

Araştırma Makalesi - Research Article

Yeni Tiyazolil-Hidrazin Türevlerinin Sentezi ve Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütirilkolinesteraz (BuChE) Aktivite Çalışmaları

Synthesis of Novel Thiazolyl-Hydrazine Derivatives and Activity Studies of Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BuChE)

Ayşen Işık^{1*}, Ulviye Acar Çevik², Tuğba Erçetin³, Ahmet Koçak⁴

Geliş / Received: 02/11/2021

Revize / Revised: 29/04/2022

Kabul / Accepted: 05/05/2022

ÖZ

Alzheimer hastalığı (AH), zamanla beyin hücrelerinin ölümüne bağlı olarak bilişsel işlevlerde azalma, hafıza kaybı ve bunama ile ilişkilendirilmiştir. Alzheimer hastalığının tedavisinde sınırlayıcı uygulamaların mevcut oluşu, hastalığın sağlık harcamalarında kanser ve kalp hastalıklardan sonra dünyada üçüncü sırada oluşu araştırmacıları AH üzerinde erken evrede tanıma ve yeni tedavi yöntemlerine yönlendirmektedir. Günümüzde kolinerjik anomalikler ile AH arasında doğrudan bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar, asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BuChE) inhibisyonunun asetilkolin (ACh) seviyesinde meydana gelen artışların Alzheimer hastalığının başlangıç evrelerindeki bilişsel yetmezliği iyileştirebileceğini kanıtlamıştır. Dolayısıyla ACh düzeylerini arttırmak için uygulanacak en iyi metot ise, ACh'yi yıkan AChE veya BuChE enzimlerinin baskılanmasıdır. Dolayısıyla yapılan bu çalışmada, süstitüe edilmiş tiyazolilhidrazin türevleri tasarlanmış, sentezlenmiş ve AH' ye karşı asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BuChE) kolinesteraz enzimlerinin inhibisyon potansiyelleri araştırılmıştır. Hedef bileşiklerin yapıları ¹H NMR/¹³C NMR analiz yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Hedef bileşiklerin AChE ve BuChE enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri Ellman yöntemi ile değerlendirilmiş ve hedef bileşiklerin enzim inhibisyon çalışmaları sonucunda **3d** bileşiğinin orta düzeyde bütirilkolinesteraz enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler- Alzheimer Hastalığı, Tiyazolilhidrazin, Ellman Metot

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) has been associated with decreased cognitive function, memory loss, and dementia due to the death of brain cells over time. Existence of limiting practices in the treatment of AD, and the fact that the disease ranks third in health expenditures in the world after cancer and heart diseases, directs researchers to early diagnosis and new treatment methods on AD. Today, it is thought that there is a direct relationship between cholinergic abnormalities and AD. Studies have shown that acetylcholine (ACh) level increases due to

^{1*}Sorumlu yazar iletişim: isik.aysen@selcuk.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-1280-0019>)

Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye

²İletişim: uacar@anadolu.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0003-1879-1034>)

Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye

³İletişim: tugba.ercetin@emu.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0001-7774-7266>)

Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Doğu Akdeniz Üniversitesi, Kıbrıs

⁴İletişim: akocak@selcuk.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-2487-2431>)

Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye

acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibition can improve cognitive impairment in the initial stages of Alzheimer's disease. The best method to increase these ACh levels is to suppress the AChE or BuChE enzymes that break down ACh. Therefore, in this study, substituted thiazolyldiazine derivatives were designed, synthesized and their cholinesterase inhibitory effects on acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) enzymes against AD were investigated. The structures of the target compounds were illuminated by ¹H NMR/¹³C NMR analysis methods. The effects of the target compounds on the on AChE and BuChE enzymes were evaluated using the Ellman process and as a result of the enzyme inhibition studies of the target compounds, it was determined that the **3d** compound showed moderate butyrylcholinesterase activity.

Keywords- Alzheimer's Disease, Thiazolyldiazine, Ellman Method

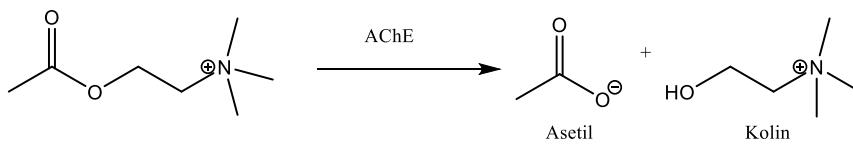
I. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH) ilk olarak 1901 yılında Alman psikiyatrist Dr. Alois Alzheimer tarafından hastalarından birinde AH' nin tipik semptomlarını tanımlamasıyla keşfedildi. Günümüzde AH, dünya çapında yaygınlığı nedeniyle en çok araştırılan nörodejeneratif bozukluklardan biridir. Günümüzde yaklaşık 30 milyon insan bu hastalıktan etkilenmektedir [1] ve bu sayının önümüzdeki on yıllarda ikiye katlanması beklenmektedir [2]. AH, kademeli olarak gelişen ve geri dönüşü olmayan bir beyin hastalığıdır. AH, hafıza kaybı, dil bozukluğu, oryantasyon bozukluğu, soyut düşünme bozukluğu, ruh hali değişimleri, davranış değişiklikleri, inisiyatif kaybı ve günlük görevleri yerine getirmede sorun ile karakterizedir [3,4].

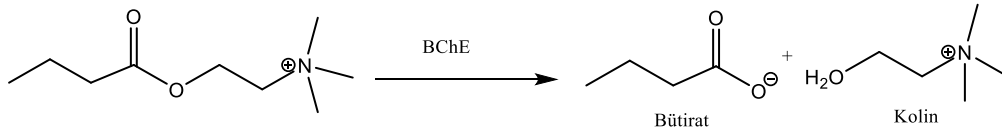
AH oluşumunun ve ilerlemesinin kesin nedenleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Günümüzde AH, hem genetik hem de çevresel faktörlerin bir kombinasyonuna bağlı olarak gelişen patolojik bir rahatsızlık olarak ele alınmaktadır [5]. Bu faktörler; yaş, cinsiyet, oksidatif hasar, aile yaşam hikayesi, genetik ve kalp-beyin arasındaki ilişki gibi faktörlerdir [6]. Günümüzde Alzheimer hastalığının moleküler mekanizmasının açıklanmasında iki temel hipotez kabul görmektedir. Bunlar; amiloid kaskat ve kolinerjik hipotezdir [7]. Kolinerjik hipotezde kabul gören gerçek, Alzheimer hastalığının asetilkolinesteraz (AChE), bütirilkolinesteraz (BuChE) ve kolin asetiltransferaz (ChAT) gibi kolinerjik sistemlerin değişimiyle ilişkili olduğu ve bunu takriben de Alzheimer hastalarında kolinerjik nöronların dejenerasyonu neticesinde kavrama bozukluklarının da görülebildiğidir. Bu nedenle de kolinerjik sistemler arasındaki değişimler ile Alzheimer hastalığı arasında doğrudan bir ilişki olduğu düşünülmektedir.

İnsanlarda asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BuChE) olmak üzere kolinesterazların iki formu bulunmaktadır[8]. Beyindeki kolinesteraz aktivitenin %80' inden sorumlu olan AChE, kolin esterlerini hidrolize eden ve beyin, sinir ve kırmızı kan hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan spesifik bir esterazdır. Beyindeki kolinesteraz aktivitenin geri kalan kısmından yani %20' sinden sorumlu olan BChE ise; kolin esterlerini ve diğer esterleri de hidrolize eden ve kan serumu, pankreas, karaciğer ve merkezi sinir sisteminde bulunan spesifik olmayan bir kolin esterazdır. Asetilkolinesteraz etkisini, beynin ve otonom sinir sisteminin kolinerjik sinapslarında asetilkolinin hidrolizini katalize ederek gerçekleştirir. Bütirilkolinesteraz ise; sinaptik aralığın dışına yayılan asetilkolini parçalayarak adeta AChE'nin yedeği olarak iş görür. Bütirilkolinesterazın beyindeki rolü belirsizliğini hala korumaktadır [9].

AChE, 537 amino asit uzunluğunda saniyede 250.000 kadar asetilkolin molekülünü hidrolize eden bir peptid monomeridir. AChE'nin moleküler yapısı 14 alfa sarmal ile çevrili 12 beta levhadan oluşmaktadır [10]. Bütirilkolinesteraz (BChE) ise yaklaşık olarak 342.000 Da ağırlığında tetramerik bir glikoproteindir [11]. Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerinin aşağıdaki şekilde de görüldüğü gibi moleküler formları ve aktif merkez yapıları benzer iki enzimdir [12,13] (Şekil 1 ve Şekil 2).



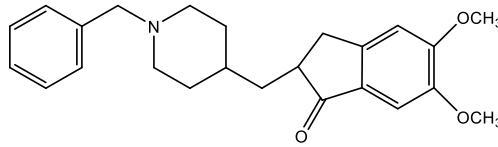
Şekil 1. Asetilkolinesterazın Hidroliz Reaksiyonu



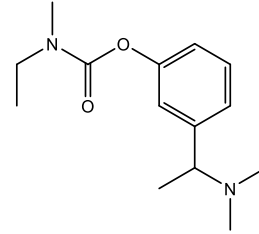
Şekil 2. Bütirikolinesterazın Hidroliz Reaksiyonu

AH' nin progresyonu sırasında ön beyinde kolinerjik nöronların yüksek oranda hasara uğradığı gözlenmiştir [14,15]. Asetilkolinesterazı (AChE) inhibe ederek sinapta asetilkolin konsantrasyonunun (ACh) artırılması, AH'nin ilerlemesini yavaşlatan yaklaşımlardan biridir [16-22].

Günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanılan beş farklı ilaç formu mevcuttur. Fakat bu ilaçlar hastalığı iyileştirmekten ziyade semptomlarını azaltmayı hedeflemektedir. Bu ilaçlar; donepil, rivastigmin, galantamin, memantin ve donepezildir [23]. Kolinesteraz inhibitörü bu ilaçları kullanan hastaların %50'sinde semptomların ilerlemesinin 6-12 ay kadar geciktiği rapor edilmiştir. Donepezil, Alzheimer hastalığının tüm aşamalarında, rivastigmin ve galantamin ise öncelikle hafif-orta dereceli Alzheimer hastalığının tedavisinde onaylanmış ilaçlardır [24]. (Şekil 3 ve Şekil 4)



Şekil 3. Donepezil' in Kimyasal Yapısı



Şekil 4. Rivastigmin'in Kimyasal Yapısı

Mevcut olan bu ilaçlardan özellikle galantamin, rivastigmin ve donepezil gibi kolinesteraz inhibitörleri (ChEi) esas olarak periferik bölgeye rekabetçi ve geri dönüşümlü bir şekilde bağlanır ve ACh'yi sinapta yedekler ve böylece kolinerjik iletimin iyileştirilmesine yardımcı olur [25,26]. Rivastigmin ayrıca beynin temporal korteks bölgesinin glial hücrelerinde bulunan bütirikolinesterazı (BuChE) hidrolize edebilir [27]. AChE inhibisyonu, sağlıklı bir beyinde ACh'nin aracılık ettiği normal nörotransmisyonun korunmasına yardımcı olabilir ve AH'nin oluşumunu önleyebilir veya ilerlemesini yavaşlatabilir. Bununla birlikte, AH' in geç evrelerinde, AChE konsantrasyonu önemli ölçüde azalır (%45'e kadar) ve BuChE artar (%40-90'a kadar). Bu nedenle, her iki enzim karşı da etkili olan ChEi, AH tedavisinde oldukça önemli bir yere sahiptir [28].

Yeni ve etkili AChE ve BuChE inhibitörlerinin geliştirilmesinde, Alzheimer'ın günümüz tedavisinde kullanılan galantamin ve donepezil gibi ilaçlar da dahil olmak üzere ciddi derecede inhibitör aktivite gösteren birçok bileşiğin yapısında oldukça fazla sayıda heterosiklik halkanın varlığı da etkili olmuştur. [29,30].

Son birkaç on yılda, tiyazollerin kimyası ve bunların heterosiklik türevleri, sentetik ve biyolojik önemlerinden dolayı büyük ilgi görmüştür. Tiyazol grubu taşıyan bileşiklerin, antikolinesteraz aktivitesi dahil olmak üzere geniş bir biyolojik etki spektrumu sergilediği rapor edilmiştir [31,32]. Ayrıca literatür araştırmalarında hidrazin grubunun da antikolinesteraz aktivite için önemli bir rol oynadığı da rapor edilmiştir [33]. Dolayısıyla yapılan bu çalışmada çeşitli gruplarla süstitüe edilmiş 4-(4-süstitüe)-2-{2-[4-(4-metoksipiperazin-1-il)benziliden]hidrazinil} tiyazol türevleri tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Ayrıca Alzheimer hastalığı, kolinesteraz enzimleri ile ilişkisi bazında bakıldığında, Alzheimer hastalığı sürecinde ilk olarak AChE aktivitesi giderek azalırken BChE aktivitesi arttığından ve sonrasında BChE enzimi ACh metabolizması için telafi edici bir mekanizma oluşturduğundan dolayı ACh düzenlemesi giderek BChE'ye bağımlı hale gelebilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada Alzheimer Hastalığına karşı hem asetilkolinesteraz (AChE) hem de bütirikolinesteraz (BuChE) enzim inhibisyon potansiyelleri değerlendirilmiştir.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A. Sentez Çalışmaları

4-(4-Metoksifenilpiperazin-1-il)benzaldehit Sentezi(1):

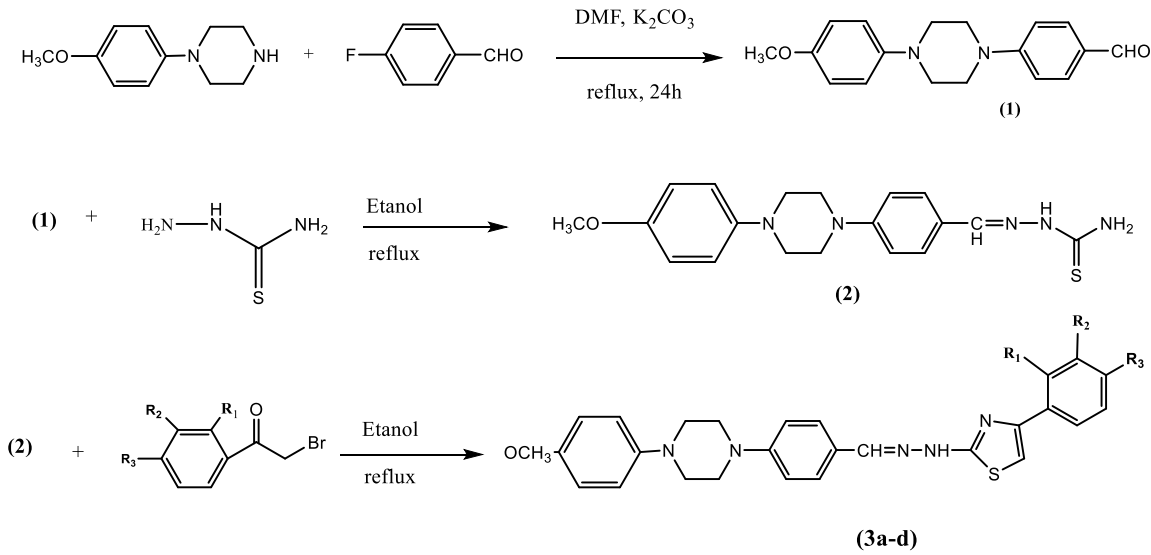
1-Metoksifenilpiperazin (0.04 mol, 4.00 g) ile 4-florobenzaldehit (0.04 mol, 4.96 g) potasyum karbonat (0.048 mol, 6.61 g) varlığında EtOH içerisinde geri soğutucu altında 24 saat ısıtılarak karıştırıldı. Reaksiyon karışımı buzlu suya döküldükten sonra çöken ürün süzülerek alındı ve etanolden kristallendirildi.

2-[4-(4-Metoksifenilpiperazin-1-il)benziliden] hidrazinkarbotiyoamid Sentezi(2):

Eşit miktarlarda alınan 4-(4-metoksifenilpiperazin-1-il)benzaldehit (1) (0.030 mol, 8.89 g) ve tiyosemikarbazid (0.030 mol, 2.74 g) etanol (100 mL) içerisinde geri soğutucu altında 3 saat ısıtılarak karıştırıldı. Reaksiyonun tamamlanmasının ardından karışım soğutuldu ve çöken ürün süzülde ve etanolden kristallendirildi.

4-(4-süstitüe)-2-[2-[4-(4-metoksifenilpiperazin-1-yl)benziliden]hidrazinil} tiyazollerin Sentezi(3a-3d):

Eşit miktarlarda alınan 2-[4-(4-Metilfenilpiperazin-1-il)benziliden] hidrazinkarbotiyoamid (2) ve uygun fenaçil bromür türevleri etanolde geri soğutucu (reflux) altında 4 saat boyunca ısıtılarak karıştırılmıştır. Çöken ürün süzülerek alınmış ve etanolden kristallendirilerek saflaştırılmıştır.



Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃
3a	H	H	F
3b	H	H	CH ₃
3c	Cl	H	Cl
3d	H	Cl	Cl

Şekil 5. Tiyazolidin hidrazin Bileşiklerinin Sentezi

B. Erime Noktalarının Tespiti

Hedef bileşiklerin erime derecelerinin (E.N) belirlenmesi, toz hale getirilen maddenin kapillerborulara ½ cm doldurulduktan sonra Elektrotermal erime noktası tayincihazında yapılmıştır.

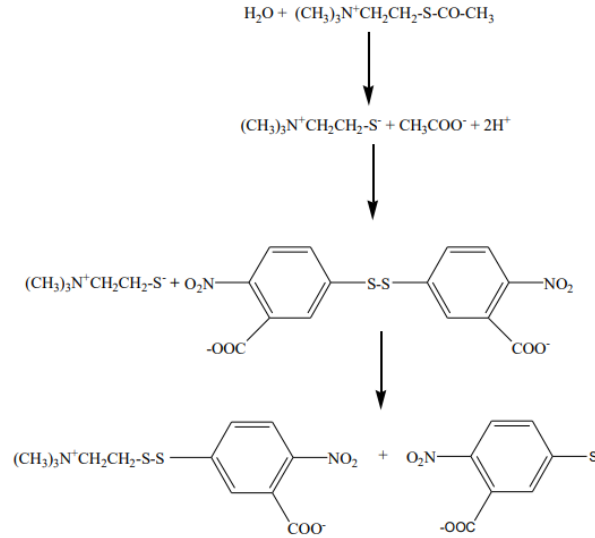
C. ¹H-NMR ve ¹³C-NMR Spektrumlarının Alınması

Hedef bileşiklerden 5 mg alınarak dötero dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözündürülüp ve tetrametilsilan'a karşı 300 (1H NMR) ve 75 MHz'lık (13C NMR) NMR spektrometresine verilmesi sonucu alınmıştır.

D. Enzim Aktivite Çalışmaları

Sentezlenen tüm orijinal bileşikler, AChE ve BChE enzimlerini inhibe etme potansiyelleri Ellman Testi ile test edilmiştir. Ellman metodu, 405 nm absorbans değerindeki farklılıkların ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu metod ilk olarak 1961 yılında Ellman ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır. Bu yöntemde asetilkolinin oksidasyonunun yerine tiyoesteri olan asetiltiyokolini kullanılır. Asetiltiyokolini tiyokolini ve asetat

haline hidroliz eder ve oluşan tiyokolin reajan olarak kullanılan DTNB 405 nm’ de absorbands veren nitrobenzoata dönüştürür. Ellman yöntemine ait reaksiyon mekanizması aşağıda verilmiştir. (Şekil 6.) [34].



Şekil 6. Ellman Metotuna ait Reaksiyon Mekanizması

Hedef bileşikler AChE ve BChE inhibitör aktiviteleri Ellman 'ın modifiye spektrofotometrik yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kolinesteraz aktivite çalışmaları için AChE (Tip-VI-S, EC 3.1.1.7, Sigma) ve BChE (EC 3.1.1.8, Sigma) enzimleri asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin klorür(Sigma, St. Louis, MO, ABD) reaksiyonlarının substratları olarak kullanılmıştır.

Kolinesteraz aktivitesinin ölçümü için; 50 mM Tris HCl tamponu (pH 8.0), 6.8 mM DTNB, 2 µl örnek çözeltileri ve 10 µl AChE/BChE çözeltileri hazırlanmıştır. İlk etapta reaksiyon, 10 µl asetiltiyokolin iyodür/bütiriltiyokolin klorür ilavesiyle başlatılmıştır. İkinci etapta ise; asetiltiyokolin iyodür/bütiriltiyokolin klorürün hidrolizi, DTNB'nin tiyokolinlerle reaksiyonunun bir sonucu olarak sarı 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun oluşumu 412 nm dalga boyunda enzimler tarafından katalize edilmesi ile izlenmiş ve 27°C'de 15 dakika inkübe edilerek periyodik olarak 75 saniyede bir ölçüm alınmıştır. Ölçümler ve hesaplamalar Varioskan Flash yazılımı için SkanIt Software 2.4.5 RE kullanılarak değerlendirilmiştir. AChE ve BChE'nin inhibisyon yüzdeleri, kör numuneye (DMSO ve metanol) göre numunelerin reaksiyon hızlarının karşılaştırılarak ve (ES)/E x 100 formülü kullanılarak belirlenmiştir. Burada E, test numunesi olmayan enzimin aktivitesi ve S, test numunesi olan enzimin aktivitesidir. Referans bileşik olarak ise, donepezil hidroklorür (Sigma Aldrich, USA) kullanılmıştır. Elde edilen absorbands değerler boş okunan (blank) değerleri ile doğrulanmıştır. Her bir deney dört tekrar ile yapılmıştır. % Enzim inhibisyon değerlerinin hesaplanabilmesi için ölçümlerdeki ortalama absorbands değerleri kullanılmıştır.

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

2-{2-[4-(4-Metoksifenilpiperazin-1-il)benziliden]hidrazinil}-4-(4-florofenil)tiyazol (3a):

C₂₇H₂₆N₅O₅.MA:487.60 g/mol. Verim: 74 %. Erime Noktası: 282.4-284.2 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.27 (4H, br.s., piperazin CH₂), 3.40 (4H, br.s., piperazin CH₂), 3.69 (3H, s., metoksi -OCH₃), 6.85 (2H, d, J=6.87 Hz, 1,4-disübstitüefenil), 6.97 (2H, d, J=6.87 Hz, 1,4-disübstitüefenil), 7.04 (2H, d, J=6.90 Hz, 1,4-disübstitüefenil), 7.22 (2H, m, J=6.66 Hz, 1,4-disübstitüefenil), 7, 26 (1H, s, tiyazol -CH), 7.52 (2H, d, J=6.81 Hz, 1,4- disübstitüefenil), 7.87 (2H, d, J=5.94 Hz, 1,4- disübstitüefenil), 7.94 (1H, s, -CH), 11.93 (1H, s, -NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ=64.11, 65.57, 69.31, 101.56, 105.85, 106.84, 113.24, 113.94, 115.16, 118.15, 125.58, 132.84, 136.62, 137.83, 149.30, 149.58, 152.45, 154.90, 172.28.

2-{2-[4-(4-Metoksifenilpiperazin-1-il)benziliden]hidrazinil}-4-(4-metilfenil)tiyazol (3b):

C₂₈H₂₉N₅O₅.MA:483.63 g/mol. Verim: 76 %. Erime Noktası: 292.3-294.7 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.31 (3H, s, -CH₃), 3.27 (4H, br.s., piperazin CH₂), 3.40 (4H, br.s., piperazin CH₂), 3.69 (3H, s., metoksi -OCH₃), 6.85 (2H, d, J=6.87 Hz, 1,4- disübstitüefenil), 6.85 (2H, d, J=9.15 Hz, 1,4- disübstitüefenil), 6.97

(3H, m, tiyazol -CH, 1,4- disüstitüefenil), 7.04 (2H, d, J=8.73 Hz, 1,4- disüstitüefenil), 7.20 (2H, d, J=7.65 Hz, 1,4- disüstitüefenil) 7.60 (2H, m, 1,4- disüstitüefenil), 7.74 (2H, d, J=8.10 Hz, disüstitüefenil), 7.94 (1H, s, -CH), 11.90 (1H, s, -NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ= 25.77, 68.67, 79.91, 83.37, 107.76, 111.22, 117.10, 120.39, 121.95, 131.98, 133.022, 135.79, 137.34, 143.74, 145.47, 151.01, 155.33, 167.10, 167.96, 176.26

2-{2-[4-(4-Metoksifenilpiperazin-1-il)benziliden]hidrazinil}-4-(2,4-diklorofenil)tiyazol (3c):

C₂₇H₂₅Cl₂N₅OS.MA:538.49 g/mol.Verim: 72 %. Erime Noktası: 283.5-284.5 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.46 (4H, br.s., piperazin CH₂), 3.68 (4H, br.s., piperazin CH₂), 3.75 (3H, s., metoksi -OCH₃), 6.98 (2H, d, J=8.88 Hz, 1,4- disüstitüefenil), 7.08 (2H, d, J=8.88 Hz, 1,4- disüstitüefenil), 7.37 (2H, br.d., 1,4- disüstitüefenil), 7.49 (1H, s, tiyazol -CH), 7.56 (2H, d, J=8.85 Hz, 1,4- disüstitüefenil), 7.69 (1H, s, 1,2,4- trisüstitüefenil), 7.88 (1H, s, 1,2,4- trisüstitüefenil), 7.96 (1H, s, -CH), 12.02 (1H, s, -NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ= 47.13, 47.79, 52.06, 111.94, 115.14, 115.75, 118.85, 119.61, 125.71, 125.96, 127.99, 130.33, 132.67, 142.47, 144.04, 146.02, 147.80, 152.83, 155.47, 156.69, 172.28.

2-{2-[4-(4-Metoksifenilpiperazin-1-il)benziliden]hidrazinil}-4-(3,4-diklorofenil)tiyazol (3d):

C₂₇H₂₅Cl₂N₅OS.MA:538.49 g/mol.Verim: 74%. Erime Noktası: 266.3-268.2 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.15 (4H, br.s., piperazin CH₂), 3.40 (4H, br.s., piperazin CH₂), 3.69 (3H, s., metoksi -OCH₃), 6.84 (2H, d, J=9.12 Hz, 1,4- disüstitüefenil), 6.96 (2H, d, J=9.06 Hz, 1,4- disüstitüefenil), 7.03 (2H, d, J=8.88 Hz, 1,4- disüstitüefenil), 7.51 (2H, br.d, 1,4- disüstitüefenil), 7.54 (1H, s, tiyazol -CH), 7.67 (1H, s, 1,3,4- trisüstitüefenil), 7.84 (1H, s, 1,3,4- tri disüstitüefenil), 7.94 (1H, s, 1,3,4- tri disüstitüefenil), 8.08 (1H, s, -CH). 11.99 (1H, s, -NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ=48.10, 50.23, 55.66, 105.90, 114.79, 115.45, 118.39, 121.80, 125.10, 126.01, 127.74, 128.09, 130.06, 131.40, 131.90, 135.78, 135.92, 142.67, 152.12, 169.08.

Bu çalışmada, süstitüe edilmiş tiyazolilhidrazin türevleri tasarlanmış, sentezlenmiş ve AH' ye karşı asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BuChE) enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri araştırılmıştır. Hedef bileşiklerin sentezi için ilk basamakta, 4-(4-(4-metoksifenil)piperazin-1-il)benzaldehit bileşiği (1), potasyum karbonat varlığında 1-(4-metoksifenil)piperazin ve 4-florobenzaldehitin reaksiyonuyla sentezlenmiştir. Bir sonraki adımda, bileşik 1, etanol içinde tiyosemikarbazid ile reaksiyona sokulmuştur (2). Son basamakta, bileşik 2 ve fenaçil bromür türevlerinin reaksiyonuyla hedef bileşikler 3a-3d elde edilmiştir (Şekil 5).

Sentezlenen bileşiklerin (3a-3d) yapıları ¹H NMR/¹³C NMR spektroskopi metotları ile doğrulanmıştır. Bileşiklerin ¹H-NMR spektrumlarında hidrazona ait C-H protonu yaklaşık 7,26-8,08 ppm'de belirlenirken, tiyazolile ait N-H protonları ise sırasıyla yaklaşık 11,90-12,02 ppm'de belirlenmiştir. ¹³C NMR spektrumları, aromatik ve alifatik iki ayrı bölgede, pikler tahmin edilen alanlarda tespit edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin AChE ve BuChE yüzde inhibisyon potansiyelleri değerlendirilmiştir. Referans bileşik olarak donepezil kullanılmıştır. Yüzdeinhibisyon değerleri olarak verilen sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir. Hedef bileşiklerin AChE enzimi üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri, modifiye Ellman prosesi ile araştırılmıştır. Bu metotta AChE enzimi öncelikle tiyokolin ve asetata parçalamaktadır. Açığa çıkan tiyokolin reaksiyonun ikinci basamağında ilave edilen 5,5'-ditiyo-bis(2-nitro-benzoik) asit (DTNB) ile hidrolizi sonucu 2-Nitro-5((2-trimetilamino)etil)disülfanil)benzoata ve 5-Tiyo-2-nitro-benzoik aside dönüşmektedir. 5-Tiyo-2-nitro-benzoik asit sarı renkli ve 412 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon göstermektedir [34]. İnhibisyon çalışmalarında, hedef bileşikler ve referans ilaç olan Donepezil hidroklorür 10 µM konsantrasyonunda test edilmiştir.

Tablo 1. 3a-3d Bileşiklerinin ve Referans İlaç Donepezil' in AChE ve BuChE' ye karşı %İnhibisyon Değerleri

Bileşik	%AChE İnhibisyonu	%BuChE İnhibisyonu
3a	NA*	NA
3b	NA	12.87 ± 0.011
3c	NA	15.71 ± 0.008
3d	NA	20.37 ± 0.01
Donepezil HCl	98.86 ± 0.005	78.95 ± 0.031

*NA: Aktivite yok

Bu çalışmada hedef ürünler benzen halkası üzerinden türevlendirme yapılarak kolinesteraz inhibisyon değerleri araştırılmıştır. Benzen halkasının para konumunda flor süstitüenti taşıyan 3a bileşiği ile para konumunda metil süstitüenti taşıyan 3b bileşiği ve orto ve para konumlarında klor süstitüenti taşıyan 3c bileşiği ile meta ve para konumlarda klor süstitüenti taşıyan 3d bileşiklerinin sentezlenerek asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerine karşı inhibe edici potansiyelleri değerlendirilmiştir. Enzim inhibisyon sonuçlarına göre; benzen halkası üzerinde 2. ve 4./3. ve 4. konumda klor süstitüentinin bulunması bütirilkolinesteraz aktiviteyi artırmıştır. Ayrıcabenzen halkasının 4. Konumda flor süstitüentinin bulunması da aktiviteyi azaltıcı yönde etki gösterdiği saptanmıştır.

Grubumuzun daha önce yapmış olduğu bir çalışmada yeni bir seri 1-süstitüe- pirol-2-karboksaldehit (4-(4-süstitüe fenil)-1,3-tiyazol-2-il) hidrazon bileşikleri (1-14) sentezlenmiş ve asetilkolinesteraz aktiviteleri değerlendirilmiştir. Buna göre; en etkili bileşik 1 in IC₅₀ değeri 0.59 mM olarak bulunmuştur [35].

Dolayısıyla yapılan tüm bu çalışmalar neticesinde, enzim inhibisyon sonuçlarında benzen halkası üzerinde 2. ve 4. / 3. ve 4. konumda klor süstitüentinin bulunması bütirilkolinesteraz aktiviteyi artırması ve daha önceki çalışmamızda süstitüe edilmemiş pirol halkasının varlığının asetilkolinesteraz aktiviteyi artırdığı sonucuna varılmıştır. Her iki yapının da tek çatı altında toplanarak oluşturulan yeni bileşiklerin kolinesteraz aktiviteyi artırması öngörülerek ileriki çalışmalara ışık tutması hedeflenmektedir.

IV. SONUÇLAR

Alzheimer hastalığı (AH) günümüzde en yaygın olarak görülen nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır. AH' nın ilerlemesini durduracak veya semptomları tersine çevirerek hastalığın tamamen iyileşmesini sağlayacak etkinliğe bu güne kadar ne yazık ki ulaşamamıştır. AH ile ilgili en bilinen gerçek; bu hastalık ile birlikte birçok nörotransmitter sistemin değişim göstermekte olduğudur. AH' nın başlaması ile birlikte nöron ve akson kaybı gerçekleşir ve bu durum da daha az düzeyde asetilkolin (ACh) salınımı meydana gelir. Dolayısıyla ACh düzeyini artırmak amacıyla uygulanacak en iyi yöntem ise; ACh'yi hidrolize eden AChE enziminin inhibisyonunu sağlamaktır. Yapılan araştırmalar, AChE inhibisyonuna bağlı olarak gerçekleşen ACh düzey artışlarının, Alzheimer hastalığının başlangıç evrelerindeki bilişsel yetmezliği iyileştirebileceğini göstermiştir. Fakat var olan AChEi'lerin gerçek manadatom bir koruma ve etkin bir tedavi sağlayamadığı, sadece hastalığa ait semptomların yavaşlayarak hastalığın ilerlemesini geciktirebildikleri kaydedilmiştir. Geliştirilen bu ilaçların tam etki mekanizmalarının bilinmeksizin sadece belirli yapılar üzerinde pozitif sonuç vermesinin baz alınması, etkin ilaç araştırmalarını ve bu ilaca yönelik tedavi yöntemlerini yetersiz kılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada 4-(4-süstitüe)-2-{2-[4-(4-metoksifenilpiperazin-1-yl)benziliden]hidrazinil} tiyazollerin (3a-3d) sentezi gerçekleştirilmiş ve son ürünlerin yapıları ¹H NMR ve ¹³C NMR analiz yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin kolinesteraz enzimi üzerindeki etkileri Ellman metodu ile değerlendirilmiş ve hedef bileşiklerin yüzde inhibisyon enzim çalışmaları sonucunda 3d bileşiğinin orta düzeyde bütirilkolinesteraz aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerde asetilkolinesteraz aktivite saptanmamıştır. Dolayısıyla yapılan bu çalışmada, tiyazol ve fenil halkası üzerinde meta ve para konumunda bulunan klor süstitüsyonunun bütirilkolinesteraz inhibitör etkiyi olumlu yönde etkilediği öngörülmüştür.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, Alzheimer hastalığının patofizyolojisi, tedavisi ve yeni ilaç geliştirilmesi üzerine yapılmakta olan araştırmalara ışık tutabilmesi açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- [1] Prince, M., Guerchet, M. & Prina, M. (2013). Policy brief for heads of government: the global impact of dementia. *The Global Impact of Dementia*, 8, 2013-2050.
- [2] Shah, H., Albanase, E. & Duggan, C. (2016). Research priorities to reduce the global burden of dementia by 2025. *The Lancet Neurology*, 15, 1285-1294.
- [3] Li, Y., Zhang, X. X., Jiang, L.J., Yuan, L., Cao, T., Li, X., Dong, L., Li, Y., & Yin, S.F. (2015). Inhibition of acetylcholinesterase (AChE): A potential therapeutic target to treat Alzheimer's disease. *Chemical Biology & Drug Design*, 86, 776-782.
- [4] Kumar, G.P. & Khanum, F. (2012). Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacognosy Reviews*, 6, 81-90.
- [5] Kocaelli, H., Yaltirik, M., Yargic, L.I., & Ozbas, H. (2002). Alzheimer's disease and dental management. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 93, 521-4.

- [6] Hofman, A., Ott, A., Breteler, M. M., Bots, M. L., Slooter, A. J., Van Harskamp, F., Van Duijn, C.N., Van Broeckhoven, C., & Grobbee, D.E. (1997). Atherosclerosis, apolipoprotein E. and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *The Lancet*, 349, 151-4.
- [7] Parihar, M. S., & Hemnani, T. (2004). Experimental excitotoxicity provokes oxidative damage in mice brain and attenuation by extract of *Asparagus racemosus*. *Journal of Neural Transmission*, 111, 1-12.
- [8] Shidore M., Machhi, J., Shingala, K., Murumkar, P., Sharma, M. K., Agrawal, N., Tripathi, A., Parikh, Z., Pillai, P. & Yadav, M. R. (2016). Benzylpiperidine-linked Diarylthiazoles as Potential Anti-alzheimer's Agents: Synthesis and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 5823-5846.
- [9] Das, U. N. (2012). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation, *Annals of hepatology*, 11, 409-411.
- [10] Tripathi, A. (2008). Acetylcholinesterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. *Annals of Neuroscience*, 15, 106-111.
- [11] Barta, C., Sasvari-Szekely, M., Devai, A., Kovacs, E., Staub, M. & Enyedi, P. (2001). Analysis of mutations in the plasma cholinesterase gene of patients with a history of prolonged neuromuscular block during anesthesia. *Molecular Genetics and Metabolism*, 74, 484-488.
- [12] Silman, I. & Sussman J.L. (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology, *Current Opinion in Pharmacology*, 5, 293-302.
- [13] Greig, N. H., Utsuki, T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H. W., Perry, T., Lee, B., Ingram, D. K. & Lahiri, D. K. (2001). A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase, *Current Medical Research and Opinion*, 17, 159-165.
- [14] Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217, 408-414.
- [15] Bartus, R. T. (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: Lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Journal of Experimental Neurology*, 163, 495-529.
- [16] Hasselmo, M. E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 16, 710-715.
- [17] Rees, T. M., & Brimijoin, S. (2003). The role of acetylcholine in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Drugs of Today*, 39, 75-83.
- [18] Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87, 955-979.
- [19] Wang, Q., Wang, C., Zuo, Y., Wang, Z., Yang, B., & Kuang, H. (2012). Compounds from the roots and rhizomes of *Valerianaamurensis* protect against neurotoxicity in PC12 cells. *Molecules*, 17, 15013-15021.
- [20] Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., & Valette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41, 31-91.
- [21] Reid, G. A., Chilukuri, N., & Darvesh, S. (2013). Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. *Journal of Neuroscience*, 234, 53-68.
- [22] Masson, P., & Lockridge, O. (2010). Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 494, 107-120.
- [23] Becker, R. E. (1991). Therapy of the Cognitive Deficit in Alzheimer's Disease: the Cholinergic System. *In Cholinergic Basis for Alzheimer Therapy*, 1-22. Birkhäuser, Boston, MA.
- [24] Robinson, D. M., & Keating, G.M. (2006). Memantine: : a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*, 66(11), 1515-1534.
- [25] Heinrich, M. (2010). Galanthamine from *galanthus* and other amaryllidaceae—Chemistry and biology based on traditional use. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 68, 157-165.
- [26] Thomsen, T., & Kewitz, H. (1990). Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine in vitro and in vivo. *Life Science Journal*, 46, 1553-1558.
- [27] Grossberg, G. T. (2003). Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Getting on and staying on. *Current Therapeutic Research*, 64, 216-235.
- [28] Arendt, T., Brückner, M. K., Lange, M., & Bigl, V. (1992). Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development—A study of molecular forms. *Neurochemistry International*, 21, 381-396.
- [29] Soyer, Z., Uysal, S., Parlar, S., Tarikogullari Dogan, A. H., & Alptuzun, V. (2017). Synthesis and molecular docking studies of some 4- phthalimidobenzenesulfonamide derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 13-19.

- [30] Özkay, Ü. D., Can, Ö. D., Özkay, Y., & Öztürk, Y. (2012). Effect of benzothiazole/piperazine derivatives on intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive deficits. *Pharmacological Reports*, 64(4), 834-847.
- [31] Siddiqui, N., Arshad, M. F., Ahsan, W., & Alam, M. S. (2009). Thiazoles: a valuable insight into the recent advances and biological activities. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 1, 136-143.
- [32] Matsunaga, Y., Tanaka, T., Yoshinaga, K., Ueki, S., Hori, Y., & Eta, R. (2011). Acotiamide hydrochloride (Z-338), a new selective acetylcholinesterase inhibitor enhances gastric motility without prolonging QT interval in dogs: comparison with cisapride, itopride, and mosapride. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336, 791-800.
- [33] Alptüzün, V., Prinz, M., & Hörr, V. (2010). Interaction of (benzylidene-hydrazono)-1,4-dihydropyridines with β -amyloid, acetylcholine, and butyrylcholine esterases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 2049-59.
- [34] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- [35] Özkay, Y., Yurttaş, L., Abu Mohsen, U., Sever, B., Hussein, W., Ozturk, O., ... & Kaplancikli, Z. (2014). Study on thiazolyl-hydrazone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 4, 1.