

**BAZI YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ANTI-
ALZHEİMER AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
MODELLEME ÇALIŞMALARI**

Muhammed ÇEÇEN
İnönü Üniversitesi ve Gazi Üniversitesi
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Ortak Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehtap UYSAL
Ortak Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep ÖZDEMİR

Doktora Tezi - 2021

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ANTI-
ALZHEİMER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI VE
MOLEKÜLER MODELLEME ÇALIŞMALARI**

Muhammed ÇEÇEN

**İnönü Üniversitesi ve Gazi Üniversitesi
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Ortak Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehtap UYSAL**

**Ortak Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep ÖZDEMİR**

**MALATYA
2021**

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH).....	4
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Tedavisi.....	8
2.1.2. Asetilkolin ve Kolinerjik Reseptörler.....	9
2.1.3. Kolinesteraz Enzimleri ve Kolinesteraz Enzim İnhibitörleri.....	11
2.1.4. Monoaminoksidaz Enzimleri ve Enzim İnhibitörleri.....	20
2.1.5. Piridazinon Halkası.....	25
2.1.6. Hidrazon Yapısı.....	29
2.1.7. Hidrazon ve Piridazinon Yapısı Taşıyan Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri.....	30
3. MATERYAL VE METOT.....	46
3.1. Kimyasal Çalışmalar.....	46
3.1.1. Materyal.....	46
3.1.2. Sentez Yöntemleri.....	46
3.1.3. Analitik Yöntemler.....	47
3.2. Biyolojik Çalışmalar.....	49
3.2.1. AChE İnhibitörü Aktivite Tayini.....	49
3.2.2. MAO-A ve MAO-B İnhibitörü Aktivite Tayini.....	50
3.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları.....	51
4. BULGULAR.....	53
4.1. Kimyasal Çalışmalar.....	53
4.2. Antikolinesteraz Aktivite.....	57
4.3. Antimonoaminoksidaz Aktivite.....	57
4.4. Moleküler Modelleme.....	58

5. TARTIŞMA.....	59
5.1. Sentez ve Yapı Aydınlatma Çalışmaları.....	60
5.2. AChE ve MAO İnhibitör Aktivite Çalışmaları.....	66
5.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları.....	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR.....	71
EKLER.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	84
ETİK KURUL KARARINA GEREK OLMADIĞINA DAİR BELGE.....	85

TEŐEKKÜR

Doktora çalıőmalarım boyunca bana inanan ve desteğini esirgemeyen, tez danıőmanım Prof. Dr. Mehtap UYSAL'a

Kahrımı çeken, yol gösteren, hastalık dönemimde bile beni motive eden, ortak tez danıőmanım Dr. Öğr. Üyesi Zeynep ÖZDEMİR'e

Hem tez çalıőmalarım, hem de hayatım boyunca benim için hem madden hem manen her türlü fedakarlığı yapan annem, babam ve kardeőlerime,

Tez çalıőmalarım sebebiyle; kendileriyle geçireceğim zamandan feragat etmeme anlayıő gösteren ve bana yardımcı olan eőim ve oğluma

Tüm destek ve özverileri için çok teőekkür ederim, minnettarım.

ÖZET

Bazi Yeni Hidrazon Türevlerinin Sentezi, Anti-Alzheimer Aktivitelerinin Araştırılması Ve Moleküler Modelleme Çalışmaları

Amaç: Alzheimer hastalığı (AH) tedavisi için çoklu enzim hedeflerine yönelik olarak tasarlanan, AChE, MAO-A ve MAO-B inhibitörü etki göstermesi beklenen, (2-florofenil)piperazin yapısı içeren piridazinonların sentezi ve biyolojik değerlendirmesinin yapıldığı bu tez kapsamında 12 bileşiğin sentezinin yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve metot: Sentezlere hazır alınan 3,6-dikloropiridazin ile 2-florofenilpiperazinin reaksiyonuyla başlanmıştır. Elde edilen 3-kloro-6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]piridazin molekülü glasiyel asetik asit içerisinde hidroliz edilerek 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2*H*)-piridazinon bileşiğine ulaşılmıştır. Sonrasında etil bromoasetatla muamelesinden ester türevine, bir sonraki basamakta da hidrazinhidratla reaksiyonundan son basamakta olan 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2*H*)-piridazinon-2-ilasetohidrazit bileşiğine ulaşılmıştır. Sonuç bileşikleri ise süstitüe veya nonsüstitüe benzaldehyitler ile asetohidrazit molekülünün reaksiyonuyla elde edilmiştir. Elde edilen bileşiklerin erime noktası tayinleri yapılmış, verimleri belirlenmiş, bileşiklerin yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS gibi çeşitli spektroskopik yöntemleriyle kanıtlanmıştır.

Bulgular: AChE enzim inhibisyonu Ellman metodu ile tayin edilmiş, fakat bileşiklerin hiçbirisi belirgin enzim inhibitörü aktivite göstermemiştir. Bileşiklerin rekombinant insan MAO-A ve MAO-B inhibitör aktiviteleri, sırasıyla kinuramin (0.06 mM) ve benzilamin (0.3 mM) kullanılarak test edilmiştir. **T₆**'nın 0.013 µM IC₅₀ değeri ile en güçlü MAO-B inhibitörü olduğu ve bunu 0.039 µM IC₅₀ değeri ile **T₃** bileşiğinin takip ettiği bulunmuştur. MAO-B için inhibe edici güç, meta bromo süstitüsyonu (**T₆**) ile para bromo süstitüsyonundan (**T₇**) daha fazla artmıştır. **T₆** ve **T₃**, 1.57 ve 4.19 µM'lık IC₅₀ değerleri ile MAO-A'yı etkili bir şekilde inhibe etmiştir. MAO bağlama bölgeleri ile moleküler yerleştirme simülasyonları, MAO-B ile **T₆** ve **T₃** için MAO-A'ya göre daha yüksek yerleştirme skorları vermiştir.

Sonuç: Bu sonuçlar, **T₃** ve **T₆**'nın MAO-B'nin seçici, geri dönüşümlü ve yarışmalı inhibitörleri olduğunu ve AH gibi nörodejeneratif bozuklukların tedavisi için öncü adaylar olarak düşünülebileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer, AChE inhibitörü, MAO-A inhibitörü, MAO-B inhibitörü, 3(2*H*)-piridazinon, hidrazon.

ABSTRACT

Synthesis Of Some New Hydrazone Derivatives, Anti-Alzheimer Activities And Molecular Modeling Studies

Aim: Within the scope of this thesis, the synthesis of 12 compounds is aimed, in which the synthesis and biological evaluation of pyridazinones containing (2-fluorophenyl) piperazine structure, designed for multiple enzyme targets and expected to act as an AChE, MAO-A and MAO-B inhibitor.

Material and method: Synthesis started with the reaction of commercially available 3,6-dichloropyridazine with 2-fluorophenylpiperazine. The obtained 3-chloro-6-[4-(2-fluorophenyl) piperazin-1-yl]pyridazine molecule is hydrolyzed in glacial acetic acid and 6-[4-(2-fluorophenyl) piperazin-1-yl]-3(2*H*)pyridazinone compound was reached. Then, from the treatment with ethyl bromoacetate, the ester derivative was obtained, and in the next step, the last step of the starting materials, 6-[4-(2-fluorophenyl) piperazin-1-yl]-3(2*H*)-pyridazinone-2-ylacetohydrazide, was obtained from the reaction with hydrazine hydrate. Result compounds were obtained by the reaction of substituted or nonsubstituted benzaldehydes and acetohydrazide molecule. The melting point of the obtained compounds were determined, their percentage yields were determined, the structures of the compounds were proved by various spectroscopic methods such as ¹H-NMR, ¹³C-NMR and HRMS.

Results: AChE enzyme inhibition was determined by the Ellman method, but none of the compounds showed significant enzyme inhibitory activity. The recombinant human MAO-A and MAO-B inhibitory activities of the compounds were tested using kinuramine (0.06 mM) and benzylamine (0.3 mM), respectively. T6 was found to be the strongest MAO-B inhibitor with an IC₅₀ value of 0.013 μM, followed by T3 compound with an IC₅₀ value of 0.039 μM. The inhibitory power for MAO-B increased more than para bromo substitution (T7) with meta bromo substitution (T6). T6 and T3 effectively inhibited MAO-A with IC₅₀ values of 1.57 and 4.19 μM. Molecular insertion simulations with MAO binding sites gave higher insertion scores for T6 and T3 with MAO-B than for MAO-A.

Conclusion: These results show that T3 and T6 are selective, reversible and competitive inhibitors of MAO-B and can be considered as leading candidates for the treatment of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer, AChE inhibitor, MAO-A inhibitor, MAO-B inhibitor, 3(2*H*)-pyridazinone, hydrazone.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH	:Alzheimer hastalığı
ACh	:Asetilkolin
AChE	:Asetilkolin esteraz
AChEI	:Asetilkolin esteraz enzim inhibitörleri
ADME	:Absorbsiyon Dağılım Metabolizma Eliminasyon
AMP	:Adenin mono fosfat
AGS	:Adenokarsinom hücreleri
ATR	:Average True Range
BACE1	: β -sekretaz
BBB	:Kan-beyin bariyeri
BChE	:Bütirilkolin esteraz
BT-549	:Meme kanseri
CAS	:Kationik aktif bölge
ChAT	:Kolin asetiltransferaz
ChEI	:Kolinesteraz enzim inhibitörü
COX	:Siklooksijenaz
DMSO	:Dimetilsülfoksit
DTNB	:5,5'-Ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
FDA	:Food and Drug Administration
HBB	:Hafif bilişsel bozukluk
HGF	:İnsan dişeti fibroblastları
HRMS	:High Resolution Mass Spektroskopy
IC50	:İnhibitör konsantrasyon
IR	:Infrared
MAO	:Monoaminoksidaz
NCI-H522	:Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
NMDA	:N-metil-D-aspartat
NMR	:Nükleer Manyetik Rezonans
PAS	:Periferik anyonik bölge
PDE4	:Fosfodiesteraz Enzimi

PH	:Parkinson hastalığı
SI	:Selektif indeks
TOF-MS	:Time of Flight Mass Spectroscopy
UV	:Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. ACh biyosentezi, iletimi ve inaktivasyonu.....	10
Şekil 2.2. AChE enziminin yapısı.....	12
Şekil 2.3. BChE enziminin yapısı.....	13
Şekil 2.4. AChEI'lerin yapısal hipotezi (donepezil).....	14
Şekil 2.5. AChE aktif bölge geçidinde geri kalanıyla üst üste çakıştırılmış donepezil bağlama profilleri.....	14
Şekil 2.6. Takrinin yapısı.....	17
Şekil 2.7. Fizostigminin yapısı.....	17
Şekil 2.8. Rivastigminin yapısı.....	18
Şekil 2.9. Donepezilin yapısı.....	18
Şekil 2.10. Galantaminin yapısı.....	19
Şekil 2.11. Huperzin A'nın yapısı.....	19
Şekil 2.12. Meftrionatın yapısı.....	20
Şekil 2.13. MAO-A ve MAO-B'nin üç boyutlu yapıları.....	21
Şekil 2.14. Dopamin, serotonin, noradrenalin, adrenalin, triptamin ve tiramin moleküllerinin yapısı.....	22
Şekil 2.15. Selejlin, rasaljin, safinamit'in kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.16. Moklobemidin bağlanma özellikleri ve MAO-A'daki boşluklar içerisindeki konumlanması (87).....	24
Şekil 2.17. Selejlinin bağlanma özellikleri ve MAO-B'deki boşluklar içerisindeki konumlanması(87).....	24
Şekil 2.18. Bileşik 1 ve 2'nin yapısı.....	32
Şekil 2.19. Piridazinon timol komplekslerinin yapısı.....	33
Şekil 2.20. Piridazinon metal komplekslerinin yapısı.....	34
Şekil 2.21. Molekül 17'nin yapısı.....	35
Şekil 2.22. Emorfazonun yapısı.....	35

Şekil 2.23. Bileşik 18'in yapısı.....	36
Şekil 2.24. Bileşik 19 ve 20'nin yapısı.....	36
Şekil 2.25. A ve B türevlerinin yapısı.....	36
Şekil 2.26. Tiyofen halkası taşıyan piridazinonların yapısı.....	37
Şekil 2.27. Bileşik 27, 28, 29 ve 30'nin yapısı.....	38
Şekil 2.28. Bileşik 31'in yapısı.....	38
Şekil 2.29. Bileşik 32'nin yapısı.....	39
Şekil 2.30. Laktam azotu içeren 4-sübstüfenilhidrazin türevi sübtitüe bileşiklerin yapısı.....	39
Şekil 2.31. Bileşik 33'ün yapısı.....	40
Şekil 2.32. Bileşik 34'ün yapısı.....	40
Şekil 2.33. Bileşik 35 ve 36'nın yapısı.....	41
Şekil 2.34. Antiproliferatif piridazinon halkası ve hidrazon yapısı taşıyan bileşiklerin yapısı.....	42
Şekil 2.35. Bileşik 37'nin yapısı.....	42
Şekil 2.36. Bileşik 38'in kimyasal yapısı.....	43
Şekil 2.37. 6-sübstüe-3(2H)-piridazinon-2-asetil-2-(non-sübstüe/4- sübstüebenzensülfonohidrazid) türevi AChE ve BChE inhibitörleri....	44
Şekil 2.38. Hidrazid parçası taşıyan piridazinon türevinin hMAO-B ile etkileşmesi.....	45
Şekil 5.1. Bileşik T10'un konformasyonel izomerlerinin yapısı (A) ve 1H-NMR (B) ve 13C-NMR (C) spektrumu.....	66
Şekil 5.2. Bileşik T8'in TOF MS ES+'da alınan kütle spektrumu.....	66
Şekil 5.3. MAO-A'ya doğru T3 (A, yeşil çubuklar) ve T6'nın (B, macenta çubuklar) en iyi pozları. Yeşil çizgiler π - π etkileşimlerini gösterir. Su molekülleri cam göbeği küreler olarak gösterilmiştir.....	68
Şekil 5.4. MAO-B'ye doğru T3 (A, yeşil çubuklar) ve T6'nın (B, macenta çubuklar) en yüksek puanlı pozları. Kırmızı oklar, hidrojen bağlarını gösterir. Su molekülleri camgöbeği küreler olarak gösterilmiştir.....	69

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1.1. Sentezi yapılan bileşiklerin yapıları.....	3
Tablo 2.1. Tedavide kullanılan piridazinon halkalı bazı ilaçlar..	31
Tablo 4.1. Tez bileşiklerinin (T1-T12) rekombinant insan MAO-A ve MAO-B inhibisyonları.....	57
Tablo 4.2. MAO-A veya MAO-B ile T3 ve T6 etkileşimleri için yerleştirme puanı değerleri.....	58
Tablo 5.1. Sentezi yapılan bileşiklerin yapıları, reaksiyon verimleri, erime dereceleri, molekül ağırlıkları ve moleküler formülleri.....	60

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı (AH), başlangıçta hastanın günlük faaliyetlerini gerçekleştirme yeteneğinde bozulma ile başlayıp, sonraki aşamalarda bilişsel fonksiyon bozuklukları ve farklı nöropsikiyatrik semptomlarla karakterize olan, geri dönüşsüz ölümcül bir hastalıktır (1-3). Hastalığın ilk belirtisi yakın hafızada bozukluk, unutkanlık iken uzak hafıza bir süre daha korunmaktadır. Hastalığın devam eden süreçlerinde, hastanın çeşitli nesne ve eşyaları kullanma yeteneğinde azalma gözlenmektedir. İleri dönemlerde kas kontraksiyonları sık görülmesine rağmen motor kuvvetin bozulması gerçekleşmemekte ve uyanıklık seviyesi korunmaktadır (3). Bu ilerleyen yetenek kayıpları sonucunda hastalar birkaç yıl sonra bakıma muhtaç hale gelebilmekte ve hareketsiz kalma süresindeki artışa bağlı olarak ortaya çıkan pnömoni, pulmoneremboli gibi hastalıklar sonucu 6-12 yıl sonrasında ölmektedir (3).

AH'nin fizyopatolojisi henüz tam bilinmemekle beraber, beyin hücrelerinin nedeni belirlenemeyen bir şekilde kaybolmasından kaynaklandığı düşünülmekte ve hastalığın oluşumu hakkında farklı hipotezler öne sürülmektedir. Öne sürülen hipotezlerden en eskisi olan kolinerjik hipoteze göre; AH'nin önemli bir nörotransmitter olan asetikolinin azalması nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir (4,5). Alzheimer hastalarında bazal ön beyinde kolinerjik nöronlarda dejenerasyon; serebral kortekste kolinerjik reseptörlerde ve kolin asetiltransferaz (ChAT) düzeylerinde belirgin bir azalma saptanmaktadır. Daha önce sürdürülen tedavi yaklaşımlarının birçoğu bu hipoteze dayandırılmakla birlikte klinik araştırmalar asetilkolin düzeylerini yükseltmeye yönelik tedavi stratejilerinin semptomatik iyileşme sağladığını ortaya çıkarmıştır (6). Kolinerjik hipotezle ilgili yapılan son çalışmalar, kolinesteraz inhibitörlerinin kullanımının amiloidfibrilasyon oluşumunu etkileyebileceğini göstermektedir (7,8). Kolinerjik hipotez ilk olarak yaklaşık 30 yıl kadar önce ortaya atılmış ve beyindeki asetilkolin içeren nöronların işlev bozukluğunun ileri yaşta ve Alzheimer hastalarında gözlenen kognitif düşüşün açıklanmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (9). Bu düşünce, bugüne kadar, AH'nin tedavi stratejilerinin ve ilaç geliştirme yaklaşımlarının çoğunun temelini oluşturmuştur. Kolinerjik eksiklik, tüm serebral kortekste kolinerjik

innervasyonu sağlayan bazal önbeyin başta olmak üzere subkortikal kolinerjik nöronlarda atrofi ve dejenerasyonla oluşmaktadır. Kolin asetiltransferaz ve/veya asetilkolinesteraz aktivitesinin etkilenmediği (hatta yukarı regüle edildiği) hafif bilişsel bozukluğu ya da erken evre AH olan hastaların beyinleri ile ilgili yapılan yakın zamanlardaki çalışmalar, kolinerjik hipotezin geçerliliğini ve aynı zamanda özellikle de erken evrelerdeki bozukluğun tedavisinde kolinomimetiklerin kullanılmasının gerekçesini açıklamıştır (6,9). Yine bu hipoteze göre Alzheimer hastalarında mediyal ön loptaki kolinerjik nöronların dejenerasyonunu takiben kavrama bozuklukları da görülebilmektedir. Bu nedenle de kolinerjik anormallikler ve AH arasında direkt bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Ölüm sonrası yapılan beyin incelemeleri birçok Alzheimer hastasında tespit edilen neokortikal bölgeleri kontrol eden nöronların dejenerasyonu, serebral kortekste bulunan kolinerjik terminallerin kaybı, azalan kolin asetiltransferaz aktivitesi ve azalan asetil kolin sentezi, azalan kolin alınımı ve artan asetilkolinesteraz aktivitesi gibi değişmiş kolinerjik belirtiler bu durumu kanıtlamaktadır (10,11). Bu nedenle AH'nin tedavisinde, asetilkolin düzeyinin artırılması ve bunun için de asetilkolini yıkan asetilkolinesteraz enziminin baskılanması sık başvurulan tedavi yöntemlerinden biridir. Kolinerjik anormallikler aynı zamanda bilişsel olmayan davranışsal anormalliklere ve AH'de toksik nöritik plakların birikmesine de neden olabilmektedir (6). Bu nedenle, kolinerjik temelli stratejiler, AH'nin diğer demans formlarının tedavisinde rasyonel ilaç geliştirilmesine yönelik bir yaklaşım olarak geçerli kalacaktır.

AH'de verilen kolinesteraz inhibitörleri mortaliteyi etkilememekle beraber hastanın yaşam kalitesinde ve hastalık evresinin stabilizasyonunda etkili olduğundan tedavide kullanılmaktadır (12). Asetilkolinesteraz inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzeyi artışları, AH'nin erken evrelerindeki kognitif yetmezliği iyileştirebilmektedir (3,13,14). Ayrıca bir N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti olan memantin ile kombine kolinesteraz inhibitörü (ChEI) tedavisinin de etkiyi güçlendirdiği bulunmuştur (15).

Monoaminoksidaz (MAO) enzimi beyinde ve periferik dokularda bulunan biyojenik aminlerin deaminasyonundan, dolayısıyla nörotransmitter seviyelerinin düzenlenmesinden sorumlu olan önemli bir enzimdir (16,17). MAO enzimi ile meydana gelen reaksiyon sonucu aldehit ve serbest amin oluşur. Fizyolojik olmayan biyojenamin seviyeleri; depresyon, anksiyete, migren, AH ve Parkinson hastalığı (PH) gibi nörodejeneratif çeşitli durumlara yol açabilir (17). MAO enziminin; amino asit sıralanması, üç boyutlu yapı, substrat tercihi ve inhibitör seçiciliğine göre tanımlanan

MAO-A ve MAO-B olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Dopamin, tiramin, ve triptamin, her iki MAO izoformunun da substratlarıdır (18). Klorjilin, selejilin, iproniazid gibi MAO inhibitörleri nörodejeneratif ve nörolojik hastalıklarda ilaç olarak kullanılmaktadır. Özellikle, MAO-A inhibitörleri depresyon tedavisinde kullanılırken, MAO-B inhibitörleri PH'nin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca MAO-B inhibitörlerinin AH'nin tedavisinde etkili olup olmadığı da araştırılmaktadır (19-21).

Son yıllarda hidrazon türevi bileşiklerin antitümoral, antibakteriyel-antifungal, antikonvülsan, analjezik, antienflamatuvar, antiplatelet, antikanser etki gösterdikleri bildirilmiştir (22-29).

Yukarıdaki literatür verilerinden hareketle bu doktora tezi kapsamında, benzalhidrazon türevi bileşiklerin sentezlerinin yapılması; bu bileşiklerin asetilkolinesteraz ve MAO-B enzim inhibitörü aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Değişik benzaldehit türevleri kullanılarak hazırlanan bileşik serisinde fenil halkası üzerindeki farklı süstitüentlerin aktiviteye katkısı araştırılmış ve aktivite için öncü molekülün bulunması amaçlanmıştır. Beş tanesi (T₈, T₉, T₁₀, T₁₁ ve T₁₂) ilk defa bu tez kapsamında olmak üzere sentezi yapılan toplam on iki bileşiğin yapısı Tablo 1.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 1.1. Sentezi yapılan bileşiklerin yapıları

Bileşik No	R
T ₁	H
T ₂	4-CH ₃
T ₃	2-Cl
T ₄	4-Cl
T ₅	4-Br
T ₆	2-CH ₃ O
T ₇	4-N(CH ₃) ₂
T ₈	3-Br
T ₉	2-F
T ₁₀	4-F
T ₁₁	4- OCH ₃
T ₁₂	2-CH ₃

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ALZHEİMER HASTALIĞI (AH)

Erken dönemlerinde hastanın günlük faaliyetlerini gerçekleştirme yeteneğinde bozulma ile başlayan Alzheimer hastalığı sonraki aşamalarda bilişsel fonksiyon bozuklukları ve farklı nöropsikiyatrik semptomlarla kendini göstermekte ve geri dönüşsüz olarak ilerleyen bu süreç, ölümlü sonuçlanmaktadır. Hastalığın ilk belirtisi olarak yakın hafızada bozukluk ve unutkanlık görülmektedir. Uzak hafıza hastalığın ilerleyen dönemlerine kadar korunmaktadır. Hastalık ilerledikçe görsel testler, obje ve eşyaları kullanabilme yetisi gitgide azalmaktadır. İleri dönemlerde kas kontraksiyonları sık görülmesine rağmen motor kuvvetin bozulması gerçekleşmemekte ve uyanıklık seviyesi korunmaktadır (3). Hastaların büyük bir kısmı birkaç yıl sonra sürekli bakıma ihtiyaç duymakta ve sürekli hareketsiz kalmaya bağlı olarak genellikle de pnömoni, pulmoner emboli gibi komplikasyonlara bağlı olarak ölmektedir (6).

AH'nin fizyopatolojisi henüz tam bilinmemekle beraber, beyin hücrelerinin nedeni belirlenemeyen bir şekilde kaybolmasından kaynaklandığı düşünülmekte ve hastalığın oluşumu ile ilgili üç ana hipotez öne sürülmektedir. Öne sürülen hipotezlerden en eskisi olan kolinerjik hipoteze göre AH'nin önemli bir nörotransmitter olan asetikolinin azalması nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir (4,5). Alzheimer hastalarında bazal ön beyinde kolinerjik nöronlarda dejenerasyon; serebral kortekste kolinerjik reseptörlerde ve kolinasetiltransferaz (ChAT) enzim düzeylerinde belirgin bir azalma saptanmaktadır. Daha önce sürdürülen tedavi yaklaşımlarının birçoğu bu hipoteze dayandırılmakla birlikte klinik araştırmalar asetilkolin düzeylerini yükseltmeye yönelik tedavi stratejilerinin semptomatik iyileşme sağladığını ortaya çıkarmıştır (6). Kolinerjik hipotezle ilgili yapılan son çalışmalar, kolinesteraz inhibitörlerinin kullanımının amiloidfibrilasyon oluşumunu etkileyebileceğini göstermektedir (7,8). Bir diğer hipotez olan Tau Hipotezi ise Alzheimer hastalığında, mikrotübülle ilişkili protein ailesinin bir üyesi olan ve tübülstabilitesini sağlayan Tau proteinlerinin hiperfosforile olması sonucu yapılarının bozularak intranöronal fibriller ağlar meydana getirdiğini öne sürmektedir. Bu oluşumların intraselüler transport sistemine ve sinyal iletimine zarar vererek AH'nin gelişimini hızlandırdığı ve nöronal ölüme yol açtığı bildirilmektedir

(30). Amiloid Hipotezi olarak bilinen üçüncü hipotezde ise Alzheimer hastalarında beynin belli bölgelerinde birikerek çözünmez fibriller meydana getiren β -amiloid peptidlerinin daha sonra senil plaklar oluşturarak sinir hücrelerini hasara uğrattığı ve bu hücrelerin birbirleri ile olan bağlantılarını koparıp nörotransmitter miktarını azalttığı öne sürülmektedir (31).

AH'nin tanısındaki önemli bulgulardan biri, limbik yolağın bellek süreçlerini yöneten bölümündeki nöron kaybıdır (32). Alzheimer hastalarında yapılan biyokimyasal çalışmalar ise kortekste bazı nöromedyatörlerin ve özellikle de asetilkolinin azaldığını ortaya koymaktadır (33). AH'deki nörokimyasal karmaşa yoğun olarak araştırılmıştır. Serebral korteksin nörotransmitter içeriği doğrudan ölçüldüğünde, nöron kaybına paralel olarak birçok nörotransmitterin, en çok da asetilkolinin azaldığı görülmüştür. Kolinerjik, nonkolinerjik, serotonerjik, dopaminerjik, aminoasiterjik ve nöropeptiderjik olmak üzere birçok nörotransmitterde oluşan değişim ile Alzheimer hastalığı arasında bir ilişki bulunmaktadır; fakat kolinerjik sistemde gözlenen değişim ile Alzheimer arasındaki ilişki bunlardan en çok bilinenidir. Kolinerjik hipotez olarak açıklanan bu ilişkiye göre, asetilkolin ve kolin asetiltransferaz düzeyindeki azalma Alzheimer hastalığı ile ilişkilidir. Atropin benzeri santral etkili kolinerjik antagonistlerin uygulanmasıyla da demansa benzer bozukluklar olduğu görülmektedir. Alzheimer hastalığında görülen asetilkolinin seçici eksikliği, hastalığın semptomlarının gelişmesinde asetilkolin eksikliğinin önemini vurgulayan "kolinerjik hipotez" in ortaya atılmasına neden olmuştur (34,35). Kolinerjik hipotez ilk olarak yaklaşık 30 yıl kadar önce ortaya atılmış ve beyindeki asetilkolin içeren nöronların işlev bozukluğunun ileri yaşta ve Alzheimer hastalarında gözlenen kognitif düşüşün açıklanmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Bu düşünce, bugüne kadar, AH'nin tedavi stratejilerinin ve ilaç geliştirme yaklaşımlarının çoğunun temelini oluşturmuştur. Kolinerjik eksiklik, tüm serebral kortekse kolinerjikinnervasyonu sağlayan bazal önbeyin başta olmak üzere subkortikalkolinerjik nöronlarda atrofi ve dejenerasyonla oluşmaktadır. Kolin asetiltransferaz ve/veya asetilkolinesteraz aktivitesinin etkilenmediği (hatta yukarı regüle edildiği) hafif bilişsel bozukluğu ya da erken evre AH olan hastaların beyinleri ile ilgili yapılan yakın zamanlardaki çalışmalar, kolinerjik hipotezin geçerliliğini ve aynı zamanda özellikle de erken evrelerdeki bozukluğun tedavisinde kolinomimetiklerin kullanılmasının gerekçesini açıklamıştır (36,37). Yine bu hipoteze göre Alzheimer hastalarında mediyal ön loptaki kolinerjik nöronların dejenerasyonunu takiben kavrama

bozuklukları da görülebilmektedir. Bu nedenle de kolinerjik anormallikler ve AH arasında direkt bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Ölüm sonrası yapılan beyin incelemeleri birçok Alzheimer hastasında tespit edilen neokortikal bölgeleri kontrol eden nöronların dejenerasyonu, serebral kortekste bulunan kolinerjik terminallerin kaybı, azalan kolin asetiltransferaz aktivitesi ve asetil kolin sentezi, azalan kolin alınımları ve artan asetilkolinesteraz aktivitesi gibi değişmiş kolinerjik belirtiler bu durumu kanıtlamaktadır (10,11). Bu nedenle AH'nin tedavisinde, asetilkolin düzeyinin artırılması ve bunun için de asetilkolini yıkan asetilkolinesteraz enziminin baskılanması sık başvurulan tedavi yöntemlerinden biridir. Kolinerjik anormallikler aynı zamanda bilişsel olmayan davranışsal anormalliklere ve AH'de toksik nöritik plakların birikmesine de neden olabilmektedir. Bu nedenle, kolinerjik temelli stratejiler, AH'nin diğer demans formlarının tedavisinde rasyonel ilaç geliştirilmesine yönelik bir yaklaşım olarak geçerli kalacaktır.

AH'de verilen kolinesteraz inhibitörleri mortaliteyi etkilememekle beraber hastanın yaşam kalitesinde ve hastalık evresinin stabilizasyonunda etkili olduğundan tedavide kullanılmaktadır (12). Asetilkolinesteraz inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzeyi artışları, AH'nin erken evrelerindeki kognitif yetmezliği iyileştirebilmektedir (3,13,14). Ayrıca NMDA reseptör antagonisti olan memantin ile kombine ChEI tedavisinin de etkiyi güçlendirdiği bulunmuştur (15).

Hafif bilişsel bozukluğu (HBB) olanların ya da AH'nin erken evrelerindeki beyinlerine odaklanan araştırmalar, bir teşhis metodu olarak giderek önem kazanmaktadır. Bu tür araştırmalar, nöroprotektif stratejilerin geliştirilmesi ve/veya tanımlanmasının yanı sıra daha spesifik hastalıkların tanı ve tedavisinde de yeni yaklaşımlara yardımcı olabilir. Bilişsel gerileme düzeyinin hastalık nöropatolojisi ile korelasyonunu sağlamaya yönelik önceki çalışmaların çoğunda, hastalığın son evresinde olan hastaların beyinleri analiz edilmiştir. Bu durum hastalık çok erken bir aşamada teşhis edilirse hastalığın ilerlemesini değiştirmeye yönelik yeni araştırma çabaları için özellikle yararlı olmayabilir (38).

HBB ve/veya hafif AH tanısı alan hastaların beyinlerinin analiz edildiği az sayıdaki yayınlanmış çalışmanın sonuçları, bazılarının kolinerjik hipotezin geçerliliğine meydan okumaya başlamasına neden olmuştur. Örneğin, *Davis ve diğerleri*, hafif AH tanısı alanların post mortem neokortikal dokularında asetilkolinesteraz (AChE) ve ChAT enzim aktivitesinin azalmadığını bildirmişlerdir (39). Sonuç olarak; yazarlar, bir

kolinerjik belirtecin AH'nin erken bir göstergesi olarak kullanılmasının olası olmadığını, hastanın semptomatik hale gelmesinden önce bir kolinerjik eksikliğin tespit edilemeyeceğini ve sadece daha şiddetli hastalığı olan hastaların kolinerjik tedavi için bir hedef olması gerektiğini bildirmişlerdir (38,39). Ayrıca, *DeKosky ve diğerleri*, HBB veya hafif AH tanısı alan hastalarda çalışılan bir dizi kortikal bölgede ChAT aktivitesinde herhangi bir azalma saptamayışlardır ve hatta, HBB olanlarda aktivite frontal korteks ve hipokampusta gerçekte yukarı doğru düzenlenmiştir (38). Başka bir çalışmada, HBB ve erken AH bireylerde, nükleus basalistede ChAT ve veziküler asetilkolin taşıyıcı protein içeren nöronlar korunduğunu göstermiştir (40).

Daha iyi *in vivo* görüntüleme yöntemleri daha yaygın hale geldikçe, HBB veya erken AH'den muzdarip yaşayan hastaların merkezi sinir sistemindeki kolinerjik fonksiyon ile ilgili belirsizlikler muhtemelen daha iyi bir şekilde ortaya çıkacaktır. İlginçtir ki, AH bugüne kadar yapılan birkaç *in vivo* görüntüleme çalışması kolinerjik hipotezi destekliyor görünmektedir. Örneğin, [11C] N-metilpiperidin-4-il-propiyonat kullanılarak yapılan PET çalışmaları, AH kortikal asetilkolinesteraz aktivitesinin gerçekten azaldığını göstermektedir (41). [11C] Nikotin bazlı PET çalışmaları, nikotinic reseptör açıklarının aslında AH'de erken bir fenomen olduğunu göstermektedir ve bu raporlar ayrıca kortikal nikotinic reseptör açıklarının bilişsel bozulma düzeyi ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu göstermektedir (42). Seçici olmayan muskarinik ligandlar [123I] kinüklidinilbenzilol ve [11C] N-metil-4-piperidil benzilol kullanan diğer PET çalışmaları, neokortikal bölgelerde bağlanmada hem yaş hem de AH ile ilişkili düşüşleri göstermektedir (43). Ayrıca, [123I] benzovesamacol bağlanmasını kullanan tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi çalışmaları, erken başlangıçlı AH, vesikülerasetilkolin taşıyıcının tüm serebral korteks ve hipokampus boyunca azaldığını göstermektedir (41). Yaş şu anda AH için bilinen risk faktörlerinin en güçlüsü olarak görüldüğünden, yaşlılarda santral kolinerjik nöronların işlevinin bozulup bozulmadığını sormak uygun görünmektedir. AH'nin kolinerjik hipotezindeki zorluklar, yaşlanma, kolinerjik bozukluk ve bilişsel gerileme arasındaki ilişkilerin desteklenmesinde kanıtların varlığını göz ardı etmektedir. Nörotransmitter fonksiyonunun dinamik yönlerini ölçmek için seçici ve duyarlı kimyasal enzimatik yöntemlerin geliştirildiği 1980'lerin başında İleri yaşın beyin kolinerjik fonksiyonu üzerindeki etkisine ilişkin bir çalışma başlamıştır. Ayrıca rutin kullanım için hızlı donma veya odaklanmış mikrodalga ışıması ile beyin asetilkolin ve kolin düzeylerinin hızlı stabilizasyonu için yöntemler de tanıtıldı (41). Örneğin, *Gibson ve diğerleri*, 3 ila 30 aylık yaşlı farelerde asetilkolinin beyindeki tüm

sentezini incelediler. Asetilkolinin biyosentezinin (radyo-etiketli bir öncünün enjeksiyonu ile ölçülen) 30 aylık hayvanlarda %75'e kadar azaldığını bildirmişlerdir. Hafif hipoksi, asetilkolin sentezini %90 oranında azaltmıştır. Dahası, yaşlı kolinerjik nöronlar, potasyum stimülasyonunu takiben asetilkolin serbest bırakma yeteneklerinde, transmitteri sentezleyebildiklerinden daha fazla bozulmuştur (44). Yaşlı beyin kolinerjik nöronların, stresli olana kadar nispeten normal işlev gördüğü, asetilkolin çıkışını arttırmak veya kolinerjik nöronlara zarar vermek için çeşitli yöntemler kullanılan deneylerle desteklenmiştir (45-48). Bu nedenle, ön beyin kolinerjik nöronlara verilen herhangi bir sürekli hakaretin, bu hücrelerin normal işlev için yeterli transmitter serbest bırakma kabiliyetine müdahale edebileceği sonucuna varmak mantıklı görünmektedir. *Sarter ve diğerleri* bu olasılığı doğrudan, bazal ön beyin kolinerjik hücrelerinin sınırlı bir şekilde azalması amacıyla genç sıçanlarda bazal ön beyin kolinerjik nöronların kimyasal lezyonlarının oluşturulduğu bir dizi deney üzerinde test etmişlerdir (49). Bu çalışma için sıçanlar, sürekli bir dikkat gerektiren görevin yerine getirilmesinde daha önce iyi eğitilmiştir. Başlangıçta her iki deney grubunda da benzer bir görev performansı varken, lezyonlu grup önemli bir görev bozukluğu sergilediğinde, hayvanların 31 aylık yaşa gelene kadar lezyonlu ve kontrol sıçanları arasında belirgin bir ayrışma gerçekleşmediği gözlenmiştir. Yaşlı kemirgenlerde yapılan bu çalışmaların sonuçlarına göre, özellikle kolinerjik nöronların dinamik yönleri ile ilgili olarak yaşa bağlı değişikliklerin çoğunun gözlemlendiği tespit edilmiştir (49).

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

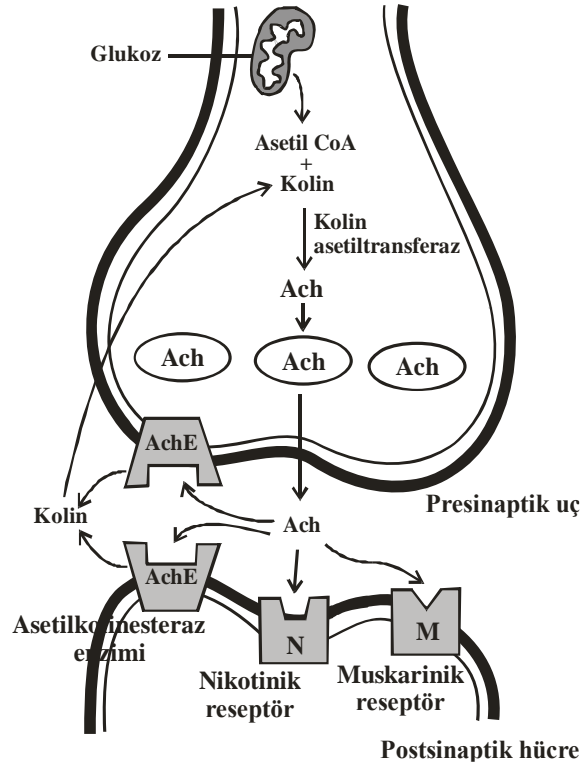
ChEI'lerin etkinliği genellikle benzerdir. Donepezil, AH'nin tüm aşamalarında kullanılmak üzere endike olan tek kolinesteraz inhibitörüdür. Rivastigmin ve galantamin hafif ve orta dereceli aşamalar için onay almıştır (50). Hafif ila orta şiddette AH için önerilen başlangıç donepezil dozu günde bir kez 5 mg olmakla beraber 4-6 hafta sonra, doz 10 mg'a çıkarılabilmektedir. Orta ila şiddetli AH'de, doz 23 mg'a kadar artırılabilir. Galantamine günde 8 mg doz ile başlanırken en az 4 hafta sonra 16 mg'a ve ek 4 hafta sonra da bu doz 24 mg'a kadar artırılabilir. Orta derecede böbrek veya karaciğer yetmezliği olan hastalarda, önerilen maksimum doz; günde iki kez 8 mg olmaktadır. Galantamin şiddetli karaciğer veya böbrek yetmezliğinde kullanılmamalıdır.

Rivastigmin kapsülü günde iki kez 1,5 mg ile başlanmalıdır. Amaç, 2-4 haftalık aralıklarla günde iki kez 1,5 mg artışla günde iki kez 6 mg idame dozuna ulaşmaktır. Oral rivastigmin yiyeceklerle birlikte kullanılmalıdır. Rivastigmin transdermal bantların günlük 4,6 mg ile başlanması ve günlük 13,3 mg'a ulaşılması önerilir (51).

Kolinesteraz inhibitörlerinin en yaygın yan etkileri gastrointestinal sistem üzerine olan bulantı, ishal, kusma, iştahsızlık, dispepsi gibi etkilerdir. Bu durumu gidermek amacıyla kolinesteraz inhibitörlerinin besinlerle birlikte alınması önerilmektedir. Ayrıca, bu ilaçların yemekle birlikte verilmesi ilaç emilimini geciktirir, bu da pik plazma ve beyin konsantrasyonlarını düşürür ve böylece tüm akut yan etki riskini azaltmaktadır. ChEI'lerin kullanımında bradikardi, hipotansiyon, kilo kaybı, kalpte dal bloğu ve atriyoventriküler blok, aritmiler, uyku bozuklukları ve deri döküntüsü gibi başka yan etkiler de gözlemlenebilmektedir (52,53).

2.1.2. Asetilkolin ve Kolinergik Reseptörler

Otonom sinir sisteminin periferik kısımlarını oluşturan pregangliyonikotonomik liflerin tamamında, bütün postgangliyonik parasempatik liflerde ve birkaç postgangliyonik sempatik sinir lifinde nörotransmitter madde asetilkolin (ACh)'dir ve ACh salıveren bu liflere de kolinergik lifler adı verilir (54). ACh sinir liflerinin ucunda sitozolde sentezlenir, sonra veziküllerin zarından veziküllerin içine taşınır. Burada, her vezikülde yaklaşık 10.000 asetilkolin molekülü olmak üzere oldukça yoğun biçimde depolanır. Bir aksiyon potansiyeli sinir ucuna ulaştığında, sinir ucu bol miktarda voltaj kapılı kalsiyum kanalına sahip olduğundan, sinir ucunun zarındaki çok sayıda kalsiyum kanalı açılır. Sonuç olarak sinir ucunun içinde kalsiyum konsantrasyonu 100 kat artar; bu da asetilkolin veziküllerinin sinir ucu zarıyla birleşme hızını 10.000 kat artırır. Bu birleşme birçok vezikülün yırtılmasına neden olarak sinaptik aralığa asetilkolinekzositozuna olanak sağlar. Genellikle 125 kadar vezikül her aksiyon potansiyeli ile yırtılır. Daha sonra birkaç milisaniye içerisinde asetilkolin, asetilkolinesteraz ile asetat iyonu ve koline parçalanır; kolin yeniden asetilkolin oluşturulmasında kullanılmak üzere aktif olarak sinir ucuna geri alınır (55). (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. ACh biyosentezi, iletimi ve inaktivasyonu

Yapılan çalışmalar, birçok dokunun nöronal olarak salınan ACh veya dışardan uygulanan ve nörotransmitterin etkisini taklit eden bileşiklerin oluşturduğu stimülasyon ve inhibisyona cevap verdiğini göstermiştir. ACh ile etkileşen periferik kolinerjik reseptörler, düz kaslarda parasempatetik postgangliyonik sinir uçları ile iskelet kasındaki nöromusküler kavşakta bulunmaktadır. Kolinerjik reseptörler, muskarinik ve nikotinik olmak üzere iki grupta toplanırlar. Muskarinik reseptörlerin beyindeki dağılımı, asetilkolin dağılımına uymaktadır. En fazla sitriatum, neokorteks, hipokampus, superiorcolliculus, locuscoeruleus ve pons çekirdeklerinde bulunur. Hipotalamus, omurilik ve kortekste dansitesi düşüktür. Nöromusküler motor uçlarda ve gangliyonlarda bulunan bu reseptörler, aktif formda izole edilmiş ve saflaştırılmış olan ilk nörotransmitter reseptörlerdir. Reseptörün, birbirine bir disülfid bağı ile bağlanmış olan ve beş alt üniteye sahip iki polipeptit zincir monomerinden oluştuğu düşünülmektedir. ACh, bu reseptörlere bağlandığı zaman membran geçirgenliğinde artışa yol açarak Ca^{++} , Na^{+} , ve K^{+} gibi küçük katyonların geçişine izin verir. Bunun fizyolojik etkisi, motor uçlarda depolarizasyon oluşması ve buna bağlı olarak nöromusküler kavşakta müsküler kasılma veya sinir uyarısının devam etmesidir. Muskarinik reseptörler, otonomik sinir sistemi tarafından uyarılan organların

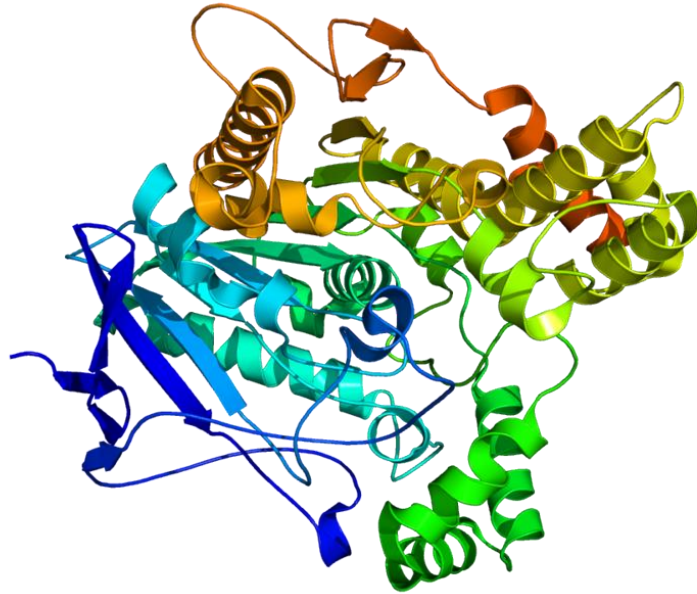
fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. ACh'nin parasempatetik sinapslarda bulunan bu reseptörler üzerindeki etkisi, uyarıcı veya inhibe edici olabilir. ACh, salgı ve tükürük bezlerindeki sekresyonu uyarır ve solunum yollarının kasılmasına yol açar. Bileşik ayrıca kalp kasılmalarını inhibe eder, kan damarlarındaki düz kasları gevşetir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, muskarinik reseptörlerin beş alt tipi (M₁, M₂, M₃, M₄ ve M₅) olduğunu göstermiştir. M₁ merkezi sinir sistemi ve gangliyonlar gibi nöronal yapılarda, M₂ kalpte, M₃ düz kaslarla salgı bezlerinde, M₄ ise striatum ve akciğerlerde bulunmaktadır (18,54,55).

2.1.3. Kolinesteraz Enzimleri ve Kolinesteraz Enzim İnhibitörleri

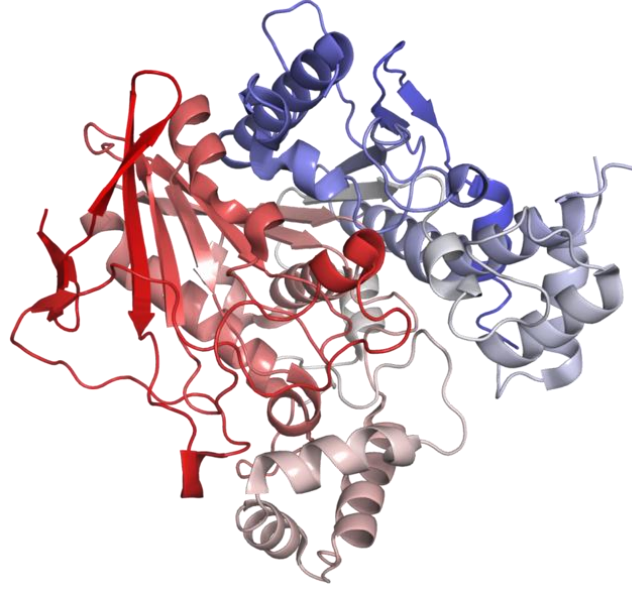
AChE, otonomik sinir sisteminin ve merkezi sinir sisteminin kolinerjiksınapslarında ACh'nin hidrolizinde büyük rol oynayan serin hidrolaz enzim sınıfına ait hidrolitik bir enzimdir (56). Histokimyasal teknikler kullanılarak elektron mikroskopisi ile yapılan incelemeler adı geçen enzimin, kolinerjik sinaps veya kavşaklarda hem sinir uçlarında ve hem de kavşak sonrası veya post sinaptik membran üzerinde yerleştiğini göstermiştir. Gerçek kolinesteraz adıyla da adlandırılan bu enzim, kolin esterleri içinde en hızlı asetilkolini hidroliz eder. Metakolini de hidroliz edebilir, fakat benzoilkoline karşı etkisizdir. Psödokolinesteraz diye adlandırılan ikinci bir kolinesteraz türü asetilkolini daha yavaş parçalar. Bu enzimin en hızlı parçaladığı kolin esteri butirilkolindir. Bu nedenle psödokolinesteraza bütirilkolinesteraz (BChE) adı verilir. Bütirilkolinesteraz sinapslarda pek bulunmaz ve bu yerlerdeki asetilkolin hidrolizine katkısı yoktur (57).

Hem AChE hem de BChE polimorfiktir ve alt-birim ilişkileri ve hidrodinamik özellikleri ile karakterize olan homomerik ve heteromerik moleküler formlar olarak bulunurlar. Heteromerik moleküler formlar, lipit veya üçlü sarmal kollajen kuyruğuna bağlı katalitik alt birimler içerir ve sıklıkla AChE'nin asimetric veya A formları olarak adlandırılır. AChE'nin homomerik hidrofilik globüler formları olan G1, G2 ve G4 formları sırasıyla bir, iki ve dört özdeş alt birim içerir. G4 formu nöronlar ve sekretuar hücreler tarafından salgılanır. Amfifilik glikofosfolipid bağlı bir form, hücre membranına glikofosfolipid bağlantısı olan iki alt birimin olan G2'nin bir dimeridir. BChE'de daha az polimorfizm görülmekte olup bu enzim için sadece hidrofilik ve asimetric formlar tanımlanmıştır (58).

AChE'nin yapısı, yaklaşık 20 Å derinliğindeki dar bir vadinin tabanında yer alan bir katalitik triad -glutamat (E327), histidin (H440) ve serin (S200) içeren aktif bir bölgeyi ortaya çıkarmaktadır (59). Bu genel amino asit düzenlemesi, serin hidrolaz enzim ailesini temsil etmektedir. AChE'deki geçit bölge, fenilalanin, tirozin veya triptofandan oluşan 14 aromatik amino asitle kaplıdır ve bölgenin tabanı, ACh'nin pozitif yüklü trimetilamonyum grubu ile etkileşmesinden ve katyonikligandların bağlanmasının hızlanmasından kolektif olarak sorumlu olan birkaç anyonik kalıntı içerir. BChE, geçitte altı daha az aromatik amino asit içerir. Bu yapısal çalışmalar, aktif merkez ile ligand arasındaki spesifikliğin moleküler temelini aydınlatmaktadır. Özellikle, AChE ve BChE arasındaki ana substrat ayrımı, AChE'de bir açıl bağlama cebi sağlayan iki fenilalaninin (F288 ve F290) bulunması ve bu amino asitlerin BChE'de daha az yapısal olarak kısıtlanmış bir cep sağlamak için lösin ve valin ile yer değiştirmesi ile belirlenebilir. Bu duruma ek olarak AChE, katalitik bölgedeki katyonikligand etkileşimleriyle allosterik inhibisyonundan sorumlu olan bir periferal anyonik bölge içerir. Bu periferal anyonik bölge, substrat inhibisyonuna aracılık ederek katalitik işlemde bir rol oynayabilir (Şekil 2.2. ve Şekil 2.3.) (60-66).



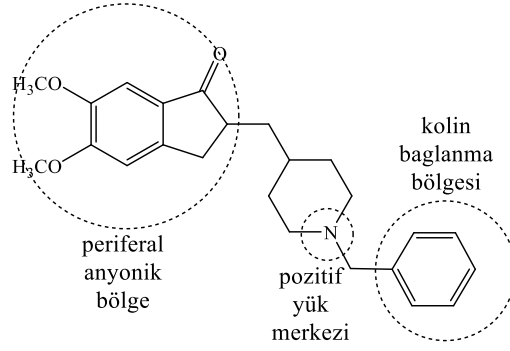
Şekil 2.2.AChEenziminin yapısı.



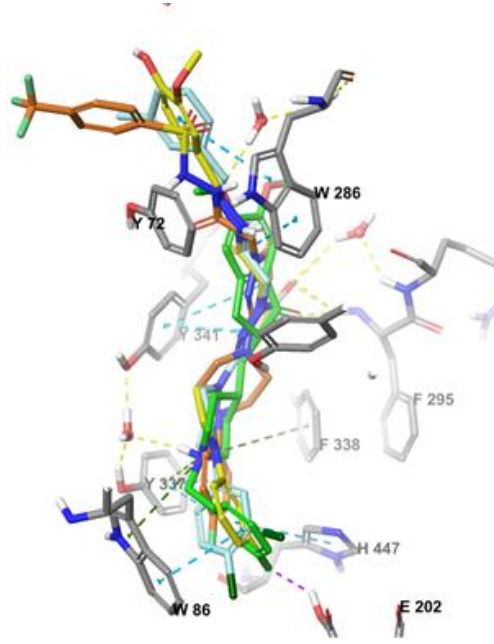
Şekil 2.3.BChEenziminin yapısı.

AChE inhibitörü aktivitede inhibitör moleküllerin enzime bağlanma bölgeleri için üç hipotez ileri sürülmektedir. Bu hipotezlerden birincisi AChEI bileşiklerin yapısında bulunan heterosiklik halkanın enzimin periferal bağlanma bölgesiyle etkileşebilen periferal anyonik bölge olarak etki gösterdiğiidir. İkincisi pek çok güçlü AChE inhibitörünün yapısında yer alan azot atomunun pozitif yük merkezi olarak etki ettiğiidir. Bu grubun AChE'nin katalitik merkezi ile etkileşebildiği AChE/donepezil ve AChE/galantamin komplekslerine ait X-ray kristalografisi çalışmalarıyla belirlenmiştir. Üçüncü hipotez ise azot atomuna bağlı fenil halkası gibi hidrofobik grupların kolin bağlanma bölgesi olarak bulunduğudur (67).

Yapılan kristalografik çalışmalarla, AChE ve BChE aktif bölgelerinin yapısal özellikleri daha net hale gelmiştir ve takrin, donepezil ve galantamin gibi bilinen inhibitörlerin anahtar bağlanma bölgesi kalıntıları ile bağlanma etkileşimleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Donepezil, galantamin ve takrinden farklı olarak, aktif geçidin girişinde kenarı çevreleyen periferikanyonik bölge (PAS) kalıntıları ve ayrıca katyonik aktif bölge (CAS) ve açıl bağlama cebi ile etkileşime girer. Bu geçidin dibinde, katalitik triad olarak da bilinen, asetil-kolin bağının bölünmesini katalize eden üç amino asit vardır: S203, E334 ve H447. İdeal olarak, bir kolinesteraz inhibitörünün bu bölgeler ile etkili bir şekilde etkileşime girmesi beklenir (Şekil 2.4. ve Şekil 2.5.) (68).



Şekil 2.4.AChEI'lerin yapısal hipotezi (donepezil)



Şekil 2.5.AChE aktif bölge geçidinde geri kalanıyla üst üste çakıştırılmış donepezil bağlama profilleri

BChE ve AChE'nin aktif bölge geçit kalıntıları %65 dizilim benzerliği gösterse de, BChE'de daha büyük olan açıl bağlama cebinin hacmi gibi bazı farklılıklar enzim spesifikliği için kritiktir.

Otonomik ve somatik motor sinirlerden salınan ACh'nin etkileri, molekülün kolinerjik sinapslarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan, hem sinir hem de kas dokusunda sentezlenen AChE tarafından enzimatik yıkımıyla sonlandırılır (69). AChE'yi inhibe eden ilaçlara antikolinesteraz ajanlar adı verilir. Antikolinesterazların karakteristik farmakolojik etkileri, primer olarak kolinerjik yollarda ACh'nin AChE enzimi tarafından hidrolizini önlemeleriyle oluşur. Kolinesterazın inhibisyonu, sinir sinapslarında ve nöromuskuler kavşakta asetilkolinin artmasına yol açarak asetilkolin reseptörlerinin uyarılmasına neden olur. ACh'nin reseptörlerinin sürekli uyarımı ile

motor son plaklarda asetilkolin birikimine bağlı olarak merkezi sinir sisteminde, otonomik gangliyonlarda, parasempatik ve sempatik sinir sonlarında ve somatik sinirlerde, yaygın kolinerjiksiniaptik paralizi ile santral ve periferik klinik belirtiler ortaya çıkar. Parasempatik aktiviteye bağlı muskarinik etkiler ve sempatik aktiviteye bağlı nikotinik etkiler görülür. Asıl semptom ve bulgular muskarinik ve nikotinik reseptörler arasındaki dengeye bağlıdır (54).

ACh gangliyon, post gangliyonik sinir ucu ve motor uçlardan salınır. Daha sonra hızlı bir Şekilde asetilkolinesteraz tarafından hidroliz olur. AChE'nin inhibisyonu, nörotransmitterin kavŐaktaki ömrünü uzatır ve böylece asetilkolinuygulandığında gözlenen etkilere benzer farmakolojik etkiler ortaya çıkar. AChE, bu ilaçların birincil hedefidir, ancak butirilkinesteraz da inhibe edilir. Antikolinesterazlar; miyastenia gravis, gastrointestinal kanaldaki atoniler, glokoma, Alzheimer gibi hastalıkların tedavisinde kullanılırlar. Bu bileşikler, aynı zamanda sinir gazları ve insektisit olarak da kullanılmaktadırlar. Etki mekanizmalarına göre, anti-AChE ajanları üç gruba ayrılabilir; a) yarışmalı agonistler, b) kısa etkili inhibitörler (karbamatlar), c) uzun etkili inhibitörler (organofosfor). Edrofonyumun rnek olduğu ilk grup, kuaterner alkollerden oluşmaktadır. Bu bileşikler (agents), enzimin aktif bölgesine hem elektrostatik olarak hem de hidrojen bağları ile geri dönüşümlü olarak bağlanabilir, böylece asetilkolinin enzime eriŐimi engellenir. Enzim-inhibitör kompleksi, bir kovalent bağ içermez ve buna uygun olarak kısa ömürlüdür (2-10 dakika boyunca). İkinci grup, neostigmin ve fizostigmin gibi karbamat esterlerinden oluşur. Bu bileşikler asetilkolin için tarif edilene benzer iki aŐamalı bir hidroliz dizisine maruz kalırlar. Bununla birlikte, karbamoile edilmiş enzimin kovalent bağı, ikinci iŐleme (hidrasyon) nemli ölçüde daha dirençlidir ve bu adım, buna uygun olarak uzatılmıŐtır (30 dakika ila 6 saat arasında). nc grup, organofosfatlardan oluşmaktadır. Bu maddeler aynı zamanda enzim tarafından ilk bağlama ve hidroliz iŐlemine tabi tutulur, bu da fosforile edilmiş bir aktif alana neden olur. Kovalent fosfor enzim bağı oldukça stabildir ve suda çok yavaş bir hızda (yüzlerce saat) hidrolize olur. Organofosfat inhibitörleri bazen “geri dönüşümlü” kolinesteraz inhibitörleri olarak adlandırılır. Pralidoxime gibi güçlü nükleofiller fosfor enzim bağını kırabilir (18,54).

II. Dünya SavaŐı'ndan önce, sadece “geri dönüşümlü” anti-ChE ajanları biliniyordu ve bunların prototipi fizostigmindir. İlk önce tarımsal böcek öldürücüler olarak geliştirilen ve yüksek derecede toksik kimyasallar sınıfı olan organofosfatlar daha sonraları II. Dünya SavaŐından da kısa bir süre önce potansiyel kimyasal savaŐ

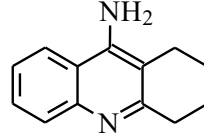
ajanları olarak geliştirildi. Bu bileşiklerin aşırı toksisitesinin, uzun süreli enzim inhibisyonu ile sonuçlanan AChE'nin "geri dönüşsüz" inaktivasyonu nedeniyle olduğu bilinmektedir. Bu nedenle organofosfat inhibitörleri bazen "geri dönüşsüz" kolinesteraz inhibitörleri olarak adlandırılır. Pralidoxime gibi güçlü nükleofiller fosfor enzim bağını kırabilir. Günümüzde halen tedavi amaçlı olarak, postoperatif dönemde görülen intestinal sistem ve mesane düz kaslarının atonisinde, glokomda, myasteniagraviste ve kompetitif nöromuskuler kas gevşeticilerin etkilerinin sonlandırılmasında kullanılan antikolinesterazlar, bu gibi kolinerjik aktivitenin azaldığı durumlarda reseptörler üzerine selektif etkiler oluşturmaktan ziyade ACh konsantrasyonunu arttırarak dolaylı etkileriyle non-selektif olarak hem muskarinik hem de nikotinik etkiler oluştururlar. Uzun etkili ve hidrofobik ChEI ayrıca, AH'nin demans semptomlarının tedavisinde sınırlı da olsa iyi belgelenmiş etkinliğe sahip tek inhibitörlerdir (54,70).

Takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin ve huperzin A gibi bazı kolinesteraz inhibitörlerinin Alzheimer hastalığında hastalık ilerlemesindeki azalmayı yavaşlattığı gösterilmiştir. 20 yıldan uzun bir süre önce (1993'te), bu bileşiklerden ilk ilaç olan ve AH'nin tedavisi için ABD'de FDA tarafından onaylanan takrin (Cognex®), bir AChEI olarak, AH'ninkolinerjik hipotezine dayanarak klinik kullanım için sunulmuştur. Hepatotoksitesi nedeniyle, tacrine çok geçmeden ilaç pazarından çekilmiştir ve sonrasında kullanımı sınırlandırılmış, ancak diğer üç AChE inhibitörü rivastigmin, donepezil ve galantamin anti-AH ilaç olarak onaylanmıştır. Bu ilaçlar, şu anda önemleri tam bilinmemekle birlikte, ek özelliklere de sahiptir. Rivastigmin, BChE'yi bloke edebilir, galantamin ise nikotinkasetilkolin reseptörlerini modüle eder (71). Donepezil amiloid betaplak sentezi ve amiloid beta sentezinden sorumlu bir β -sekretaz (BACE1) ılımlı inhibitörüdür. Donepezil ayrıca anti-amnesik aktiviteleri ile bilinen sigma-1 reseptörleri ile de etkileşir (72).

Takrin

Hem AChE, hem de BChE inhibitörü olan takrin, klinik çalışmalar sonucunda hafıza, dikkat, mantık yürütme, konuşma ve basit görevleri yerine getirme gibi AH ile ilişkili kognitif belirtileri olumlu yönde etki sağlamış ve AH tedavisi için FDA'dan onay almıştır (Şekil 2.6.). Düşük substrat konsantrasyonlarında rekabetçi olmayan bir inhibitör olarak ve daha yüksek substrat konsantrasyonlarında bir rekabetçi inhibitör

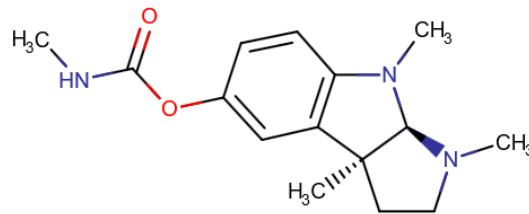
olarak karışık inhibisyon yoluyla hareket eder. TakrinAChE'ye katalitik triadın yanına bağlanır, bu da ACh'nin aktif bölgeye bağlanmasını engeller. Her ne kadar 2013 yılında hepatoksisite nedeniyle kullanımdan kaldırılmış olsa da, takrin, geliştirilmiş farmakolojik profile sahip yeni çok fonksiyonlu ajanlar geliştirmek için bir başlangıç molekülü olarak kullanılmıştır. (71).



Şekil 2.6.Takrinin yapısı

Fizostigmin

Fizostigmin, AH tedavisi için araştırılan ilk ChEI idi (Şekil 2.7.). *Physostigmavenenosum* tohumlarından bir parasempatomimetik bitki alkaloidi olarak izole edilir. Kan-beyin bariyerini (BBB) geçmesine rağmen, kısa bir yarı ömür ve dar bir terapötik indekse sahiptir. Ayrıca bulantı, kusma, baş ağrısı, ishal ve baş dönmesi gibi birçok yan etkiye de sahiptir. Fizostigmin; myastenia gravis, glokom ve gecikmiş gastrik boşalmada kullanılmıştır. Ancak, ilaç onaylanmamış ve yukarıda belirtilen dezavantajlar nedeniyle AH kullanımdan terk edilmiştir. Bunun yerine, enzimatik analizlerde fizostigmin bir referans bileşik olarak kullanılır. Bununla birlikte, fizostigminin bir karbamatanalogu olan rivastigmin, AH'li hastaları tedavi etmek için kullanılır (73).

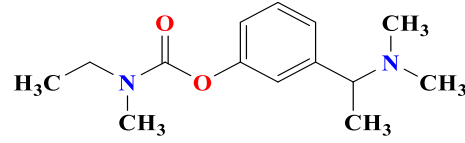


Şekil 2.7.Fizostigminin yapısı

Rivastigmin

Rivastigmin dahil olmak üzere diğer kolinesteraz inhibitörleri, etkinin özgüllüğü ve daha düşük yan etki riski açısından daha üstün özelliklere sahiptir (Şekil 2.8.). Rivastigmine, Avrupa Birliği ve ABD'nin tüm üye ülkeleri dahil olmak üzere 60 ülkede kullanılmak üzere onay almıştır. Rivastigmin küçük bir moleküldür ve kolay BBB geçirgenliğine sahiptir. Rivastigmine ayrıca BChE ve AChE inhibitör özelliklerine

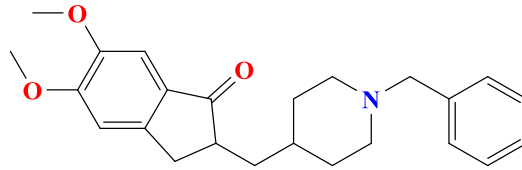
sahiptir. Rivastigmine 2000 yılında hafif-orta dereceli AH'nin tedavisi için onaylandı ve o zamandan beri Parkinson'un ilgili demansları için de onay aldı (75).



Şekil 2.8.Rivastigminin yapısı

Donepezil

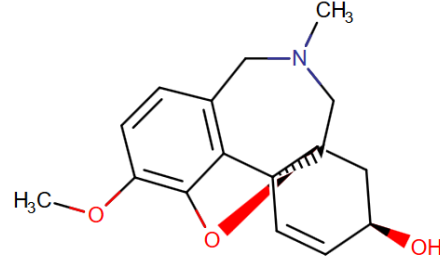
1997 yılında kullanım için onay alan donepezil günümüzde en çok kullanılan AH ilacıdır (Şekil 2.9.). Donepezil çok güçlü ve oldukça seçici bir AChE inhibitörüdür. Enzim ile birkaç bağ oluşturur ve aynı zamanda PAS ve enzim geçidinin aromatik kalıntı halkalarıyla etkileşir. Donepezil de AChE için oldukça seçicidir. BChE için düşük seçiciliği, BChE üzerindeki daha büyük vadinin bir sonucudur ve bu da donepezilin eşzamanlı olarak periferik anyonik ve katalitik bölgelere bağlanamamasıyla sonuçlanır (72).



Şekil 2.9.Donepezilin yapısı

Galantamin

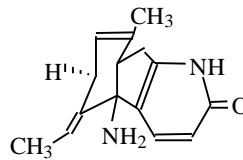
Birkaç kolinesteraz inhibitörü, doğal ürünlerden türetilmiştir (Şekil 2.10.). Bunlardan biri olan ve üç onaylı kolinesteraz inhibitöründen biri olan galantamin kardelen bitkisinden (*Galanthusspp.*) izole edilmiştir. Galantamin, yarışmalı ve geri dönüşümlü bir kolinesteraz inhibitörüdür. Beyindeki asetilkolin konsantrasyonunu artırarak kolinerjik fonksiyonu güçlendirdiği düşünülmektedir. Galantamin AChE kompleksinin üç boyutlu yapısı 1999 yılında X-ışını kristalografisi ile belirlenmiştir (PDB code: 1DX6). Galantamin'in altta yatan demans sürecinin seyrini değiştirdiğine dair bir kanıt yoktur. Galantamin ayrıca, asetilkolin salınımını arttırmak için nikotinik kolinerjik reseptörlerin modüle edilmesinde aktivite göstermiştir (75).



Şekil 2.10.Galantaminin yapısı

Huperzin A

Huperzin A, *Huperziaserrata*'dan izole edilen ve kan-beyin bariyerini geçebilen bir alkaloidtir (Şekil 2.11.). Huperzin A, son derece seçici ve geri dönüşümlü bir AChE inhibitörüdür. AChE'nin huperzin A tarafından inhibisyonu, aktif geçit bölgesindeki kalıntılar ile etkileşimlerin sonucudur. Huperzin A'nın bir faz II çalışmasında, günde iki kez uygulanan ilacın 200 µg'ının hafif ila orta şiddette AH olan hastalarda bilişsel etkinliğe belirgin bir faydası olmadığı gözlenmiş olsa da, yakın zamanda yapılan bir meta analiz, mevcut çalışmaların zayıf metodolojik kalitesinden dolayı etkililiğini tesis etmek için daha ileri çalışmaların gerekli olduğunu belirtmiştir. Huperzin A'nın β-amiloid kaynaklı oksidatif hasara ve oksidatif stresi azaltmaya karşı nöroprotektif etkileri gösterdiği de bildirilmiştir (76).

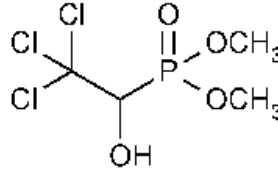


Şekil 2.11.Huperzin A'nın yapısı

Metrifonat

Metrifonat, şistosomiasis tedavisinde orijinal olarak kullanılan uzun etkili, geri dönüşümsüz bir ChEI'dir (Şekil 2.12.). Kısa süreli kullanımda yan etki riski düşük olmakla birlikte uzun süreli kullanım miyastenik krize benzer şekilde solunum felci ve nöromüsküler iletim disfonksiyonuna neden olmuştur. Bu nedenle FDA başvurusu durdurulmuş ve klinik çalışmalar faz III sırasında kesilmiştir. Bununla birlikte, ADAS-cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale) ve diğer önlemler

üzerinde sağlam bir terapötik etki göstermiştir. Ancak, metrifonat ve nöromusküler disfonksiyon arasındaki ilişki daha fazla araştırılıncaya kadar, metrifonat şu anda AH tedavisi için bir seçenek değildir (77).



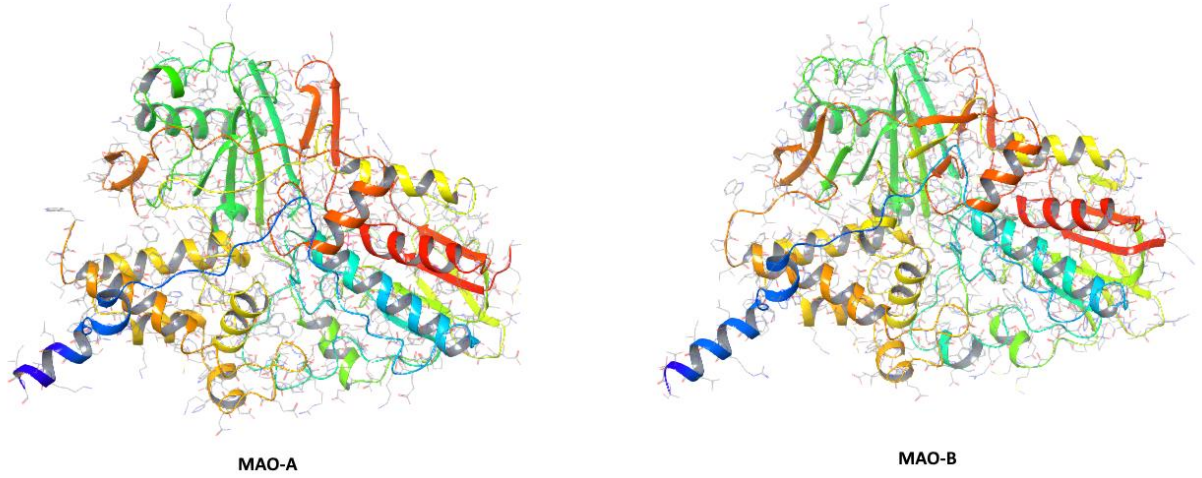
Şekil 2.12.Met trifonatin yapısı

2.1.4. Monoaminoksidaz Enzimleri ve Enzim İnhibitörleri

MAO enzimleri, serotonin, histamin, dopamin, noradrenalin ve adrenalin gibi endojen moleküllerinin arasında yer aldığı bir dizi monoamin molekülünün oksidatifdeaminasyonunda rol oynar. Bu reaksiyon sonucunda hidrojen peroksit, aldehit ve amonyak veya molekülün yapısına bağlı olarak değişen süstitüeamın türevi bir bileşik oluşur (78).

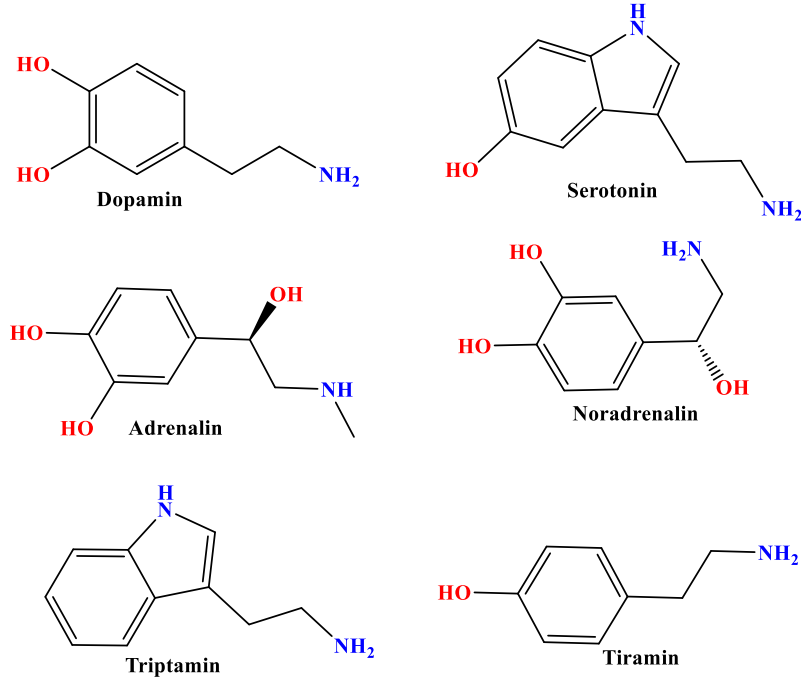
Çoğu memeli dokusunda bulunan MAO enzimi, MAO-A ve MAO-B olmak üzere iki izoenzime sahiptir. Bu iki izoenzimin flavin parçasının aktif bölgeleri aynı olmakla beraber, substrat, enzim, inhibitör gibi çeşitli ligand tanıma bölgeleri birbirinden farklıdır. MAO izoenzimlerinin farklı üç boyutlu yapıları, bu enzimlerin aynı substratlar ve inhibitörlerle farklı etkileşimlerine neden olmaktadır. Yapısında flavin adenin dinükleotit (FAD) enzimi bulunan MAO'ların kristal yapıları ilk olarak 2002 yılında aydınlatılmıştır. Bu tarihten yıllar sonra bu enzimlerin nörotransmitterlerin oksidasyonundan sorumlu olduğu keşfedilmiştir. Dinükleotid bağlanma bölgesi (Rossmann halkası), MAO izoenzimlerinin (MAO-A ve MAO-B) N-terminallerinin yanında bulunmaktadır. Bu bölüm, her iki MAO izoformunda adenin (AMP) bağlanma bölgesini göstermektedir. FAD bölgesi, kovalent bağlanma parçasını içeren C-terminalinin yanında yer almakta ve her iki izoformda da aktif bölge, protetik grubu FAD'nin eklendiği kısımdır. FAD bölgesinin amino asit dizisi, MAO-A ve -MAO-B'ye %94 oranında benzerlik göstermektedir. hMAO-A ve rMAO-A enzimleri% 90 oranında benzerlik gösterse de, aktif site yapısının konformasyon ve hacim açısından farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Her iki enzim arasındaki en belirgin fark, hMAO-A'nın bir

monomer olarak kristalize olurken, rMAO-A'nın bir dimer olarak kristalleşmesidir. MAO enzimlerinin aktif bölgeleri hidrofobiktir ve yapılarında flavin kofaktörünün önündedir. hMAO-A enziminin aktif kısmı, 210-2016 amino asitlerinin konformasyonunun eğrisidir ve tek parça bir hidrofobik boşluktan oluşmaktadır. Bu kısım, MAO-B'nin aktif alanından farklıdır. İki izoenzim yapısal olarak benzer olmasına rağmen, MAO-A'daki Phe208 / Ile335 ve MAO-B'deki Ile199 / Tyr326 geçit kalıntıları birbirinden farklıdır. Bu, bu izoenzimlerin substratı ve inhibe edici özelliklerinin spesifik olmasına neden olmaktadır (Şekil 2.13.) (79,80).



Şekil 2.13. MAO-A ve MAO-B'nin üç boyutlu yapıları

Bu durum ilk olarak, klorgilinin ve selegilinin bu izoenzimlere karşı farklı duyarlılık göstermeleri ve özgül olmaları ile anlaşılmıştır. Her iki izoenzim de adrenalin, nöroadrenalin, dopamin ve triptamini benzer şekilde okside etmektedir. Bununla birlikte, klorgilin düşük konsantrasyonlarda MAO-A'yı inhibe ederken, selegilin düşük konsantrasyonlarda MAO-B'yi inhibe etmektedir. Bu durum, MAO-A ve MAO-B izoenzimlerinin yapısında bir farklılık olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 2.14.) (80,81).



Şekil 2.14. Dopamin, serotonin, noradrenalin, adrenalin, triptamin ve tiramin moleküllerinin yapısı.

Yapısal farklılıklara sahip başka MAO izoenzim örnekleri de vardır. Örneğin, MAO-A beyin ve periferik dokularda bir imidazolin bağlayıcı enzim olarak bulunurken, karaciğerdeki MAO-B'nin yalnızca %10'u imidazolinlere bağlanabilmektedir. Bununla beraber, trombosit hücrelerindeki MAO-B enzimleri, imidazolinleri zayıf bir şekilde bağlamaktadır. MAO izoformlarının yapısının aydınlatılması ve ilgili inhibitörlerinin belirlenmesi, fizyolojik rollerinin daha iyi tanımlanmasına, nörotransmitterlerin etki mekanizmalarının anlaşılmasına ve sonuç olarak daha etkili ve daha spesifik MAO inhibitörlerinin tasarımına katkıda bulunmaktadır (78-80).

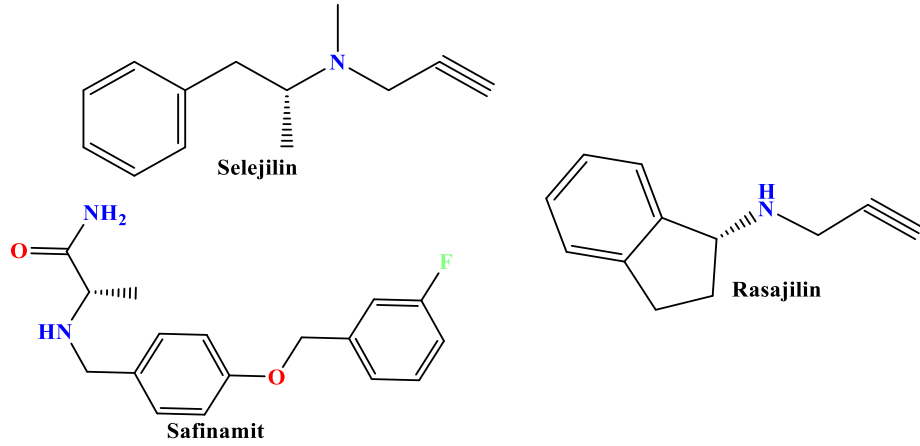
MAO-B inhibitörleri olan deprenil ve parjilini seçici bir geri dönüşümsüz MAO-A inhibitörü olan klorjilin, sitokimyasal olarak enzimle bire bir oranında izoenzimlerin aktif bölgesindeki kalıntılara bağlanmaktadır. Bu izoenzimlerin bağlanma bölgeleri özdeş olmasına rağmen, inhibitör seçiciliğindeki fark, bağlanma bölgelerinin yanındaki farklı tanıma bölgelerinin bulunma olasılığı ile açıklanabilir. MAO izoenzimi çoğunlukla sinir sistemi dokularında bulunur ve substratları, depresif bozuklukların fizyolojisinde önemli bir rol oynayan noradrenalin ve serotoninidir. Çalışmalar, MAO-A inhibitörlerinin noradrenalin ve 5-hidroksitriptaminin aracılık ettiği fizyolojik olayları ve etkilerini MAO-B inhibitörlerinden daha fazla güçlendirdiğini göstermektedir. Bu

nedenle, MAO-A inhibitörlerinin MAO-B inhibitörlerinden daha güçlü antidepresan aktivite göstermesi beklenir (82).

Tedavide kullanılan MAO-B İnhibitörleri

Mevcut MAO-B inhibitörlerinin antidepresan olarak geliştirilmesinin üzerinden yaklaşık 50 yıl geçmesine rağmen bu bileşikler ve inhibe ettikleri enzimler hala tam olarak açıklanmamıştır (83).

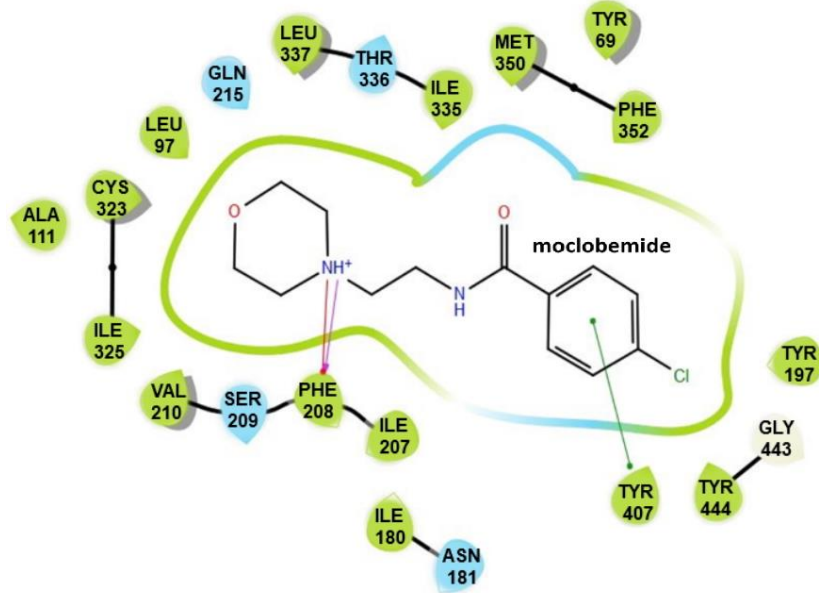
Antidepresan aktivitelerin yanı sıra proparjilamin, selejilin ve rasajilin gibi geri dönüşümsüz MAO-B inhibitörlerinin PH'nin tedavisinde de etkili olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.15). Bu bileşikler, *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında ve *in vivo* hayvan modelleme çalışmalarında, nöronlar üzerinde MAO inhibisyonu ile ilişkilendirilemeyen nöroprotektif etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu aktivitenin mekanizmasının Bcl-2 proteinleri ve protein kinaza bağımlı sinyal yollarıyla ilgili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca geri dönüşümlü MAO-A inhibitörü olan safinamidin, Parkinson hastalarında test edildiği ve hastalığa karşı etkili olduğu bildirilmiştir (84).



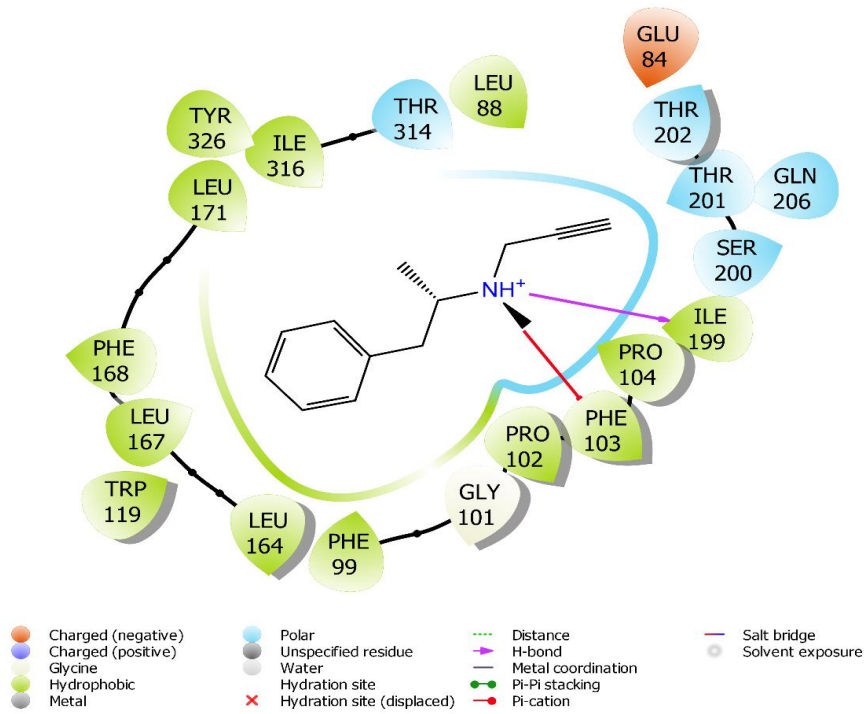
Şekil 2.15. Selejlin, rasaljin ve safinamitin kimyasal yapısı

MAO inhibitörlerinin klinik potansiyeli ve enzimin bağlanma bölgesinin yapısı hakkında detaylı bilgiler, bu moleküller ile ilgili çalışmaların artarak devam edeceğini göstermektedir. Uzun yıllar boyunca geliştirilen birkaç inhibitör molekül geliştirilmekle beraber, bu bileşiklerde MAO izoenzimleri için inhibisyon seçiciliğinin açıklanması mümkün olmamıştır. MAO izoenzimlerinin üç boyutlu yapıları aydınlatıldıktan sonra bu yapının protein grupları ve bağlantıları ortaya çıkarılmıştır (85). Sonrasında hMAO-

A'nın biri giriş, biri reaktif boşluk olmak üzere iki aktif boşluğa sahip olduğu anlaşılmış ve MAO-A'daki bu kavitenin MAO-B'ye göre daha kısa ve daha geniş olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.16. ve Şekil 2.17.) (86).



Şekil 2.16. Moclobemidin bağlanma özellikleri ve MAO-A'daki boşluklar içerisindeki konumlanması (86).

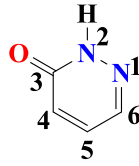


Şekil 2.17. Selegilin'in bağlanma özellikleri ve MAO-B'deki boşluklar içerisindeki konumlanması (86).

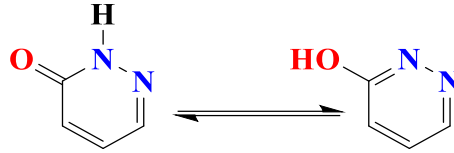
2.1.5. Piridazinon Halkası

Piridazin çekirdeği, farmakolojik olarak yeni, aktif bileşikler geliştirmek için çok yönlü bir yapıyı temsil etmektedir. Heterosiklik azot yapısı; geniş biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerin yapısına büyük ölçüde yer almakta ve ayrıca diğer farmakoforik grupları bağlamak için de kullanılabilir (87).

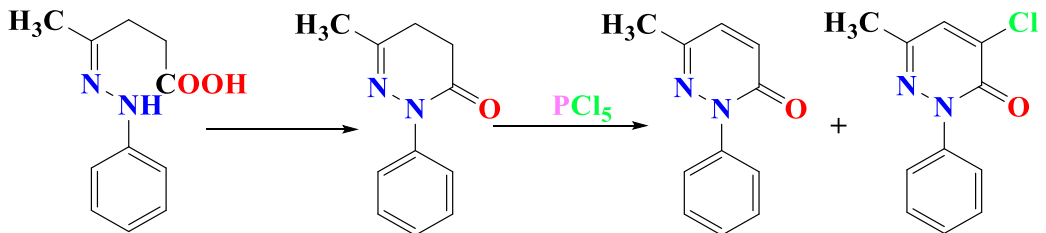
3-(2*H*)-piridazinon ve türevleri isimlendirilirken aşağıdaki gibi numaralandırma yapılır.



Üzerinde herhangi bir süstitüent bulunmayan 3(2*H*)-piridazinon türevlerinde azot atomundaki serbest hidrojen nedeniyle tautomer dengesi iki numaralı pozisyonda belirtilmektedir (88). 3(2*H*)-Piridazinonların IR ve UV spektral verileri değerlendirildiğinde çoğunlukla okso formunda oldukları görülmektedir (89).



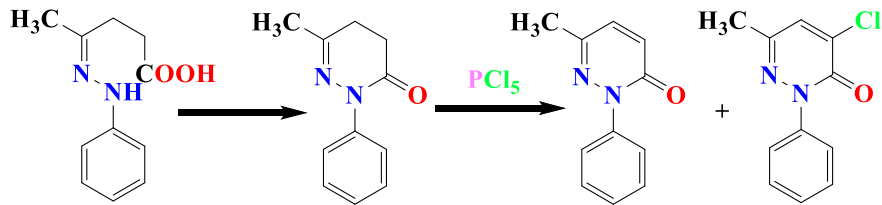
Halka azot atomunda süstitüent taşımayan 3(2*H*)-piridazinon bileşikleri, amonyak ve aminlerle güçlü bazlar veya tuzlar oluşturan zayıf asitlerdir. Çoğu piridazinon türevi, karbonil bileşiklerinden hareketle sentezlenmektedir. İlk piridazinon bileşiği 1886'da Fischer tarafından sentezlenmiş ve reaksiyon levulinik asitfenilhidrazondan hareketle gerçekleştirilmiştir (90).



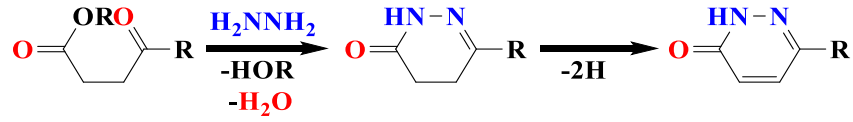
Piridazinon elde etmenin en yaygın yöntemlerinden biri, maleik asit türevlerinin veya bunların mono- ve di-bağlı türevlerinin hidrazin ile reaksiyonudur. Bu reaksiyonlarda yaygın olarak maleik anhidrit kullanılmasına rağmen, maleik asit, maleik asit esteri ve asit halojenür türevleri de kullanılmaktadır. 3(2*H*)-Piridazinon yapısı, piridazin türevlerinin modifikasyonu ile de elde edilebilir. Piridazin halkasındaki halojen veya alkoksil gruplarının hidrolizi ile karbonil yapısına sahip piridazinon bileşiklerine ulaşılır, ancak bu reaksiyonlarda tautomerik yapıların oluşabileceği bildirilmektedir (90,91).

Piridazinon Halkasının Sentez Reaksiyonları

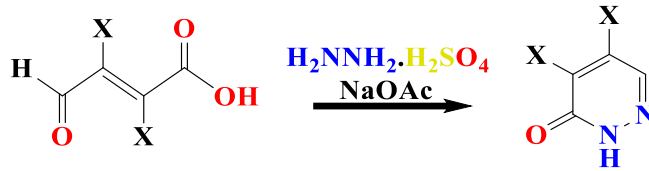
Genellikle 1,4-ketoasitler, 1,4-dikarboksilik asitler, 1,2-dikarbonil bileşikleri gibi karbonil türevlerinden yola çıkılarak sentezleri gerçekleştirilen piridazinon türevleri, halojen veya alkoksi grupları taşıyan piridazin halkalarının hidroliziyle de elde edilmektedir. Bu sentez yöntemlerinin ilki Fischer tarafından 1886 yılında gerçekleştirilen, levulinik asit fenilhidrazondan hareketle piridazinon halkasının elde edilmesidir (90). Aşağıdaki reaksiyon şemasına göre gerçekleştirilen reaksiyonun ilk aşamasında levulinik asit yapısındaki karboksilli asit kısmı ile, fenilhidrazonun fenile komşu azot atomu ile reaksiyonu sonucu halka kapanması ile 4,5-dihidropiridazinon türevine ulaşılmış, sonrasında fosforpentaklorür ile reaksiyonu sonucu piridazinon halkasına ulaşılmıştır.



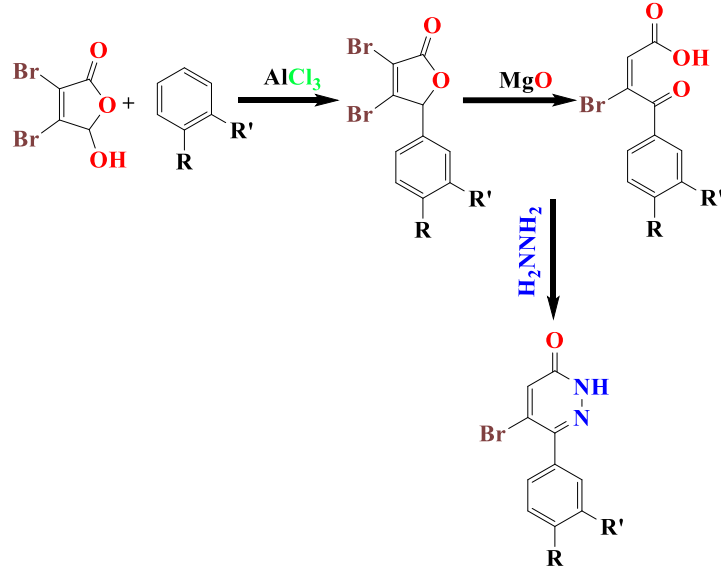
Bu ilk piridazinon bileşiğinin elde edilışinden sonra pek çok piridazinon bileşiği sentezlenmiş, bu çalışmalardan birinde 1,4-keto asitler veya bu asitlerin ester türevlerinin hidrazin ile siklokonenzasyon reaksiyonundan dihidropiridazinon bileşikleri elde edilmiş ve bir sonraki aşamada bu bileşiğin dehidrojenasyonu ile 6-sübstitüe-3(2*H*)-piridazinon bileşikleri elde edilmiştir (92).



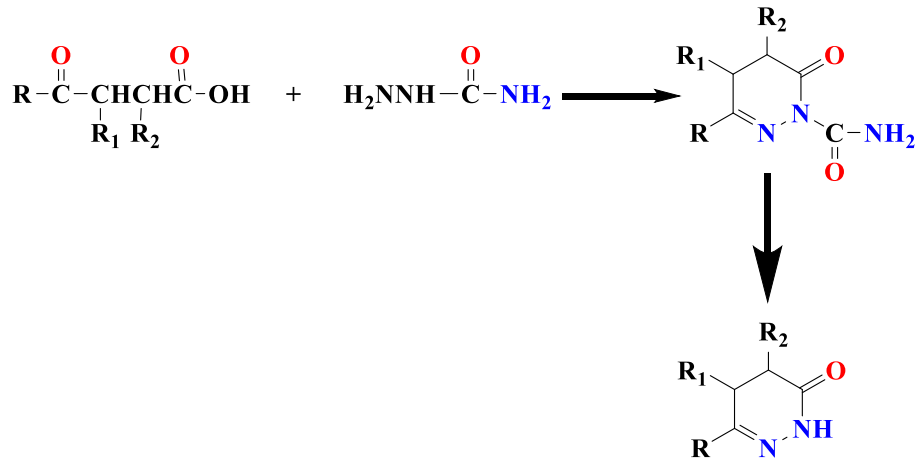
Bu şekilde 4,5-dihidro-3(2*H*)-piridazinon halkası elde edildikten sonra, 3(2*H*)-piridazinon halkasına ulaşmak için, çeşitli oksidan reaktiflerin kullanılmasıyla dört ve beşinci karbonlar arasınaçifte bağın ilave edildiği pek çok reaksiyon metodu bulunmaktadır. 4,5-dihidro-3(2*H*)-piridazinon halkasından farklı olarak aynı konumda çifte bağın bulunduğu süstitüentin de yer aldığı 4,5-dihalo-3(2*H*)-piridazinonların α,β -doymamış-1,4-aldehido asitler ve hidrazinin reaksiyonundan elde edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu yöntemle piridazinon sentezinde 4,5-dikloro-3(2*H*)-piridazinon, 4,5-dibromo-3(2*H*)-piridazinon, 2-fenil-4,5-dikloro-3(2*H*)-piridazinon bileşikleri kullanılmaktadır (91).



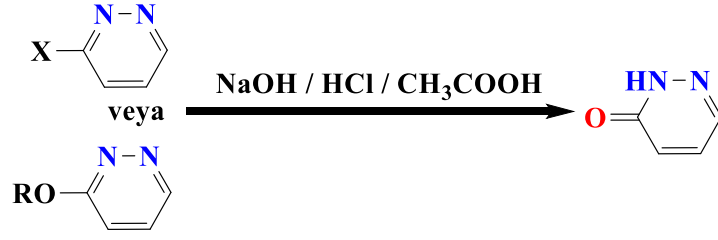
Piridazinon halka sentezinin gerçekleştirildiği bir başka çalışmada, ilk aşamada alüminyum triklorür katalizörlüğünde, FriedelCrafts reaksiyonuyla benzen ve mukobromik asitten 4-fenil-3,3-dibromokrotonolakton bileşiği elde edilmiştir. Reaksiyonun son basamağında ise etilenglikol içerisinde hidrazin hidrat ilavesiyle 6-aril-5-bromo-3(2*H*)-piridazinon bileşiği elde edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada bir de 4-fenil-3,3-dibromokrotonolakton bileşiğinin magnezyum oksit ile reaksiyonu sonucu α -konumundaki halojenin ortadan kalktığını ve *E*-akrilik asit türevlerine ulaştıklarını bildirmişlerdir. 5-bromo-3(2*H*)-piridazinon türevlerine ise metanol içerisinde akrilik asit türevlerinin hidrazin hidrat ile reaksiyonu sonucu ulaşımlardır (93).



Wolff-Kishner redüksiyonu ile 1,4-Keto asitler yapılarındaki arilsübstitüentlerine bağlı olarak piridazinona dönüşmektedir; ancak asit yerine ester yapısının olduğu durumlarda, bu dönüşüm gerçekleşmemektedir. Sübstitüe veya non-sübstitüe 1,4-ketoasitlerin semikarbazitlerle olan reaksiyonlarından da 3(2*H*)piridazinonlara ulaşılabilir. Bu reaksiyon sonucu *N*-karboksamido kısmı halka üzerinde kalabileceği gibi reaksiyon koşullarına bağlı olarak halkadan ayrılabilir (92).

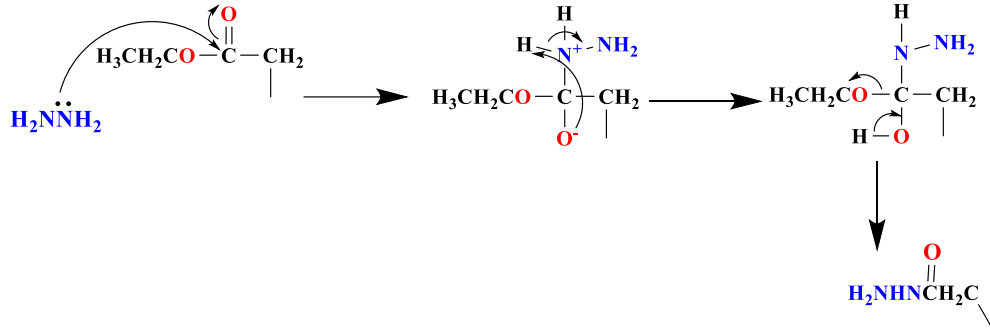


3(2*H*)-Piridazinon halkası piridazin türevi bileşiklerin reaksiyonundan da elde edilmektedir. Özellikle halojen veya alkoksil grubu taşıyan piridazin türevlerinde, bu yapıların hidrolizi ile laktam yapısında olan piridazinon halkasına ulaşılmaktadır. Bu yöntemle piridazinon eldesinde tautomerik yapıların oluştuğu da literatürde kayıtlıdır (68).



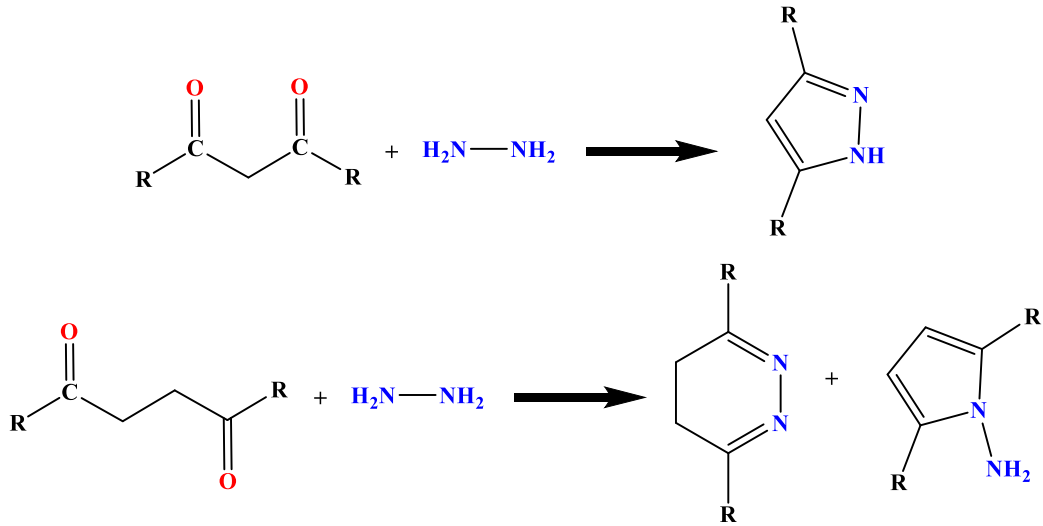
2.1.6. Hidrazon Yapısı

Hidrazon yapısındaki bileşikler, aldehit ve ketonların yapısında yer alan karbonil grupları ile bir primer amin yapısı taşıyan hidrazinlerle reaksiyonu sonucu elde edilirler.

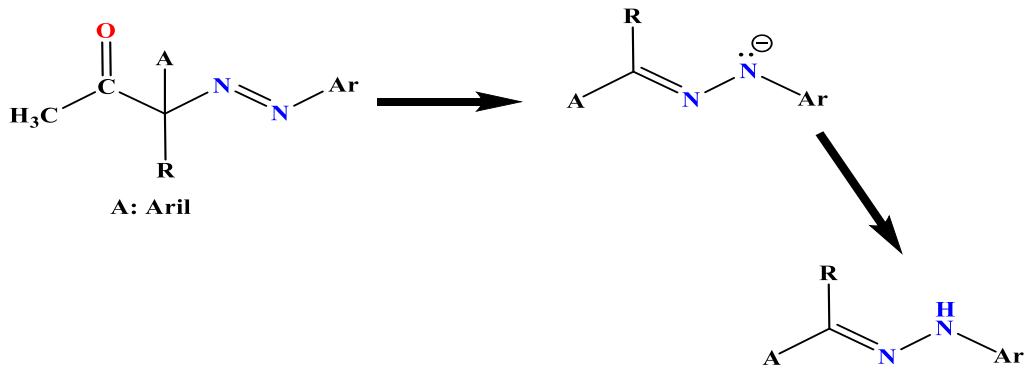


Yukarıdaki mekanizmada da gösterildiği gibi reaksiyon, hidrazin molekülünün azot atomlarından birinin ortaklanmamış elektronlarının, kısmi pozitif yükü yüklenmiş olan karbonil karbonuna atak yapması üzerine başlamaktadır. Sonrasında bir takım elektron hareketlerini takiben su molekülünün ayrılması ve sonrasında da oksijenli grubun ayrılmasıyla hidrazon yapısı oluşmaktadır. Bu yöntem pek çok aldehit ve keton türevinden hidrazon bileşiklerinin elde edilmesinde kullanılmaktadır (94).

Hidrazinler ve çeşitli sübstitüe diketonların reaksiyonu sonucu halkalı azinler oluşmaktadır. Bu sentez yönteminde, kullanılan diketonların yapısına da bağlı olarak pirazoller, dihidropiridazinleri ve N-aminopiroller oluşabilmektedir.



Hidrazon türevleri ayrıca, kararsız olan diazonyum bileşiklerinden de elde edilebilmektedir. Karbon atomuna bağlı azo grubu, karbon atomu üzerinde hidrojen atomu bulunması halinde kararsız alifatik azo bileşikleri oluşmakta ve bu nedenle bileşikler, bu yapının izomeri olan hidrazonlara tautomerize olmaktadır. Bu nedenle oluşan ürün azo bileşiği değil hidrazon türevidir. Japp-Klingemann reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon bir keton ya da karboksilik asit molekülünden hidrazon yapısının oluşumunu göstermektedir. Bu reaksiyonda kullanılan azo bileşiklerinde, alkil ya da karboksil grubu bulunmadığı durumlarda tautomerizm gerçekleşmeyip, alifatik azo bileşiği kararlı halde kalmaktadır (95).



2.1.7. Hidrazon ve Piridazinon Yapısı taşıyan Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri

Hidrazon yapısına sahip bileşikler üzerinde çok sayıda farmakolojik aktivite çalışması yapılmıştır ve yapılan çalışmalarda bu fonksiyonel grubu taşıyan bileşiklerin; analjezik, antiinflamatuvar, antiplatelet, antikolinesteraz, antibakteriyel, antifungal,

antitümoral aktivite gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (68,94,96,97). Yapıda yer alan hidrojen donörü ve azot akseptörü, hidrazon yapısı taşıyan bileşiklerin, bu grup aracılığıyla çeşitli enzimlerin aktif bölgelerindeki aminoasitlerle hidrojen bağı yapabilmesine olanak sağlamaktadır.

Benzer şekilde 3(2*H*)-piridazinon yapısına sahip bileşikler üzerinde de çok sayıda farmakolojik aktivite çalışması yapılmıştır ve yapılan çalışmalarda bu iskeleti taşıyan bileşiklerin; analjezik, antiinflamatuvar, antihipertansif, kardiyotonik, antiplatelet, antikolinesteraz, antibakteriyel, antifungal, antitümoral ve herbisit aktivite gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (86,87).

Örneğin; tedavide kullanılan piridazinon türevleri arasında, trombositagregasyonu inhibisyonlarının yanı sıra, antihipertansif aktiviteleri ve kardiyotonik özelliklerinden dolayı kardiyovasküler sistemde farklı etkilere sahip ilaçlar yer almaktadır (Tablo 2.1).

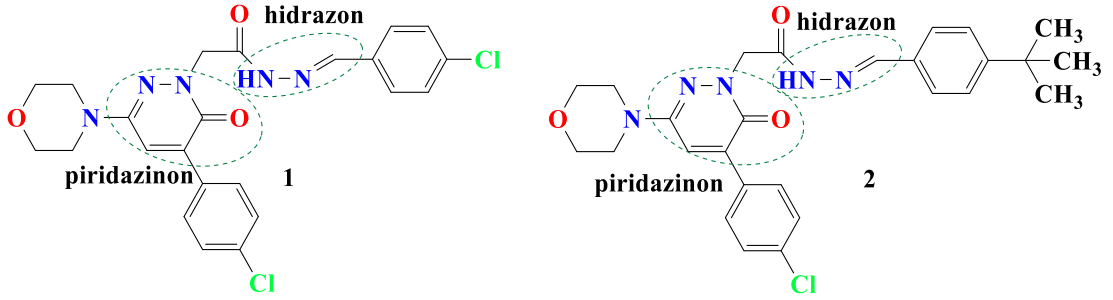
Tablo 2.1. Tedavide kullanılan piridazinon halkalı bazı ilaçlar

Formül	Aktif bileşik	Aktivitesi
	Zardaverin	Kardiyotonik
	Levosimendan	Vazodilatör
	Pimobendan	Vazodilatör
	Imazodan	Kardiyotonik
	Emorfazon	Analjezik
	Medazonamid	Antitussif

Antibakteriyel ve antifungaletkili hidrazon ve 3(2H)-piridazinonlar

Antimikrobiyal enfeksiyonlar, dünyanın birçok ülkesinde en öneml imortalite ve morbidite nedenlerinden biridir. Literatürde 3(2H)-piridazinon halkası taşıyan birçok bileşiğin antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiği bildirilmektedir.

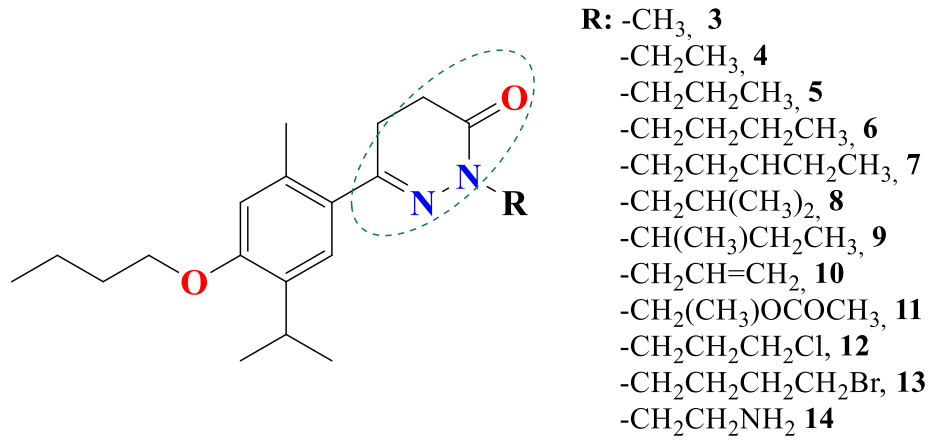
3(2H)-Piridazinon halkasının ikinci konumunda N'-benziliden-asetohidrazit grubu taşıyan bir seri bileşiğin sentezinin yapıldığı bir çalışmada, bileşiklerin antibakteriyel, antifungal ve antimikobakteriyel aktiviteleri araştırılmış, elde edilen bileşiklerden 2-[4-(4-klorofenil)-6-(morfolin-4-il)-3-okso-(2H)-piridazin-2-il]-N'-(4-tert-butilbenziliden)asetohidrazit(**1**) ve 2-[4-(4-klorofenil)-6-(morfolin-4-il)-3-okso-(2H)-piridazin-2-il]-N'-(4-klorobenziliden)asetohidrazit (**2**) moleküllerinin hem *Gr*(+) hem de *Gr*(-) bakterilere karşı yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada sentezlenen bileşiklerin çoğunun *E.coli*(ATCC 35218)'e karşı aktivite göstermediği de belirtilmiştir (Şekil2.18) (98).



Şekil 2.18. Bileşik 1 ve 2'nin yapısı

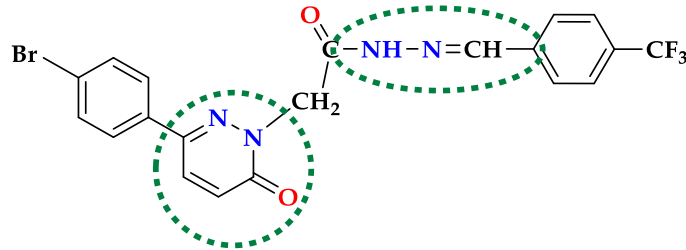
Nagle ve diğerleri, yapmış oldukları bir çalışmada sentezledikleri timol yapısını içeren piridazinon türevi bileşiklerin (**3-14**) antibakteriyel aktivitesini *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı agardilüsyon yöntemiyle belirlemişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda bu çalışmada bileşiklerin antifungal etkilerini de *A. niger* ve *P. Marneffe*'ye test etmişlerdir.

Siprofloksasin ve flukonazolile karşılaştırmalı yapılan bu çalışmada, tüm bileşiklerini antibakteriyel ve antifungal etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca, bileşiklerin glukozamin-6-fosfat sentaz ve *A. Nig*erfitaz enzimlerine karşı moleküler modelleme çalışmaları da yapılmış ve bileşiklerin reseptörlere yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği bildirilmiştir(Şekil 2.19) (99).

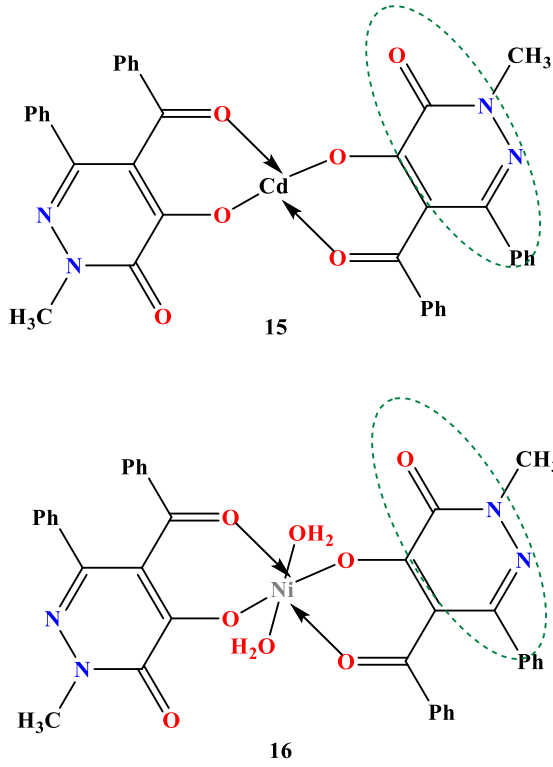


Şekil 2.19. Piridazinontimol komplekslerinin yapısı

3(2H)-piridazinon halkası taşıyan sekiz hidrazon türevinin sentezlendiği ve iki Gr (+) (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), iki Gr(-) bakterisi (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) ve iki mantar (*Candida albicans*, *Candida krusei*) suşu kullanılarak antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirildiği çalışmada sentezlenen bileşikler arasında, en iyi antibakteriyel aktiviteye sahip olan molekül funguslara karşı da 8 mg/ml dozda aktivite göstermiştir. Bu çalışmada, CYP51 inhibisyonlarının derinlemesine anlaşılmasını sağlamak için moleküler modelleme çalışmaları da yapılmış, elde edilen en aktif bileşiğin enzimlerin aktif bölgesine bağlanma profilleri, flukonazol gibi bilinen inhibitörlerle bağlanma etkileşimlerine benzerlikler göstermiştir (100).

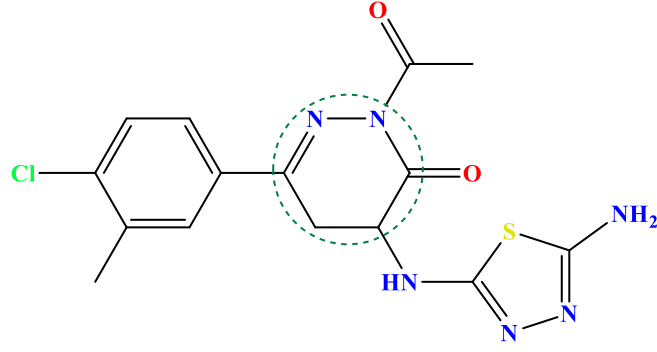


Sönmez ve diğerlerinin yapmış olduğu bir çalışmada piridazinon türevi metal kompleksleri sentezlenmiştir. 5-benzoil-4-hidroksi-2-metil-6-fenil-2H-piridazin-3-on'un çeşitli metal komplekslerinin hem Gr(+) hem de Gr(-) bakterilere ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirildiği bu çalışmanın sonuçlarına göre, Cd (II) (**15**) ve Ni (II) (**16**) komplekslerinin bir Gr(+) bakterisi (*S.aureus* ATCC 6538), bir Gr(-) bakterisi (*Pseudomonasputida* ATCC 12633) ve iki mantar hücrelerine (*C.albicans* ATCC 27541 ve *C.tropicalis* 1828) karşı yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 2.20) (101).



Şekil 2.20. Piridazinon metal komplekslerinin yapısı

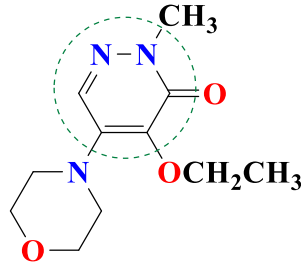
Sallam ve diğerleri, aza-Michael katım reaksiyonunu uygulayarak, dördüncü konumunda 1,3,4-tiyadiazolil halkası taşıyan yeni N-substüe 6-aril-piridazin-3(2H)on türevlerini sentezlemişlerdir. Bileşiklerin *in vitro* antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı bu çalışmalarda bileşiklerin bir çoğu umut verici biyosidal etkiler göstermiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, piridazinon halkasının dördüncü konumunda tiyadiazol ve N-2'de karbamoil veya tiyokarbamoil grubu taşıyan bileşiklerin, genellikle *P. Aeruginosa* ve *C. Albicans* dışındaki tüm mikrobiyal suşlara karşı aktif olduğu bildirilmiştir. Sentezlenen sübstüe piridazin-3(2H)-on serileri arasında ikinci konumda asetil taşıyan bileşik **17**, *S. Racemosum*'a karşı en iyi antibakteriyel aktiviteyi göstermiştir (Şekil2.21) (102).



Şekil 2.21.Bileşik17'nin yapısı

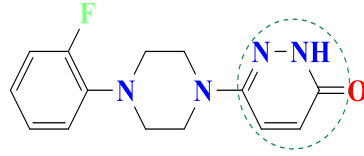
Analjezik ve antiinflamatuaretkili hidrazon ve 3(2H)-piridazinonlar

3(2H)-Piridazinon türevleri üzerinde yapılan analjezik ve antiinflamatuvar aktivite çalışmaları 19. ve 20. yüzyıllarda önem kazanmıştır. Pentoil ve Nandron ismiyle 1980'lerin sonunda analjezik ve antiinflamatuvar ilaç olarak piyasaya giren Emorfazon, 3(2H)-piridazinon halkası taşıyan bir bileşiktir (Şekil 2.22) (103).



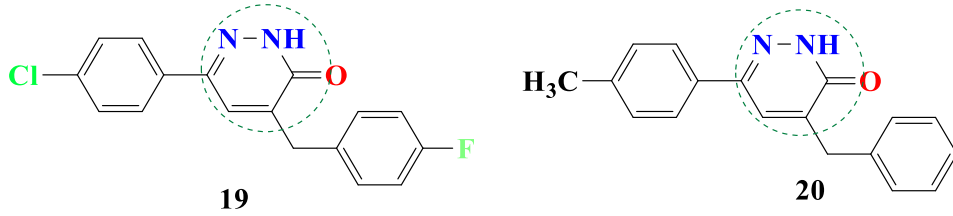
Şekil 2.22.Emorfazon'un yapısı

Literatürde 6-sübstü-3(2H)-piridazinon türevi bileşiklerin analjezik ve antiinflamatuvar aktivitelerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, on bileşikten oluşan 6-sübstü-3(2H)-piridazinon serisinde bileşiklerin analjezik ve antiinflamatuvar aktiviteleri, fenilbenzokinon kaynaklı kıvrınma testi (PBQ) ve karagen ile indüklenen pençe ödemi testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Bileşiklerin dördünün, ülserojenik etki ve akut toksisite olmaksızın 200 mg/kg dozda önemli bir analjezik etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, sentezledikleri 6- [4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon **18** bileşiğinin, standart ilaç olan indometazine benzer antiinflamatuvar aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Şekil 2.23) (104).



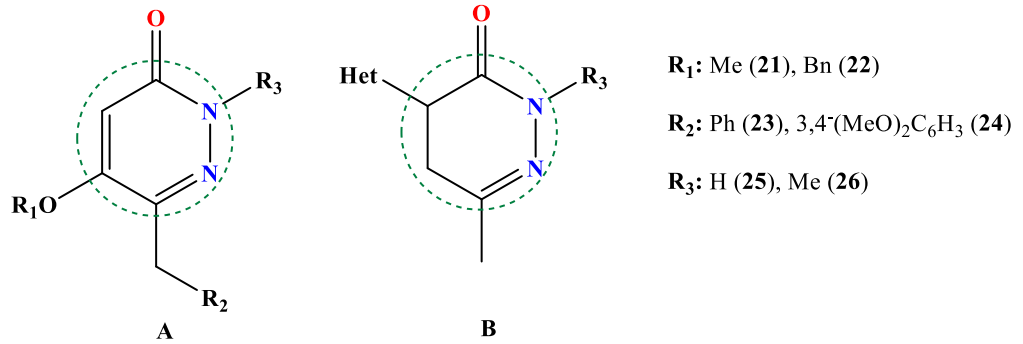
Şekil 2.23. Bileşik 18'in yapısı

Husain ve diğerleri, mevcut anti-enflamatuar ilaçlardan daha güvenli olarak sentezlediği piridazinon türevlerinin ayrıca analjezik, ülserojenik ve lipid peroksidasyon etkilerini de araştırmıştır. Anti-enflamatuar aktivite çalışmalarında, ibuprofen ile karşılaştırıldığında, 5-(4-florobenzil)-3-(4-klorofenil)-1,6-dihidro-6-piridazinon **19** ve 5-benzil-3-(4-metilfenil)-1,6-dihidro-6-piridazinon **20** bileşiklerinin en aktif olduğu bulunmuştur (Şekil 2.24). (105).



Şekil 2.24. Bileşik 19 ve 20'nin yapısı

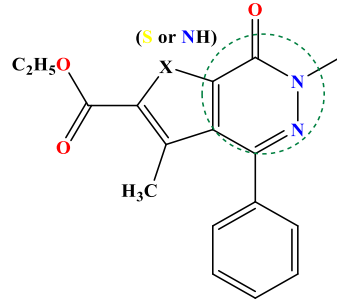
Barberot ve diğerleri potansiyel PDE4 (fosfodiesteraz 4) inhibitörleri olarak iki piridazinon türevi bileşik grubu (A ve B) geliştirmiş ve bunların anti-enflamatuar etkilerini değerlendirmişlerdir (Şekil 2.25) (106).



Şekil 2.25. A ve B türevlerinin yapısı

Araştırmacılar, 5-arilidenetronatlardan veya levulinik asit türevlerinden A grubu bileşikleri tasarlarken ana iskelet ealkoksi veya katekol kısımlarını eklemiştir. Bunun nedeni, dialkoksifenil içeren moleküllerin, PDE4'ün seçici inhibitörleri olması ve böylece, katalitik bölgenin arkasında bir glutamin kalıntısı ile hidrojen bağlarının

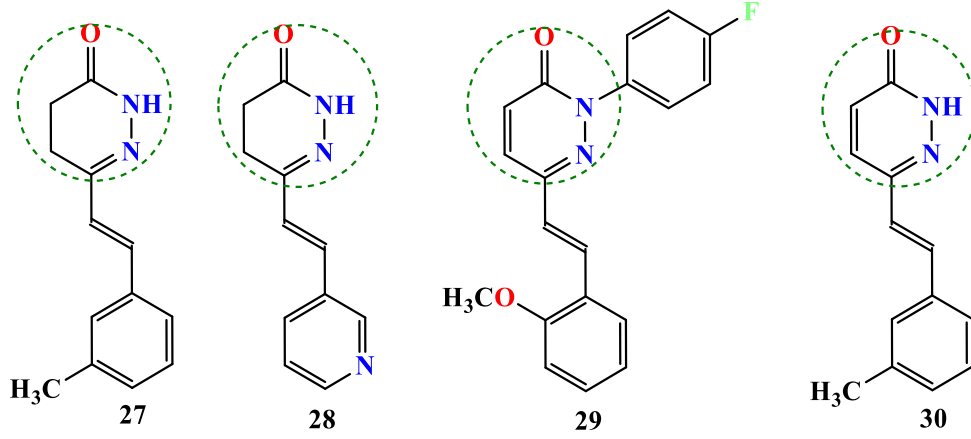
oluşturulmasının sağlanmasıdır. Araştırmacılar ayrıca, 1998 yılında *Pieretti ve Dal Piaz* tarafından yapılan PDE4 inhibitörü piridazinon türevlerine dayanan B grubu bileşiklerin tasarımını da gerçekleştirmişlerdir (106,107). Bu çalışmalarda, tiyofen ve izoksazol gibi heterosiklik çekirdeklerle kaynaşmış piridazinonlar, olası anti-enflamatuar ajanlar olarak geliştirilmiştir (Şekil2.26).



Şekil 2.26.Tiyofenhalkası taşıyan piridazinonların yapısı

Bu nedenle, *Barberot ve diğerleri*, PDE4 üzerindeki gücü ve seçiciliği etkileyip etkilemediğini incelemişler ve piridazinon türevlerinde yapı iskeleti ve heterosiklik kısım arasında bir dereceye kadar konformasyonel serbestlik olduğunu ve bu kısıtlı konformasyonların arasında 4,5-dihidropiridazinona ait B grubu bileşiklerin, ümit verici aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu bileşiklerin, PDE4 izoenzimlerine karşı seçici olduğunu bulmuş ve insan birincil polimorfonükleer hücreleri tarafından IL-8 üretimini azalttığını bildirilmişlerdir (106).

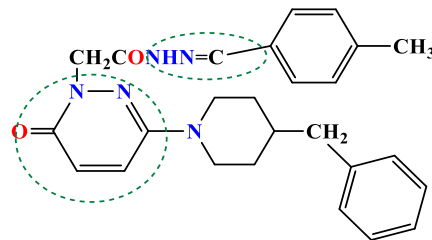
Eman ve diğerleri, bir etenil aracılığıyla altıncı konuma bağlanmış bir aril veya piridil kısmı taşıyan bir dizi piridazinon türevi bileşiği, COX-1 ve COX-2 izoformları üzerinde seçici inhibisyonunu belirlemek için tasarlayıp sentezlemişlerdir. Bileşiklerin dokuzu, nano-molar aralıkta IC₅₀ değerleri ve 4 ila 38 arasında değişen seçici indeksler (SI) ile son derece güçlü bir COX-2 inhibitör etki göstermiştir. Özellikle bileşik 27, 28, 29 ve 30 (Şekil2.27), 15.56-19.77 nM aralığında IC₅₀ değerleri ile en yüksek COX-2 inhibitör aktivitesi gösteren bileşikler seçilmiştir. Araştırmacılar, bu bileşiklerin selekoksibden 1,4-2,2 kat daha yüksek seçicilik gösterdiğini ve SI değerleri sırasıyla 24, 38, 35 ve 24 olduğunu bildirmişlerdir (108).



Şekil 2.27. Bileşik 27, 28, 29 ve 30'nin yapısı

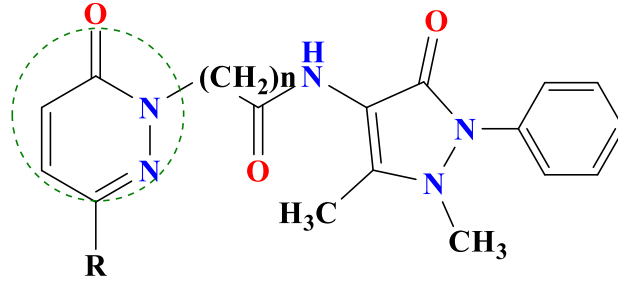
Araştırmacılar ayrıca, *in vivo* İrlanda yosunu kaynaklı sıçan pençe ödemi yöntemi ve ülserojenik ajan kullanarak bu dört bileşik için anti-enflamatuar aktivite testleride gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmaların sonunda, bileşik 28, 29 ve 30, hem indometazin hem de selekoksibile karşılaştırıldığında üstün anti-enflamatuar aktivite göstermiş ve bileşiklerin hiçbiri mide ülserojenik yan etkiler göstermemiştir. Daha ileri çalışmalarının bir sonucu olarak, bileşik 27'nin oral uygulamanın ikinci saatinde selekoksibe eşdeğer olduğu ve dördüncü saatte indometazine eşdeğer bir anti-enflamatuar aktivite sergilediği gözlemlenmiştir. Bileşik, indometazin ve selekoksibile karşılaştırıldığında *in vivo* şartlarda hafif hiperemi göstermiştir (108).

6-süstitüe-3(2H)-pidridazon-2-asetil-2-(süstitüe benzal) hidrazon türevlerinin bir serisinin sentezlendiği bir çalışmada bileşiklerin analjezik, antiinflatuar ve antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Yeni pidridazon türevlerinin analjezik aktivitesi fenilbenzokinon ile indüklenen kıvrınma testi, antiinflatuar aktivitesi karragenin ile indüklenen pençe ödemi testi ile değerlendirilmiştir. Antiinflatuar ve analjezik aktivitede süstitüentlere belirgin bir bağımlılık gözlenmiştir. Bileşiklerin farmakolojik çalışmaları benzalhidrazon yapısının fenil halkası üzerindeki atom veya kimyasal grupların modifikasyonunun analjezik ve antiinflatuar aktiviteyi etkilediğini doğrulamış, bileşik 31 en aktif molekül olarak seçilmiştir (Şekil 2.28) (109).



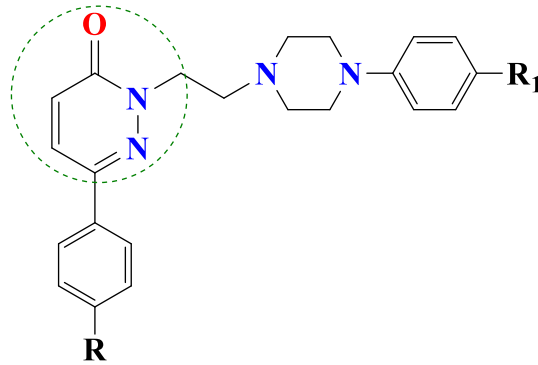
Şekil 2.28. Bileşik 31'in yapısı

Antipirin ve piridazinon türevlerinin sentezlendiği başka bir çalışmada, elde edilen bileşiklerin analjezik ve antiinflamatuvar aktiviteleri sırasıyla p-benzokinon kaynaklı bölünme testi ve karragenan kaynaklı pençe ödemi testi kullanılarak, sırasıyla aspirin ve indometazin referans ilaçlarına karşı değerlendirilmiştir. Bu ödem testi yöntemlerine karşı bazı bileşikler, referans ilaçlardan daha etkili bulunmuştur. Bileşiklerin yan etki potansiyelleri de araştırılmış ve ülserojenik yan etki bulunmamıştır, aktif bulunan bileşik 32 şekilde gösterilmiştir(Şekil 2.29) (110).



Şekil 2.29. Bileşik 32'nin yapısı

Laktam azotu içeren 4-sübstüefenilhidrazin türevi süstitüebileşiklerin sentezlendiği benzer bir çalışmada, p-benzokinon kaynaklı bölünme testi ve İrlanda yosunu ile indüklenmiş pençe ödemi test yöntemlerinde, aspirin referans ilaca karşı bileşiklerin analjezik ve antiinflamatuvar aktiviteleri çalışılarak değerlendirilmiş, bileşiklerin ülserojenik yan etkiler olmaksızın analjezik ve antiinflamatuvar etkileri olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.30) (111).



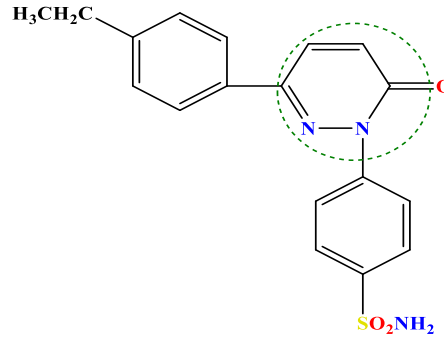
Şekil 2.30. Laktam azotu içeren 4-sübstüefenilhidrazin türevi süstitüebileşiklerin yapısı

Antikanser etkili hidrazon ve 3(2H)-piridazinonlar

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre kanser, dünya nüfusunun büyük bir bölümünü etkileyen en tehlikeli hastalıklardan biridir. Çok çeşitli kanserlerin tedavisi için, farklı

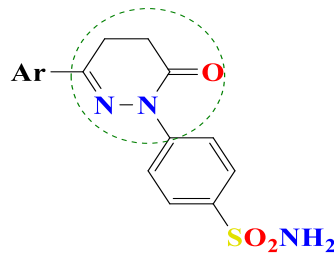
mekanizmalarla hareket eden ilaç molekülleri vardır. Bununla birlikte, bu ilaçların temel yan etkisiseçicilik eksikliğinin olması ve bu sebeple kanser hücresi gibi normal hücelere karşı da sitotoksik etkilere sahip olmalarıdır. Çeşitli araştırmacılar, piridazinon taşıyan antitümör ajanları sentezlemiş, sonuç olarak, piridazinon ana halkasına dayalı birçok antitümör etkili bileşik geliştirilmiştir (112,113).

Benzen sülfonamid yapısı taşıyan bir dizi yeni piridazinon türevi, *Rathish ve diğerleri* tarafından lösemi, küçük olmayan hücreli akciğer kanseri, kolon, melanom, yumurtalık ve göğüs kanseri gibi insan kanser hücre dizilerine yönelik antikanser aktivitelerini incelemek için tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, bileşik **33**'ün (Şekil 2.31), GI₅₀ değeri 0.1 mM'den düşük olan SR (lösemi) ve NCI-H522'ye (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) karşı kayda değer aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (114).



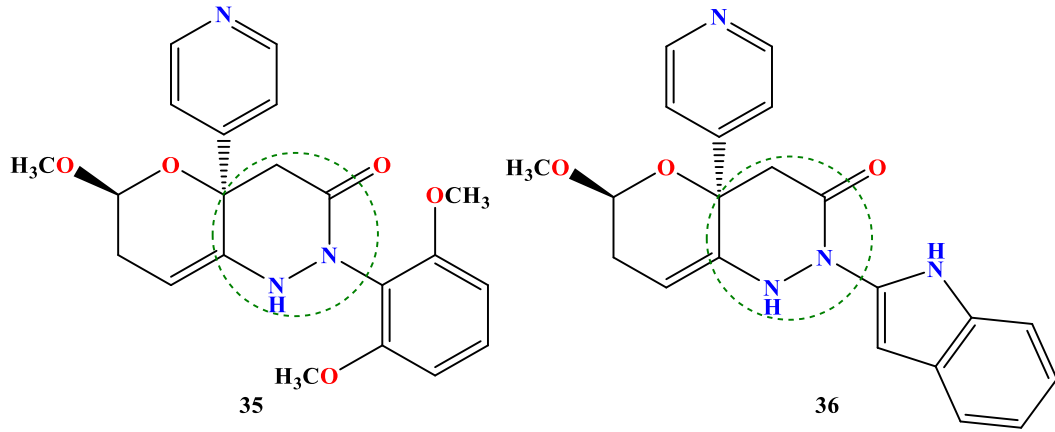
Şekil 2.31. Bileşik 33'ün yapısı

Ahmad ve diğerleri, β -aroilpropanoik asit ve 4-hidrazinobenzensülfonamidhidroklorürün reaksiyonundan bir dizi 6-aril-2-(p-sülfamilfenil)-4,5-dihidropiridazin-3 (2H)-on bileşiklerini (**34**) (Şekil 2.32) sentezlemiş ve HL-60 (TB) (lösemi), SR (lösemi), NCI-H522 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) ve BT-549 (meme kanseri)'ne karşı etkilerini araştırmışlardır. Bileşiklerin 2 μ M'den daha düşük konsantrasyonda dahi yüksek antitümöralaktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (115).



Şekil 2.32. Bileşik 34'ün yapısı

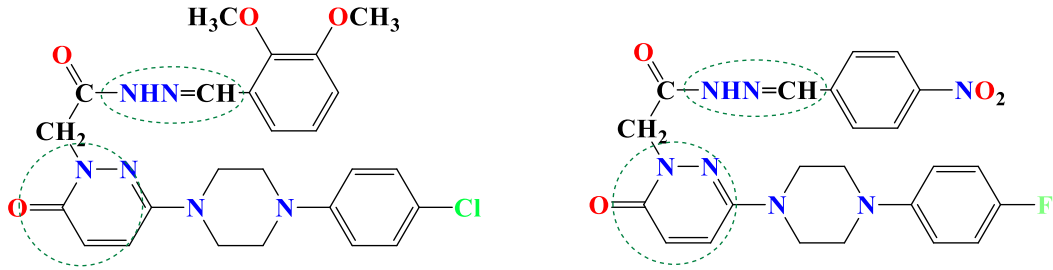
Al-Tel ve diğeri yaptıkları yeni biyolojik çalışmalarda, antikanser ajanları olarak tetrahidro-2H-pirano[3,2-c] piridazin-3(6H)-on türevlerini aktivite olarak değerlendirmişlerdir. Bileşik **35** ve **36** (Şekil 2.33), test edilen diğeri kanser hücrelerine kıyasla SK-BR-3'e karşı (sırasıyla IC50 0.21 ve 0.15 mM) yaklaşık 30 kat daha güçlü etkinlik göstermiş, ayrıca bu iki bileşik, SKBR-3 meme kanseri hücrelerine normal meme hücre hattı olan MCF10A'ya göre yaklaşık 295 kat daha yüksek sitotoksosite göstererek seçici ve güvenli olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.33) (116).



Şekil 2.33. Bileşik **35** ve **36**'nın yapısı

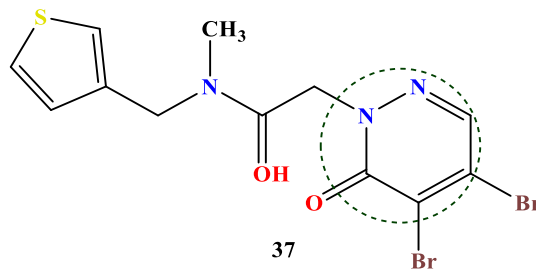
Ana yapı olarak piridazinon halkası ve hidrazon yapısı içeren 23 bileşiğin sentezinin yapıldığı bir çalışmada, bileşiklerin anti-proliferatif etkileri belirlenmiştir. Piridazinon halkasına bağlı piperazin ve ona bağlı süstitüe ve nonsüstitüe fenil halkası içeren bu türevlerin, insan diğeri fibroblastlarına (HGF'ler) karşı sınırlı bir sitotoksosite ve mide adenokarsinom hücrelerine (AGS) karşı iyi anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. MTT ve LDH testlerinin doksorubisinin pozitif kontrol olarak kullanılmasıyla yapıldığı bu çalışmada, ardışık analizler, en umut verici iki öncü bileşiğin, piperazine bağlı fenil halkasının 4-kloro ve 4-floro süstitüe türevler arasında yer alan ve benzalhidrazon yapısındaki fenil halkasında 4-nitro ve 2,3-metoksi içeren türevler olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 2.34). Bu bileşiklerin, antiproliferatif etkilerini, hidrojen peroksit salınımı ve hematoksilen-eozin boyamasından sonra ışık mikroskobu analizi ile ortaya çıkan morfolojik değişiklikler (hücre kabarması) gibi oksidatif stresi indükleyerek uygulayabildiği ortaya konmuştur. Ayrıca, bu en aktif bileşikler tarafından indüklenen apoptotik süreci daha fazla değerlendirmek için Bax ekspresyonu, akış sitometrisi ile ölçülmüş, elde edilen bulgular, kanserli hücre hatlarına karşı önemli

biyolojik etkiler göstermek için bu ana iskeletteki yapı-aktivite ilişkileri hakkında yeni bilgiler sunmuştur (29).



Şekil 2.34. Antiproliferatif piridazinon halkası ve hidrazon yapısı taşıyan bileşiklerin yapısı

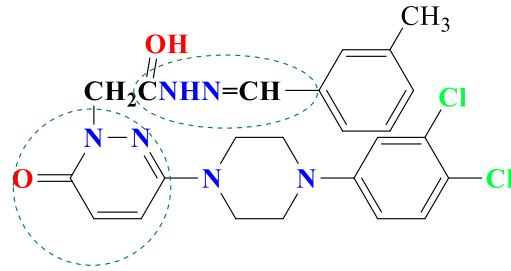
Gong ve diğerleri, hücre bazlı tarama modelleri kullanarak kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkili, yeni bir bileşik olan IMB5043'ü (**37**) (Şekil 2.35) sentezlemişler. Bu bileşik yapı olarak tiyofenille kondanse edilmiş bir piridazinon halkasıdır. Bu çalışmada, elde edilen bileşiklerin antitümör etkinliğini ve olası mekanizmalarını değerlendiren araştırmacılar, MTT analizinin çeşitli insan kanser hücre dizilerinin, özellikle hepatokarsinom SMMC-7721 hücrelerinin çoğalmasını engellediğini bildirmişlerdir. IMB5043'ün hücre döngüsünü bloke ettiği, hücre apoptozunu indüklediği ve G2/M tutuklaması ile SMMC-7721 hücrelerinin göçünü ve istilasını inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Aktivite sonuçları; kuyruklu yıldız testi ve γ -H2AX odak oluşumunun yanı sıra IMB5043'ün DNA hasarına neden olduğu ve fosforilasyon ile ATM, Chk2 ve p53'ü aktive ettiği bildirilmiştir (113).



Şekil 2.35. Bileşik 37'nin yapısı

Sinirsistemi etkileyen 3(2H)-Piridazinonlar

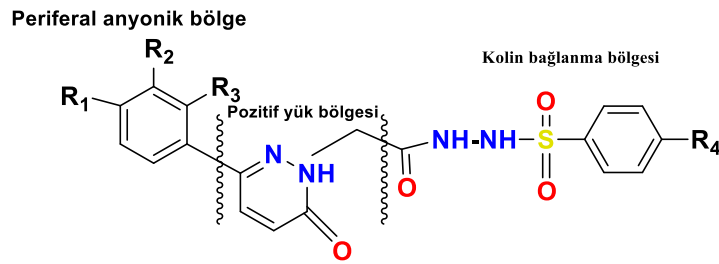
Kolinesterazların inhibisyonu, ilerleyici ve ölümcül bir nörolojik bozukluk olan Alzheimer hastalığını kontrol altına almak için etkili bir yöntemdir. Bir dizi 6-sübstü-3(2H)-piridazinon-2-asetil-2-(p-sübstübenzalhidrazon) türevleri, araştırmacılar tarafından tasarlanmış, sentezlenmiş ve bunların asetilkolinesteraz ve butirilkinesteraz üzerindeki inhibitör etkileri, güçlü ikili inhibitör olarak değerlendirilmiştir. Bileşikler çeşitli sübstü/non-süstübenzalhitlerin 6-[4-(3,4-diklorofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-il asetohidrazit ile reaksiyonu ile elde edilmiş ve antikolinesteraz aktiviteleri buna göre belirlemiştir. Ellman yöntemine göre; araştırmacıların yapmış oldukları bileşiklerden en aktif olan iki tanesi, 100 µg/ml dozda %75.52 ve %71.72 asetilkolinesteraz inhibisyonu etki göstermiştir. Öte yandan butirilkinesteraz üzerine daha yüksek aktivite gösteren ve farklı sübstüent içeren iki bileşik de, aynı konsantrasyonda sırasıyla %67.16 ve %62.03 inhibisyonla en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Araştırmacılar, her iki enzimi de inhibe eden güçlü ikili kolinesteraz inhibitörü bileşiklere de ulaşmışlardır. Moleküler kenetleme çalışmaları sayesinde araştırmacılar, inhibisyonda farklılık gösteren önceki türevlere kıyasla her iki enzim için bileşik 38'in inhibisyon mekanizmasını ve moleküler düzeyde reseptör afinitesini etkileyen faktörlere ilişkin öngörü elde etmeye çalışmışlardır (Şekil 2.36) (68).



Şekil 2.36. Bileşik 38'in kimyasal yapısı

Piridazinon çekirdeği üzerine yapılan çalışmalarda, yapıyı terapötik açıdan ilaçlara dönüştürmek için yapıya çok çeşitli farklı moleküller dahil edilmiştir. Oniki yeni 6-sübstü-3(2H)-piridazinon-2-asetil-2-(non-sübstü/4-sübstü benzenesülfonohidrazid) türevlerinin hazırlandığı ve bunların asetilkolinesteraz ve butirilkinesteraz üzerindeki inhibitör etkilerinin bakıldığı bir çalışmada, elde edilen

bileşikler güçlü ikili inhibitörler olarak değerlendirilmiştir. Bileşikler çeşitli substitute ve nonsübstüe benzene sülfonik asitlerin 6-sübstüefenil-3(2H)-piridazinon-2-il asetohidrazid ile reaksiyonu sonucu elde edilmiş ve *Ellman* yöntemine göre antikolinesteraz aktivitelerini belirlenmiştir. 100 µg/ml'de orta derecede inhibisyona sahip bileşiklerin elde edildiği bu çalışmada en aktif bileşikler, AChE ve BChE'ye karşısırasıyla %25.02 ve %51.70 inhibisyonla aktivite göstermiş ve ikili bir inhibitor olarak etkin olabileceği belirlenmiştir. Yine bu çalışmada, moleküler kenetleme çalışmaları yoluyla, bileşiklerin moleküler düzeyde her iki enzime karşı inhibisyon mekanizmasına ilişkin bilgiler sağlanmıştır (Şekil 2.37). (117).



Şekil 2.37. 6-sübstüe-3(2H)-piridazinon-2-asetil-2-(non-sübstüe/4-sübstüebenzensülfonohidrazid) türevi AChE ve BChE inhibitörleri

Hidrazid parçası taşıyan altı piridazinon türevinin sentezlendiği ve bunların insan monoamin oksidaz (hMAO) inhibitör aktivitelerinin belirlendiği bir başka çalışmada, *in silico* ADME tahmininde ve *in vitro* biyolojik tarama testlerinde moleküler kenetleme çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Bir bileşik dışında sentezlenen bileşiklerin çoğuseçici olarak hMAO-B'yi inhibe etmiş, bileşikler yarışmalı olarak hMAO-B'yi seçici ve geri dönüşlü olarak inhibe etmiştir. Yapılan bu seride, piperazin halkasına bağlı R grubu olarak 4-klorofenil halkasına sahip olan bileşik, en güçlü ($k_i = 0.022 \pm 0.001 \mu\text{M}$) ve seçici ($SI (K_i \text{ hMAO-A/hMAO-B}) = 206.82$) hMAO-B inhibitörü olarak bulunmuştur. Moleküler kenetleme çalışmaları, piperazin halkası üzerindeki fenil grubunun hMAO-B inhibe edici etki gücünü etkilediğini, fenil halkası üzerindeki 4-kloro sübstitüentinin hem inhibe edici etkiyi hem de bileşiğin bu serideki hMAO-B'ye karşı seçiciliğini arttırdığını ortaya çıkarmıştır. Kenetleme çalışmalarından elde edilen hesaplama değerlerinin, *in vitro* deneysel verilerle uyum içerisinde olduğu bulunmuştur. Bileşiklerin, 25 µM konsantrasyonda HepG2 hücreleri için toksik olmadığı bulunmuştur. ADME özelliklerinin *in silico* hesaplamaları, bileşiklerin iyi farmakokinetik profillere sahip olduğunu göstermiştir. AH ve PH tedavisinde yeni piridazinonların

3. MATERYAL VE METOT

3.1. KİMYASAL ÇALIŞMALAR

3.1.1. Materyal

Bileşiklerin sentezinde kullanılan 3-kloro-6-(4-(2-florofenil)piperazin-1-il)piridazin, literatür yöntemine göre tarafımızdan hazırlanmıştır. (119-122). İlk basamaktan sonra elde edilen başlangıç maddeleri olan 6-(4-(2-florofenil)piperazin-1-il)piridazin-3(2*H*)-on, etil 6-(4-(2-florofenil)piperazin-1-il)piridazin-3(2*H*)-on-2-il asetat ve 6-(4-(2-florofenil)piperazin-1-il)piridazin-3(2*H*)-on-2-il asetohidrazitde literatür yöntemlerinden uyarlanarak ilk defa tarafımızdan sentezlenmiştir (68,118,119).

Sentez çalışmalarında; 3,6-dikloropiridazin(Aldrich), 2-florofenilpiperazin(Merck), hidrazin hidrat (%99)(Aldrich), etil bromoasetat(Fluka), benzaldehit (Merck), 2-klorobenzaldehit (Fluka), 4-klorobenzaldehit (Fluka), 3-bromobenzaldehit (Fluka),4-bromobenzaldehit (Fluka), 2-florobenzaldehit (Aldrich), 4-florobenzaldehit (Aldrich), 2-metilbenzaldehit (AcrosOrganics), 4-metilbenzaldehit(Aldrich), 2-metoksibenzaldehit (Merck), 4-metoksibenzaldehit (Merck) ve 4-(dimetilamino)benzaldehit(Aldrich) kullanılmıştır.

3.1.2. Sentez Yöntemleri

Başlangıç Maddelerinin Sentezleri

3-Kloro-6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]piridazin

0.01 mol 3,6-dikloropiridazin ve 0.01 mol 2-florofenilpiperazin 15 ml etanol içerisinde, geri çeviren soğutucu altında, 6 saat ısıtılarak karıştırılır. Reaksiyon ortamı buzlu suya dökülür; süzülerek alınan çökelek etanolden kristallendirilerek saflaştırılır (68,120,121).

6-[4-(2-Florofenil)piperazin-1-il]-3(2*H*)-piridazinon

0.05 mol 3-Kloro-6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]piridazin 30 ml glasiyel asetik asit içerisinde, geri çeviren soğutucu altında, 6 saat ısıtılarak karıştırılır. Asetik asit uçurulur; kalan artık suda çözülür ve kloroform ile ekstre edilir. Organik faz susuz

Na₂SO₄ ile kurutulur ve sonrasında kloroform uçurulur. Kalan artık metanol/su karışımından kristallendirilerek saflaştırılır (68,120,121).

Etil 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-il asetat

0.01 mol 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon, 0.02 mol etil bromoasetat ve 0.02 mol potasyum karbonat 40 ml aseton içerisinde, geri çeviren soğutucu altında, 24 saat ısıtılarak karıştırılır. Karışım soğutulur, çöken tuz süzülür ve aseton uçurulur. Kalan artık n-hekzandankristallendirilerek saflaştırılır (68,120,121).

6-[4-(2-Florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-ilasetohidrazit

0.01 mol etil 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-il asetat 25 ml metanolde çözülür ve üzerine 3 ml hidrazin hidrat eklenir. Reaksiyon ortamı 3 saat oda sıcaklığında karıştırılır. Oluşan çökelek süzülür, suyla yıkanır, kurutulur ve metanoldenkristallendirilerek saflaştırılır (68,120,121).

Bileşiklerin Genel Sentezi

0.01 mol 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-il asetohidrazit ve 0.01 mol sübtitüe ve nonsübtitüebenzaldehit 15 ml etanol içerisinde, geri çeviren soğutucu altında, 6 saat ısıtılarak karıştırılır. Reaksiyon ortamı buzlu suya dökülür; çöken madde süzülür, kurutulur. Bileşikler monograflarda belirtilen uygun yöntemlerle saflaştırılır (68,120,121).

3.1.3. Analitik Yöntemler

Erime Derecesi Tayinleri

Bileşiklerin erime derecesi tayinleri Barnstead/Electrothermal (9100) erime derecesi tayin cihazı ile yapılmıştır. Verilen erime dereceleri düzeltilmemiş değerlerdir.

İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller

Materyal

Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) hazır plaklar kullanılmıştır. Çözücü sistemleri ve belirteçlerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler Merck firmasının ürünleridir.

Bileşiklerin kromatografik kontrollerinde Kloroform-Metanol (90:10) çözücü sistemi kullanılmıştır.

Yöntem

Sürüklenme şartları: Kromatografi tanklarına çözücü sistemleri konulduktan sonra 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek tankların doygunlukları sağlanmıştır. Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) hazır alüminyum plaklara sentez ürünleri ile bunların hazırlanmasında kullanılan başlangıç maddelerinin uygun çözücülerdeki çözeltileri tatbik edilmiş, R_f değerleri oda sıcaklığında 10 cm'lik sürüklenme sağlandıktan sonra tayin edilmiştir.

Lekelerin belirlenmesi: Kromatogramlarda sentez ürünlerine ve başlangıç maddelerine ait lekelerin belirlenmesinde UV ışığı (254 ve 365 nm), iyot buharı ve Dragendorff belirtecinden yararlanılmıştır:

Spektrometrik Kontroller

IR spektrumları

Bileşiklerin IR spektrumları, ATR tekniği kullanılarak, İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkez Laboratuvarı'nda, Perkin Elmer Spectrum One FTIR Spektrometre'sinde alınmış ve dalga sayısı (cm⁻¹) cinsinden değerlendirilmiştir.

¹H-NMRspektrumları

Bileşiklerin ¹H-NMR spektrumları, kloroform veya dimetilsülfoksit-d₆ (Merck)'deki yaklaşık %10'luk çözeltilerinden, İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkez Laboratuvarı'nda, BrukerAvonce 300 MHz Ultrashield™ NMR Spektrometre'sinde alınmış; δ skalasında değerlendirilmiştir.

¹³C-NMR Spektrumları

Bileşiklerin ¹³C-NMR spektrumları, dimetilsülfoksit-d₆ (Merck)'deki yaklaşık %10'luk çözeltilerinden İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkez Laboratuvarı'nda, BrukerAvonce 300 MHz Ultrashield™ NMR Spektrometre'sinde alınmış; δ skalasında değerlendirilmiştir.

Kütle spektrumları

Sentezlenen bileşiklerin HRMS spektrumları metanol içerisindeki çözeltilerinden pozitif iyon (ESI+) ve negatif iyon (ESI-) elektron spreyci iyonizasyon teknikleri ile Waters LCT Premier XE UPLC/MS TOFF sistemi ile MassLynx 4.1 yazılımı kullanılarak Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda alınmıştır.

3.2. BİYOLOJİK ÇALIŞMALAR

3.2.1. AChE İnhibitörü Aktivite Tayini

Bileşiklerin AChE inhibitörü aktivite tayinleri Suncheon National Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Enstitüsü'nde yapılmıştır.

Materyal

Enzim inhibisyonu çalışmalarında asetilkolinesteraz enzimi (ElectricelType-VI-S, EC 3.1.1.7, Sigma, St. Louis, MO, USA), asetiltiyokolin iyodür (sigma-aldrich), bütiriltiyokolin klorür (sigma-aldrich), 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit (Sigma, St. Louis, MO, USA), galantamin hidrobromür (Sigma, St. Louis, MO, USA) kullanılmıştır.

Yöntem

Bileşiklerin *in vitro* AChE enzim inhibisyonları Ellman metoduna göre yapılmıştır (123). Enzim kaynağı olarak *Electricel* AChE Type-VI-S, substrat olarak asetiltiyokolin iyodür, standart bileşik olarak ise galantamin kullanılmıştır. Anti-kolinesteraz aktivitenin belirlenmesi için de 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit (DTNB) kullanılmıştır.

140 µl 0.1 mM sodyum fosfat tamponu (pH 8.0), 20 µl DTNB, 20 µl test bileşiğinin çözeltisi ve 20 µl AChE çözeltisi çok kanallı mikropipetle 96 kuyucuklu kültür kabına eklenip 25°C'de 15 dakika inkübe edilmiş, sonrasında 10 µl asetiltiyokolin iyodür/bütiriltiyokolin klorür eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin klorürün hidrolizi, enzimlerin kataliziyle oluşan tiyokolinlerin DTNB ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonu oluşumunun Eliza cihazı kullanılarak 412nm dalga boyunda görüntülenmesiyle belirlenmiştir.

Ölçüm ve değerlendirmeler SoftmaxPro4.3.2.LS bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmiştir. AChEenzimlerinin inhibisyon yüzdeleri, kör numune ile kıyaslamalı olarak örneklerin reaksiyon oranlarının karşılaştırılmasıyla, aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir (26).

$$(E-S)/Ex100$$

E: Test örneği içermeyen enzimin aktivitesi.

S: Test örneği içeren enzimin aktivitesi.

Deneyler üç paralel halinde çalışılmış ve sonuçlar ortalama standart sapma değerleri ile verilmiştir.

3.2.2. MAO-A ve MAO-B İnhibitörü Aktivite Tayini

Bileşiklerin MAO-A ve MAO-B inhibitörü aktivite tayinleri Sunchon National Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Enstitüsü'nde yapılmıştır.

Materyal

Monoamine-oksidad Elabscience marka ELISA assay kiti kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak ölçülmüştür. Enzimler ve kimyasallar Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir.

Yöntem

Rekombinant insan MAO-A ve MAO-B inhibitör aktiviteleri, sırasıyla kinuramin (0.06 mM) ve benzilamin (0.3 mM) kullanılarak sürekli olarak test edilmiştir.

İkinci Yöntem

1 mM Vanilik asit, 500 µM 4-aminoantipirin ve 4 U.ml⁻¹ peroksidaz (Tip II) (0.2 M KP tamponu, pH 7.6 içinde hazırlanmış) içeren kromojenik (renkli) çözelti hazırlanır. Deney karışımı 167 µl kromojenik çözelti, 667 µl substrat çözeltisi (500 µM p-tiramin) ve 133 µl KP tamponu (pH 7.0) den oluşur. Karışım, enzim eklenmeden önce 37°C'de 10 dk preinkübe edilir; reaksiyon 100 µl enzim eklenerek başlatılır ve absorbans artışı 498 nm'de 60 dk takip edilir. Reaksiyonun ilk hızı, molar soğurma katsayısı olan 4654 M⁻¹.cm⁻¹ kullanılarak hesaplanır. Sonuçlar nmol.saad⁻¹.mg⁻¹ olarak ifade edilir (123). MAO-A ve MAO-B aktivitelerinin ölçümünde homojenat ikiye ayrılır. Substrat olarak p-tiramin (MAO-A için 500 µM; MAO-B için 2.5 mM) kullanılır ve bir izoform ölçülürken diğeri inhibe edilerek izoformların aktiviteleri tayin edilir. Tayinden önce

enzim, özgül MAO-A inhibitörü klorjilin veya özgül MAO-B inhibitörü parjilin (her ikisi de 50 µM) ile 1:100 oranında 37 °C’de 60 dk muamele edilir (son inhibitör derişimleri 0.50 µM olacak şekilde ayarlanır). Daha sonra total MAO aktivitesi tayin edilir.

MAO İçeren Homojenatların Yeni İnhibitörlerle Etkileşimi ve Kinetiğinin Tayini

Sentezlenen bileşiklerin MAO ile etkileşiminin incelenmesinde, aktivite tayininden önce homojenatlar bileşiklerle 37°C’de 0, 10, 20 ,30, 45 ve 60 dakika ön inkübasyona tabi tutulur. Bileşiklerin MAO izoformlarıyla etkileşim kinetikleri Lineweaver-Burk ikincil resiprokal grafiği, farklı substrat derişimlerinde 1/v nin 1/s’ye karşı grafiklenmesi ile hesaplanır. İnhibisyon sabitleri ve diğer kinetik veriler, non-regresyon analizi ve excel paket programı kullanılarak hesaplanır; IC50 değerleri (enzim aktivitesini %50 azaltan inhibitör derişimi) ön inkübasyon yapılmaksızın veya yapılarak ve doz-cevap eğrilerinin nonlinear regresyonu yardımıyla hesaplanır. İnhibisyonların tersinirliği (geri dönebilirliği) dilüsyon tekniğiyle incelenir. Son derişimin 10 katı derişimde hazırlanan enzim örnekleri 37°C’de farklı derişimdeki inhibitörlerle 60 dakika inkübe edilir. Paralel bir deneyde inhibitör yerine distile su kullanılarak; örneklerin tümü daha sonra 10 kez dilüe olacak şekilde ölçüm karışımına eklenir. Tüm setlerde MAO aktivitesi tayin edilir.

3.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Yapılan invitro çalışmalar sonucunda bileşiklerin MAO-B seçicilikleri ve inhibitör aktiviteleri yüksek çıktığından, MAO-B ile bileşikler arasındaki etkileşimler in siliko modelleme çalışmaları ile de desteklenmiştir. Moleküler kenetleme çalışmaları yüksek işlemci kapasitesine sahip iş istasyonu (Dell precision, 32 GB RAM, 16 CPU işlemci), lisanslı Gaussian 09 ve Gaussview 5.0 programları ve Schrödinger programları kullanılarak yapılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin çizimi ve pozitif kontrol X ve 3D optimizasyonları Gaussian 09 paket programı ile yapılacaktır. Optimizasyon yöntemi DFT yöntemi ile yapılmıştır (Yük: 0, Spin: singlet, solvation: none). Elde edilen optimizasyon çıktı dosyaları pdb uzantılı dosyalar olarak kaydedilmiştir. Protein molekülü, Protein Veri Bankası’ndan (www.rcsb.org) indirilerek insan MAO-B kristal yapıları (PDB kodu: 4A79) için kullanılmıştır (125). Makromolekül, Discovery studio

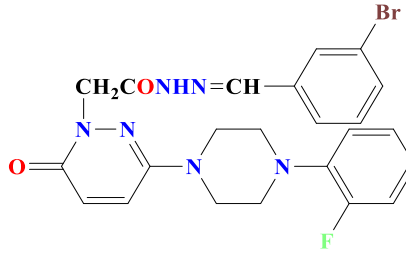
2016 programı ile ligand moleküllerinin ve su molekülünün keşfiyle yeniden yapılandırılmıştır. Yine aynı programda, aktif bölgedeki amino asitler belirlenmiştir. Enzim ve ligand molekülleri hazırlanmış ve Schrödinger programı ile bir grid haritası hazırlanmıştır. Yerleştirme parametreleri varsayılan olarak ayarlanarak, popülasyon büyüklüğü 300 olarak belirlenip yerleştirme yapılmıştır. En küçük bağlanma enerjisinin 10 farklı konformasyondan oluşan konformasyonunun enzim ligandı, elde edilen her bir molekül için oluşturulmuştur. Daha sonra bu kompleks Discovery studio ve ligand bağlanma bölgesindeki amino asitlerle etkileşimin 2D diyagramı ile incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. KİMYASAL ÇALIŞMALAR

Bu tez kapsamında AChE ve MAO-B inhibitörü aktiviteleri belirlenen 12 bileşikten 7 tanesi daha önceden antikanser aktiviteleri belirlenerek yayınlanmış olup 5 tanesi ilk defa bu tez kapsamında sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin erime noktası tayinleri yapılmış, yüzde verimleri belirlenmiş, ilk defa bu çalışmada sentezlenmiş olan 5 yeni bileşiğin yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS gibi çeşitli spektroskopik yöntemler ile kanıtlanmış olup bulgular aşağıda verilmiştir.

6-[4-(2-Florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-asetil-2-(3-bromobenzenal)hidrazon (T8)

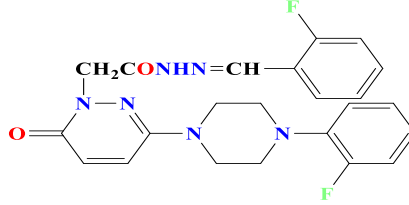


%90.08 verimle beyaz kristalize bir madde olarak elde edilen molekülün erime derecesi 207-208°C olarak bulunmuştur. Metanol/su karışımından kristallendirilerek saflaştırılan bileşik eterve suda çözünmezken, aseton, etil asetat, kloroform ve metanolde soğukta çözünmektedir. Bileşiğe ait ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS sonuçları aşağıdaki gibidir.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.18 (4H; t; CH₂N; b+b'), 3.45 (4H; t; CH₂N; a+a'), 5.31 (2H; s; CH₂CO), 6.96 (1H; d; *J* = 4.14 Hz, piridazinon H⁵), 6.97-7.87 (9H; m; fenil protonları, piridazinon H⁴), 8.58 (1H; s; -N=CH-) ve 10.80 (1H; s; -NH-N).
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz), δ 46.82 (2C, CH₂-N; b+b'), 50.05 (2C, CH₂-N; a+a'), 53.14 (1C; -N-CH₂-C=O), 115.13 (1C; =CH), 119.10 (1C; piridazinon C⁵), 122.96 (1C; 2-florofenil C⁴), 124.55 (1C; 3-bromofenil C⁵), 125.90 (1C; 2-florofenil C⁵), 126.05 (1C; 3-bromofenil C²), 129.72 (1C; 3-bromofenil C⁶), 130.26 (1C; piridazinon C⁴), 131.08 (1C; 2-florofenil C⁶), 134.22 (1C; 3-bromofenil C³), 142.99 (1C; 2-florofenil C³), 147.39 (1C; 3-bromofenil C¹), 149.13 (1C; 2-florofenil C¹), 154.40 (1C; 3-

bromofenil C⁴), 156.56 (1C; piridazinon C⁶), 158.53 (1C; 2-florofenil C²), 161.02 (1C; CH₂-N-C=O), 168.75 (1C; piridazinon C³); C₂₃H₂₂BrFN₆O₂ MS (ESI+) hesaplanan: 513.3714, bulunan: *m/e* 513.10526 (M⁺; 100.0%).

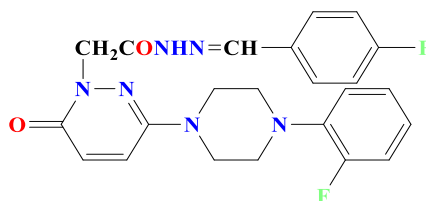
6-[4-(2-Florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-asetil-2-(2-florobenzal)hidrazon (T9)



%88.36 verimle beyaz kristalize bir madde olarak elde edilen molekülün erime derecesi 225-226°C olarak bulunmuştur. Metanol/su karışımından kristallendirilerek saflaştırılan bileşik suda çözünmezken, aseton, etil asetat, kloroform ve metanolde soğukta çözünmektedir. Bileşiğe ait ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS sonuçları aşağıdaki gibidir.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ; 3.19 (4H; t; CH₂N; b+b'), 3.47 (4H; t; CH₂N; a+a'), 5.31 (2H; s; CH₂CO), 6.94 (1H; d; J = 4.15 Hz, piridazinon H⁵), 6.95-7.49 (9H; m; fenil protonları, piridazinon H⁴), 8.96 (1H; s; -N=CH-) ve 10.69 (1H; s; -NH-N). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz), 46.63 (2C, CH₂N; b+b'), 50.07 (2C, CH₂N; a+a'), 53.29 (1C; -N-CH₂-C=O), 115.83 (1C; =CH), 116.14 (1C; piridazinon C⁵), 119.06 (1C; 2-florofenil C⁶), 122.90 (1C; 2-florofenil C⁵), 124.51 (1C; 2-florofenil C⁴), 125.84 (1C; 2-florofenil C⁵), 129.07 (1C; 2-florofenil C⁴), 129.15 (1C; piridazinon C⁴), 129.62 (1C; 2-florofenil C⁶), 129.70 (1C; 2-florofenil C³), 129.78 (1C; 2-florofenil C³), 131.09 (1C; 2-florofenil C¹), 143.43 (1C; 2-florofenil C¹), 147.80 (1C; 2-florofenil C²), 149.09 (1C; piridazinon C⁶), 154.54 (1C; 2-florofenil C²), 158.79 (1C; CH₂-N-C=O) ve 168.73 (1C; piridazinon C³); C₂₃H₂₂F₂N₆O₂ MS (ESI+) hesaplanan: 452.47, bulunan: 453.18594 *m/e* (M⁺; 100.0%).

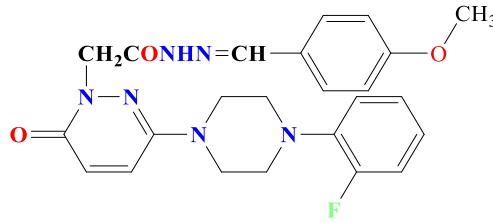
6-[4-(2-Florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-asetil-2-(4-florobenzal)hidrazon (T10)



%57.70 verimle beyaz kristalize bir madde olarak elde edilen molekülün erime derecesi 178-180°C olarak bulunmuştur. Metanol/su karışımından kristallendirilerek saflaştırılan bileşik suda çözünmezken, aseton, etil asetat, kloroform ve metanolde soğukta çözünmektedir. Bileşiğe ait ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS sonuçları aşağıdaki gibidir.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ; 3.17 (4H; t; CH₂N; b+b'), 3.46 (4H; t; CH₂N; a+a'), 5.30 (2H; s; CH₂CO), 6.84 (1H; d; *J* = 4.15 Hz, piridazinon H⁵), 6.85-7.83 (9H; m; fenil protonları, piridazinon H⁴), 8.08 (1H; s; -N=CH-) ve 10.68 (1H; s; -NH-N). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz), 46.84 (2C, CH₂N; b+b'), 50.07 (2C, CH₂N; a+a'), 53.29 (1C; -N-CH₂-C=O), 115.83 (1C; =CH), 116.05 (1C; piridazinon C⁵), 116.35 (1C; 4-florofenil C⁶), 122.90 (1C; 4-florofenil C⁵), 124.51 (1C; 4-florofenil C⁴), 125.84 (1C; 2-florofenil C⁵), 129.07 (1C; 2-florofenil C⁴), 129.62 (1C; piridazinon C⁴), 129.70 (1C; 2-florofenil C⁶), 130.68 (1C; 2-florofenil C³), 139.71 (1C; 4-florofenil C³), 147.80 (1C; 2-florofenil C¹), 149.09 (1C; 4-florofenil C¹), 154.54 (1C; 4-florofenil C²), 158.79 (1C; piridazinon C⁶), 162.52 (1C; 2-florofenil C²), 165.16 (1C; CH₂-N-C=O) ve 168.73 (1C; piridazinon C³); C₂₃H₂₂F₂N₆O₂ MS (ESI+) hesaplanan: 452.47, bulunan: 453.18583 *m/e* (M⁺; 100.0%).

6-[4-(2-Florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-asetil-2-(4-metoksibenzal)hidrazon (T11)

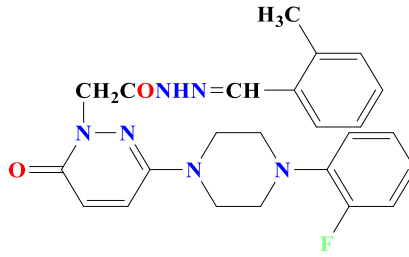


%75.32 verimle beyaz kristalize bir madde olarak elde edilen molekülün erime derecesi 148-150°C olarak bulunmuştur. Metanol/su karışımından kristallendirilerek saflaştırılan bileşik suda çözünmezken, aseton, etil asetat, kloroform ve metanolde soğukta çözünmektedir. Bileşiğe ait ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS sonuçları aşağıdaki gibidir.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.17 (4H; t; CH₂N; b+b'), 3.45 (4H; t; CH₂N; a+a'), 3.85 (3H; s; CH₃O), 5.30 (2H; s; CH₂CO), 6.88 (1H; d; *J* = 4.15 Hz, piridazinon H⁵), 6.89-7.79 (9H; m; fenil protonları, piridazinon H⁴), 8.64 (1H; s; -N=CH-) ve 10.55 (1H; s; -NH-N). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz), 46.83 (2C, CH₂N;

b+b'), 50.07 (2C, CH₂N; a+a'), 53.03 (1C; -N-CH₂-C=O), 55.38 (1C; -OCH₃), 114.07 (1C; =CH), 116.12 (1C; piridazinon C⁵), 119.07 (1C; 4-metoksifenil C⁶), 124.50 (1C; 4-metoksifenil C⁵), 125.77 (1C; 4-metoksifenil C⁴), 126.30 (1C; 2-florofenil C⁵), 128.82 (1C; 2-florofenil C⁴), 129.43 (1C; piridazinon C⁴), 130.14 (1C; 2-florofenil C⁶), 131.10 (1C; 2-florofenil C³), 139.63 (1C; 4-metoksifenil C³), 144.42 (1C; 2-florofenil C¹), 149.04 (1C; 4-metoksifenil C¹), 154.39 (1C; 4-metoksifenil C²), 156.83 (1C; piridazinon C⁶), 158.82 (1C; 2-florofenil C²), 161.35 (1C; CH₂-N-C=O) ve 168.56 (1C; piridazinon C³); C₂₄H₂₅FN₆O₃ MS (ESI+) hesaplanan: 464.49, bulunun: 465.20506 m/e (M⁺; 100.0%).

6-[4-(2-Florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-asetil-2-(2-metilbenzal)hidrazon (T12)



%72.21 verimle beyaz kristalize bir madde olarak elde edilen molekülün erime derecesi 244-245°C olarak bulunmuştur. Metanol/su karışımından kristallendirilerek saflaştırılan bileşik eter ve suda çözünmezken, aseton, etil asetat, kloroform ve metanolde soğukta çözünmektedir. Bileşiğe ait ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS sonuçları aşağıdaki gibidir.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.50 (3H; s; -CH₃), 3.17 (4H; t; CH₂N; b+b'), 3.45 (4H; t; CH₂N; a+a'), 5.30 (2H; s; CH₂CO), 6.92 (1H; d; *J* = 4.19 Hz, piridazinon H⁵), 6.92-7.77 (9H; m; fenil protonları, piridazinon H⁴), 8.37 (1H; s; -N=CH-) ve 10.58 (1H; s; -NH-N). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz), δ 20.16 (1C; -CH₃), 46.69 (2C; CH₂-N; b+b'), 50.10 (2C, CH₂-N; a+a'), 53.36 (1C; -N-CH₂-C=O), 116.13 (1C; =CH), 119.07 (1C; piridazinon C⁵), 122.87 (1C; 2-metilfenil C⁶), 124.54 (1C; 2-metilfenil C²), 125.78 (1C; 2-metilfenil C³), 126.24 (1C; 2-metilfenil C⁵), 127.47 (1C; 2-metilfenil C⁴), 129.96 (1C; piridazinon C⁴), 130.85 (1C; 2-florofenil C³), 131.48 (1C; 2-florofenil C⁴), 137.13 (1C; 2-florofenil C⁵), 143.70 (1C; 2-metilfenil C¹), 147.49 (1C; 2-florofenil C⁶), 149.71 (1C; 2-florofenil C¹), 156.98 (1C; 2-florofenil C²), 158.81

(1C; piridazinon C⁶) 163.96 (1C; CH₂-N-C=O) ve 168.57 (1C; piridazinon C³); C₂₄H₂₅FN₆O₂ MS (ESI+) hesaplanan: 448.49, bulunan: 449.21034 *m/e* (M⁺; 100.0%).

4.2.ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTE

Mevcut AChE ve MAO-B inhibitörü ilaçların AH tedavisindeki ümit verici etkilerinin değerlendirilmesinden yola çıkılarak hipotezi oluşturulan ve hazırlanan bu çalışmada, sentezi yapılan bileşiklerin AChE ve BChE inhibitör aktivite çalışmaları sonucunda bileşiklerin her iki enzime karşı da inhibitör etki göstermediği belirlenmiştir.

4.3.ANTİMONOAMİNOKSİDAZ AKTİVİTE

Sentezi yapılan bileşiklerin MAO-A ve MAO-B inhibitör aktivite sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Tez bileşiklerinin (T1-T12)rekombinant insan MAO-A ve MAO-B inhibisyonları.

Bileşikler	Artık aktivite (%)		IC ₅₀ (µM)		SI ^b
	MAO-A (10 µM)	MAO-B (1.0 µM)	MAO-A	MAO-B	
T1	96.6 ± 1.20	99.4 ± 0.85	-	7.68 ± 0.14	-
T2	24.6 ± 2.86	4.22 ± 0.85	4.29 ± 0.12	0.10 ± 0.035	42.9
T3	24.6 ± 0.97	3.01 ± 0.85	4.19 ± 0.27	0.039 ± 0.0028	107.4
T4	75.2 ± 4.70	6.00 ± 0.94	-	0.099 ± 0.0069	-
T5	84.0 ± 0.68	54.0 ± 2.83	-	1.68 ± 0.11	-
T6	20.7 ± 0.62	-15.3 ± 0.94	1.57 ± 0.80	0.013 ± 0.0016	120.8
T7	25.4 ± 6.92	57.8 ± 9.58	4.43 ± 0.29	0.87 ± 0.056	-
T8	73.3 ± 2.86	67.2 ± 9.58	-	2.67 ± 0.051	-
T9	35.2 ± 0.56	2.60 ± 0.74	6.76 ± 0.46	0.20 ± 0.0017	33.8
T10	33.7 ± 4.70	95.3 ± 6.70	7.35 ± 0.059	35.3 ± 0.39	0.21
T11	70.4 ± 8.50	61.1 ± 2.98	-	6.86 ± 0.37	-
T12	61.8 ± 1.65	17.9 ± 5.95	-	0.15 ± 0.021	-
Toloksaton			1.08 ± 0.025	-	
Lazabemid			-	0.14 ± 0.011	
Klorjilin			0.0070 ± 0.00070	-	
Parjilin			-	0.030 ± 0.00083	

^aSonuçlar, çift veya üçlü deneylerin ortalama ± standart hataları olarak ifade edilmiştir.

^bGösterilen seçicilik indeksi (SI) değerleri, MAO-B'nin MAO-A/IC₅₀'sinin IC₅₀'si olarak ifade edilmiştir.

Referans bileşikler için IC₅₀ değerleri, MAO-A veya MAO-B ile 30 dakika süreyle ön inkübasyondan sonra belirlenmiştir.

4.4. MOLEKÜLER MODELLEME

Tablo 4.2. MAO-A veya MAO-B ile **T3** ve **T6** etkileşimleri için yerleştirme puanı değerleri.

Bileşikler	Bağlanma Skorları (kcal/mol)	
	MAO-A	MAO-B
T3	-8.20	-9.45
T6	-8.43	-9.56

5. TARTIŞMA

AH, hastanın günlük faaliyetlerini gerçekleştirme yeteneğinde bozulma ile başlayıp, sonrasında farklı nöropsikiyatrik semptomlarla karakterize olan ölümcül bir nörodejeneratif bir hastalıktır. Fizyopatolojisi henüz tam bilinmemekle beraber, beyin hücrelerinin nedeni belirlenemeyen bir şekilde kaybolmasından kaynaklandığı düşünülmekte ve hastalığın oluşumu hakkında farklı hipotezler öne sürülmektedir. Bu hipotezlerden biri olan kolinerjik hipoteze göre, hastalığın asetikolin düzeyinin azalmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Fizyolojik olmayan biyogenamin seviyeleri, depresyon, anksiyete, migren, AH ve PH gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna sebebiyet vermektedir (1-5).

MAO ve AChE enzimleri beyinde ve periferik dokularda bulunan bu biyogenik aminlerin deaminasyonundan, dolayısıyla nörotransmitter seviyelerinin düzenlenmesinden sorumlu olan önemli enzimlerdir. Dolayısıyla, nörodejeneratif hastalıklarda bu enzimlerin inhibisyonuyla yapılan tedavi yaklaşımları mevcuttur. AH'de verilen kolinesteraz inhibitörleri mortaliteyi etkilememekle beraber hastanın yaşam kalitesinde ve hastalık evresinin stabilizasyonunda etkili olduğundan ve hastalığın erken evrelerindeki kognitif yetmezliği iyileştirebildiğinden tedavide kullanılmaktadır. Bununla birlikte MAO inhibitörleri nörodejeneratif ve nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle, MAO-A inhibitörleri depresyon tedavisinde kullanılırken, MAO-B inhibitörleri de PH'nin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca MAO-B inhibitörlerinin AH'nin tedavisinde etkili olabileceğine dair güncel araştırmalar da mevcuttur (19-21).

Son yıllarda hidrazon türevi bileşiklerin antitümoral, antibakteriyel-antifungal, antikonvülsan, analjezik, antiinflamatuvar, antiplatelet, antikanser etki gösterdikleri bildirilmiştir (22-28).

Bu tez kapsamında, yukarıdaki bilgiler ışığında, AChE ve MAO-B enzim inhibitörü etki göstermesini beklediğimiz, 6-sübstitüe-3(2H)-piridazinon-2-asetil-2-(sübstitüebenzalhidrazon)türevi 12 bileşiğin sentezi yapılarak invitro enzim inhibitörü aktiviteleri incelenmiştir. Benzalhidrazon türevlerinin sentezinde nonsübstitüebenzaldehytin yanı sıra farklı konumlarında kloro, bromo, floro, metil, metoksi ve disübstitüemetilamino sübstitüentleri taşıyan benzaldehyt türevleri kullanılarak bu grupların aktiviteye katkıları incelenmiştir.

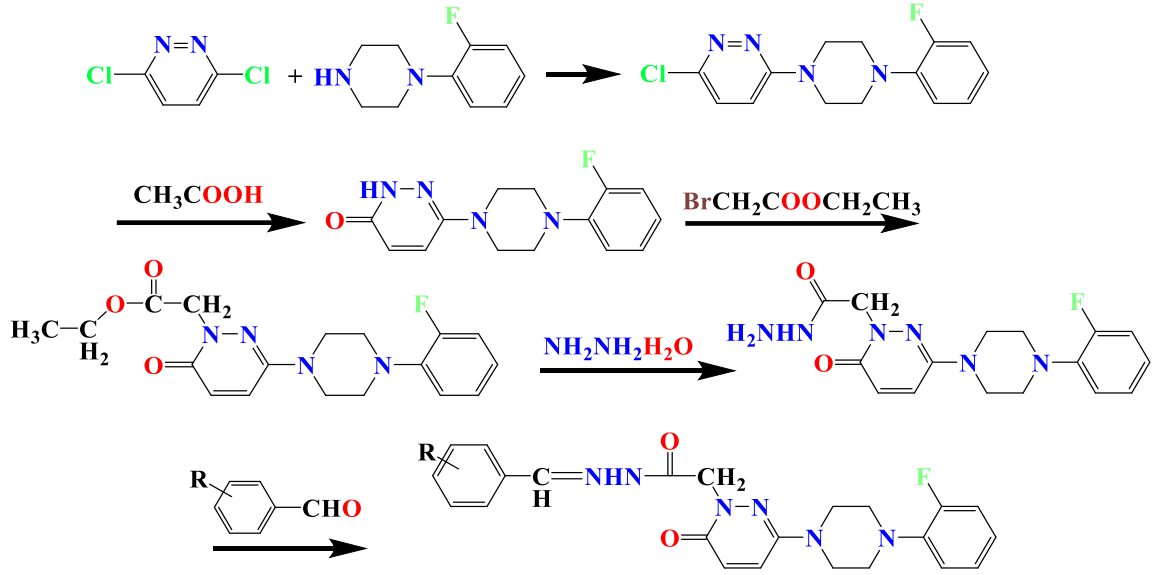
Elde edilen bileşiklerin yapıları, reaksiyon verimleri, erime dereceleri, molekül ağırlıkları ve kapalı formülleri Tablo 5.1.'de verilmektedir.

Tablo 5.1. Sentezi yapılan bileşiklerin yapıları, reaksiyon verimleri, erime dereceleri, molekül ağırlıkları ve moleküler formülleri

Bileşik	R	Verim (%)	Erime derecesi (°C)	MA mg/ml	Moleküler formül
T ₁	H	79.90	226-228	434.48	C ₂₃ H ₂₃ FN ₆ O ₂
T ₂	4-CH ₃	78.15	198-200	448.49	C ₂₄ H ₂₅ FN ₆ O ₂
T ₃	2-Cl	73.19	203-205	468.91	C ₂₃ H ₂₂ ClFN ₆ O ₂
T ₄	4-Cl	91.21	192-194	468.91	C ₂₃ H ₂₂ ClFN ₆ O ₂
T ₅	4-Br	85.69	209-211	513.36	C ₂₃ H ₂₂ BrFN ₆ O ₂
T ₆	2-OCH ₃	77.45	239-241	464.49	C ₂₄ H ₂₅ FN ₆ O ₃
T ₇	4-N(CH ₃) ₂	68.77	237-239	477.53	C ₂₅ H ₂₈ FN ₇ O ₂
T ₈	3-Br	90.08	207-208	513.36	C ₂₃ H ₂₂ BrFN ₆ O ₂
T ₉	2-F	88.36	225-226	452.47	C ₂₃ H ₂₂ F ₂ N ₆ O ₂
T ₁₀	4-F	57.70	178-180	452.47	C ₂₃ H ₂₂ F ₂ N ₆ O ₂
T ₁₁	4-OCH ₃	75.52	148-150	464.49	C ₂₄ H ₂₅ FN ₆ O ₃
T ₁₂	2-CH ₃	72.21	224-245	448.49	C ₂₄ H ₂₅ FN ₆ O ₂

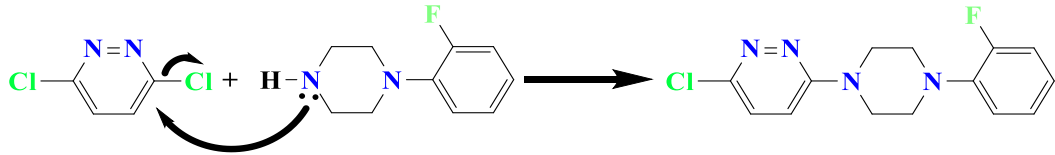
5.1. Sentez ve Yapı Aydınlatma Çalışmaları

Bu tez kapsamında elde edilen bileşiklerin 5 tanesi ilk defa bu çalışmada sentezlenmiş olup, bileşiklerin sentez basamakları aşağıdaki şemada gösterilmektedir.

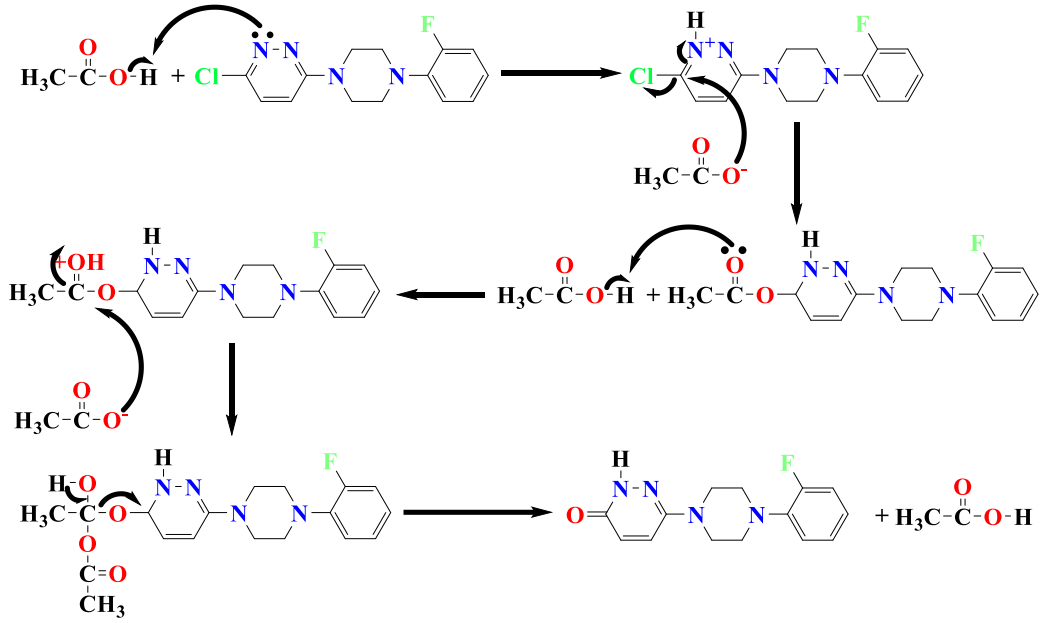


Başlangıç Maddelerinin Sentezi

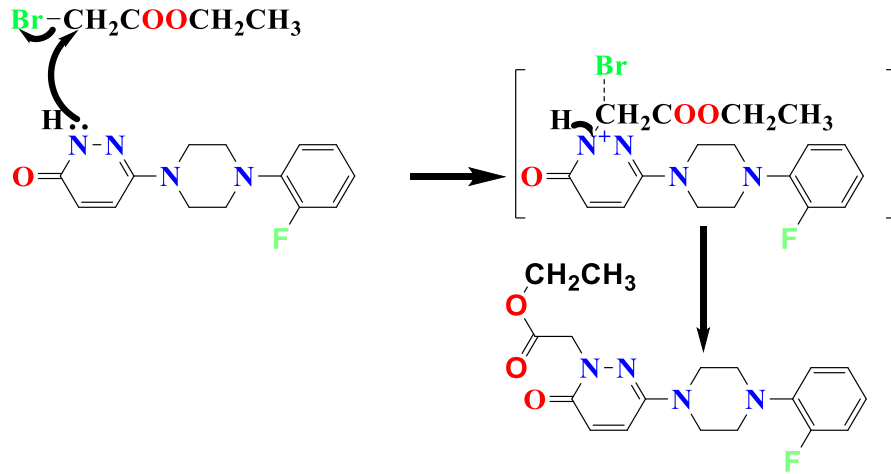
AChE ve MAO-B inhibitörü olarak tasarlanan sonuç moleküllerine ulaşmak için senteze ticari olarak temin edilen 3,6-dikloropiridazin ve 2-florofenilpiperazinin reaksiyonundan başlanmıştır. Literatür yöntemine göre, etanol içerisinde 6 saatlik reflüks işlemiyle gerçekleştirilen senteze ait reaksiyon mekanizması aşağıda gösterilmektedir (68,120,121).



Bu reaksiyon sonucunda elde edilen 3-kloro-6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]piridazin bileşiğinin glasiyel asetik asit içerisinde 6 saat boyunca ısıtılması ile hidrolizi sonucu % 87 verimle 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon molekülüne ulaşılmıştır(68,120,121). Bu reaksiyon için önerilen mekanizma aşağıdaki şemada belirtilmiştir.

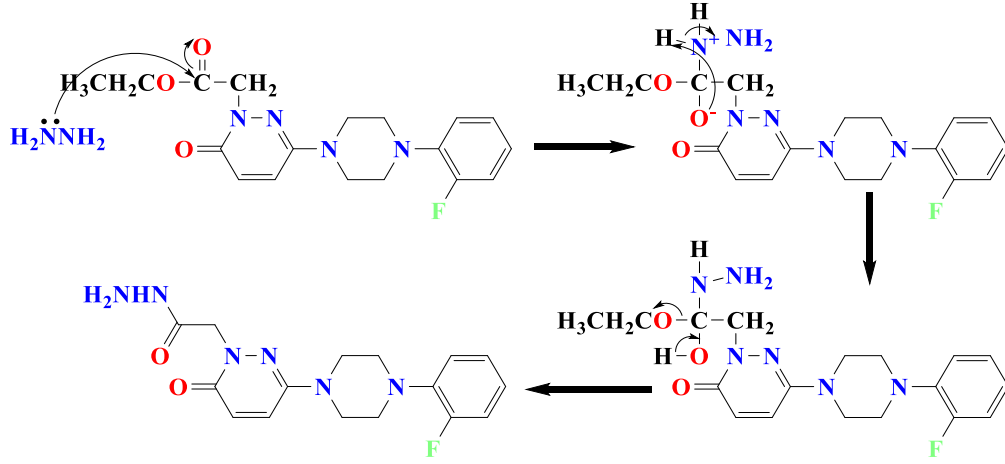


Bir sonraki aşama olan asetat türevinin sentezi, piridazinon halkasının 2. konumundaki azot atomuna ait ortaklanmamış elektronların S_{N}^2 reaksiyon mekanizmasıyla, etil bromoasetatın bromu bağlı karbonuna atak yapmasıyla gerçekleşir. Piridazinon halkasının 2. azotu, potasyum karbonat varlığında oluşan bazik ortamda nükleofil hale geçer ve bromun elektron çekici etkisiyle elektronca fakirleşen karbon atomuna nükleofilik atak yapar. Reaksiyon için önerilen mekanizma aşağıdaki gösterilmektedir.



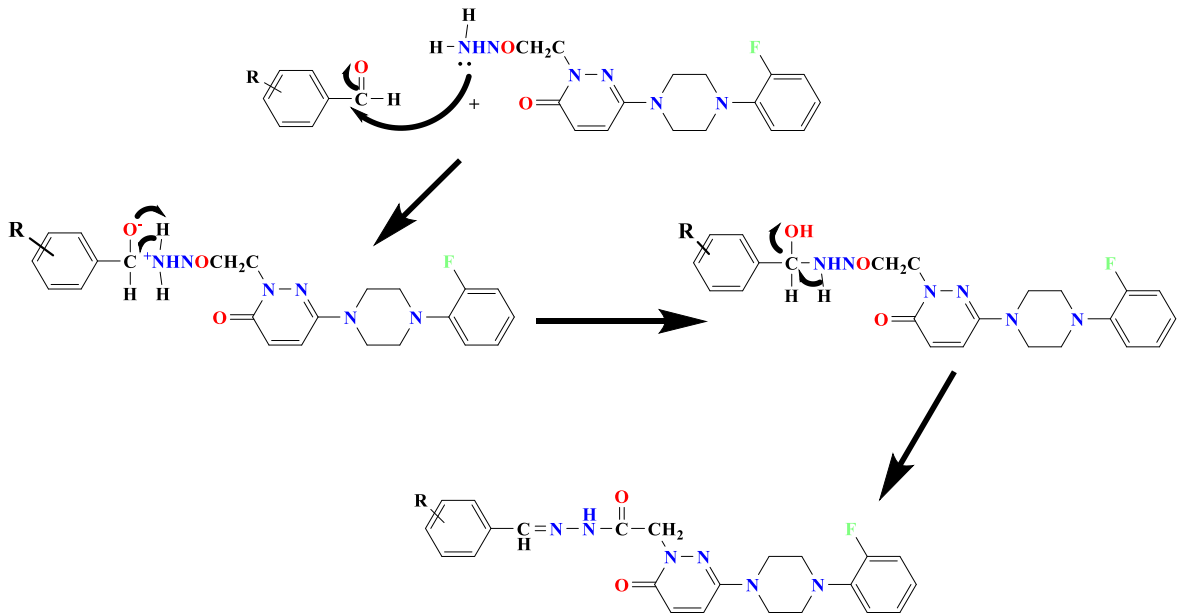
Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen sonuç bileşiklerine ulaşmadan önce elde edilen son basamak başlangıç maddesi olan 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-il asetohidrazit ester türevi ile hidrazin hidratın reaksiyonu sonucunda ulaşılmıştır. Hidrazinhidrat nükleofilinin karbonil karbonuna atak etmesiyle önce

katım reaksiyonu, ardından molekülden alkolün ayrılmasıyla karbon ile oksijen arasında çifte bağ oluşarak eliminasyon reaksiyonu oluşur. Reaksiyon için önerilen mekanizma aşağıda gösterilmektedir.



Sonuç Bileşiklerinin Sentezi

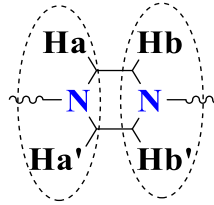
Son basamak başlangıç maddesi olan 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-ilasetohidrazitin süstitüe ve nonsüstitüe benzaldehit türevleriyle reaksiyonundan sonuç bileşiklerine ulaşılmıştır. Bir önceki sentez basamağında da olduğu gibi ilk önce, hidrazin azotunun serbest elektronlarının, benzaldehit karbonilinin karbonuna nükleofilik atağıyla katım reaksiyonu, sonraki aşamada ise yapıdan su çıkışıyla karbon-azot çifte bağının olduğu eliminasyon reaksiyonu gerçekleşmektedir (121). Aşağıda verilen mekanizmaya göre elde edilen bu bileşikler bulgular bölümünde yer alan uygun kristalizasyon çözücülerini ile kristallendirilerek saflaştırılmışlardır.



Spektral Analizlerle Yapıların Aydınlatılması

Tez kapsamında elde edilen sonuç bileşiklerinin yapıları, saf olarak katılaştırıldıktan sonra $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve kütle spektroskopisi yöntemleriyle aydınlatılmıştır.

Elde edilen bileşiklerin yapısında yer alan piridazinon halkasının 4. konumundaki hidrojen protonu 7.34-7.58 ppm aralığında, 5. konumda yer alan hidrojen ise 6.78-6.90 ppm aralığında dublet pik vermiştir. Bileşiklerin yapısında yer alan piridazinon halkasına bağlı piperazin halkasının protonlarına ait pikler iki grup şeklinde çıkmıştır (90).

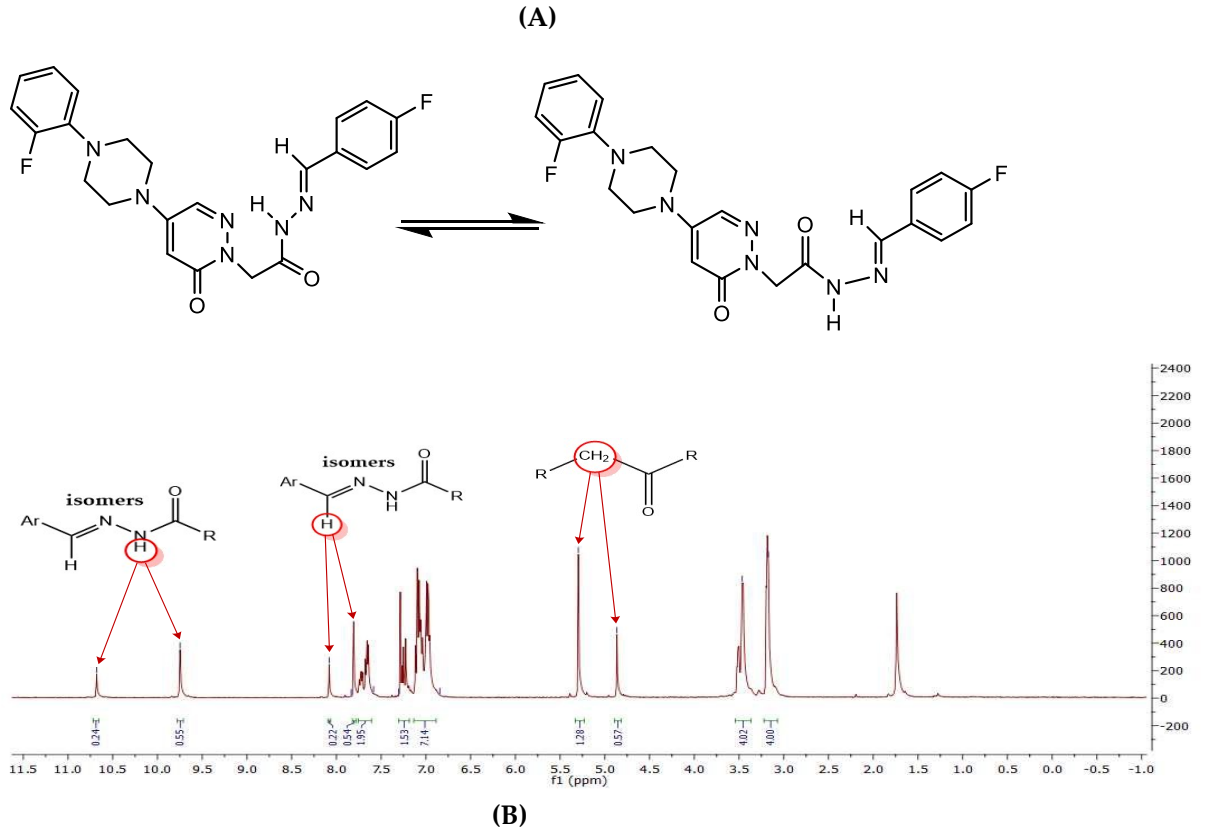


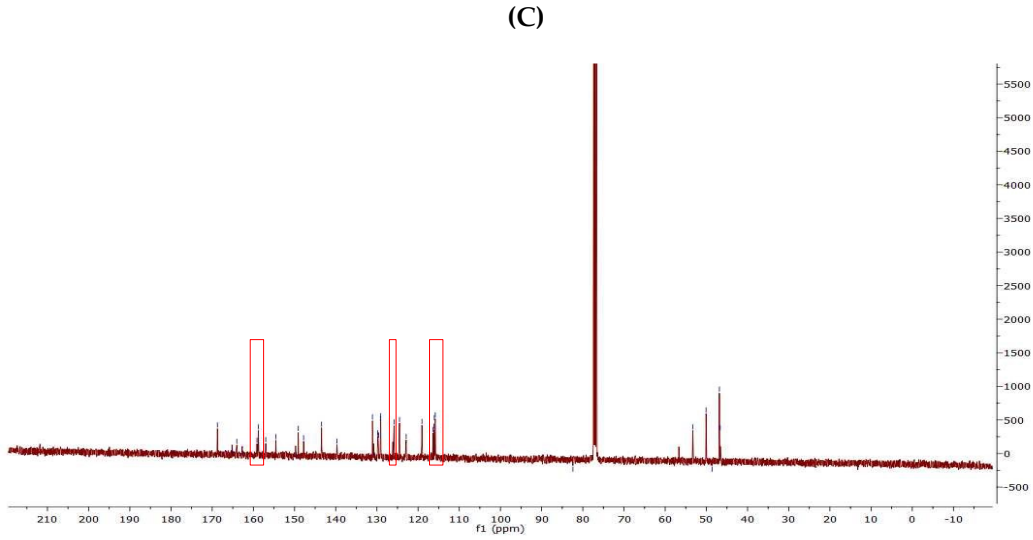
Yukarıdaki yapıda da gözleendiği gibi Ha ve Ha' ile Hb ve Hb' protonları eşdeğer protonlar olup, elektron yoğunlukları birbirine eşittir. Bu nedenle her iki proton grubu da tek bir proton gibi davranmaktadır. Bu tez kapsamında sentezlenen 5 yeni bileşikte yer alan piperazin halkasındaki Ha ve Ha' protonları 3.20-3.40 ppm aralığında, birbirine eş değer olan Hb ve Hb' protonları da 2.90-3.10 ppm aralığında triplet pikler vermişlerdir. Sentez başlangıç maddesi olarak kullanılan 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon bileşiğinin ana iskeletinde yer alan piridazinon halkasının 2. konumlu azot atomu üzerinde yer alan N-H protonu 10.40-10.50 ppm arasında singlet pik verirken, bir sonraki basamakta sentezlenen etil 6-[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]-3(2H)-piridazinon-2-il asetat bileşiğinin spektrumunda aynı pikin gözlenmemesi, reaksiyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Yine aynı şekilde sentezlerin tamamlandığının bir diğer göstergesi son başlangıç maddesi olan hidrazit türevinin oluştuğunu kanıtlayan, etil asetat türevi başlangıç maddesindeki triplet CH_3 pikinin kaybolması olmuştur (90,118).

İlk defa sentezlenen (**T8-T12**) sonuç maddelerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında, 6.90-7.80 ppm aralığında gözlenen aromatik protonlara ait pikler, 8.00-8.20 ppm aralığında gözlenen $\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}$ 'a ait singlet pik ve 11.00-11.30 aralığında gözlenen NH 'a ait siglet pikler literatürle uyum göstermektedir (118).

Bileşiklere ait ^{13}C -NMR spektrumlarında 45.00-46.30 ppm ve 47.10-48.00 ppm aralığında, literatürle uyumlu olarak görülmesi beklenen, piperazin halkasının eşdeğer karbonlarına ait pikler görülmüştür. Fenilhidrazon yapısındaki halkanın metil ve metoksi süstituentlerine ait pikler 52.00-55.00 ppm aralığında gözlenmiştir. Ayrıca aromatik karbonlara ve piridazinon halkasının 4, 5 ve 6 numaralı karbonlarına ait pikler 117.00-151.00 ppm aralığında görülmüştür. Bileşikte yer alan piridazinon halkasının 3. konumundaki ve $\text{N}-\text{C}=\text{O}$ yapısındaki karbona ait pikler ise, karbonil gruplarının rastlandığı 157.00-169.00 ppm aralığında gözlenmiştir (125).

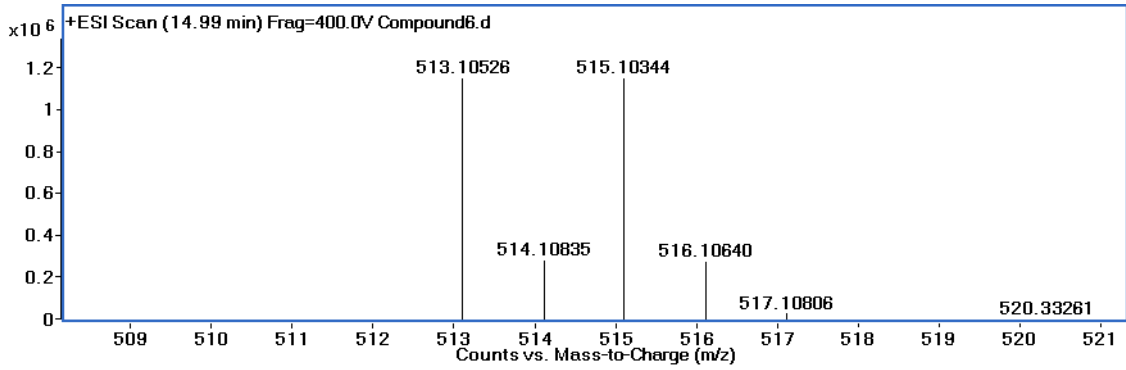
Ayrıca bileşiklere ait ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları dikkatlice incelendiğinde bu bileşiklerin iki stereoizomerik formda olduğu gözlenmektedir. Örneğin bileşik T10, ^1H -NMR spektrumunda görüldüğü üzere iki izomerik formda çıkmıştır (Şekil 5.1. A). Karbonil grubuna bağlı metilen grubunun rezonansa girdiği 5.30 ve 4.87 ppm'de iki adet singlet pikin gözlenmesi ve hidrazon yapısının N-H protonuna ait biri 8.0 ile 8.4 ppm'de ve diğeri 9.5 and 10.6 ppm'deki ayrı singlet çiftinin gözlenmesi bu durumu kanıtlamaktadır (Şekil 5.1. B). Ayrıca, piridazinon C6, piridazinon C4 ve 2-florofenil C5'in karbonları, düşük MHz'de ^{13}C -NMR spektrumunda çift olarak gözlenmiştir (Şekil 5.1. C). Bu sinyal çiftleri, bu bileşiklerin, daha önce tarif edilen diğer izomerler gibi iki stereoizomerik formda var olduğunu açıkça göstermektedir (120).





Şekil 5.1. Bileşik **T10**'ün konformasyonel izomerlerinin yapısı (A) ve ^1H -NMR (B) ve ^{13}C -NMR (C) spektrumu

Sentezi yapılan bileşiklerin kütle spektrumları elektron spray yöntemi kullanılarak TOF MS tekniği ile alınmıştır. Kullanılan bu yöntem nedeniyle sadece moleküler iyon piki ve izotop pikleri gözlenmiştir. Bileşik **T8**'e ait kütle spektrumu incelendiğinde moleküler iyon piki ile aynı şiddette M^{+2} pikinin olması molekül yapısında brom atomu olduğunu kanıtlamaktadır (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. Bileşik **T8**'in TOF MS ES⁺'da alınan kütle spektrumu

5.2. AChE ve MAO İnhibitör Aktivite Çalışmaları

Tez kapsamında sentezlenen bileşikler için invitro AChE ve MAO enzim inhibisyon çalışmaları Sunchon National Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Enstitüsü Laboratuvarında, materyal-metod bölümünde verilen yöntemler

uygulanarak incelenmiştir. Yapılan testler sonucunda bileşiklerin inhibitör aktivitelerine dair IC50 değerleri ve enzime olan selektif indeks değerleri belirlenmiştir. Aktivite taramalarının sonuçlarına göre:

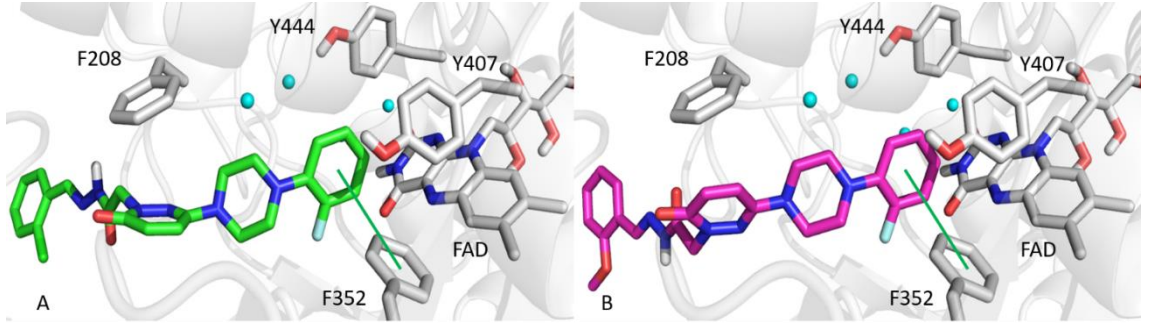
- Test edilen bileşikler belirgin bir AChE enzim inhibisyonu göstermemişlerdir.
- Test edilen bileşikler yüksek MAO-B inhibisyonu, düşük MAO-A enzim inhibisyonu göstermişlerdir.
- Sentez edilen 12 türevden yedisi, MAO-B'yi 1.0 µM'de güçlü bir şekilde inhibe etmiştir.
- **T6**, **T3** ve **T4** bileşikleri de sırasıyla 0.013, 0.039 ve 0.099 µM IC50 değerleriyle MAO-B'yi güçlü bir şekilde inhibe etmiştir.
- Meta pozisyonundaki brom (**T8**), para pozisyonuna kaydırıldığında (**T5**) MAO-B inhibitörü etkinin düştüğü gözlenmiştir. Para pozisyonundaki süstitüentlerle ilgili olarak, MAO-B inhibitör aktivitelerin şu sırayla arttığı belirlenmiştir: -Cl (**T4**)>-CH₃ (**T2**)>-N (CH₃)₂ (**T7**)>-Br (**T5**)>-OCH₃ (**T11**)>-H (**T1**)>-F (**T10**)
- Ek olarak, **T6**, 1.57 µM IC50 değeriyle MAO-A'yı da etkili bir şekilde inhibe etmiştir.
- **T3** ve **T6** bileşiklerinin, MAO-B için, sırasıyla SI=107.4 ve SI=120.8 değerleriyle, en yüksek seçicilik indeksi (SI) değerine sahip olduğu bulunmuştur.

Daha önce yapılmış çalışmalar incelendiğinde, benzer şekilde, azot atomu üzerinde yer alan grubun fenil halkasında metoksi, dimetilamin ve hidroksi grubu taşıyan bileşiklerde en yüksek AChE inhibitör aktivite gözlenirken; tez bileşiklerinde belirgin bir inhibisyon gözlenmemiştir. Bununla birlikte fenil hidrazon halkası üzerinde farklı süstitüentlerin varlığı, MAO seçiciliğini önemli ölçüde etkilememiş, halojenler, metoksi, metil veya dimetilamino gruplarının dahil edilmesinin, nonsüstitüe hidrazona kıyasla MAO-B inhibisyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Fenil halkasının orto pozisyonunda metoksi veya klor gruplarına sahip olan öncü bileşikler **T6** ve **T3**, referans tersinir MAO-B inhibitörü lazabemide göre sırasıyla 11 ve 3 kat daha kuvvetli bulunmuştur. Ayrıca **T6**, referans bileşiği olan geri dönüşümsüz MAO-B inhibitörü pargilinin iki katı kadar güçlü etki göstermiştir. Metoksi grubunun orto konumundan para konumuna kaydırılması ile elde edilen **T11** bileşğinde ve kloru atomunu orto konumundan para konumuna kaydırılması ile elde edilen **T4** bileşğinde MAO-B

inhibisyonunun belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Bu gözlemler; MAO-B inhibisyonu açısından orto konumundan sübstituent eklenmesinin para yerine tercih edildiğini göstermektedir. Ayrıca çalışma sonuçları ilginç bir şekilde, klor ve metoksi gruplarının MAO-B inhibisyonu üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Yapı-aktivite ilişkileri kurmak amacıyla yapılan bu modifikasyonlar ileri çalışmalara ışık tutacak ve en aktif çok hedefli enzim inhibitörlerine ulaşma imkânı sunacaktır.

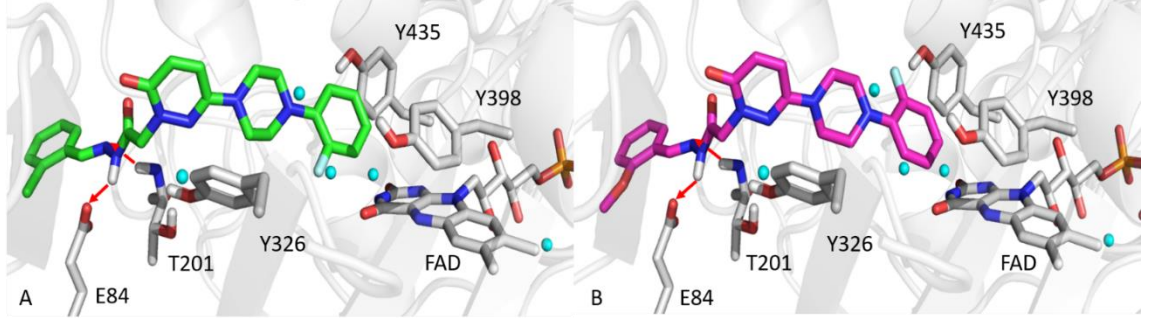
5.3.Moleküler Modelleme Çalışmaları

En aktif MAO inhibitörü olarak belirlenen bileşik **T3** ve **T6**'nın MAO-A ve MAO-B ile moleküler etkileşimlerini ve bağlanma modlarını araştırmak için moleküler modelleme çalışmaları yapılmıştır. Simülasyonlar yerleştirme skorları Tablo 4.2.'de verilmiştir. **T3** ve **T6**'nın orto-flor fenil halkaları, MAO-A'nın F352'si ve FAD ile π - π teması kurarak ve Y444, Y407 ile de hidrofobik teması kurarak etkileşime girmiştir (Şekil 5.3.).



T3 (A, yeşil çubuklar) ve **T6**'nın (B, macenta çubuklar) en iyi pozları. Yeşil çizgiler π - π etkileşimlerini gösterir. Su molekülleri cam göbeği küreler olarak gösterilmiştir.

Ayrıca, **T6**'nın piridazinon halkası, MAO-A'nın F208'ine doğru iyi yönlendirilmiş ve başka bir hidrofobik etkileşim oluşturmuştur. **T3** veya **T6**'nın fenil halkası üzerinde orto konumlandırılmış flor, MAO-A bağlanma moduna benzer şekilde FAD, Y435 ve MAO-B'nin Y398'inden oluşan hidrofobik bir kafesle karşı karşıya kalmıştır (Şekil 5.4.). Piridazinon halkaları, MAO-B seçici kalıntısı Y326 ile hidrofobik etkileşimlere katılmış ve **T3** ve **T6**'nın hidrazon kısımları, E84 yan zinciri ve MAO-B'nin T201 omurgası ile hidrojen bağları oluşturmuştur.



Şekil 5.4. MAO-B'ye doğru **T3** (A, yeşil çubuklar) ve **T6**'nın (B, macenta çubuklar) en yüksek puanlı pozları. Kırmızı oklar, hidrojen bağlarını gösterir. Su molekülleri camgöbeği küreler olarak gösterilmiştir.

MAO-A veya MAO-B ile **T3** ve **T6** etkileşimlerinin hesaplamalı çalışmaları, elde edilen deneysel biyolojik veriler ile uyum içerisinde bulunmuştur. **T3** ve **T6**'nın yerleştirme skorları, **T6**'nın **T3**'ten daha iyi olduğunu gösteren IC50 deneysel değerleri ile uyumlu bulunmuştur. Bağlanma modları ile ilgili olarak, **T3** ve **T6**'nın orto-flor fenil halkaları, MAO-A ve MAO-B'nin hidrofobik kafesleri ile karşı karşıyadır. İlginç bir şekilde, MAO-A ve MAO-B etkileşimleri arasındaki temel fark, MAO-B'nin **T3** ve **T6** ve E84 ve T201 hidrazon kısımları arasındaki iki hidrojen bağının varlığına dayanmaktadır, çünkü bunlara karşılık gelen bölgeler olan MAO-B'de V93 ve MAO-A'da V210, **T3** ve **T6**'nın seçici MAO-B inhibitörleri olduğunu desteklemektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında MAO-B inhibitörü etki gösteren, hidrazon yapısında 12 bileşik hazırlanmış ve bileşiklerin yapıları ile aktiviteleri arasında ilişkiler kurulmuştur. AH'nin mevcut tedavisinde de kullanılan, AChE inhibitörlerinden donepezil ve galantamin gibi ilaç molekülleri ve MAO inhibitörlerinden parjilin, toloksaton, lazabemid ve klorjilinin referans olarak kullanıldığı *in vitro* enzim inhibisyonu testlerinde, bileşiklerin hiçbirinde AChE inhibitörü aktivite gözlenmezken MAO-B inhibisyonunda ümit verici sonuçlara ulaşılmıştır. Bileşiklerden **T6**, 120.8 değeri ile en yüksek selektif indekse sahip ve en yüksek MAO-B enzim inhibitörü bileşik olarak belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen bileşik yapılarından hareketle yeni çalışmalar türetilebilecek, hedef enzimler olan AChE ve MAO-B'nin ikisini de inihbe edecek çok hedefli bileşiklere ulaşılabilecektir. Bu çalışmanın ve sonrasında geliştirilebilecek *in vitro* çalışmaların sonuçlarıyla elde edilecek en yüksek aktiviteli bileşikler için, AH modeli geliştirilmiş deney hayvanlarında *in vivo* aktivite çalışmalarının yapılması da yeni hedefler arasında yer almaktadır.

KAYNAKLAR

1. Harilal S, Jose J, Parambi DGT, Kumar R, Mathew GE, Uddin MS, Kim H, Mathew B. Advancements in nanotherapeutics for Alzheimer's disease: Current perspectives. *J Pharm Pharmacol* 2019, 71: 1370-83.
2. Geldenhuys WJ, Darvesh AS. Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: Current and future trends. *Expert Rev Neurother* 2015, 5: 3-5.
3. Gaugler J, James B, Johnson T, Marin A, Weuve J. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2019, 15(3): 321-87.
4. Kayaalp, O. *Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 13. baskı. Ankara, Pelikan Yayımevi, 2018.
5. Perry EK. The cholinergic hypothesis-ten years on. *Br Med Bull* 1986, 42: 63-9.
6. Özdemir Z, Özçelik AB, Uysal M. *Approaches Based on Cholinergic Hypothesis and Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease*. *Frontiers in Clinical Drug Research-Alzheimer Disorders*, 1st ed; Sharjah, Bentham Science Publishers, 2019: 1-37.
7. Vassar R, Bennett BD, Babu-Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow BW, Ross S, Amarante P, Loeloff R. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999, 286(5440): 735-41.
8. Edwards IGA, Gamez N, Escobedo GJr, Calderon O, Moreno-Gonzalez I. Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 2019, 11: 146.
9. Fotiou D, Kaltsatou A, Tsiptsios D, Nakou M. Evaluation of the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease with neuropsychological methods. *Aging Clin Exp Res* 2015, 27: 727-33
10. Brookmeyer R, Abdalla N, Kawas CH, Corrada MM. Forecasting the prevalence of preclinical and clinical Alzheimer's disease in the United States. *Alzheimer's & Dement* 2018, 14(2): 121-9.

11. Huang XT, Qian ZM, He X, Gong Q, Wu KC, Jiang LR, Lu LN, Zhu Z, Zhang HY, Yung WH, Ke Y. Reducing iron in the brain: a novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2013, 1-10.
12. Farlow MR. Pharmacological treatment of cognition in Alzheimer's disease. *Neurol* 1998, 51: 36-44.
13. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancett* 2011, 377: 1019-31.
14. Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol* 2014, 13(8): 788-794.
15. Gauthier S, Molinuevo JL. Benefits of combined cholinesterase inhibitor and memantine treatment in moderate-severe Alzheimer's disease. *Alzheim Dement* 2013, 9: 326-31.
16. Dezsi L, Vecsei L. Monoamine oxidase B inhibitors in Parkinson's disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2017, 16(4): 425-39.
17. Özdemir Z, Alagöz MA, Bahçecioğlu ÖF, Gök S. Monoamine Oxidase-B (MAO-B) Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Curr Med Chem* 2021, 28: 1-12.
18. Akgün H, Balkan A, Bilgin AA, Çalış Ü, Gökhan N, Dalkara S, Erdoğan H, Erol DD, Ertan M, Özkanlı F, Palaska E, Saraç S, Şafak C, Tozkoparan B. *Farmasötik Kimya*, 2. baskı Ankara, Hacettepe Yayınları, 2004.
19. Kumar B, Sheetal Mantha AK, Kumar V. Recent developments on the structure-activity relationship studies of MAO inhibitors and their role in different neurological disorders. *RSC Advances* 2016, 6: 42660-83.
20. He Q, Liu J, Lan JS, Ding J, Sun Y, Fang Y, Jiang N, Yang Z, Sun L, Jin Y, Xie SS. Coumarin-dithiocarbamate hybrids as novel multitarget AChE and MAO-B inhibitors against Alzheimer's disease: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorg Chem* 2018, 81: 512-28.

21. Suresh J, Baek SC, Ramakrishnan SP, Kim H, Mathew B. Discovery of potent and reversible MAO-B inhibitors as furanochalcones. *Int J Biol Macromol* 2018, 108: 660-4.
22. Cui Z, Yang X, Shi Y, Shi Y, Uzawa H, Cui J, Dohi E, Nishida Y. Molecular design, synthesis and bioactivity of glycosyl hydrazine and hydrazone derivatives: Notable effects of the sugar moiety. *Bioorg Med Chem Lett* 2001, 21: 7193-6.
23. Küçükgülzel ŞG, Mazi A, Sahin F, Öztürk S, Stables J. Synthesis and biological activities of diflunisal hydrazide/hydrazones. *Eur J Med Chem* 2003, 38: 1005-13.
24. Masunari A, Tavares LC. A new class of nifuroxazide analogues: Synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem* 2007, 15: 4229-36.
25. Bernhardt PV, Wilson GJ, Sharpe PC, Kalinowski DS, Richardson DR. Tuning the antiproliferative activity of biologically active iron chelators: characterization of the coordination chemistry and biological efficacy of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine hydrazone ligands. *J Biol Inorg Chem* 2007, 13: 107-19.
26. Gökşen US, Keleşçi NG, Göktaş Ö, Köysal Y, Kılıç E, Işık Ş, Aktay G, Özalp M. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: Synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorg Med Chem* 2007, 15: 5738-51.
27. Cunha AC, Figueiredo JM, Tributino JLM, Miranda ALP, Castro HC, Zingali RB, Fraga CAM, de Souza MC, Ferreira VF, Barreiro EJ. Antiplatelet properties of novel N-substitutedphenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. *Bioorg Med Chem* 2003, 11: 2051-9.
28. Gürsoy A, Karali N. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of 3-[[[(3-phenyl-4(3H)quinazolinone-2-yl)mercaptoacetyl]hydrazono]-1H-2-indolinones. *Eur J Med Chem* 2003, 38: 633-43.
29. Alagöz MA, Özdemir Z, Uysal M, Carradori S, Gallorini M, Ricci A, Zara S,

- Mathew B. Synthesis, Cytotoxicity and Anti-Proliferative Activity against AGS Cells of New 3(2H)-Pyridazinone Derivatives Endowed with a Piperazinyl Linker. *Pharmaceuticals* 2021, 14(3): 183.
30. Maccioni RB, Farias GA, Morales I, Navarrete LP. The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch Med Res* 2010, 41(3): 226-31.
 31. Mullane K, Williams M. Alzheimer's therapeutics: Continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis—But what lies beyond? *Biochem Pharmacol* 2013, 85: 289-305.
 32. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Pathologic Basis of Disease*. 7th edition, 2004, Philadelphia: Saunders.
 33. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, Kachaturian ZS The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 2018, 141: 1917-33.
 34. Anand P, Singh P. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* 2013, 36: 375-99.
 35. Swerdlow RH. Alzheimer's disease pathologic cascades: Who comes first, what drives what. *Neurotox Res* 2012, 22: 182-94.
 36. Kocahan S, Doğan Z. Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: the brain, neural pathology, N-methyl-D-aspartate receptors, tau protein and other risk factors. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2017, 15(1): 1-8.
 37. Özdemir Z, Alagöz MA. *Anticholinesterases, Selected Topics in Myasthenia Gravis*, 1st edition; 2019, London: Intech Open, 69-78.
 38. DeKosky ST, Ikonovic MD, Styren S, Beckett L, Wisniewski S, Bennett DA. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 2002, 51: 145-55.
 39. Davis DG, Schmitt FA, Wekstein DR, Markesbery WR. Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects. *J Neuropathol*

Exp Neurol 1999, 58: 376-88.

40. Gilmor ML, Erickson JD, Varoqui H, Hersh LB, Bennett DA, Cochran EJ, Mufson EJ, Levey AI. Preservation of nucleus basalis neurons containing choline acetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter in the elderly with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 1999, 411: 693-704.
41. Kuhl DE, Minoshima S, Fessler JA, Frey KA, Foster NL, Ficaró EP. In Vivo Mapping of Cholinergic Termina in Normal &ng, Alzheimer's Disease, and Parlunson's Disease. *Ann Neurol* 1996, 40: 3399-410.
42. Koeppe RA, Frey KA, Snyder SE, Meyer P, Kilbourn MR, Kuhl DE. Kinetic Modeling of N-[11C]Methylpiperidin-4-yl Propionate: Alternatives for Analysis of an Irreversible Positron Emission Tomography Tracer for Measurement of Acetylcholinesterase Activity in Human Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999, 19: 1150-1.
43. Kadir A, Darreh-Shori T, Almkvist O, Wall A, Grunt M, Strandberg B PET imaging of the in vivo brain acetylcholinesterase activity and nicotine binding in galantaminetreated patients with AD. *Nerobiol Aging* 2008, 29: 1204-17.
44. Gibson GE, Peterson C, Jenden DJ. Brain acetylcholine synthesis declines with senescence. *AAAS* 1986, 213(4508): 674-6.
45. Terry AV. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development", *J Pharmacol Experiment Therapeut* 2003, 3: 821-27
46. Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drugdevelopment pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther* 2007, 6: 1-7.
47. Rashid U, Ansari FL. Challenges in Designing Therapeutic Agents for Treating Alzheimer's Disease-from Serendipity to Rationality, *Elsevier BV* 2014, 40:141.
48. Marko K, Silva H. Phospholipids and Alzheimer's Disease: Alterations, Mechanisms and Potential Biomarkers. *Int J Mol Sci* 2013, 14: 1310-22.

49. Sarter M, Turchi J. Age- and Dementia-Associated Impairments in Divided Attention: Psychological Constructs, Animal Models, and Underlying Neuronal Mechanisms. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2002, 13: 46-58.
50. Cummings JL, Isaacson RS, Schmitt FA, Velting DM, A practical algorithm for managing Alzheimer's disease: what, when, and why? *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, 2015, 2(3), 307-323.
51. Dou KX, Tan MS, Tan CC, Cao XP, Hou XH, Guo QH, Tan L, Mok V, Yu JT, Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: a network meta-analysis of 41 randomized controlled trials. *Alzheimers Res. Ther.*, 2018, 10(1): 126.
52. Regenold WT, Loreck DJ, Brandt N. Prescribing Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer Disease: Timing Matters. *Am. Fam. Physician*, 2018, 97(11): 700.
53. Kim DH, Brown RT, Ding EL, Kiel DP, Berry SD. Dementia medications and risk of falls, syncope, and related adverse events: meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 2011, 59(6): 1019-31.
54. Goodman-Gillman. *Tedavinin Farmakolojik Temeli*. 2006, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 201-14.
55. Guyton AC, Hall JE. *Alzheimer Hastalığı-Amiloid Plaklar ve Bellek Baskılanması, Tıbbi Fizyoloji.*, 11. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2007.
56. Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology, *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(3): 315–35.
57. Imramovsky A, Pejchal V, Štepankova S, Vorcakova K, Jampilek J, Vanco J, Šimunek P, Kralovec K, Bruckova L, Mandikova J, Trejtnar F. Synthesis and in vitro evaluation of new derivatives of 2-substituted-6-fluorobenzo[d]thiazoles as cholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem*. 2013, 21: 1735–48.
58. Greig NH, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway HW, Perry TA, Lee B, Ingram DK, Lahiri DK. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin* 2001, 17(3): 159-65.

59. Zhou Y, Wang S, Zhang Y. Catalytic reaction mechanism of acetylcholinesterase determined by born-oppenheimer AB initio QM/MM molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B* 2010, 114: 8817-25.
60. Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussmana JL. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact* 2010, 187: 10–22.
61. Costanzo P, Cariati L, Desiderio D, Sgammato R, Lamberti A, Arcone R. Design, synthesis, and evaluation of donepezil-like compounds as AChE and BACE-1 inhibitors. *ACS Med Chem Lett* 2016, 7: 470-5.
62. Nachon F, Carletti E, Ronco C, Trovaslet M, Nicolet Y, Jean L. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyrylcholinesterase. *Biochem J* 2013, 453: 393-9.
63. Leon J, Marco-Contelles J. A step further towards multitarget drugs for Alzheimer and neuronal vascular diseases: targeting the cholinergic system, amyloid- β aggregation and Ca²⁺ dyshomeostatis. *J Curr Med Chem* 2011, 18: 552.
64. Simoni E, Daniele S, Bottegoni G, Pizzirani D, Trincavelli ML, Goldoni L. Combining Galantamine and Memantine in Multitargeted, New Chemical Entities Potentially Useful in Alzheimer's Disease. *J Med Chem* 2012, 55(22): 9708-21.
65. Nepovimova E, Uliassi E, Korabecny J, Peña-Altamira LE, Samez S, Pesaresi A, Garcia GE, Bartolini M, Andrisano V, Bergamini C, Fato R, Lamba D, Roberti M, Kuca K, Monti B, Bolognesi ML. Multitarget drug design strategy: quinone–tacrine hybrids designed To block Amyloid- β aggregation and to exert anticholinesterase and antioxidant effects. *J Med Chem* 2014, 57(20): 8576-89.
66. Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, Cassidy MS, Gary EN, Love J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J Med Chem* 2012, 55: 10282-6.
67. Brus B, Kosak U, Turk S, Pisljar A, Coquelle N, Kos J, Stojan J, Colletier JP, Gobec S. Discovery, biological evaluation, and crystal structure of a novel

- nanomolar selective butyrylcholinesterase inhibitor. *J Med Chem* 2014, 57: 816-79.
68. Özdemir Z, Yılmaz H, Sarı S, Karakurt A, Şenol FS, Uysal M. Design, synthesis, and molecular modeling of new 3(2H)-pyridazinone derivatives as acetylcholinesterase/ butyrylcholinesterase inhibitors. *Med Chem Res* 2017, 26: 2293-308.
 69. Kasa P, Rakonczay Z, Gulya K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 1997, 52: 511-53.
 70. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 1989, 260(3): 625-34.
 71. Romero A, Cacabelos R, Oset-Gasque MJ, Samadi A, MarcoContelles J. Novel tacrine-related drugs as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett* 2013, 23(7): 1916-22.
 72. ChiuPY, Wei CY. Donepezil in the one-year treatment of dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2017, 381: 322.
 73. Arens AM, Shah K, Al-Abri S, Olson KR, Kearney T. Safety and effectiveness of physostigmine: a 10-year retrospective review, *Clin Toxicol* 2018, 56(2): 101-7.
 74. Işık AT, Bozoğlu E, Eker D. AChE and BuChE inhibition by rivastigmin have no effect on peripheral insulin resistance in elderly patients with Alzheimer disease. *J Nutr* 2012, 16(2): 139-41.
 75. Hanazawa T, Kamijo Y, Yoshizawa T, Fujita Y, Usui K, Haga Y. Acute cholinergic syndrome in a patient with Alzheimer's disease taking the prescribed dose of galantamine. *Psychogeriatrics* 2018,
 76. Huang XT, Qian ZM, He X, Gong Q, Wu KC, Jiang LR. Reducing iron in the brain: a novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013: 1-10.
 77. Mele T, Jurič DM. Metrifonate, like acetylcholine, up-regulates neurotrophic activity of cultured rat astrocytes. *Pharmacol Rep* 2014, 66(4): 618-23.

- 78.** He Q, Liu J, Lan JS, Ding J, Sun Y, Fang Y, Jiang N, Yang Z, Sun L, Jin Y, Xie SS. Coumarin-dithiocarbamate hybrids as novel multitarget AChE and MAO-B inhibitors against Alzheimer's disease: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorg Chem* 2018, 81: 512-28.
- 79.** Entzeroth M, Ratty AK. Monoamine Oxidase Inhibitors-Revisiting a Therapeutic Principle. *Open J Depress* 2017, 6: 31-68.
- 80.** Kumar B, Sheetal Mantha AK, Kumar V. Recent developments on the structure-activity relationship studies of MAO inhibitors and their role in different neurological disorders. *RSC Advances* 2016, 6: 42660-83.
- 81.** Olotu FA, Joy M, Abdelgawad MA, Narayanan SE, Soliman ME, Mathew B. Revealing the role of fluorine pharmacophore in chalcone scaffold for shifting the MAOB selectivity: investigation of a detailed molecular dynamics and quantum chemical study. *J Biomol Struct Dyn* 2020, 1-14.
- 82.** Kumar B, Gupta VP, Kumar V. A Perspective on Monoamine Oxidase Enzyme as Drug Target: Challenges and Opportunities. *Curr Drug Targets* 2017, 18(1): 87-97.
- 83.** Guglielmi P, Carradori S, Ammazalorso A, Secci D. Novel approaches to the discovery of selective human monoamine oxidase-B inhibitors: Is there room for improvement? *Expert Opin Drug Discov* 2019, 14: 995-1035.
- 84.** Carradori S, Silvestri R. New frontiers in selective human MAO-B inhibitors. *J Med Chem* 2015, 58: 6717-32.
- 85.** Vishnu SS, Rohit SP, Anuf AR, Latha MS. Computational Investigations on Structural and Functional Impact of SNP in Parkinson's Disease Associated With Human Monoamine Oxidase-B (Mao-B). *SSRN* 2019.
- 86.** Özdemir Z, Alagöz MA, Uslu H, Karakurt A, Erikci A, Ucar G, Uysal M. Synthesis, molecular modelling and biological activity of some pyridazinone derivatives as selective human monoamine oxidase-B inhibitors. *Pharmacol Rep* 2020, 72(3): 692-704.

87. Dubey S, Bhosle PA. Pyridazinone: An important element of pharmacophore possessing broad spectrum of activity. *Med Chem Res* 2015, 24: 3579-98.
88. Matrai E. Infrared Spectroscopic Studies on Polarity and Tautomerism of 3(2H)-pyridazinone Derivatives. *J Mol Struct* 1997, 408/409: 467-72.
89. Lapinski L, Fulara J, Czerminski R, Nowak MJ. Infrared matrix isolation and ab initio studies of 3(2H)-pyridazinone and photoproduct 3-hydroxypyridazine. *Spectrochim. Acta A* 1990, 46: 1087-96.
90. Lenhert AG, Castle RN. *Chemistry of Heterocyclic Compounds: Pyridazines, Physical Properties of Pyridazines*, John Wiley & Sons. 1973.
91. Liang L, Yang G, Xu F, Niu Y, Sun Q, Xu P. Copper-catalyzed aerobic dehydrogenation of C–C to C=C bonds in the synthesis of pyridazinones. *Eur J Org Chem* 2013,6130-6.
92. Katritzky AR, Boulton AJ. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, New York, London: Academic Press.1968
93. Estevez I, Ravina E, Sotelo E. Pyridazines. XV. Synthesis of 6-aryl-5-amino-3(2H)-pyridazinones as potential platelet aggregation inhibitors. *J Heterocycl Chem* 1998, 35: 1421-8.
94. Bozbey İ, Özdemir Z, Uslu H, Özçelik AB, Şenol FS, Erdoğan Orhan İ, Uysal M. A Series of New Hydrazone Derivatives: Synthesis, Molecular Docking and Anticholinesterase Activity Studies. *Mini Rev Med Chem* 2020, 20: 1042.
95. Dietrich B. Synthesis: Carbon With Two Attached Heteroatoms With at Least One Carbon-to-Heteroatom Multiple Link. *Comp Org Func Group Trans II* 2005, 5: 725-98.
96. Cui Z, Yang X, Shi Y, Uzawa H, Cui J, Dohi H, Nishida Y, Nishida Y. Molecular design, synthesis and bioactivity of glycosyl hydrazine and hydrazone derivatives: notable effects of the sugar moiety. *Bioorg Med Chem Lett* 2011, 21(23): 7193-6.
97. Bernhardt PV, Wilson GJ, Sharpe PC, Kalinowski DS, Richardson DR. Tuning the antiproliferative activity of biologically active iron chelators: characterization of the coordination chemistry and biological efficacy of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine hydrazone ligands. *J Biol Inorg Chem* 2008, 13(1): 107-19.

98. Şüküroğlu M, Önkol T, Kaynak-Onurdağ F, Akalınç G, Şahin MF. Synthesis and *in vitro* biological activity of new 4,6-disubstituted 3(2*H*)-pyridazinone-acetohydrazide derivatives. *Z Naturforsch* 2012, 67: 257-65.
99. Nagle P, Pawar Y, Sonawane A, Bhosale S, More D. Docking simulation, synthesis and biological evaluation of novel pyridazinone containing thymol as potential antimicrobial agents. *Med Chem Res* 2013.
100. Özdemir Z, Alagöz M, Akdemir A, Özçelik A, Özçelik B. Studies on a novel series of 3(2*H*)-pyridazinones: Synthesis, molecular modelling, antimicrobial activity. *J Res Pharm* 2019, 23(5): 960-72.
101. Sonmez M, Berber I, Akbas E. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some new pyridazinone metal complexes. *Eur J Med Chem* 2006, 41: 101-5.
102. Sallam MS, El-Hashash MA, Guirguis DB. Synthesis and anti-microbial activity of some novel substituted pyridazin-3(2*H*)-ones containing 1,3,4-thiadiazole moiety. *Med Chem Res* 2016, 25: 369-80.
103. Heinisch G, Frank H. Pharmacologically active pyridazine derivatives. *Progress in Medicinal Chemistry, Part 1*. 1990, 27: 1-49.
104. Gökçe M, Şahin MF, Küpeli E, Yeşilada E. Synthesis and evaluation of the analgesic and anti-inflammatory activity of new 3(2*H*)-pyridazinone derivatives. *Arzneim.-Forsch./Drug Res* 2004, 54(7): 396-401.
105. Husain A, Drabu S, Kumar N, Alam MM, Ahmad A. Synthesis and biological evaluation of some new pyridazinone derivatives. *J Enzym Inhib Med Chem* 2011, 26(5): 742-8.
106. Barberot C, Moniot A, Allart-Simon I, Malleret L, Yegorova T, Laronze-Cochard M, Bentaher A, Medebielle M, Bouillon JP, Henon E, Sapi J, Velard F, Gerard S. Synthesis and biological evaluation of pyridazinone derivatives as potential anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem* 2018, 146: 139-46.
107. DalPiaz V, Giovannonia MP, Castellana C, Palaciosb JM, Beletab J, Domnech T, Segarra V. Heterocyclic-fused 3(2*H*)-pyridazinones as potent and selective PDE IV inhibitors: Further structure-activity relationships and molecular modelling studies. *Eur J Med Chem* 1998, 33: 789-97.
108. Ahmad EM, Kassab AE, El-Malah AA, Hassan MSA. Synthesis and biological evaluation of pyridazinone derivatives as selective COX-2 inhibitors and

- potential anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem* 2019, 171(1): 25-37.
109. Özdemir Z, Gökçe M, Karakurt A. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 6-Substituted-3(2H)-pyridazinone-2-acetyl-2-(substitutedbenzal)hydrazone Derivatives. *FABAD* 2012, 37: 111-22.
 110. Baytaş S, İnceler N, Mavaneh KF, Uludağ MO, Abacıoğlu N, Gökçe M. Synthesis of antipyrine/pyridazinone hybrids and investigation of their in vivo analgesic and anti-inflammatory activities. *Turk J Chem* 2012, 36: 734-48.
 111. Tiryaki D, Şüküroğlu M, Doğruer DS, Akkol E, Özgen S, Şahin MF. Synthesis of some new 2,6-disubstituted-3(2H)-pyridazinone derivatives and investigation of their analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Med Chem Res* 2013, 22: 2553-60.
 112. Akhtar W, Shaquiquzzaman M, Akhter M, Verma G, Khan MF, Alam MM. The therapeutic journey of pyridazinone. *Eur J Med Chem* 2016, 123: 256-81.
 113. Gong J, Zheng Y, Wang Y, Sheng W, Li Y, Liu X. A new compound of thiophenylated pyridazinone IMB5043 showing potent antitumor efficacy through ATM-Chk2 pathway. *PLoS ONE* 2018, 13(2): e0191984.
 114. Rathish IG, Javed K, Ahmad S, Bano S, Alam MS, Akhter M, Pillai KK, Ovais S, Samim M. Synthesis and evaluation of anticancer activity of some novel 6-aryl-2-(p-sulfamylphenyl)-pyridazin-3(2H)-ones. *Eur J Med Chem* 2012,49: 304-9.
 115. Ahmad S, Rathish IG, Bano S, Alam MS, Javed K. Synthesis and biological evaluation of some novel 6-aryl-2-(p-sulfamylphenyl)-4,5-dihydropyridazin-3(2H)-ones as anti-cancer, antimicrobial, and anti-inflammatory agents. *J Enzym Inhib Med Chem* 2010, 25(2): 266-71.
 116. Al-Tel HT. Design and synthesis of novel tetrahydro-2H-Pyrano[3,2-c]Pyridazin-3(6H)-one derivatives as potential anti-cancer agents, *Eur J Med Chem* 2010, 45: 5724-31.
 117. Özçelik AB, Özdemir Z, Sari S, Utku S, Uysal M. A New Series of Pyridazinone Derivatives as Cholinesterases Inhibitors: Synthesis, In Vitro Activity and Molecular Modeling Studies. *Pharmacol Rep* 2019, 71(6): 1253-63.
 118. Utku S, Gökçe M, Orhan İ, Şahin MF. Synthesis of novel 6-substituted-3(2H)-pyridazinone-2-acetyl-2-(substituted/-nonsubstituted benzal)hydrazone

derivatives and acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities in vitro. *Arzneim.-Forsch* 2011, 61(1): 1-7.

- 119.** Önkol, T., Gökçe, M., Orhan, İ., Kaynak, F. (2013). Design, synthesis and evaluation of some novel 3(2H)-pyridazinone-2-yl acetohydrazides as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Org. Commun* 2013 6:1, 55-67.
- 120.** Çeçen M, Oh JM, Özdemir Z, Büyüktuncel SE, Uysal M, Abdelgawad MA, Musa A, Gambacorta N, Nicolotti O, Mathew B, Kim H. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Pyridazinones Containing the (2-Fluorophenyl) Piperazine Moiety as Selective MAO-B Inhibitors. *Molecules* 2020, 25(22): 5371.
- 121.** Özdemir Z, Başak-Türkmen N, Ayhan İ. Çiftçi O, Uysal M. Synthesis of New 6-[4-(2-Fluorophenylpiperazine-1-YL)]-3(2H)-Pyridazinone-2-Acethyl-2-(Substitutedbenzal)Hydrazone Derivatives and Evaluation of Their Cytotoxic Effects in Liver and Colon Cancer Cell Lines. *Pharm Chem J* 2019, 52: 923-9.
- 122.** Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961, 7(2): 88-90.
- 123.** Mathew B, Baek SC, Parambi DGT, Lee JP, Joy M, Annie Rilda PR, Randev RV, Nithyamol P, Vijayan V, Inasu ST. Selected aryl thiosemicarbazones as a new class of multi-targeted monoamine oxidase inhibitors. *Med Chem Comm* 2018, 9: 1871-81.
- 124.** Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 2000, 28: 235-42.
- 125.** Besada P, Costas T, Vila N, Chessa C, Teran C. Synthesis and complete assignment of the ^1H and ^{13}C -NMR spectra of 6-substituted and 2,6-disubstituted pyridazin-3(2H)-ones. *Magn Reson Chem* 2011, 49: 437-42.

EKLER