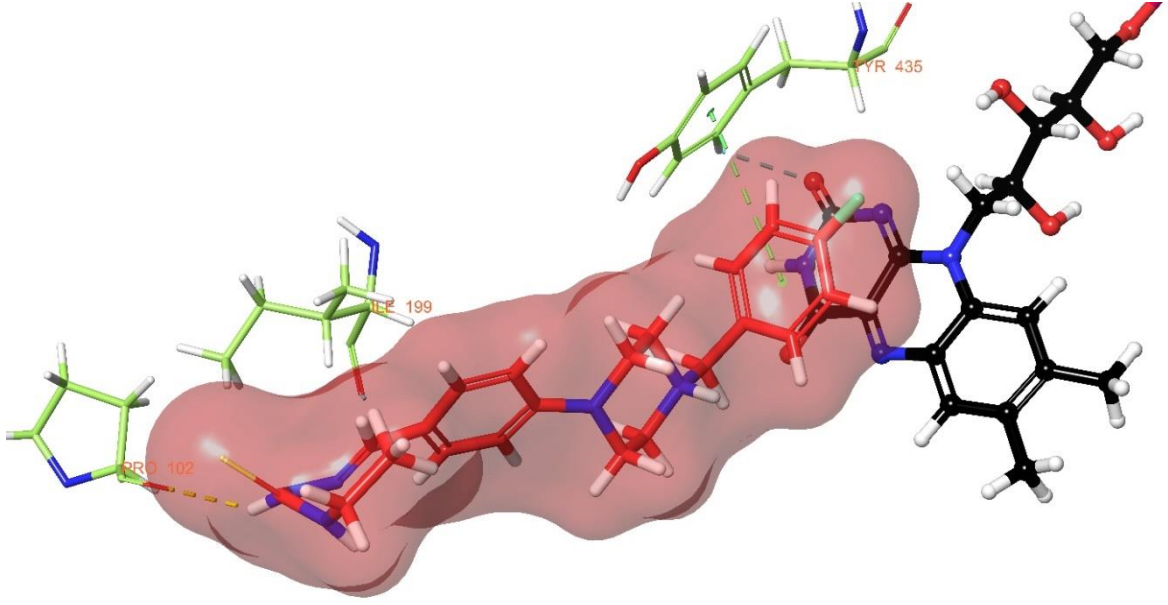


Şekil 5.70. Bileşik 3o'nun üç boyutlu olarak AchE enzim aktif bölgesiyle etkileşimi (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler gri renkli, bileşik 3o ise yeşil renkli gösterilmiştir).

Şekil 5.70 ve 5.71 incelendiğinde bileşik 3k'nın MAO-B enzim aktif yoresi ile etkileşimi görülmektedir. Tiyosemikarbazid kısmının amini ile Pro102 aminoasidinin karbonil grubu arasında bir hidrojen bağı gözlenmektedir. Tiyosemikarbazid kalıntısına bağılı etil grubu ise Ile199 aminoasidinin karbonil grubu ile aromatik hidrojen bağı oluşturmıştır. Son olarak 4-florobenzil yapısındaki fenil halkası ile Tyr435 aminoasidinin fenil halkası arasında π - π etkileşimi görülmüştür.



Şekil 5.71. Bileşik 3k'nın iki boyutlu olarak MAO-B enzim aktif yoresiyle etkileşimi.



Şekil 5.72. Bileşik **3k**'nin üç boyutlu olarak MAO-B enzim aktif bölgesiyle etkileşimi (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler yeşil renkli, bileşik **3k** ise kırmızı renkli gösterilmiştir. FAD ise siyah renk ile belirtilmiştir).

Sonuç olarak tüm veriler incelendiğinde bileşikler **3k-3o** AchE enzimine karşı elde edilen diğer bileşiklerden daha aktif bulunmuştur. Piperazin halkasına bağlı benzil grubunun bu aktivite farkını yarattığı düşünülmektedir. Bu bileşikler kendi arasında kıyaslandığında ise bileşikler **3m**, **3n** ve **3o**'nun bileşikler **3k** ve **3l**'ye göre daha aktif olduğu görülmektedir. Bu durumda tiyosemikarbazid kısmına getirilen aromatik sübstituentlerin aktiviteyi arttırdığı düşünülmektedir. Aromatik yapı içeren bileşiklerin hepsi Glu202 aminoasidi ile aromatik hidrojen bağı oluşturmuştur. Aktivitede gözlenen artış bu bağ ile de açıklanabilir. MAO-B enzimi ile gerçekleştirilen çalışmalarda ise bileşik **3k**'nin potansiyel bir MAO-B inhibitörü olduğu fark edilmiştir. Ve yapılan *in silico* çalışmalar ile de bu kanıtlanmıştır. Bileşik **3k** MAO-B enziminde FAD molekülüne yakın bir şekilde konumlanmaktadır. Ayrıca MAO-B enzim aktif bölgesinde önemli aminoasitler ile etkileşim göstermiştir. Sonuç olarak bileşik **3l-3o** AchE enzimi üzerinden inhibitör etkinlik gösterirken; bileşik **3k** ise AchE-MAO-B enzimleri üzerinden dual etkinlik sergilemiştir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Artan küresel yaşam süresi ve yaşlanan nüfusla birlikte demans insidansı hızla artmaktadır. 2030 yılına kadar demanslı birey sayısının 75,6 milyona yükseleceği ve 2050 yılına kadar 135,5 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Günümüzde AH'nın tedavisinde AChE inhibitörleri olan donepezil, rivastigmin, galantamin ve NMDA reseptör antagonisti olan memantin kullanılmaktadır. Bu ilaçlar hastalığın semptomlarını nispeten önlemekte ve hastanın yaşam kalitesini nispeten yükseltmektedir ancak tedavi etmemektedir. AH'nın radikal tedavisinin olmaması, mevcut tedavilerin yetersizliği ve kullanılan ilaçların potansiyel yan etkileri bu alanda yeni ilaç geliştirme çalışmalarına hız ve önem vermektedir. Diğer yandan AH'da gözlenen MAO-B enzim aktivasyonundaki artış, AH tedavisinde MAO inhibitörlerinin de alternatif bir tedavi yoluyla olabileceği hipotezini doğurmuştur.

AH'nin giderek yayılan insidansı mevcut ve ilaçların sayısının azlığı, bilim insanlarını yeni ve etkili bileşiklerin geliştirilmesine teşvik etmektedir. Yeni ajanlar geliştirirken ise tek hedefe yönelik olmasından ziyade çoklu hedefi olan ajanlar tercih edilmektedir. Böylece hasta birden çok ilaç kullanmak yerine tek ilaç kullanacaktır. Hem hastaya kullanım kolaylığı sunması hem de aynı anda AH'na sebep olduğu düşünülen birden fazla yolağı inhibe etmesi yeni dual etkili bileşikleri ön plana çıkarmaktadır.

Dünya genelinde geriatrik popülasyonun ve yaşlılığa bağlı kronik hastalıkların sayısının her geçen gün arttığı bilinmektedir. Kronik hastalıklar sağlık sisteminde en yüksek maliyet yaratan hastalıklardır. Yıkıcı bir nörolojik hastalık olan AH demans tipi hastalıklar içerisinde en yaygındır, dünya çapında milyonlarca insanı etkilemekte ve toplumlar üzerinde önemli bir sosyoekonomik yüke neden olmaktadır. AH'ın önümüzdeki yıllar için tahmin edilen prevelans rakamları gerçekten endişe vericidir. Şu anda FDA tarafından AH tedavisi için onaylanan ilaçlar, genellikle ciddi yan etkileri göstermelerinin yanında radikal bir tedavi sunmamakta sadece hastalığın semptomlarını iyileştirmek amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu nedenle daha etkili yeni ajanların geliştirilmesine duyulan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Hastalığın patogenezinin tam olarak netleşmemesi ile birlikte hastalık sürecinin beyindeki plaklar ve nörofibriler yumaklar ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bunların esas nedeni azalan asetilkolin (ACh) seviyesi ağırlıklı olarak kolinerjik sistemi etkileyen nörodejeneratif süreçler, öğrenme süreçlerini ve hafıza oluşumunu engelleyen düşük ACh seviyeleri ile sonuçlanır, Aβ agregasyonu ve beyindeki tau proteinlerinin değişikliklerin kombinasyonu olmakla

birlikte artmış MAO-B aktivitesi de sayılabilir. Azalan ACh seviyesine bağlı olarak değişen kolinerjik sistem dengelerindeki değişimin AH ile olan ilişkisine kolinerjik hipotez adı verilmektedir. Kolinerjik hipotez Alzheimer hastalarında gözlenen kognitif düşüşün açıklanmasına önemli katkıda bulunmuş aynı zamanda AH tedavi stratejilerinin ve ilaç geliştirme çalışmalarının birçoğunun temelini oluşturmuştur. Bu sebeple AH'da ACh seviyelerini arttırmak için kullanılmakta olan AChE ilaçlar arasında rivastigmin, donepezil, galantamin sayılabilir. Donepezil AH tedavisinde bu ilaçlar arasında en sık reçete edilen ajandır. Klinikte en sık kullanılan donepezil geri dönüşümlü ve selektif bir AChE inhibitörüdür. Donepezilin yapısı incelendiğinde yapıda bulunan benzilpiperidin grubu dikkat çekicidir ve bu grup enzim inhibisyonunda anahtar rol oynamaktadır.

Bu çalışma kapsamında 15 yeni tiyosemikarbazon türevi bileşik tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bileşiklerin tasarımı sırasında hem AChE hem MAO-B enzim aktif yöreleri ile etkileşebilecek farmakofor ve hacimsel grupların doğru yerleşimlerine dikkat edilmiştir.

AChE enzim yapısı incelendiğinde katyonik anyonik bölge ve periferik anyonik bölge olduğu görülmektedir. Donepezilin yapısında bulunan benzil piperidin grubu enzimin katalitik anyonik bölgesi ile etkileşmektedir. Enzimin bu bölgesi ile etkileşmesi için yapımızda fenilpiperazin, 4-florofenilpiperazin ve 4-florobenzilpiperazin yapıları tercih edilmiştir. Böylelikle fenilamin ve benzilamin arasındaki aktivite farkını kıyaslama imkânı oluşmuştur. Tiyosemikarbazon yapısı hem AChE hem de MAO inhibitörü olarak sıklıkla kullanılan bir farmakofor gruptur. Tiyosemikarbazon grubu bu zengin aktivite profili için seçilmiştir. Tiyosemikarbazon kısmının kalıntısına ise periferik anyonik bölge ile etkileşim kurabilecek aromatik ve alifatik yapılar tercih edilmiştir.

Sentez çalışmaları sonucunda elde edilen bileşiklerin yapı tayinleri HRMS, ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektroskopik yöntemleri ile yapılmıştır. Aktivite çalışmaları modifiye Ellman metodu ile *in vitro* olarak gerçekleştirilmiş ve moleküler modelleme çalışmaları Schrödinger programı kullanılarak *in silico* değerlendirilmiştir.

Aktivite çalışmaları gerçekleştirilirken bileşiklerin dual etki profillerinin incelenmesi amacıyla AChE, BChE, MAO-A ve MAO-B enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda AChE enzimi üzerinde önemli inhibisyon gösteren bileşikler (**3b**, **3c**, **3e**, **3k**, **3l**, **3m**, **3n**, **3o**) ve MAO-B enzimi üzerinde önemli inhibisyon gösteren bileşikler (**3f**, **3i**, **3k**, **3l**, **3m**, **3n**, **3o**) olarak belirlenmiştir. Bu türevler içerisinde AChE enzimine karşı en aktif bileşik olan **3k** IC₅₀=0,033±0.001 µM

değeri ile öne çıkmıştır. MAO-B enzimi üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde ise en aktif bileşiğin $IC_{50}=0.062\pm0.002$ μ M değeri ile **3k** olduğu belirlenmiştir. Bileşiklerin yapıları incelendiğinde benzil piperazin içeren grubun (**3k-3o**) fenil piperazin içeren bileşiklere (**3a-3j**) kıyasla daha aktif oldukları görülmüştür. Bu bilgiden hareketle donepezilin de yapısında bulunan benzil grubunun aktiviteyi pozitif yönde etkilediği düşünülmektedir. Benzil piperazin içeren türevler (**3k-3o**) arasından ise bileşik **3k** hem AChE hem de MAO-B enzimi üzerinde en yüksek aktiviteye sahip olarak dual etkili ilaç tasarımına yönelik önemli bir bileşik olarak ön plana çıkmıştır. Aktif bileşikler üzerinden gerçekleştirilen moleküler doking çalışmaları aktivite çalışmaları ile uyum içerisinde dir.

In silico çalışmalar sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde 4-florobenzilpiperazin kalıntısının AChE enziminin katalitik anyonik bölgesine yerleştiği görülmektedir. Bileşikler arasında sadece bileşik **3k** Trp286 ile etkileşim göstermiştir. Bileşik **3k** MAO-B enzimi üzerinde de FAD ile yakın bir yerleşim göstermiştir. FAD'ın kendisinin de etkileşim yaptığı ve MAO-B enzim aktif bölgesi için oldukça önemli olan Tyr435 aminoasidi ile π - π etkileşimi kurmaktadır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bileşik **3k** baz alınarak daha aktif dual etkili bileşiklere ulaşılması hedeflenmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Masand, N., P Gupta, S., Lal Khosa, R., M Patil, V. (2017). Heterocyclic secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: An Overview. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 17 (1), 3-25.
- [2] Hussein, W., Saglik, B.N., Levent, S., Korkut, B., Ilgin, S., Ozkay, Y., Kaplancikli, Z.A. (2018). Synthesis and Biological Evaluation of New Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Molecules*, 23 (8), 2033.
- [3] Topal, G. R., Mészáros, M., Porkoláb, G., Szecskó, A., Polgár, T. F., Siklós, L., Deli, M.A., Veszélka, S., Bozskir, A. (2020). ApoE-targeting increases the transfer of solid lipid nanoparticles with donepezil cargo across a culture model of the blood–brain barrier. *Pharmaceutics*, 13(1), 38.
- [4] Peron, E.P., Zimmerman, K.M., Crouse, E.L., Slattum, P.W., Hobgood, S.E. (2020). Alzheimer Disease, J. T. Dipiro, G. C. Yee, L. M. Posey, S. T. Haines, T. D. Nolin ve V. Ellingrod (Eds.), *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 11e* içinde (s. New York, NY: McGraw-Hill Education).
- [5] Alzheimer's, A. (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 12 (4), 459-509.
- [6] Heaton, G., M Davis, B., A Turner, L., F Cordeiro, M. (2015). Ocular biomarkers of Alzheimer's disease. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 15 (2), 117-125.
- [7] Özçelik, A.B., Akdağ, M., Ergün, M., Uysal, M. (2019). Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Yeni Yaklaşımlar. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(2), 1149-1159.
- [8] Shinde, P., Vidyasagar, N., Dhulap, S., Dhulap, A., Hirwani, R. (2016). Natural Products based P-glycoprotein Activators for Improved β -amyloid Clearance in Alzheimer's Disease: An in silico Approach. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 16 (1), 50-59.
- [9] Işık, M. (2015). Alzheimer tipi demans ve koroner arter hastalarında asetilkolinesteraz gen ekspresyonu ve bazı biyomarkır düzeylerinin belirlenmesi

ve asetilkolinesteraz aktivitesinin belirlenerek bazı fenolik bileşiklerin bu enzim aktivitesi üzerine in vitro etkilerinin incelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.*

- [10] Lyketsos, C.G., Carrillo, M.C., Ryan, J.M., Khachaturian, A.S., Trzepacz, P., Amatniek, J., Cedarbaum, J., Brashear, R., Miller, D.S. (2011). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7 (5), 532-539.
- [11] Selekler, K. (2010). Alois Alzheimer and Alzheimer's Disease. *Turkish Journal Of Geriatrics*, 13, 9-14.
- [12] Keleş, E., Özalevli, S. (2018). Alzheimer hastalığı ve tedavi yaklaşımları. *İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 3 (2), 39-42.
- [13] Sağlık, B.N., Osmaniye, D., Acar Cevik, U., Levent, S., Kaya Cavusoglu, B., Ozkay, Y., Kaplancikli, Z.A. (2020). Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Thiazole Analogs as Anticholinesterase Agents for Alzheimer's Disease. *Molecules*, 25 (18), 4312.
- [14] Belkacemi, A., Ramassamy, C. (2016). Innovative anthocyanin/anthocyanidin formulation protects SK-N-SH cells against the amyloid- β peptide-induced toxicity: relevance to Alzheimer's disease. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 16 (1), 37-49.
- [15] Armstrong, R.A. (2013). What causes alzheimer's disease? *Folia Neuropathologica*, 51 (3), 169-188.
- [16] Aydın, A., Elçioğlu, H., Yavuz, A. İntraserebroventriküler A β 42 Peptidi Uygulamasıyla Siçanlarda Oluşturulan Deneysel Alzheimer Hastalığı Modelinde Kannabidiol'ün Etkilerinin İncelenmesi. *International Congress on Medical Sciences and Multidisciplinary Approaches*'da sunulan bildiri, İstanbul:Marmara Üniversitesi
- [17] Demir Ozkay, U., Can, O.D., Sağlık, B.N., Acar Cevik, U., Levent, S., Ozkay, Y., Ilgin, S., Atli, O. (2016). Design, synthesis, and AChE inhibitory activity of new benzothiazole-piperazines. *Bioorg Med Chem Lett*, 26 (22), 5387-5394.
- [18] Çeçen, M. (2021). Bazı yeni hidrazon türevlerinin sentezi, anti-alzheimer aktivitelerinin araştırılması ve moleküler modelleme çalışmaları. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Malatya.*

- [19] Sağlık, B.N. (2019). Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılacak yeni bileşiklerin tasarımı, sentezi ve biyolojik aktivite çalışmaları. *Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Eskişehir.*
- [20] Özkurt, H. (2015). Galantamin'in ilaç preparatlarından kapiler elektroforez yöntemiyle tayini. *Uşak Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Uşak,*
- [21] Mutlu, N.B., Değim, Z., Yılmaz, Ş., Eşsiz, D., Nacar, A. (2011). New perspective for the treatment of Alzheimer diseases: liposomal rivastigmine formulations. *Drug development and industrial pharmacy*, 37 (7), 775-789.
- [22] Temel, H. (2008). Demanslı hastalarda asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile değişimi. *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Doktora Tezi, Eskişehir.*
- [23] Peron, E.P., Slattum, P.W., Powers, K.E., Hobgood, S.E. (2017). Alzheimer Disease, J. T. Dipiro, R. L. Talbert, G. C. Yee, G. R. Matzke, B. G. Wells ve L. M. Posey (Eds.), *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 10e içinde (s. New York, NY: McGraw-Hill Education).
- [24] Crouse, E.L., Zimmerman, K.M., Peron, E.P., Sargent, L.J., Hobgood, S.E. (2021). Alzheimer Disease, J. T. Dipiro, G. C. Yee, L. Michael Posey, S. T. Haines, T. D. Nolin ve V. L. Ellingrod (Eds.), *DiPiro: Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*, 12e içinde (s. New York, NY: McGraw Hill).
- [25] Bourne, Y., Radic, Z., Kolb, H.C., Sharpless, K.B., Taylor, P., Marchot, P. (2005). Structural insights into conformational flexibility at the peripheral site and within the active center gorge of AChE. *Chem Biol Interact*, 157-158, 159-165.
- [26] Toptaş, B. (2020). Asetilkolinesteraz İnhibitörü Donepezil'in Dana Kardiyak Ven Düz Kasına Etkileri-Temperatürün Rolü. *Necmettin Erbakan University Doktora Tezi, Konya.*
- [27] Sanli, N., Bulduk, I., Ozkurt, H., Şanlı, S., Ozkan, S.A. (2016). Development and validation of a capillary zone electrophoretic method for rapid and sensitive determination of galanthamine: Application in plant and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 131, 188-194.
- [28] Bayraktar, G. Yeni bir grup potansiyel anti-alzheimer etkili takrin-donepezil hibritleri üzerinde çalışmalar. *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.*

- [29] Baysal, İ. (2012). Selektif MAO-B İnhibitörü Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Beta Amiloid Fibrillerle Etkileşiminin İncelenmesi. *Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.*
- [30] Mathew, B., Suresh, J., E Mathew, G., Parasuraman, R., Abdulla, N. (2014). Plant secondary metabolites-potent inhibitors of monoamine oxidase isoforms. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 14 (1), 28-33.
- [31] Mathew, B., Dev, S., Suresh, J., E Mathew, G., Lakshmanan, B., Haridas, A., Fathima, F., K Krishnan, G. (2016). Pharmacophore modeling, 3D-QSAR and molecular docking of furanochalcones as inhibitors of monoamine oxidase-B. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 16 (2), 105-111.
- [32] Mathew, B., Suresh, J., Anbazhagan, S., Elizabeth Mathew, G. (2013). Pyrazoline: A promising scaffold for the inhibition of monoamine oxidase. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 13 (3), 195-206.
- [33] Ilgin, S., Osmaniye, D., Levent, S., Saglik, B.N., Acar Cevik, U., Cavusoglu, B.K., Ozkay, Y., Kaplancikli, Z.A. (2017). Design and Synthesis of New Benzothiazole Compounds as Selective hMAO-B Inhibitors. *Molecules*, 22 (12), 2187.
- [34] ASLAN, A. (2017). Zenginleştirilmiş Çevre, Memantin Ve Skf82958'in Siçanlarda Nalokson İle Başlatılan Morfin Yoksunluk Sendromuna Etkileri: Hipokampal Doku Plazminojen Aktivatörü Mrna Düzeyleri. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.*
- [35] Yildiz, M., Bingul, M., Zorlu, Y., Saglam, M.F., Boga, M., Temel, M., Koca, M.S., Kandemir, H., Sengul, I.F. (2022). Dimethoxyindoles based thiosemicarbazones as multi-target agents; synthesis, crystal interactions, biological activity and molecular modeling. *Bioorg Chem*, 120, 105647.
- [36] Osmaniye, D., Kurban, B., Saglik, B.N., Levent, S., Ozkay, Y., Kaplancikli, Z.A. (2021). Novel Thiosemicarbazone Derivatives: *In Vitro* and *In Silico* Evaluation as Potential MAO-B Inhibitors. *Molecules*, 26 (21)

- [37] Zaib, S., Munir, R., Younas, M.T., Kausar, N., Ibrar, A., Aqsa, S., Shahid, N., Asif, T.T., Alsaab, H.O., Khan, I. (2021). Hybrid Quinoline-Thiosemicarbazone Therapeutics as a New Treatment Opportunity for Alzheimer's Disease Synthesis, In Vitro Cholinesterase Inhibitory Potential and Computational Modeling Analysis. *Molecules*, 26 (21), 6640.
- [38] Varma, M., Shravage, B., Tayade, S., Kumbhar, A., Butcher, R., Jani, V., Sonavane, U., Joshi, R., Kulkarni, P.P. (2021). A simple methyl substitution of 3-acetylcoumarin thiosemicarbazone enhances cellular autophagy flux, reduces inflammation and ameliorates rough eye phenotype in the Drosophila model of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Structure*, 1235, 130265.
- [39] Bulut, N., Kocyigit, U.M., Gecibesler, I.H., Dastan, T., Karci, H., Taslimi, P., Durna Dastan, S., Gulcin, I., Cetin, A. (2018). Synthesis of some novel pyridine compounds containing bis-1,2,4-triazole/thiosemicarbazide moiety and investigation of their antioxidant properties, carbonic anhydrase, and acetylcholinesterase enzymes inhibition profiles. *J Biochem Mol Toxicol*, 32 (1).
- [40] Brunetti, L., Leuci, R., Carrieri, A., Catto, M., Occhineri, S., Vinci, G., Gambacorta, L., Baltrukevich, H., Chaves, S., Laghezza, A., Altomare, C.D., Tortorella, P., Santos, M.A., Loiodice, F., Piemontese, L. (2022). Structure-based design of novel donepezil-like hybrids for a multi-target approach to the therapy of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 237, 114358.
- [41] Mohammadi-Khanaposhtani, M., Nori, M., Valizadeh, Y., Javanshir, S., Dastyafteh, N., Moaazam, A., Hosseini, S., Larijani, B., Adibi, H., Biglar, M., Hamedifar, H., Mahdavi, M., Kamci, H., Karakus, A., Taslimi, P. (2022). New 4-phenylpiperazine-carbodithioate-*N*-phenylacetamide hybrids: Synthesis, *in vitro* and *in silico* evaluations against cholinesterase and alpha-glucosidase enzymes. *Archiv Der Pharmazie*, 355 (5), e2100313.
- [42] Kaur, S., Bansal, Y. (2022). Design, molecular Docking, synthesis and evaluation of xanthoxylin hybrids as dual inhibitors of IL-6 and acetylcholinesterase for Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry*, 121, 105670.
- [43] Osmaniye, D., Evren, A.E., Saglik, B.N., Levent, S., Ozkay, Y., Kaplancikli, Z.A. (2022). Design, synthesis, biological activity, molecular docking, and molecular dynamics of novel benzimidazole derivatives as potential AChE/MAO-B dual inhibitors. *Archive Der Pharmazie*, 355 (3), e2100450.

- [44] Ramrao, S.P., Verma, A., Waiker, D.K., Tripathi, P.N., Shrivastava, S.K. (2021). Design, synthesis, and evaluation of some novel biphenyl imidazole derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Structure*, 1246, 131152.
- [45] Sağlık, B.N., Ilgın, S., Özkay, Y. (2016). Synthesis of new donepezil analogues and investigation of their effects on cholinesterase enzymes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 124, 1026-1040.
- [46] Acar Cevik, U., Levent, S., Nurpelin Sağlık, B., Ozkay, Y., Asım Kaplancıklı, Z. (2017). Synthesis of Novel 4-(Dimethylaminoalkyl) piperazine-1-carbodithioa te Derivatives as Cholinesterase Inhibitors. *Letters in Drug Design & Discovery*, 14 (5), 528-539.
- [47] Acar Cevik, U., Sağlık, B.N., Levent, S., Osmaniye, D., Kaya Cavusoglu, B., Ozkay, Y., Kaplancikli, Z.A. (2019). Synthesis and AChE-Inhibitory Activity of New Benzimidazole Derivatives. *Molecules*, 24 (5), 861.
- [48] Demir Ozkay, U., Can, O.D., Sağlık, B.N., Turan, N. (2017). A benzothiazole/piperazine derivative with acetylcholinesterase inhibitory activity: Improvement in streptozotocin-induced cognitive deficits in rats. *Pharmacological Reports*, 69 (6), 1349-1356.
- [49] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Feather-Stone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7 (2), 88-95.
- [50] Levent, S., Acar Çevik, U., Sağlık, B.N., Özkay, Y., Can, Ö.D., Özkay, Ü.D., Uçucu, Ü. (2017). Anticholinesterase activity screening of some novel dithiocarbamate derivatives including piperidine and piperazine moieties. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 192 (4), 469-474.
- [51] Osmaniye, D., Sağlık, B.N., Acar Cevik, U., Levent, S., Kaya Cavusoglu, B., Ozkay, Y., Kaplancikli, Z.A., Turan, G. (2019). Synthesis and AChE Inhibitory Activity of Novel Thiazolylhydrazone Derivatives. *Molecules*, 24 (13), 2392.
- [52] Sağlık, B.N., Özkay, Y., Demir Özkay, Ü., Karaca Gençer, H. (2014). Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Dithiocarbamate Derivatives. *Journal of Chemistry*, 2014, 1-9.
- [53] Tok, F., Kocyigit-Kaymakcioglu, B., Sağlık, B.N., Levent, S., Ozkay, Y., Kaplancikli, Z.A. (2019). Synthesis and biological evaluation of new pyrazolone

- Schiff bases as monoamine oxidase and cholinesterase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 84, 41-50.
- [54] Turan-Zitouni, G., Hussein, W., Saglik, B.N., Baysal, M., Kaplancikli, Z.A. (2018). Fighting Against Alzheimer's Disease: Synthesis of New Pyrazoline and Benzothiazole Derivatives as New Acetylcholinesterase and MAO Inhibitors. *Letters in Drug Design & Discovery*, 15 (4), 414-427.
- [55] Altintop, M.D., Sever, B., Osmaniye, D., Sağlık, B.N., Özdemir, A. (2018). Design, synthesis, *in vitro* and *in silico* evaluation of new pyrrole derivatives as monoamine oxidase inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, 351 (7), 1800082.
- [56] Can, N.Ö., Osmaniye, D., Levent, S., Sağlık, B.N., Inci, B., Ilgın, S., Özkay, Y., Kaplancıklı, Z.A. (2017). Synthesis of new hydrazone derivatives for MAO enzymes inhibitory activity. *Molecules*, 22 (8), 1381.
- [57] Can, N.Ö., Osmaniye, D., Levent, S., Sağlık, B.N., Korkut, B., Atlı, Ö., Özkay, Y., Kaplancıklı, Z.A. (2018). Design, synthesis and biological assessment of new thiazolyldiazine derivatives as selective and reversible hMAO-A inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144, 68-81.
- [58] Can, Ö.D., Osmaniye, D., Özkay, Ü.D., Sağlık, B.N., Levent, S., Ilgın, S., Baysal, M., Özkay, Y., Kaplancıklı, Z.A. (2017). MAO enzymes inhibitory activity of new benzimidazole derivatives including hydrazone and propargyl side chains. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 131, 92-106.
- [59] Çavuşoğlu, B.K., Sağlık, B.N., Osmaniye, D., Levent, S., Acar Çevik, U., Karaduman, A.B., Özkay, Y., Kaplancıklı, Z.A. (2017). Synthesis and biological evaluation of new thiosemicarbazone derivative schiff bases as monoamine oxidase inhibitory agents. *Molecules*, 23 (1), 60.
- [60] Kaya, B., Sağlık, B.N., Levent, S., Özkay, Y., Kaplancıklı, Z.A. (2016). Synthesis of some novel 2-substituted benzothiazole derivatives containing benzylamine moiety as monoamine oxidase inhibitory agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31 (6), 1654-1661.
- [61] Kaya, B., Yurttas, L., Sağlık, B.N., Levent, S., Özkay, Y., Kaplancikli, Z.A. (2017). Novel 1-(2-pyrimidin-2-yl) piperazine derivatives as selective monoamine oxidase (MAO)-A inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32 (1), 193-202.

- [62] Çavuşoğlu, B.K., Sağlık, B.N., Özkay, Y., Inci, B., Kaplancıklı, Z.A. (2018). Design, synthesis, monoamine oxidase inhibition and docking studies of new dithiocarbamate derivatives bearing benzylamine moiety. *Bioorganic Chemistry*, 76, 177-187.
- [63] Sağlık, B.N., Çavuşoğlu, B.K., Osmaniye, D., Levent, S., Çevik, U.A., İlgin, S., Özkay, Y., Kaplancıklı, Z.A., Öztürk, Y. (2019). In vitro and in silico evaluation of new thiazole compounds as monoamine oxidase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 85, 97-108.
- [64] Turan-Zitouni, G., Hussein, W., Sağlık, B.N., Tabbi, A., Korkut, B. (2018). Design, synthesis and biological evaluation of novel N-pyridyl-hydrazone derivatives as potential monoamine oxidase (MAO) inhibitors. *Molecules*, 23 (1), 113.
- [65] Cheung, J., Rudolph, M.J., Burshteyn, F., Cassidy, M.S., Gary, E.N., Love, J., Franklin, M.C., Height, J.J. (2012). Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55 (22), 10282-10286.
- [66] Binda, C., Wang, J., Pisani, L., Caccia, C., Carotti, A., Salvati, P., Edmondson, D.E., Mattevi, A. (2007). Structures of human monoamine oxidase B complexes with selective noncovalent inhibitors: safinamide and coumarin analogs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50 (23), 5848-5852.
- [67] Schrödinger, L. (2020). New York, NY, USA, 2012. LigPrep. version, 3
- [68] Release, S. (2020). 2: LigPrep, version 3.8 (2020) Schrödinger. LLC, New York, NY.
- [69] Schrödinger, L. (2020). Glide, version 7.1. Schrödinger, LLC: New York, NY, USA.

