

**Monoamin Oksidaz (MAO) İnhibitör Etkili Yeni Pirazolin
Türevlerinin Moleküler Modelleme Yöntemiyle
Tasarlanması, Sentezi ve İnhibisyon Kinetiklerinin
Hesapsal ve Deneysel Olarak Tayini**

Proje No : 108T232

Prof. Dr. Kemal Yelekçi
Prof. Dr. Gülberk Uçar
Prof. Nesrin Gökhan Kelekçi
Prof. Dr. Safiye Erdem
Dr. Ayşe Erdem
Umut Salgın Gökşen
Seyhan Türkkan

Eylül 2010
İSTANBUL

ÖNSÖZ

108T232 Numaralı “Monoamin Oksidaz (MAO) İnhibitör Etkili Yeni Pirazolin Türevlerinin Moleküler Modelleme Yöntemiyle Tasarlanması, Sentezi ve İnhibisyon Kinetiklerinin Hesapsal ve Deneysel Olarak Tayini” isimli projemizin 280.289,00 TL bütçesinin tamamı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından karşılanmıştır. Projemiz 01/08/2008 ile 01/08/2010 tarihleri arasında iki yıl sürede bitirilmiştir.

Bu vesile ile TÜBİTAK’ da projemizi yürütölmeye uygun bulan, izleyen ve değerdendiren değerdli bilim insanlarına ve bizlere iki yıl süre ile desteklerini esirgemeyen kurum görevlilerine en içten duygularımızla teşekkür ediyoruz.

ÖZET

İlaç geliştirilmesi konusundaki geleneksel yaklaşımların genellikle basamaklı sentez prosedürlerine dayanmaları ve aktivite profillerinin optimizasyonu için çok sayıda bileşiğin sentezinin gerekmesi nedeniyle araştırmacılar son yıllarda aktivite profillerinin çıkarılmasında bilgisayar tabanlı moleküler modelleme teknikleri kullanmaya başlamışlardır. Farmasötik araştırmalarında kullanılan moleküler modelleme tekniklerine **bilgisayar yardımlı ilaç tasarımı** (Computer Assisted Drug Design (CADD)) veya **bilgisayar yardımlı moleküler tasarım** (Computer Assisted Molecular Design (CAMD)) adı verilmektedir.

Bu çalışmada bu yöntemlerden yararlanılarak biyojenik aminlerin oksidatif deaminasyonunda önemli rol oynayan monoamin oksidaz (MAO); MAO-A ve MAO-B olarak isimlendirilen farklı iki izoformdaki enzimle çalışılmıştır. Bu izoformları inhibe eden bileşiklerin duygusal bozukluklar (Örneğin major depresyon) ve nörodejeneratif hastalıklar (Örneğin Parkinson ve Alzheimer Hastalıkları) gibi birçok hastalıkta tedavi edici değeri olduğu bilinmektedir.

Öncelikle, bir dizi yeni pirazolin türevi moleküler modelleme yöntemi ile taranarak potensiyel inhibitör adayları tespit edilmiştir. (Burada esas olarak , *Accelrys Discovery Studio* programları modelleme, tarama ve görüntüleme işlerinde kullanılmıştır.) Daha sonra seçilen bu bileşikler sentezlenmiştir. Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin sıçan karaciğer mikrozomlarından izole edilip kısmen saflaştırılmış olan MAO-A ve MAO-B izoformları ile etkileşimi incelenmiştir. Sıçan karaciğer kaynaklı MAO izoformlarının yeni sentezlenen türevler ile inhibisyonuna ilişkin kinetik parametreler, inhibisyonun seçiciliği ve tersinirliği biyokimyasal olarak tayin edilmiştir.

Hem hesapsal, hemde deneysel olarak ümit vaad eden bileşikler “*Discovery Studio De Novo Design*” tasarım programı kullanılarak daha da geliştirilmiştir. Enzimlerin aktif kısımları farmakofor tasarım programı yardımıyla modellenmiştir. *Spartan* ve *Gaussian* programları kullanılarak sadece aktif kısımda bağlı olan model inhibitörlerin, PM6 seviyesinde enzim-inhibitör bağlanma motifleri daha detaylı olarak incelenmiştir.

Sonuç olarak, deneysel olarak elde edilen veriler hesapsal olarak elde edilen verilerle karşılaştırılarak tartışılmıştır. Elde edilen detaylı veriler MAO enzimleri ile daha sonra yapılabilecek seçimli inhibitörler geliştirme çalışmaları için önemli ve yol gösterici sonuçlara ulaşılmasını sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Monoamin oksidaz (MAO), inhibisyon, pirazolin türevleri, moleküler modelleme, kinetik

ABSTRACT

Since traditional approaches to drug discovery rely on a step-wise synthesis and screening program for large numbers of compounds to optimize activity profiles, scientists recently use computer models of new chemical entities to help define activity profiles. The development of molecular modeling programs and their application in pharmaceutical research has been formalized as a field of study known as **computer assisted drug design (CADD)** or **computer assisted molecular design (CAMD)**.

In this study, using the above techniques, Monoamine oxidase-A (MAO-A) and MAO-B isozymes which play an essential role in the oxidative deamination of the biogenic amines were studied. Compounds that inhibit these isozymes were shown to have therapeutic value in a variety of conditions including affective disorders (e.g. major depression) and neurodegenerative diseases (e.g. Parkinson's and Alzheimer's Diseases).

First, a series of new pyrazoline derivatives were screened using molecular modeling and docking methods (Mainly, Accelrys' Discovery Studio tools were used for modeling, screening and visualization) and promising lead compounds were selected, synthesized and evaluated as novel selective MAO-A or -B inhibitors. MAO-A and -B isoforms will be isolated and partly purified from rat liver microsomal fractions. The kinetic behaviors and selectivities of these novel compounds, as well as the reversibility of their inhibitory actions towards rat liver MAO isoforms will be determined biochemically.

Both experimentally and computationally promising compounds were selected using Discovery Studio's de Novo Design program in order to enhance their binding ability. Pharmacophoric properties of the active site of the enzymes were also mapped. In order to understand the binding pose in the active site in detail quantum mechanics studies were also performed at PM6 level using Gaussian program.

In conclusion, computational results were compared with the experimental studies. The results obtained both computationally and experimentally in this project will provide invaluable data for further studies of these isozymes in order to develop more selective and potential inhibitors.

Keywords: Monoamine oxidase (MAO), inhibition, pyrazoline derivatives, molecular modelling, kinetics

İÇİNDEKİLER

Sayfa
Numarası

ÖNSÖZ	2
ÖZET	3
ABSTRACT	4
İÇİNDEKİLER	5
Şekillerin listesi	9
Tabloların listesi	12
Grafiklerin listesi	13
1.GİRİŞ	14
1.1.Depresyon ve Monoamin Oksidaz İnhibitörleri	14
1.2.Monoamin Oksidazin Genel Yapısı	14
2.GENEL BİLGİLER	16
2.1.Monoaminlerin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	16
2.2.Monoamin Oksidaz İnhibitörlerinin Yapısı	18
2.3.Geri dönüşümsüz MAO İnhibitörleri	18
2.3.1.Hidrazin Türevleri	18
2.3.2.Siklopropilamin Türevleri	18
2.3.3.Proparjilamin Türevleri	19

2.3.4. Allilamin Türevleri	19
2.4. Hidrazolonun Yapısı ve Önemi	19
2.5. MAO-A ve MAO-B'nin Moleküler Özellikleri ve Önemi	22
3. GEREÇ, YÖNTEM ve YAPILAN ÇALIŞMALAR	26
3.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları	26
3.1.1. Proje Kapsamında Kullanılan Programlar	26
3.1.2. Uygulanan Genel Prosedür	27
3.1.2.1. Enzimler İçin Uygulanan Prosedür	27
3.1.2.2. Ligandlar İçin Uygulanan Prosedür	27
3.2. Kimyasal Çalışmalar	34
3.2.1. Materyal	34
3.2.2. Sentez Yöntemleri	34
3.2.2.1. 1-Süstitüefenil-3-furil-2-propen-1-on	34
3.2.2.2. 1-Süstitüetiyokarbamoil-3-süstitüefenil-5-furfuril-2-pirazolin	34
3.3. Analitik Yöntemler	34
3.3.1. Erime Derecesi Tayinleri	34
3.3.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller	34
3.4. Spektrometrik Kontroller	35
3.4.1. IR Spektrumları	35
3.4.2. ¹ H-NMR	35
3.4.3. Kütle Spektrumları	35

3.4.4. Eleman Analizleri	35
3.5.Sentezlenen Bileşiklerin Spektroskopik Sonuçları	38
3.6. Biyokimyasal Çalışmalar	46
3.6.1.Materyal	46
3.6.2.Sıçan Karaciğer Dokusundan Mitokondrial Pellet Eldesi	46
3.6.3.Total MAO, MAO-A ve MAO-B Aktivitelerinin Tayini	46
3.6.4.Protein Tayini	47
3.6.5.Saflaştırma ve MAO'ın Kinetik Özellikleri	47
4. YAPILAN ÇALIŞMALARIN SONUÇLARI	48
4.1.Biyokimyasal Sonuçlar	48
4.1.1.Sentezlenen Pirazolin Türevlerinin MAO İzofomları ile Etkileşimlerine İlişkin Sonuçlar	48
4.2.Moleküler Modellemeye İlişkin Sonuçlar	55
4.2.1.Tasarlanan Bileşiklerin İki Boyutlu Şekilleri	55
4.2.2.Elde Edilen Verilerin Değişik İstatistiksel Yöntemlerle Yorumlanması	75
4.2.3.Tasarlanan İnhibitörlere Uygulanan ADMET (Absorbtion, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) Testleri	83
4.2.4.Kuantum Kimya Hesaplamaları	84
4.2.4.1.F1F-R İnhibitörü-PM6 Hesaplamaları Sonucunda F1F-R İnhibitöründe Gözlemlenen Değişimler	85
4.2.4.2.F2F-R İnhibitörü-PM6 Hesaplamaları Sonucunda F2F-R İnhibitöründe Gözlemlenen Değişimler	87
4.2.4.3.F3F-R İnhibitörü-PM6 Hesaplamaları Sonucunda F3F-R İnhibitöründe Gözlemlenen Değişimler	90
4.2.4.4.F4F-R İnhibitörü-PM6 Hesaplamaları Sonucunda F4F-R İnhibitöründe Gözlemlenen Değişimler	92
4.3. CDOCKER	95

4.4.DS AutoLudi “de novo design”	95
4.5.FARMAKOFÖRE MAPPING	97
5. SONUÇ	99
6. KAYNAKLAR	100
Proje Özet Bilgi Formu	

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1: İnsan MAO-A ve MAO-B'sinde aynı olan FAD-peptit kısmı	15
Şekil 2: MAO-B içerisinde FAD'nin bağlanma bölgesi	15
Şekil 3: Monoaminlerin deaminasyon reaksiyonu	16
Şekil 4: MAO tarafından katalizlenen reaksiyon	16
Şekil 5: MAO'nun substrat oksidasyonunda ileri sürülen kimyasal mekanizma	17
Şekil 6: Hidrazin türevlerinin kimyasal yapısı	18
Şekil 7: Siklopropil amin türevlerinin kimyasal yapısı	18
Şekil 8: Proparjilamin türevlerinin kimyasal yapısı	19
Şekil 9: Fluoroallilamitürevlerinin kimyasal yapısı	19
Şekil 10: Hidrazolonun kimyasal yapısı	21
Şekil 11: Pirazolin türevleri	21
Şekil 12: 1,3,5-trifenil-2-pirazolin türevleri	22
Şekil 13: İnsan MAO-B'nin şematik görünümü	22
Şekil 14: İnsan MAO-A'sının şematik gösterimi	24
Şekil 15: MAO-A ve MAO-B'nin aktif bölge kaviteilerinin karşılaştırmalı bir şekilde şematik gösterimi	25

Şekil 16: 1,4-Difenil-2-bütenin giriş ve substrat kavileri kaynaşmış (kapı açık olduğu zaman) durumdaki görüntüsü	25
Şekil 17: Charmm force field parametreleri	28
Şekil 18: Serbest enerji değeri formülü	28
Şekil 19: Bileşiklerin sentez şeması	34
Şekil 20: F1A_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz-A enziminin aktif kısmındaki üç boyutlu görüntüsü	55
Şekil 21: F1A_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz A enziminin aktif kısmında iki boyutta (2D) görünüşü	56
Şekil 22: F1A_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz B enziminin aktif kısmında görüntüsü	57
Şekil 23: F1A_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz B enziminin aktif kısmında iki boyutlu görüntüsü	58
Şekil 24: F2F_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz A enziminin aktif kısmında üç boyutlu görüntüsü	59
Şekil 25: F2F_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz B enziminin aktif kısmında iki boyutlu görüntüsü	60
Şekil 26: F2F_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz B enziminin aktif kısmında üç boyutlu görüntüsü	61
Şekil 27: F2F_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz B enziminin aktif kısmında iki boyutlu görüntüsü	62
Şekil 28: F3F_R inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü	63
Şekil 29: F3F_R inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü	64
Şekil 30: F3F_R inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü	65
Şekil 31: F3F_R inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü	66
Şekil 32: F3F_S inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü	67
Şekil 33: F3F_S inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu pozunu	68

Şekil 34: F3F_S inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü	69
Şekil 35: F3F_S inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü	70
Şekil 36: F4F_R inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü	71
Şekil 37: F4F_R inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü	72
Şekil 38: F4F_R inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü	73
Şekil 39: F4F_R inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü	74
Şekil 40: F1F-R inhibitörünün PM6 Hesaplaması sonucunda inhibitörün enzim içinde konumlandığı yer	86
Şekil 41: F1F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması	87
Şekil 42: F2F-R inhibitörünün PM6 Hesaplaması sonucunda inhibitörün enzim içinde konumlandığı yer	88
Şekil 43: F2F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması-Poz1	89
Şekil 44: F2F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması-Poz2	89
Şekil 45: F3F-R inhibitörünün PM6 Hesaplaması sonucunda inhibitörün enzim içinde konumlandığı yer	91
Şekil 46: F3F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması	92
Şekil 47: F4F-R inhibitörünün PM6 Hesaplaması sonucunda inhibitörün enzim içinde konumlandığı yer	93
Şekil 48: F4F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması	94
Şekil 49: F4F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması-poz 2	94
Şekil 50: MAO-A aktif bölge farmakofore mapping	97
Şekil 51: MAO-B aktif bölge farmakofore mapping	98

TABLULARIN LİSTESİ

TABLO- 1: Ligandların temel yapısı ve bileşik formülleri	30
TABLO- 2: Bileşiklerin kimyasal yapısı	36
TABLO- 3: Sıçan karaciğerinden elde edilen MAO enziminin kısmi saflaştırma tablosu	47
TABLO- 4: Sıçan karaciğeri MAO enziminin kinetik özellikleri	48
TABLO- 5: Sıçan karaciğer MAO izozimlerinin yeni sentezlenen pirazolin türevleri ile inhibisyonuna ilişkin deneysel IC50 değerleri	48
TABLO-6: MAO izo-enzimlerinin yeni sentezlenen pirazolin türevleri ile inhibisyonuna ilişkin hesapsal Ki değerleri	49
TABLO-7: Sıçan karaciğer MAO izo-enzimlerinin yeni sentezlenen pirazolin türevleri ile inhibisyonuna ilişkin deneysel Ki değerleri	52
TABLO-8: MAO- A ve MAO-B Enzimlerinin deneysel Ki değerleri ve Ki 'lerin log değerleri	75
TABLO- 9: MAO- A ve MAO-B Enzimlerinin hesapsal S-izomerleri için Ki değerleri ve Ki' lerin log değerleri	76
TABLO-10: MAO- A ve MAO-B Enzimlerinin hesapsal R-izomerleri için Ki değerleri ve Ki'lerin log değerleri	77
TABLO-11: MAO-A enzime karşı deneysel, S- ve R-izomerlerinin inhibisyon katsayılarının logaritmik değerleri	78
TABLO-12: MAO -B Enziminin deneysel, hesapsal (R ve S izomerleri) Ki değerlerinin log değerleri	80
TABLO-13: Deneysel ve Hesapsal Seçicilik Değerleri (MAO-B Ki/MAO-A Ki)	82
TABLO-14: De Novo Yöntemiyle Geliştirilen Yüksek Potansiyelli ve Seçimli Geliştirilmiş İnhibitörler	96
TABLO-15: De Novo Yöntemiyle Geliştirilen Yüksek Potansiyelli ve Seçimli Geliştirilmiş İnhibitörlerin Kimyasal Yapısı	97

GRAFİKLERİN LİSTESİ

Grafik 1: Sıçan karaciğer MAO-A aktivitesinin F3F bileşiği tarafından inhibisyonuna ilişkin Lineweaver-Burk grafiği	54
Grafik 2: MAO-A Enziminin deneysel hesapsal S-izomeri ve hesapsal R izomerlerin log Ki değerlerinin karşılaştırılması	78
Grafik 3: MAO-A Enziminin deneysel, S-izomeri ve R izomerlerin logKi değerlerinin korelasyonu	79
Grafik 4: MAO-B Enziminin deneysel, hesapsal S-izomeri ve hesapsal R izomerlerin logKi değerlerinin karşılaştırılması	80
Grafik 5: MAO-B Enziminin deneysel, S ve R izomerlerin log Ki değerlerinin korelasyonu	81
Grafik 6 Deneysel ve Hesapsal Seçicilik indekslerinin karşılaştırması	82
Grafik 7: ADMET test sonuçları	84

1. GİRİŞ

1.1. Depresyon ve Monoamin Oksidaz İnhibitörleri:

Depresyon günümüzde sık rastlanan bir psikiyatrik hastalık olup, tedavisi için geliştirilen yeni ilaçlara rağmen, hala önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI) depresyon tedavisinde 40 yılı aşkın bir süredir kullanımı devam eden ilaçlardır. Bu grup ilaçlar 1950'lerin sonlarında antidepressan olarak tedaviye sokulmalarını takiben gözlenen hepatotoksisite, tiramin içeren yiyeceklerle ve başka tip ilaçlarla birlikte alındıklarında meydana gelen hipertansif krizler ve kümülatif etkiler gibi yan etkilerinden dolayı klinik kullanımlarında azalma ve gerileme olmuş, fakat son yıllarda bu ilaçlara olan ilgi yeniden artmıştır (1).

Bunun en önemli nedeni peptit kimyası ve gen teknolojisi alanlarındaki gelişmeyle birlikte MAO enziminin yapısı ve fonksiyonu hakkındaki bilgilerin artması, MAO'nun MAO-A ve MAO-B olarak adlandırılan ve yapısal farklılıklar gösteren en az iki izoenziminin bulunmasıdır (2). Böylelikle seçici olmayan ve geri dönüşümsüz birinci jenerasyon MAOI'nin yerine tiramin içeren yiyeceklerle etkileşme sonucu hipertansif etki meydana getirmeyen seçici, geri dönüşümlü bileşiklerin geliştirilmesi yönündeki çalışmalar yoğunlaşmış ve bu grup ilaçlar yeniden güncelleştirilmiştir. MAO-A'ya seçici olan inhibitörler depresyon tedavisinde önem kazanırken, MAO-B inhibitörleri de Parkinson tedavisinde umut verici ilaçlar olarak tedaviye girmişlerdir (3,4).

1.2. Monoamin Oksidazın Genel Yapısı:

Monoamin oksidaz [MAO, (EC 1.4.3.4): Monoamin: O₂ oksido redüktaz (deamine edici)] flavin-adenin dinükleotid (FAD) taşıyan bir enzimdir. Dış mitokondriyal membrana bağlı olarak bulunur. c-DNA klonlama çalışmaları sonucunda MAO enziminin MAO-A ve MAO-B olarak isimlendirilen iki formunun olduğu ve bunların amino asit sıralamasının %70 benzerlik gösterdiği bulunmuştur. MAO-A 527 adet, MAO-B ise 520 adet amino asitten oluşur. Amino asit sıralanmasında üç polipeptid bölgesi çalışılan türlerdeki iki alt form arasında yüksek amino asit benzerliği gösterir. İki izoenzimde de aktif bölge, prostetik grup flavin adenin dinükleotidin (FAD) bağlı olduğu kısımdır (5). FAD'nin yapısı **Şekil 1'** de görülmektedir. MAO-B içerisinde FAD'nin bağlanma bölgesi ve hidrojen bağları ise **Şekil 2'** de görülmektedir.

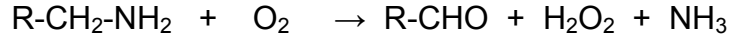
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Monoaminlerin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri:

Yapılan çeşitli histokimyasal, immünokimyasal ve otoradyografik incelemeler MAO-A ve MAO-B'nin merkezi sinir sisteminin ve periferal organların farklı hücre populasyonlarında (MAO-A plasenta ve bağırsakta baskın iken , kan patelelerinde, lenfositlerde (6) ve kromofin hücrelerinde (7) MAO-B baskındır) mevcut olduğunu ve farklı dağılım gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

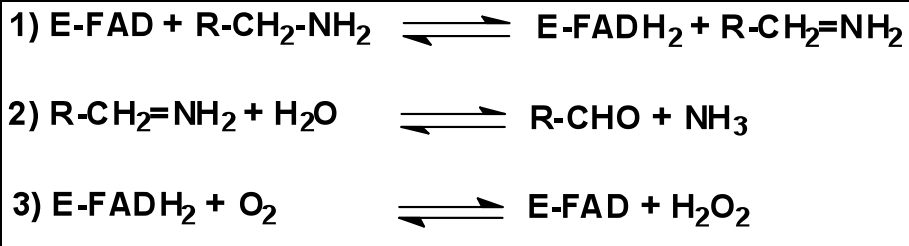
MAO-A ve MAO-B nöroaktif ve vazoaktif aminlerin oksidatif deaminasyonunu, ksenobiyotiklerin (MPTP;1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) deoksidasyonunu katalize eder. Bunlar için asıl substratlar klasik nörotransmitterler olan 5-hidroksi triptamin(serotonin), dopamin, noradrenalin ve adrenalindir. Çoğu doğal substrat her iki MAO tarafından da metabolize edilir. Çünkü kofaktör kısmı her iki MAO formunda da benzerlik gösterir. Dolayısıyla substrat spesifikliğinden sorumlu olan yapısal farklılıklar muhtemelen proteinlerin diğer bölgelerindedir (8). Bundan dolayı substratlar; MAO-A substratları (5-hidroksi triptamin), MAO-B substratları (feniletıl amin ve benzil amin) ve karışık substratlar (tiramin ve dopamin) şeklinde kabaca sınıflandırılabilir.

MAO, nörotransmitterlerin ve diğer endojen monoaminlerin deaminasyon reaksiyonunu **Şekil 3'** te görülen genel denkleme göre katalize etmektedir.

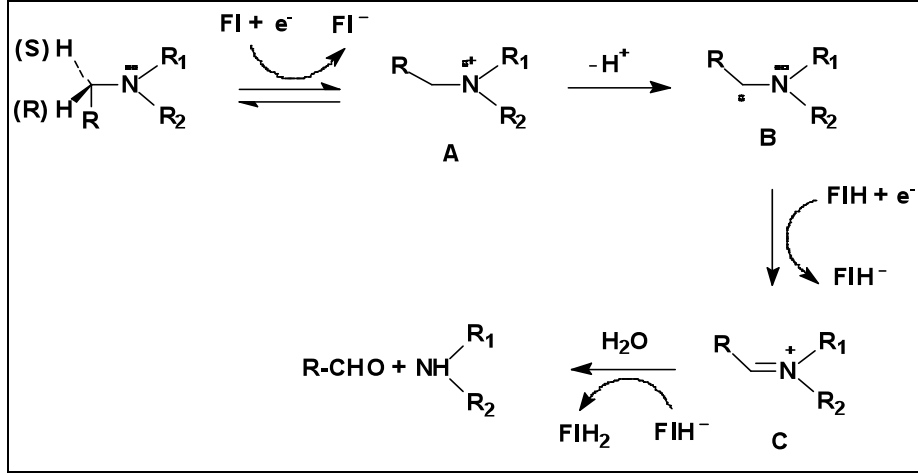


Şekil 3: Monoaminlerin deaminasyon reaksiyonu

MAO tarafından katalize edilen bu reaksiyon **Şekil 4'**de görüldüğü gibi üç basamaklıdır ve kimyasal mekanizması **Şekil 5** 'te açıklanmıştır.



Şekil 4: MAO tarafından katalizlenen reaksiyon



Şekil 5. MAO'nun substrat oksidasyonunda ileri sürülen kimyasal mekanizma

Bu reaksiyonda, substratdan enzime iki defa elektron transferi olur (9). *Silverman ve arkadaşlarının* ileri sürdüğü mekanizmaya göre önce substratın amino grubundan, enzimin flavinine bir elektron transferi ile amin radikal katyonu oluşur (A). Bu radikal **a** proton kaybı ile karbon radikalini oluşturur (B). Daha sonra ikinci bir elektron transferi veya aktif bölge radikaliyle olan birleşmeyi takiben de **b** eliminasyon ile iminyum ürünü oluşur (C). Bu ürün kendiliğinden amonyak veya primer amin çıkışıyla, aldehide hidroliz olur. Bunu FAD'in moleküle oksijen tarafından yeniden oksidasyonu izler (10).

MAO'nun substratları ile etkileşimini stereokimyasal yönden incelemek amacıyla yapılan çalışmalar, reaksiyonun ikinci basamağının (B) yani azot atomuna komşu proşiral metilen grubundan hidrojen kopmasının önemli olduğunu ve bu hidrojenlerden hangisinin öncelikli olarak kopacağını bunların konfigürasyonu ile tayin edildiği gösterilmiştir. *Yu ve arkadaşları* substrat olarak benzil amin veya dopamin kullanarak yaptıkları çalışmada MAO-A ve MAO-B'nin aynı stereospesifiteyi gösterdiğini yani pro-R-hidrojenin her iki MAO formu tarafından da kopartıldığını (H_R, **Şekil 5**) tespit etmişlerdir (11).

MAO ile **b** pozisyonunda asimetrik merkez taşıyan substratlar arasındaki etkileşimi incelemek amacıyla b-feniletanol aminlerin R ve S enantiomerleri kullanılmış ve yapılan bu çalışmada, *Williams* MAO-B'nin her iki enantiomeri de oksitlemesine karşın MAO-A'nin sadece R formu üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (5). Bu sonuçlar MAO-A'nin aktif bölgesinin aralkilamin substratlarındaki **b** karbonuna kaşılık gelen pozisyonlarının sterik engellere sahip olduğunu aynı şeyin MAO-B için mevcut olmadığını göstermektedir.

Ayrıca araştırmalar MAO-A ve MAO-B'nin aktif bölgesinin stereospesifik özelliğinin yanı sıra N atomu ile aromatik halka arasındaki uzaklığın da substrat ya da

inhibitör aktiviteyi etkilediğini göstermiştir.

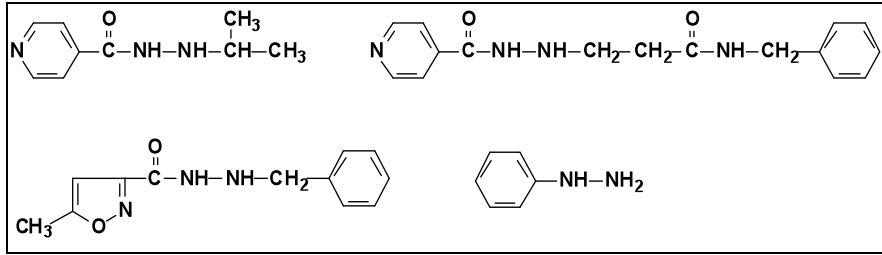
2.2. Monoamin Oksidaz İnhibitörlerinin Yapısı:

Monoamin oksidaz inhibitörleri, dopaminerjik, serotonerjik ve noradrenerjik sinir uçlarındaki MAO'yu inhibe ederek, bu nörotransmitterlerin yıkımını azaltır. Sonuçta bunların intranöronal düzeyini artırır. Böylelikle bu nörotransmitterlerin yıkımı azalır ve intranöronal düzey artar. Böylelikle bu nörotransmitterlerin daha büyük bir miktarının nöronun dışına difüze olduğu ve post-sinaptik reseptör bölgeleriyle etkileştiği dolayısıyla depresif durumlardan sorumlu nörotransmitter eksikliğini giderdiği düşünülmektedir.

MAO inhibitörleri enzimle etkileşim biçimlerine göre geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz monoamin oksidaz inhibitörleri olmak üzere iki grupta incelenebilirler.

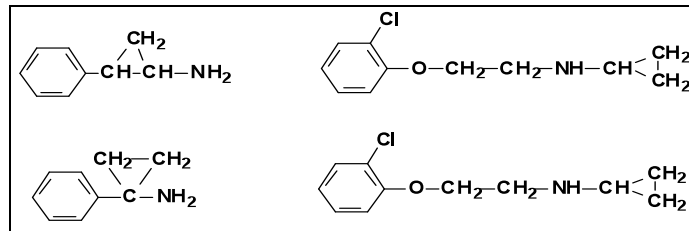
2.3. Geri Dönüşümsüz MAO İnhibitörleri :

2.3.1. Hidrazin Türevleri :



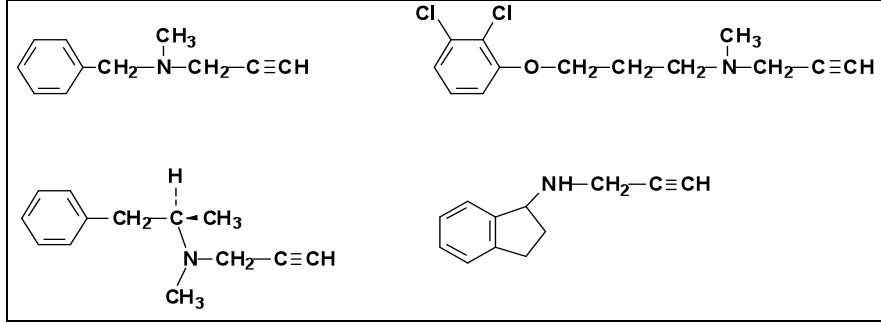
Şekil 6: Hidrazin türevlerinin kimyasal yapısı

2.3.2. Siklopropilamin Türevleri :



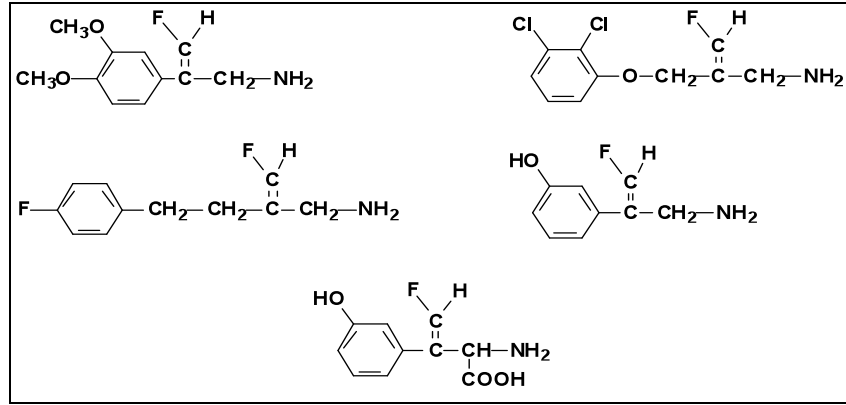
Şekil 7: Siklopropil amin türevlerinin kimyasal yapısı

2.3.3. Proparjilamin Türevleri :



Şekil 8: Proparjilamin türevlerinin kimyasal yapısı

2.3.4. Allilamin Türevleri:



Şekil 9: Fluoroallilamin türevlerinin kimyasal yapısı

2.4. Hidrazolonun Yapısı ve Önemi

Hidrazin türevleri MAO inhibitörlerinin klasik sınıfını oluşturur. Bu grubun prototipi iproniaziddir (N'-isonikotinoil-N''-isopropilhidrazin). İproniazid aslında tüberkülostatik olarak geliştirilen ancak sonradan "Marsilid" ticari adı ile tedaviye giren ilk modern antidepresan ilaçtır (12). Daha sonra bu yapıyı taşıyan fenelzin (Nardil[®]), Isokarboksazid (Marplan), Nialamid (Niamid) gibi diğer antidepresanlar geliştirilmiştir. Bütün bu antidepresanlar MAO alt tiplerine karşı ya çok az seçicilik göstermişlerdir veya hiç seçici olmadıkları anlaşılmıştır.

Bu bileşiklerin N-asetilasyonla metabolize oldukları ve bu yolla oluşan asetil hidrazinlerin hızlı biyosentezlerinin, bu bileşiklerin ciddi hepatotoksik etkilerine neden olan mekanizmayı oluşturdukları bildirilmiştir (13). Metabolizasyonlarındaki sıkıntı ve MAO'nun izozimleri ile seçici olmayan etkileşimlerinden kaynaklanan yan etkilerinden

dolayı kullanımları kısıtlanmıştır. Fakat etkinlikleri kesin olarak bilinen farmakoforik bir grup olan hidrazin grubu bileşiklerin seçici ve hepatotoksik yan etkileri azaltılmış yeni türevlerinin elde edilmesi ile tedaviye yeni öncü bileşikler kazandırılabilceği düşünüldüğü için konu üzerinde çalışmalar devam etmiştir (14-16).

Diğer taraftan hidrazonların da hidrazidler gibi MAO inhibitörü etki gösterebildikleri bildirilmiştir (17-20). Bu grup substrat ve inhibitörlerin ortak özelliği enzimin aktif bölgesiyle etkileşmesinde rol oynayan amino veya imino grubunun varlığıdır (21).

İki ya da dört azot atomu taşıyan farklı heterosiklik bileşikler geri dönüşümlü ve seçici monoamin oksidaz inhibitörü tasarımında yapı taşı rolü üstlenmişler ve oksadiazolonlar, tetrazoller, oksadiazinonlar ve indenopiridazinlerin güçlü, geri dönüşümlü ve seçici MAO-B inhibitörü oldukları bulunmuştur (22-26). Bu grup bileşiklerde ortak özellik inhibitör aktivite için önemli olan ;

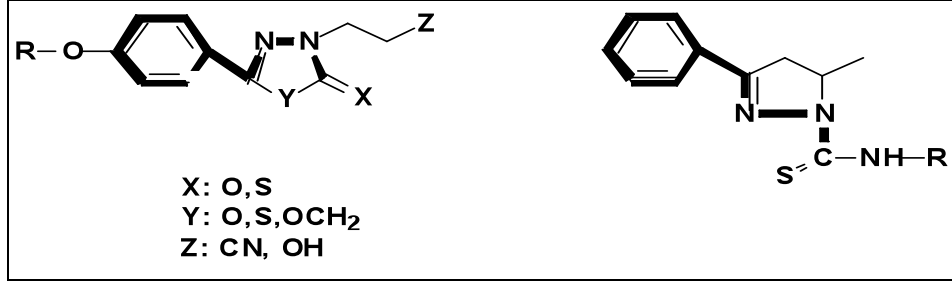
i) Benziloksi grubunun varlığı,

ii) Beş üyeli bir heterosiklik halkanın varlığı (altı üyeli halkalara göre beş üyeli halkalar MAO-B'ye daha iyi afinite gösterir) ve

iii) Arildiazo türevlerinin yan zincirlerinin uzunluğunun substratlarda olduğu gibi iki karbondan daha uzun olmamasıdır.

İki azot içeren 2-pirazolin halkası da bu halkalara izoster yapıda bir moleküldür. Halka kapama veya halka içine alma literatürde örnekleri bulunan ve yeni ilaç geliştirmede kullanılan klasik moleküler modifikasyon yöntemlerinden biridir (27). 2-Pirazolin ve bunların bisiklik türevlerinde farmakofor grubun halka içine alınması bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerine, sterik ve stereokimyasal yapılarına çeşitlilik getirmektedir. Ayrıca 2-pirazolin ve kondanse türevlerinin *cis/trans* ve optik izomeri göstermesinden kaynaklanan aktivite farkı da bildirilmiştir.

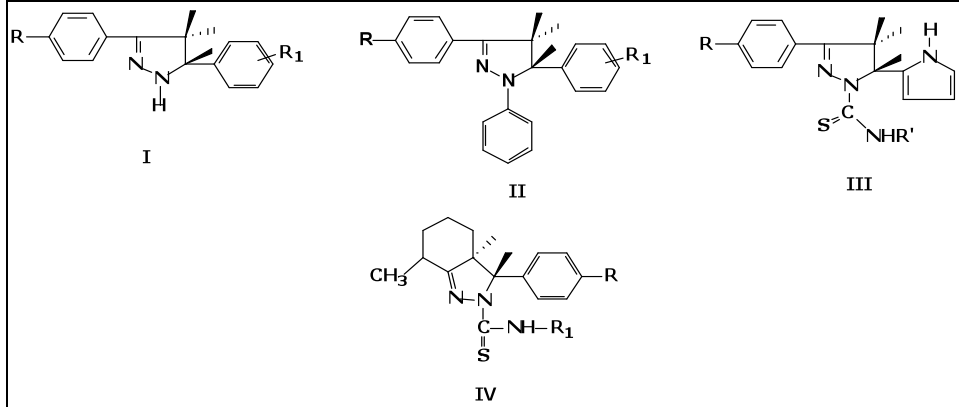
Yukarıda bahsedilen özellikler bileşiklerin gerek metabolizasyonlarının yavaşlatılarak hepatotoksisitesinin azaltılması, gerekse enzimle etkileşim açısından seçicilik sağlanmasında rol oynayabilen kimyasal modifikasyonlardandır.



Şekil 10: Hidrazonun kimyasal yapısı

Halka içinde hidrazon yapısı taşıyan ve santral sinir sistemi üzerinde çeşitli farmakolojik etkiler gösteren (trankilizan, psikoanaleptik, hipnotik ve antikonvülsan) 2-pirazolin bileşiklerinin MAO inhibitörü etkilerinin olduğu hatta MAO alt tiplerine özgüllük gösterdiği, antidepresan/antiparkinson etkiye ve SSAO (Semicarbazide sensitive (duyarlı) amine oksidaz) inhibitörü etkiye sahip oldukları bildirilmiştir (28-38). Bu türevlerin monamin oksidaz inhibitörü etkileri üzerindeki ilk çalışma 1974 yılında *Parmar ve arkadaşları* tarafından yapılmıştır (39). Daha sonra benzer bulgulara *Soni ve arkadaşları* da ulaşmışlardır (40).

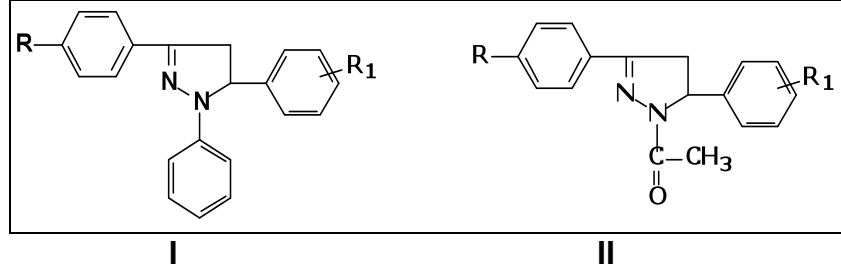
Bu bulguların ışığında daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından 3,5-difenil (I), 1,3,5-trifenil (II), 1-tiyokarbamoil-3,5-difenil-2-pirazolin (III) ve 8-tiyokarbamoil-7,8-diazabisiklo[4.3.0]non-6-en (IV) yapısında çok sayıda 2-pirazolin türevi sentezlenerek antidepresan ve MAO inhibitör etkileri incelenmiş ve bazı bileşiklerin kuvvetli antidepresan etkiye sahip olduğu ve yüksek derecede MAO inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir (28-38).



Şekil 11: Pirazolin türevleri

Bununla birlikte son yıllarda 1,3,5-trifenil-2-pirazolin türevleri (I) üzerinde yapılan moleküler modelleme çalışmaları, 1 numaralı konumdaki fenil halkasının pirazolin halkasının N2'si ile isoalloksazinin N5'i arasında MAO inhibisyonu açısından oldukça önemli olan yük-transfer etkileşme oluşumuna izin vermediğini göstermiştir

(31). Aktivite tarama sonuçlarına göre de bu bileşikler daha düşük MAO inhibitörü etki gösterirken, BSAO (bovine serum amin oksidaz) daha iyi inhibe ettiği görülmüştür. N1'deki fenil grubu yerine N1'de pozitif yük oluşumunu arttıracak bir grup olan asetil grubunun (II) gelmesinin de isoalloksazin halkasıyla etkileşimi arttırarak daha güçlü bir inhibisyona yol açtığı bildirilmiştir.

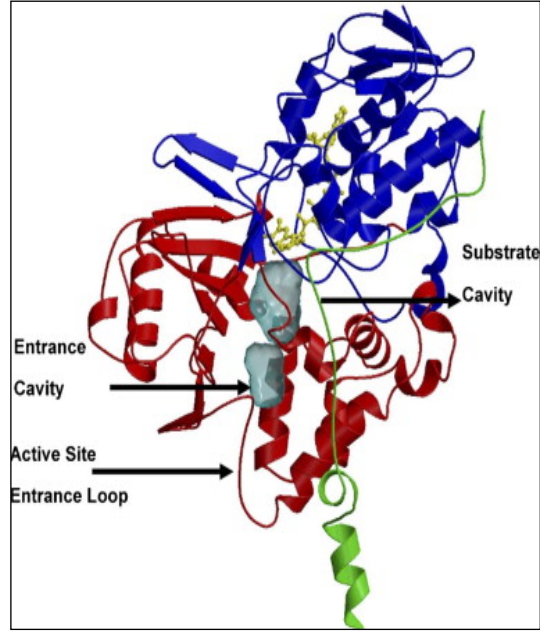


Şekil 12: 1,3,5-trifenil-2-pirazolin türevleri

2.5. MAO-A ve MAO-B 'nin Moleküler Özellikleri:

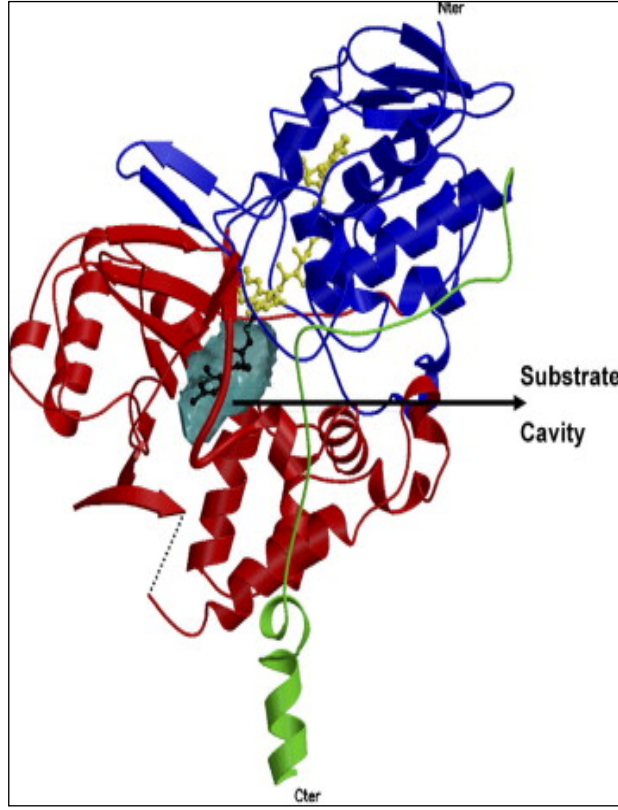
İnsan MAO'ın kristal yapısının tanımlanmış olması bu proteinler ve ligandlar arasındaki seçici etkileşmeyi açıklamada son derece önemlidir. Bu veriler katalitik mekanizmanın araştırılmasında ve rasyonel ilaç tasarımı için gereken farmakoforik ihtiyaçların anlaşılmasında yardımcıdır. *Binda ve arkadaşları* insan MAO-B'sinin kristal yapısını 2002 yılında aydınlatmıştır (41). Aynı araştırmacılar 2005 yılında insan ve sıçan MAO-A'sının üç boyutlu yapısını tespit edip, yayınlamışlardır (42). Sıçan MAO-A'sının kristalografik yapısı da *Ma* tarafından yayınlanmıştır (43). İnsan ve sıçan MAO-A'sı %90 benzerlik göstermesine rağmen (44), konformasyon ve hacim açısından aktif bölge yapısı farklılık gösterir (42).

İnsan MAO-B'si ise dimer olarak kristallenir ve dimerik formun hidrodinamik özelliklerini gösterir. Dimerik formun tek bir monomerinin yapısı **şekil 13'** te görülmektedir. Yapıda çok önemli olan, birbirine komşu iki kavitenin varlığıdır. En büyük kavite flavin kofaktörünün önünde yer alan substrat bağlanma bölgesidir, 390 Å³ büyüklüğündedir. Bu bölge düzdür ve lizin 171, tirozin 188, tirozin 326 ve fenil alanin 343 gibi aromatik ve alifatik amino asitlerden dolayı hidrofobik özelliktedir. "*Giriş kavitesi*" olarak isimlendirilen diğer kavite 290 Å³ büyüklüğünde ve hidrofobiktir. İsolösin bu iki kavite arasında kapı görevi üstlenir ve isolösinin yönlenmesine ya da substrat/ inhibitöre bağlı olarak kapı açılıp, kapanabilir. Kapı görevini gören bu amino asit MAO-B'nin inhibitör seçiciliğinde önemlidir. Substrat kavitesinin sonunda sistein 397'ye kovalent bağlı FAD koenzimi yer almaktadır. Bu enzim katalitik öneme sahip ve flavine yakın, birbirine paralel tirozin 398 ve tirozin 435 amino asitlerini içeren kavitesi "*aromatik kısım*" olarak adlandırılır. Aromatik kısım substratın amin grubunun yönelmesi ve tanınmasında önemlidir. İlgili substrat amininin bu amino asitler ve flavin arasındaki konumlanması kovalent inhibisyon kadar kataliz mekanizması için de önemlidir. Kovalent olmayan inhibisyonda da aromatik kısım yer almasına rağmen, bu çeşit inhibitörler hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler yoluyla bağlanır (45).



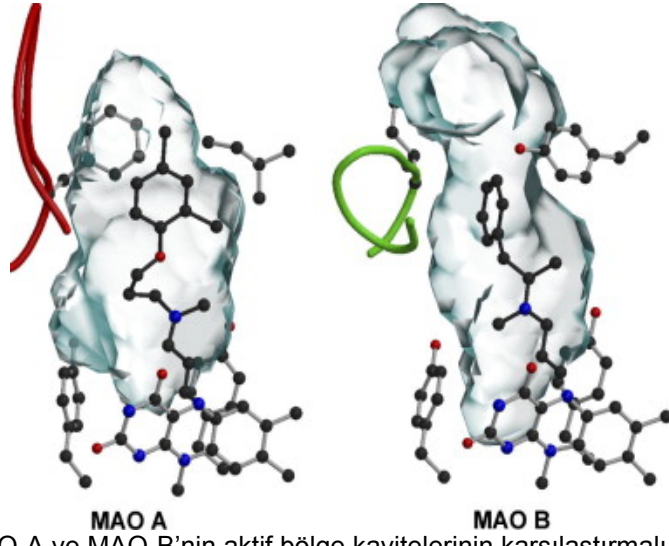
Şekil 13: İnsan MAO-B'nin şematik görünümü- Flavin kısmı sarı, flavin bağlanma bölgesi mavi, sübstrat bağlanma kısmı kırmızı, C-terminal membran bağlanma bölgesi ise yeşil renkte gösterilmiştir.

İnsan MAO-A enzimi MAO-B enziminin tersine , monomer olarak kristallenmektedir.Sıçanda ise insandakinin tersine dimer olarak kristallenme görülmektedir. Buna karşın her iki MAO-A da girişteki protein boşluğuna ilaveten oldukça hidrofobik olan tek bir substrat bağlanma bölgesi içerir. Ölçüsü insan MAO-A'sı için 550 Å iken, sıçan MAO-A'sı için 450 Å'dur. Substrat bağlanma kavitesi MAO-B'de olduğu gibi giriş boşluğuna zıt yöndedir. Aynı zamanda flavinin önünde birbirine paralel iki tirozin halkasının (tirozin 407, 444) yer aldığı aromatik kavite vardır (42) (**Şekil 14**).

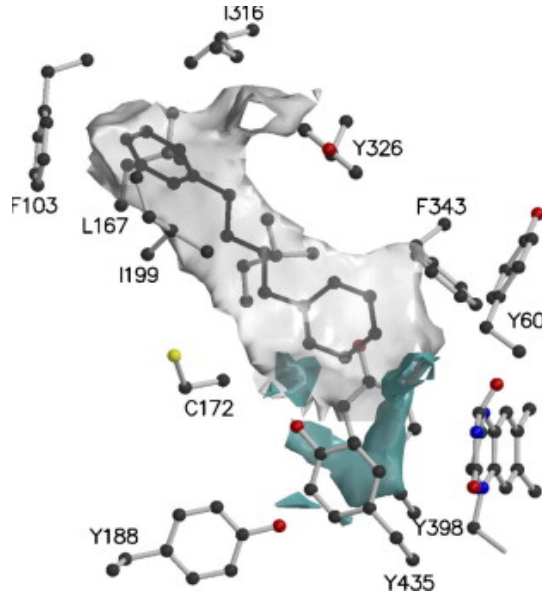


Şekil 14: İnsan MAO-A'sının şematik gösterimi. Flavin kısmı sarı, flavin bağlanma bölgesi mavi, substrat kısmı kırmızı, membran bağlanma bölgesi ise yeşil renkte gösterilmiştir.

İnsan MAO-A ve MAO-B'sinin karşılaştırmalı resmi **Şekil 15**'de görülmektedir. MAO-B iki bölümlü uzayan bir kaviteye sahiptir. İzolösin 199'un yan zinciri açık konformasyonda olduğu zaman (kapı açıldığında) kavite büyüklüğü 700Å'a çıkmaktadır (**Şekil 16**). Buna karşın MAO-A yuvarlak şekilli ve MAO-B'nin substrat kavitesinden daha büyük substrat kavite hacmine sahiptir. Her iki izoenzimin aktif bölgesindeki amino asit yan zincirlerinin analizi, substratların MAO-B'de rotasyon için daha az serbestliğe sahip olduğunu gösterir.



Şekil 15: MAO-A ve MAO-B'nin aktif bölge kaviteilerinin karşılaştırmalı bir şekilde şematik gösterimi



Şekil 16: 1,4-Difenil-2-bütenin giriş ve sübstrat kaviteileri kaynaşmış (kapı açık olduğu zaman) durumdaki görüntüsü

3.GEREÇ, YÖNTEM ve YAPILAN ÇALIŞMALAR

3.1 . Moleküler Modelleme Çalışmaları:

3.1.1 Proje Kapsamında Kullanılan Programlar:

ACCELRY'S Discovery Studio (DS) modülleri : Bu program modülleri moleküler dinamik, protein hazırlama, inhibitör molekülü hazırlama, inhibitör olarak tasarlanan maddelerin minimizasyonunda kullanılmaktadır.

ADMET ve TOPKAT testleri, 3 değişik yöntemle inhibitörün protein yapısına yerleştirilmesi (docking yapılması), sonuçların analiz edilmesi, görüntülerinin alınması (iki ve üçlü boyutta) olmak üzere alt "tool" lardan oluşmaktadır. Bu tool'lara ek olarak, ilaç tasarımında önemli olan inhibitörün türevlerinin hazırlanarak bağlanma potansiyelinin artırılması için kullanılan De Novo Evolution, DS Ludi, Pharmacopore ve amino asit sırası bilinen proteinlerin 3 boyutlu yapılarını oluşturmada kullanılan "Homology Modeling tool" larından oluşmaktadır.

Aşağıda moleküler modelleme yapılırken kullanılan program ve tool'ların listesi yer almaktadır.

ACCELRY'S_DS_SCIENCE
ACCELRY'S_DS_USER_BUNDLE
ACCELRY'S_DS_USER_BUNDLE
ACCELRY'S_MS_COMPONENTS
DS_ANALYSIS
DS_BIOPOLYMER
DS_CATALYST_CONFORMATION
DS_CATALYST_SCORE
DS_CHARMM
DS_DE_NOVO_EVOLUTION
DS_DMOL3-MOLECULAR
DS_FLEXIBLE_DOCKING
DS_LIBDOCK
DS_LIGANDSCORE
DS_LUDI
DS_PROTEIN_REFINE
DS_QUANTUMM
DS_STANDALONE_BUNDLE
Gaussian G09
GausView 05
Spartan 06
AutoDock 4.02
AutoDockTools 1.5.2
NAMD
VMD

3.1.2.Uygulanan Genel Prosedür:

3.1.2.1.Enzimler İçin Uygulanan Prosedür:

Protein data bank (www.pdb.org) sitesinden MAO-A için **2z5x** kodlu (çözünürlüğü 2.2 Å) , MAO-B için ise **1s3e** kodlu (çözünürlüğü 1.6 Å) pdb kristal yapılarının dosyaları alındı. PDB veri bankasından elde edilen MAO-A ve MAO-B enzimleri *Accelrys programının Protein Refine Tool'u* kullanılarak su molekülleri ve bağlı olan inhibitörler çıkartıldı. Amino asitlerin varsa eksiklikleri, kırık bağları ve yükleri ayarlandı. Sonra *Protein DS_Quantum Modülü* kullanılarak enzimler minimize edildi. Minimize edilen bu enzimler *NAMD* ve *VMD* programları kullanılarak moleküler dinamik yapıları düzenlendi.

Bunun için önce FAD koenzimine ait topoloji parametreleri topoloji dosyasına eklendi. Simülasyon, 310K sıcaklığında Langevin dinamiği ile "*Langevin damping*" katsayısı 5ps^{-1} kullanılarak gerçekleştirildi. Sistem önce konjuge gradient algoritma kullanılarak 10000 basamaklı enerji minimizasyonuna, bunu takibinde toplamda 10 ns(nanosaniye)lik moleküler dinamik simülasyonuna tabi tutuldu. Sistem 2 fs (femto saniye) aralıklarla ilerlendi ve her bir ps (pikosaniye) de bir veri kaydedildi. Daha sonra bu enzimler için tasarlanan inhibitörler dokingi yapılar serbest bağlanma enerjileri (ΔG) ve inhibisyon katsayıları (K_i) hesaplandı.

3.1.2.2.Ligandlar İçin Uygulanan Prosedür:

Tasarlanan ligandların (N-sübstitüe pirazolin türevleri) üç boyutlu görüntüleri *Accelrys* ve *Spartan_06* programları kullanılarak çizildi. Yarı deneysel *PM3* metodu ile konformasyon analizi yapıldı ve her bir ligand için en kararlı konformer yapısı seçilerek doking işleminde kullanılmak üzere *.pdb veya *.mol2 dosyası formatında kaydedildi. Liganda her değişiklik yapıldığında bu işlemler tekrarlandı.

Tasarlanan ligandlar MAO-A ve MAO-B enzimine *LibDock*, *AutoDock* programları kullanılarak dock edildi. Bu docking (yerleştirme) programları force field parametrelerini kullanmaktadır. *Accelrys* ise *CHARMM force field* parametrelerini kullanmaktadır. "CHARMm (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics) Force Fields " protein ve DNA gibi biyomoleküllerin simülasyonunda yaygın kullanılan bir programdır.

Kısaca bu parametreler aşağıdaki gibidir. (**Şekil 17**)

$$\begin{aligned}
E_{\text{pot}} &= E_{\text{bond}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{oop}} && \text{internal terms} \\
&+ E_{\text{elec}} + E_{\text{vdW}} && \text{internal/external terms} \\
&+ E_{\text{constraint}} + E_{\text{user}} && \text{special}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
E_{\text{pot}} &= \sum k_b (r - r_0)^2 + \sum K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum |k_\phi| - k_\phi \cos(n\phi) + \sum k_\chi (\chi - \chi_0)^2 \\
&+ \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon 4\pi \epsilon_0 r_{ij}} + \sum \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \text{sw}(r_{ij}^2, r_{\text{on}}^2, r_{\text{off}}^2) + E_{\text{constraint}} + E_{\text{user}}
\end{aligned}$$

The electrostatic energy:

Equation 3:

$$E_{\text{elstat}} = \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon 4\pi \epsilon_0 r_{ij}}$$

Şekil 17: CHARMM force field parametreleri

Burada OOP (out of plane) improper torsiyon olarak tanımlanmıştır.

Serbest enerji değerlerinden (ΔG) aşağıdaki formül temel alınarak inhibisyon katsayıları hesaplandı.

$$\begin{aligned}
&\Delta G^\circ = RT \ln K_i \\
&E.I \rightarrow E+I
\end{aligned}$$

(K_i Enzim inhibitör kompleksinin E.I ayrışma sabitidir)

Şekil 18: Serbest enerji değeri formülü

Daha sonra temizlenen bu yapılar MAO-A, MAO-B ve kofaktör FAD, *NAMD* (Nanoscale Molecular Dynamics) v.2.6 kullanılarak uzun süreli MD yöntemiyle dengeye getirilmiştir. Bu işlemin enzim üzerinde kristalleşme sırasında oluşan gerilimleri düzelttiği için canlı bünyesinde bulunan enzime daha çok benzediği düşünülmektedir. MD simülasyonu sabit NPT şartlarında 310 K'de Langevin dinamiği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Moleküler dinamikten önce sistem konjüge gradient algoritması kullanılarak 10.000 basamaklı enerji minimizasyonu yapılmıştır.

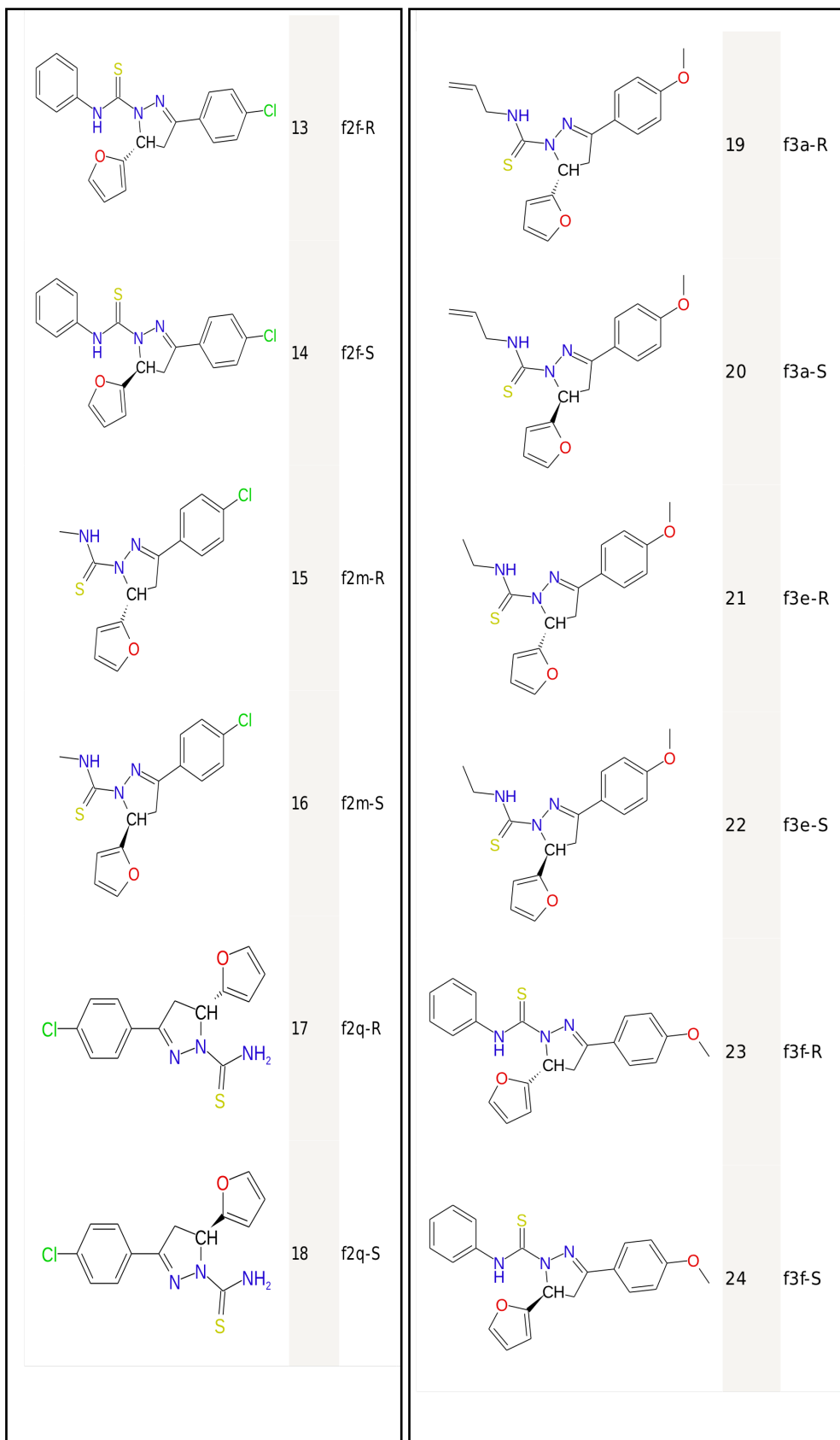
IntelliStation Z Pro iş istasyonu kullanılarak toplam 10 ns MD simülasyonuna devam edilmiştir. En son elde edilen "snapshot" docking deneylerinde kullanılmıştır. Minimize edilen bu enzimlere daha önceden yukarıda bahsedilen optimize edilmiş inhibitörlerle *AutoDock 4.02* ve *Accelrys* programının *LibDock* ve *CDOCKER*

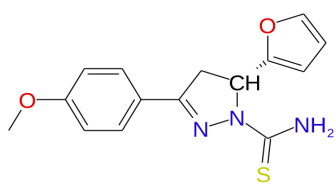
programları kullanılarak bağlanmıştır.

Modelleme çalışmalarından elde edilen sonuçlardan yararlanılarak sentezi yapılacak bileşikler planlanmıştır. Bileşiklerde bir kiral merkez olduğu için her bileşğin iki optik izomeri bulunmaktadır. Yapılan modelleme çalışmalarında R ve S formları aynı enzime çok yakın (hemen hemen aynı) serbest bağlanma enerjileri ile bağlanmışlardır. Sentez sonucunda elde edilen enantiomerler karışımlarının da ayrılmaları teknik zorluklardan dolayı yapılamamış ve karışım olarak enzimatik deneylerde kullanılmıştır. **Tablo-1'** de ligandların temel yapısı ve her birine verilen bileşik kodları yer almaktadır.

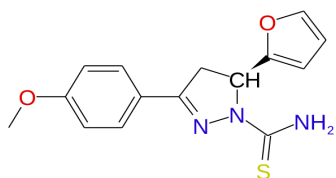
TABLO – 1: Ligandların temel yapısı ve bileşik formülleri

	1	f1a-R		7	f1q-R
	2	f1a-S		8	f1q-S
	3	f1e-R		9	f2a-R
	4	f1e_S		10	f2a-S
	5	f1f-R		11	f2e-R
	6	f1f-S		12	f2e_S

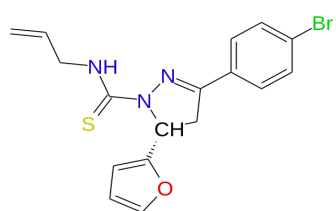




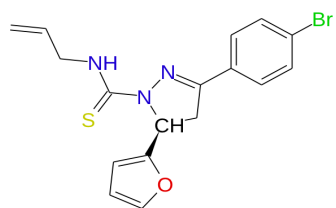
25 f3q-R



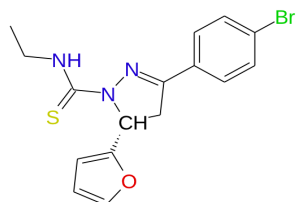
26 f3q-S



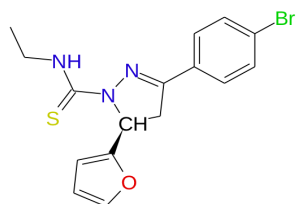
27 f4a-R



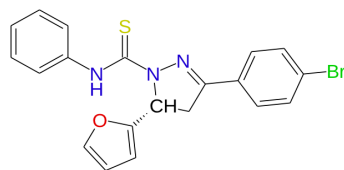
28 f4a-S



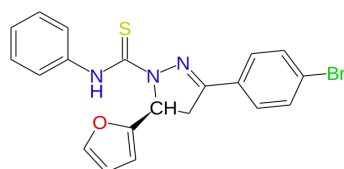
29 f4e-R



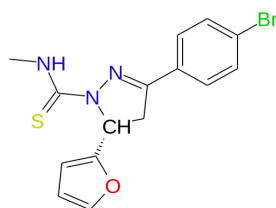
30 f4e-S



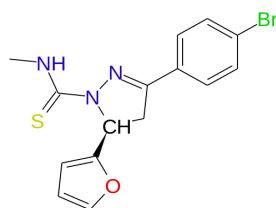
31 f4f-R



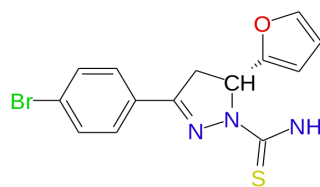
32 f4f-S



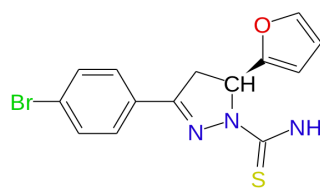
33 f4m-R



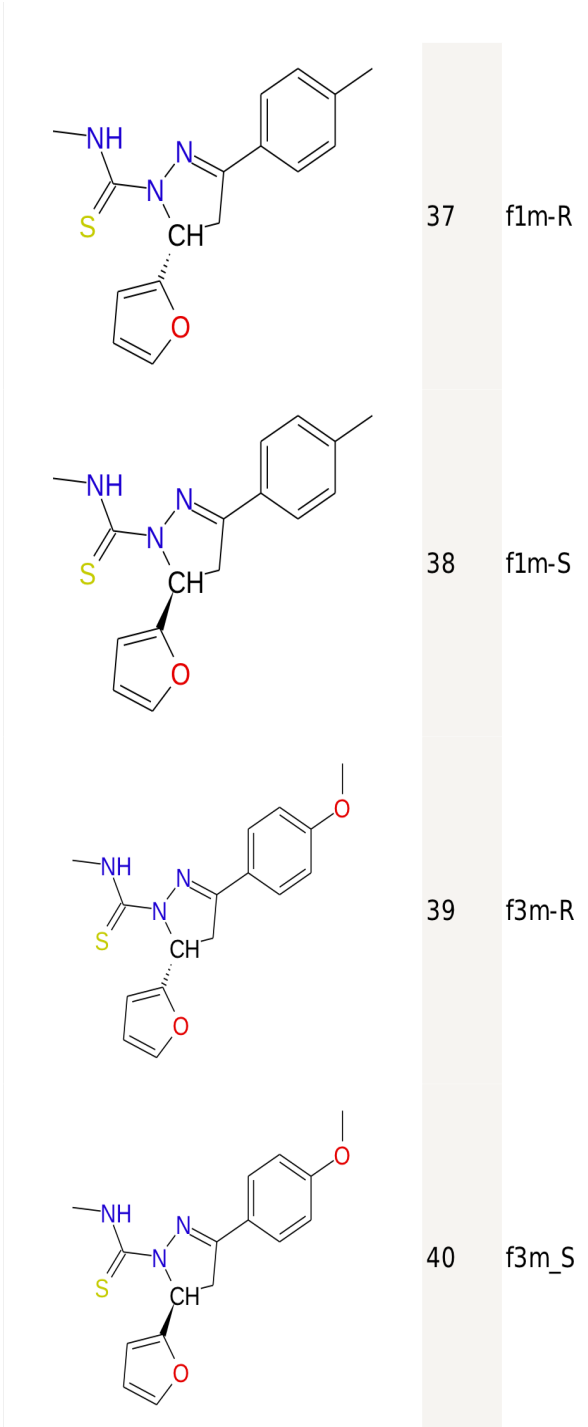
34 f4m-S



35 f4q-R



36 f4q-S

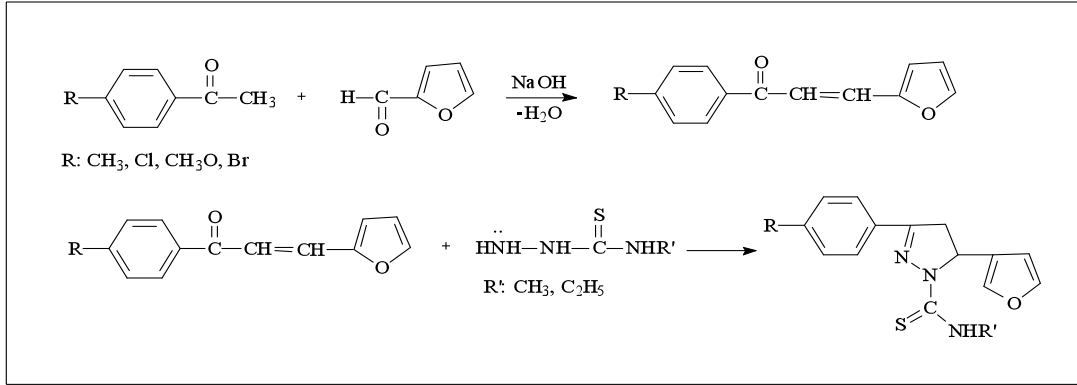


3.2. Kimyasal Çalışmalar:

3.2.1. Materyal:

Çalışmalarımızda kullanılan asetofenon, furfural, 4/metil/etil/alil/feniltiyosemikarbazit ve nonsübstitüe tiyosemikarbazit türevleri Aldrich ve Merck firmalarının ürünleridir.

3.2.2. Sentez Yöntemleri:



Şekil 19: Bileşiklerin sentez şeması

3.2.2.1. 1-Sübstitüefenil-3-furil-2-propen-1-on:

0.02 mol asetofenon ile 0.02 mol furfuralin etanoldeki karışımına buz banyosunda 0.8 g (0.02 mol) sodyum hidroksitinin 20 mL sudaki çözeltisi damla damla eklenerek ve reaksiyon tamamlanıncaya kadar karıştırıldı. Oluşan kristalize çökelti bir gün buzdolabında bekletildi. Bu süre sonunda çöken bileşik büchner hunisinden süzülde; nötral pH'ya gelinceye kadar su ile yıkanıp oda ısısında kurutulduktan sonra etanolde kristallendirilerek saflaştırıldı (43, 44).

3.2.2.2. 1-Sübstitüe tiyokarbamoil-3-sübstitüefenil-5-furfuril-2-pirazolin:

Bir mol şalkon türevi ile 0.012 mol tiyosemikarbazit/sübstitüe tiyosemikarbazit 25 mL etanolde çözüldükten sonra 5 ml su içinde hazırlanmış NaOH (0.025 mol) çözeltisi eklenerek su banyosunda 8 saat kaynatıp bir gece bekletildi. Çöken ürün süzülde. Uygun bir çözücüde kristallendirilerek saflaştırıldı.

3.3. Analitik Yöntemler:

3.3.1. Erime Derecesi Tayinleri:

Bileşiklerimizin erime derecesi tayinleri "Thomas Hoover Capillary Melting Point Apparatus" erime derecesi tayin cihazı ile saptanmıştır.

3.3.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller:

Çalışmalarımızda Kieselgel HF254 Typ 60(Merck) firmasına ait hazır plaklar kullanılmıştır.

3.4. Spektrometrik Kontroller:

3.4.1. IR Spektrumları:

Spektrumlar, yaklaşık %1 konsantrasyonda madde içeren potasyum bromür ile 10t/cm^2 basınçta hazırlanmış diskler kullanılarak, Perkin Elmer FT IR 1720 X Spektrofotometresinde alınmış ve dalga sayısı (cm^{-1}) cinsinden değerlendirilmiştir.

3.4.2. $^1\text{H-NMR}$:

Spektrumlar bileşiklerin kloroform-d (Merck) daki yaklaşık %10'luk çözeltileri ile Bruker 200 MHz FT-NMR spektrometresinde alınıp, d (ppm) skalasında değerlendirilmiştir.

3.4.3. Kütle spektrumları:

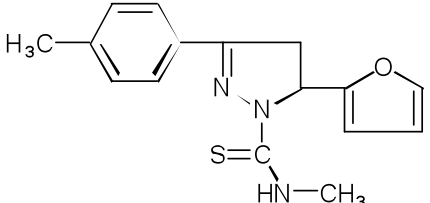
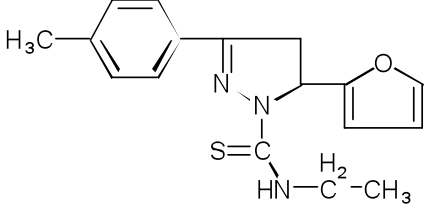
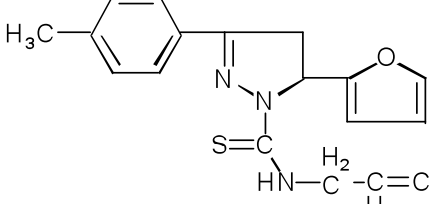
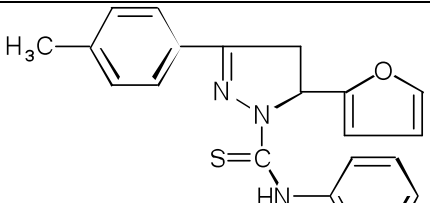
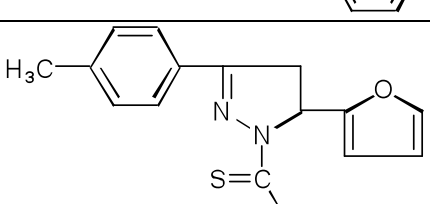
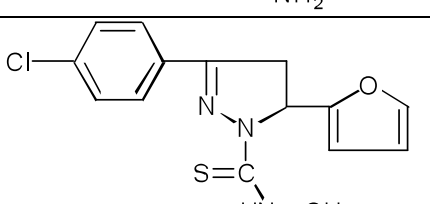
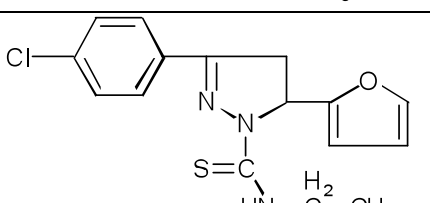
Agilent 5973 Network Mass Selective Detector Direct Insertion Probe SIS (Scientific Instrument Services) HPP7-M kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

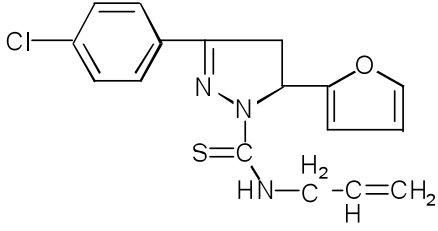
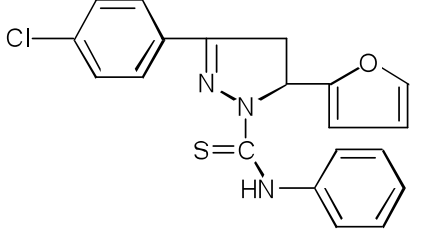
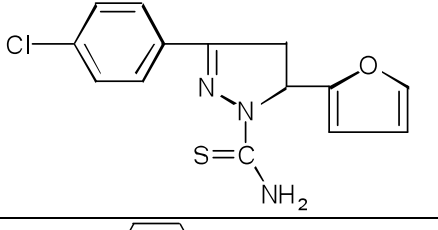
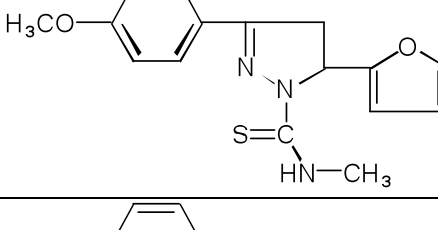
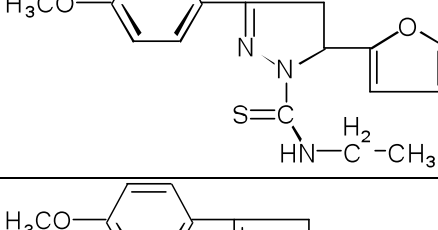
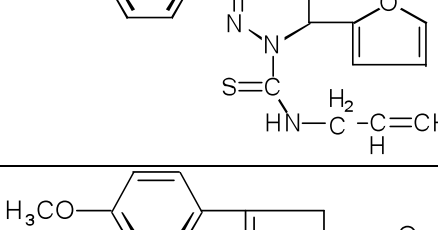
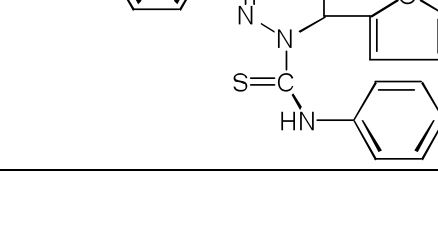
3.4.4. Eleman Analizleri:

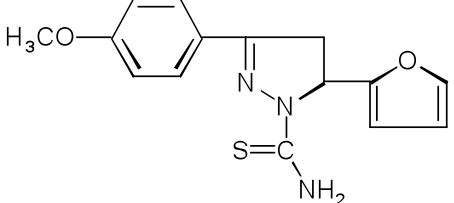
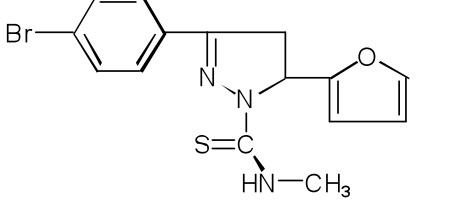
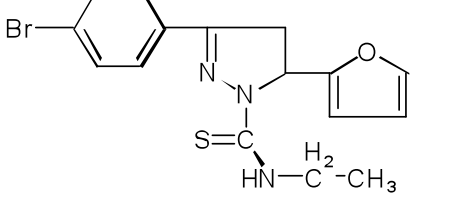
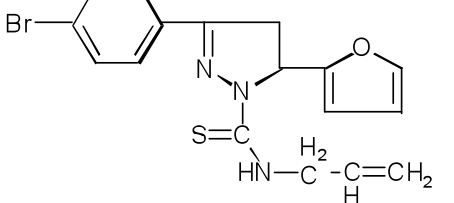
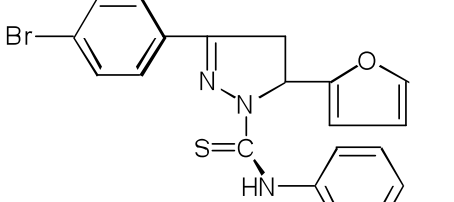
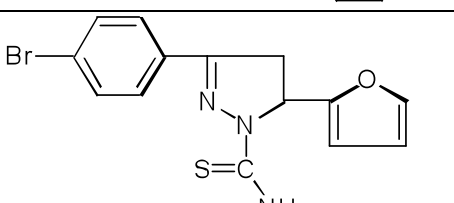
Bileşiklerin C, H ve N elementlerinin analizleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında yaptırılmıştır.

Tablo-2' de bu bileşiklerin yapısı yer almaktadır.

TABLO- 2 : Bileşiklerin kimyasal yapısı

Bileşik Kodu	Bileşiğin Yapısı	Çözündüğü Solvanlar	Kristalizasyon Çözücüsü	Erime Derecesi (°C)	Verim (%)
F ₁ M		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	129,5-130,5	48
F ₁ E		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	125-126	29
F ₁ A		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	103-104	41
F ₁ F		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	174	31
F ₁ Q		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	194,5-195	37
F ₂ M		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	CHCl ₃ :MeOH	175-175,5	48
F ₂ E		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	CHCl ₃ :MeOH	170-171	42

F₂A		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	118-119	53
F₂F		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	CHCl ₃ :MeOH	181-182	61
F₂Q		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	218-219	48
F₃M		MeOH, CHCl ₃ , DMSO, Aseton	Aseton	188-188,5	59
F₃E		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol	144-145,5	63
F₃A		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	139-140	55
F₃F		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	172-173	9

F₃Q		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	198-199,5	35
F₄M		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol	172-173	55
F₄E		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	177,5-178,5	34,5
F₄A		MeOH	Metanol:Su	127-128	48
F₄F		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	Metanol:Su	181	29
F₄Q		MeOH, CHCl ₃ , DMSO	3. Metanol:Su	229-230	36

3.5.Sentezlenen Bileşiklerin Spektroskopik Sonuçları:

1-Tiyokarbamoil-3-(4-metilfenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₁Q)

37%; mp 194,5-195°C (Metanol-su); ¹H-NMR (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 2.41 (s, 3H, Ph-CH₃), 3.46 (dd, 1H, H_A, J_{AB}: 17.6, J_{AX}: 3.6), 3.66 (dd, 1H, H_B, J_{AB}: 17.6, J_{BX}: 11.4), 6.13 (dd, 1H, H_X, J_{AX}: 3.6, J_{BX}: 11.4), 6.33 (dd, 1H, furan H⁴), 6.43 (d, 1H, furan H³), 7.24-7.30 (m, 3H, furan H⁵, Fenil H³, H⁵), 7.65 (d, 2H, Fenil H²,

H^6); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 285 (M^+ , 100%), 286 ($M+1^+$, 19%), 268 (M^+-OH , 11%), 256 (M^+-CNH_2 , M^+-CO , 22%), 252 (M^+-SH , 16%), 225 (M^+-CSNH_2 , 43%), 197 ($M^+-N_2CSNH_2$, 25%), 182 ($M^+-CH_3C_6H_4C$, 6%), 168 ($M^+-CH_3C_6H_4CN$, 26%), 153 ($C_6H_5ON_2S$, 60%), 140 (C_6H_6ONS , 28%), 114 ($C_3H_4N_3S$, 45%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCHN(CH_2)$, 62%), 91 ($CH_3C_6H_4$, 47%), 81 (C_5H_5O , 47%), 60 ($CSNH_2$, 20%). Analiz Hesaplanan $C_{15}H_{15}N_3OS$: C, 63.13; H, 5.30; N, 14.73; S, 11.24. Bulunan C, 62.83; H, 4.99; N, 14.73; S, 11.17.

1-N-Metiltiyokarbamoil-3-(4-metilfenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F_{1M})

48%; mp 129,5-130,5°C (Metanol-su); **¹H-NMR** (400 mHz, $CDCl_3$) d (ppm) (J in Hz): 2.42 (s, 3H, Ph- CH_3), 3.20 (d, 3H, NH- CH_3 , J:1.8), 3.42 (dd, 1H, H_A , J_{AB} : 17.4, J_{AX} : 3.6), 3.63 (dd, 1H, H_B , J_{AB} : 17.4, J_{BX} : 11.4), 6.18 (dd, 1H, H_X , J_{AX} : 3.6, J_{BX} : 11.4), 6.33 (dd, 1H, furan H^4), 6.41 (d, 1H, furan H^3), 7.25-7.35 (m, 3H, furan H^5 , Fenil H^3 , H^5), 7.44 (br, 1H, NH- CH_3), 7.66 (d, 2H, Fenil H^2 , H^6); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 299 (M^+ , 100%), 300 ($M+1^+$, 20%), 282 (M^+-OH , 7%), 270 (M^+-NCH_3 , 26%), 266 (M^+-SH , 14%), 225 ($M^+-CSNHCH_3$, 54%), 209 ($M^+-C_7H_6$, 24%), 197 ($M^+-N_2CSNHCH_3$, 31%), 182 ($M^+-CH_3C_6H_4CN$, 33%), 167 ($C_7H_7ON_2S$, 25%), 153 ($C_6H_5ON_2S$, 25%), 128 ($C_4H_6N_3S$, 68%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCH_2N(CH_2)$, 34%), 91 ($CH_3C_6H_4$, 30%), 81 (C_5H_5O , 51%), 74 ($CSNHCH_3$, 33%). Analiz Hesaplanan $C_{16}H_{17}N_3OS$: C, 64.19; H, 5.72; N, 14.04; S, 10.71. Bulunan C, 64.41; H, 6.35; N, 13.86; S, 10.39.

1-N-Etiltiyokarbamoil-3-(4-metilfenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F_{1E})

29%; mp 125-126°C (Metanol-su); **¹H-NMR** (400 mHz, $CDCl_3$) d (ppm) (J in Hz): 1.28 (t, 3H, CH_2-CH_3), 2.41 (s, 3H, Ph- CH_3), 3.39 (dd, 1H, H_A , J_{AB} : 17.6, J_{AX} : 3.6), 3.62 (dd, 1H, H_B , J_{AB} : 17.6, J_{BX} : 11.2), 3.67-3.74 (m, 2H, NH- CH_2-CH_3), 6.18 (dd, 1H, H_X , J_{AX} : 3.6, J_{BX} : 11.2), 6.31 (dd, 1H, furan H^4), 6.39 (d, 1H, furan H^3), 7.24 (d, 2H, Fenil H^3 , H^5), 7.26 (s, 1H, furan H^5), 7.28 (br, 1H, NH- CH_2), 7.65 (d, 2H, Fenil H^2 , H^6); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 313 (M^+ , 100%), 314 ($M+1^+$, 28%), 296 (M^+-OH , 7%), 284 ($M^+-CH_2CH_3$, 31%), 280 (M^+-SH , 15%), 270 ($M^+-NCH_2CH_3$, 12%), 225 ($M^+-CSNHCH_2CH_3$, 68%), 209 ($M^+-CH_3C_6H_4CH$, 32%), 197 ($M^+-N_2CSNHC_2H_5$, 43%), 196 ($M^+-CH_3C_6H_4CN$, 38%), 181 ($C_8H_9ON_2S$, 25%), 168 ($C_7H_8ON_2S$, 15%), 153 ($C_6H_5ON_2S$, 36%), 142 ($C_5H_8N_3S$, 42%), 118 ($CH_3C_6H_4CHN$, 32%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCHN(CH_2)$, 27%), 94 (C_4H_3OCHN , 30%), 91 ($CH_3C_6H_4$, 30%), 81 (C_5H_5O , 31%), 44 (NH CH_2CH_3 , 34%). Analiz Hesaplanan $C_{17}H_{19}N_3OS$: C, 65.15; H, 6.11; N, 13.41; S, 10.23. Bulunan C, 64.81; H, 6.23; N, 13.32; S, 10.09.

1-N-Alliltiyokarbamoil-3-(4-metilfenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F_{1A})

41%; mp 103-104°C (Metanol-su); **¹H-NMR** (400 mHz, $CDCl_3$) d (ppm) (J in Hz): 2.41 (s, 3H, Ph- CH_3), 3.41 (dd, 1H, H_A , J_{AB} : 17.8, J_{AX} : 3.6), 3.61 (dd, 1H, H_B , J_{AB} : 17.2, J_{BX} : 11.6), 4.26-4.40 (m, 2H, NH- CH_2-CH), 5.23 (dt, 2H, CH= CH_2 , J:.....), 5.92-6.02 (dddd, 1H, CH= CH_2), 6.17 (dd, 1H, H_X , J_{AX} : 3.6, J_{BX} : 11.6), 6.31 (dd, 1H, furan H^4), 6.39 (d, 1H, furan H^3), 7.24 (d, 2H, Fenil H^3 , H^5), 7.26 (s, 1H, furan H^5),

7.44 (br, 1H, NH-CH₂), 7.65 (d, 2H, Fenil H², H⁶); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 325 (M⁺, 89%), 326 (M+1⁺, 20%), 310 (M⁺-CH₃, 11%), 292 (M⁺-SH, 11%), 269 (M⁺-NHC₃H₅, 32%), 225 (M⁺-CSNHC₃H₅, 34%), 211 (M⁺-NCSNHC₃H₅, 100%), 209 (208=M⁺-CH₃C₆H₄CN, 26%), 197 (M⁺-N₂CSNHC₃H₅, 34%), 193 (M⁺-CH₃C₆H₄CN(CH₃), 38%), 167 (C₇H₇ON₂S, 13%), 152 (C₆H₄ON₂S, 79%), 138 (C₆H₄ONS, 17%), 118 (CH₃C₆H₄CHN, 50%), 115 (NHCSNHC₃H₅, 30%), 109 (C₆H₇ON, C₄H₃OCHN(CH₂), 22%), 94 (C₄H₃OCHN, 87%), 91 (CH₃C₆H₄, 37%), 81 (C₅H₅O, 20%), 56 (NHC₃H₅, 35%), 41 (C₃H₅, 57%). Analiz Hesaplanan C₁₈H₁₉N₃OS: C, 66.43; H, 5.88; N, 12.91; S, 9.85. Bulunan C, 66.31; H, 5.68; N, 12.98; S, 9.92.

1-N-Feniltiyokarbamoil-3-(4-metilfenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₁F)

31%; mp 174°C (Metanol-su); **¹H-NMR** (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 2.41 (s, 3H, Ph-CH₃), 3.46 (dd, 1H, H_A, J_{AB}: 17.6, J_{AX}: 3.6), 3.67 (dd, 1H, H_B, J_{AB}: 17.6, J_{BX}: 11.6), 6.27 (dd, 1H, H_X, J_{AX}: 3.6, J_{BX}: 11.6), 6.32 (dd, 1H, furan H⁴), 6.45 (d, 1H, furan H³), 7.28 (s, 1H, furan H⁵), 7.16-7.37 (m, 5H, NH-Fenil), 7.62 (d, 2H, Fenil H³, H⁵), 7.69 (d, 2H, Fenil H², H⁶), 9.18 (br, 1H, NH-Fenil); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 361 (M⁺, 100%), 362 (M+1⁺, 25%), 344 (M⁺-OH, 4%), 332 (M⁺-C₂H₅, 27%), 328 (M⁺-SH, 22%), 269 (M⁺-NHC₆H₅, 4%), 244 (M⁺-CH₃C₆H₄CN, 38%), 225 (M⁺-CSNHC₆H₅, 34%), 197 (M⁺-N₂CSNHC₆H₅, 31%), 190 (C₉H₈N₃S, 42%), 152 (C₆H₄ON₂S, 80%), 135 (CSNC₆H₅, 43%), 118 (CH₃C₆H₄CHN, 24%), 109 (C₆H₇ON, C₄H₃OCHN(CH₂), 28%), 93 (C₄H₃OCN, 34%), 91 (CH₃C₆H₄, 28%), 81 (C₅H₅O, 15%), 77 (C₆H₅, 44%). Analiz Hesaplanan C₂₁H₁₉N₃OS: C, 69.78; H, 5.30; N, 11.63; S, 8.87. Bulunan C, 70.06; H, 5.35; N, 11.59; S, 8.94.

1-Tiyokarbamoil-3-(4-klorofenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₂Q)

48%; mp 218-219°C (Metanol-su); **¹H-NMR** (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 3.44 (dd, 1H, H_A, J_{AB}: 17.4, J_{AX}: 3.6), 3.66 (dd, 1H, H_B, J_{AB}: 17.4, J_{BX}: 11.2), 6.15 (dd, 1H, H_X, J_{AX}: 3.6, J_{BX}: 11.2), 6.34 (dd, 1H, furan H⁴), 6.44 (d, 1H, furan H³), 7.30 (s, 1H, furan H⁵), 7.42 (dt, 2H, Fenil H³, H⁵), 7.69 (dt, 2H, Fenil H², H⁶); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 305 (M⁺, 100%), 306 (M+1⁺, 20%), 307 (M+2⁺, 37%), 288 (M⁺-OH, 9%), 276 (M⁺-CNH₂, M⁺-CO, 36%), 272 (M⁺-SH, 17%), 245 (M⁺-CSNH₂, 43%), 217 (M⁺-N₂CSNH₂, 27%), 194 (M⁺-ClC₆H₄, 5%), 181 (M⁺-ClC₆H₄CH, 12%), 168 (M⁺-ClC₆H₄CN, 34%), 153 (C₆H₅ON₂S, 96%), 152 (M⁺-C₆H₅ON₂S, 58%), 140 (C₆H₆ONS, 49%), 114 (C₃H₄N₃S, 68%), 109 (C₆H₇ON, C₄H₃OCHN(CH₂), 88%), 102 (C₂H₄N₃S, 21%), 94 (C₄H₃OCHN, 34%), 81 (C₅H₅O, 72%), 75 (NHCSNH₂, 32%), 60(CSNH₂, 47%). Analiz Hesaplanan C₁₄H₁₂ClN₃OS: C, 54.99; H, 3.96; N, 13.74; S, 10.49. Bulunan C, 54.75; H, 3.88; N, 13.75; S, 10.35.

1-N-Metiltiyokarbamoil-3-(4-klorofenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₂M)

48 %; mp 175-175,5°C (Kloroform-metanol); **¹H-NMR** (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 3.18 (s, 3H, NH-CH₃), 3.39 (dd, 1H, H_A, J_{AB}: 17.6, J_{AX}: 3.6), 3.62 (dd, 1H, H_B, J_{AB}: 17.6, J_{BX}: 11.6), 6.19 (dd, 1H, H_X, J_{AX}: 3.6, J_{BX}: 11.6), 6.32 (dd, 1H, furan H⁴),

6.41 (d, 1H, furan H^3), 7.26 (s, 1H, furan H^5), 7.41 (d, 2H, Fenil H^3 , H^5), 7.68 (d, 2H, Fenil H^2 , H^6); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 319 (M^+ , 100%), 320 ($M+1^+$, 24%), 321 ($M+2^+$, 40%), 302 (M^+-OH , 8%), 290 (M^+-NCH_3 , 27%), 286 (M^+-SH , 10%), 245 ($M^+-CSNHCH_3$, 42%), 229 ($M^+-OCSNHCH_3$, 22%), 217 ($M^+-N_2CSNHCH_3$, 24%), 182 ($M^+-ClC_6H_4CN$, 47%), 167 ($C_7H_7ON_2S$, 19%), 154 ($C_6H_6ON_2S$, 29%), 128 ($C_4H_6N_3S$, 41%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCH_2N(CH_2)$, 35%), 94 (C_4H_3OCHN , 18%), 81 (C_5H_5O , 45%), 74 ($CSNHCH_3$, 26%). Analiz Hesaplanan $C_{15}H_{14}ClN_3OS$: C, 56.33; H, 4.41; N, 13.14; S, 10.03. Bulunan C, 56.61; H, 3.96; N, 12.99; S, 9.48.

1-N-Etiltiyokarbamoil-3-(4-klorofenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₂E)

42 %; mp 170-171°C (Kloroform-metanol); **¹H-NMR** (400 mHz, $CDCl_3$) d (ppm) (J in Hz): 1.28 (s, 3H, CH_2-CH_3), 3.38 (dd, 1H, H_A , J_{AB} : 17.6, J_{AX} : 3.6), 3.61 (dd, 1H, H_B , J_{AB} : 17.6, J_{BX} : 11.6), 3.67-3.71 (m, 2H, $NH-CH_2-CH_3$), 6.20 (dd, 1H, H_X , J_{AX} : 3.6, J_{BX} : 11.6), 6.32 (s, 1H, furan H^4), 6.40 (d, 1H, furan H^3), 7.26 (s, 1H, furan H^5), 7.33 (br, 1H, $NH-CH_2$), 7.41 (d, 2H, Fenil H^3 , H^5), 7.69 (d, 2H, Fenil H^2 , H^6); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 333 (M^+ , 100%), 334 ($M+1^+$, 25%), 335 ($M+2^+$, 37%), 316 (M^+-OH , 6%), 304 ($M^+-CH_2CH_3$, 24%), 300 (M^+-SH , 8%), 290 ($M^+-NCH_2CH_3$, 8%), 245 ($M^+-CSNHCH_2CH_3$, 35%), 229 ($M^+-OCSNHCH_3$, 20%), 217 ($M^+-N_2CSNHCH_3$, 22%), 196 ($M^+-ClC_6H_4CN$, 38%), 183 ($C_8H_{11}ON_2S$, 20%), 168 ($C_7H_8ON_2S$, 13%), 153 ($C_6H_5ON_2S$, 23%), 152 ($M^+-C_8H_9ON_2S$, 17%), 142 ($C_5H_8N_3S$, 22%), 138 (ClC_6H_4CHN , 20%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCHN(CH_2)$, 21%), 94 (C_4H_3OCHN , 20%), 81 (C_5H_5O , 31%), 44 ($NHCH_2CH_3$, 29%). Analiz Hesaplanan $C_{16}H_{16}ClN_3OS$: C, 57.56; H, 4.83; N, 12.59; S, 9.61. Bulunan C, 57.84; H, 4.63; N, 12.46; S, 9.25.

1-N-Aliltiyokarbamoil-3-(4-klorofenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₂A)

53%; mp 118-119°C (Metanol-su); **¹H-NMR** (400 mHz, $CDCl_3$) d (ppm) (J in Hz): 3.39 (dd, 1H, H_A , J_{AB} : 17.4, J_{AX} : 3.6), 3.62 (dd, 1H, H_B , J_{AB} : 17.4, J_{BX} : 11.2), 4.26-4.39 (m, 2H, $NH-CH_2-CH$), 5.24 (ddq, 2H, $CH=CH_2$, J :.....), 5.96 (dddd, 1H, $CH=CH_2$), 6.19 (dd, 1H, H_X , J_{AX} : 3.6, J_{BX} : 11.2), 6.32 (dd, 1H, furan H^4), 6.41 (d, 1H, furan H^3), 7.26 (s, 1H, furan H^5), 7.44 (dt, 3H, $NH-CH_2$ and Fenil H^3 , H^5), 7.68 (dt, 2H, Fenil H^2 , H^6); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 345 (M^+ , 89%), 346 ($M+1^+$, 26%), 347 ($M+2^+$, 39%), 330 (M^+-CH_3 , 13%), 312 (M^+-SH , 8%), 289 ($M^+-NHC_3H_5$, 25%), 246 ($M^+-CSNC_3H_5$, 23%), 245 ($M^+-CSNHC_3H_5$, 21%), 231 ($M^+-NCSNHC_3H_5$, 73%), 217 ($M^+-N_2CSNHC_3H_5$, 20%), 208 ($M^+-ClC_6H_4CN$, 13%), 193 ($C_9H_9ON_2S$, 29%), 179 ($C_8H_7ON_2S$, 15%), 152 ($ClC_6H_4CN(CH_3)$, $C_6H_4ON_2S$, 58%), 138 (ClC_6H_4CHN , C_6H_4ONS , 27%), 115 ($NHCSNHC_3H_5$, 19%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCHN(CH_2)$, 17%), 94 (C_4H_3OCHN , 45%), 81 (C_5H_5O , 13%), 56 (NHC_3H_5 , 24%), 41 (C_3H_5 , 21%). Analiz Hesaplanan $C_{17}H_{16}ClN_3OS$: C, 59.04; H, 4.66; N, 12.15; S, 9.27. Bulunan C, 58.82; H, 4.66; N, 12.18; S, 9.20.

1-N-Feniltiyokarbamoil-3-(4-klorofenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₂F)

61 %; mp 181-182°C (Kloroform-metanol); **¹H-NMR** (400 mHz, $CDCl_3$) d (ppm) (J in Hz): 3.46 (dd, 1H, H_A , J_{AB} : 17.6, J_{AX} : 3.2), 3.69 (dd, 1H, H_B , J_{AB} : 17.6, J_{BX} : 11.2),

6.32 (dd, 1H, H_X , J_{AX} : 3.2, J_{BX} : 11.2), 6.34 (t, 1H, furan H^4), 6.47 (d, 1H, furan H^3), 7.20 (t, 1H, NH-Fenil H^4), 7.26 (s, 1H, furan H^5), 7.36 (t, 2H, NH-Fenil H^3 , H^5), 7.45 (d 2H, NH-Fenil H^2 , H^6), 7.61 (d, 2H, Fenil H^3 , H^5), 7.74 (d, 2H, Fenil H^2 , H^6), 9.14 (br, 1H, NH-Fenil); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 381 (M^+ , 100%), 382 ($M+1^+$, 31%), 383 ($M+2^+$, 39%), 364 (M^+ -OH, 6%), 352 (M^+ - C_2H_5 , 31%), 348 (M^+ -SH, 17%), 289 (M^+ - NHC_6H_5 , 7%), 245 (M^+ - $CSNHC_6H_5$, 36%), 244 (M^+ - ClC_6H_4CN , 72%), 229 (M^+ - $OCSNHCH_3$, $C_{12}H_9ON_2S$, 41%), 217 (M^+ - $N_2CSNHC_6H_5$, 32%), 190 ($C_9H_8N_3S$, 37%), 183 (....., 30%), 152 ($ClC_6H_4CN(CH_3)$, $C_6H_4ON_2S$, 77%), 138 (ClC_6H_4CHN , 15%), 135 ($CSNC_6H_5$, 47%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCHN(CH_2)$, 31%), 93 (C_4H_3OCN , 34%), 81 (C_5H_5O , 44%), 77 (C_6H_5 , 32%). Analiz Hesaplanan $C_{20}H_{16}ClN_3OS$: C, 62.90; H, 4.22; N, 11.00; S, 8.40. Bulunan C, 62.37; H, 3.85; N, 10.78; S, 8.26.

1-Tiyokarbamoil-3-(4-metoksifenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₃Q)

35%; mp 198-199,5°C (Metanol-su); **¹H-NMR** (400 mHz, $CDCl_3$) d (ppm) (J in Hz): 3.44 (dd, 1H, H_A , J_{AB} : 17.2, J_{AX} : 3.2), 3.65 (dd, 1H, H_B , J_{AB} : 17.4, J_{BX} : 11.2), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 6.12 (dd, 1H, H_X , J_{AX} : 3.6, J_{BX} : 11.2), 6.33 (dd, 1H, furan H^4), 6.43 (d, 1H, furan H^3), 6.95 (d, 2H, Fenil H^3 , H^5), 7.27 (s, 1H, furan H^5), 7.70 (d, 2H, Fenil H^2 , H^6); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 301 (M^+ , 100%), 302 ($M+1^+$, 18%), 286 (M^+ - CH_3 , 21%), 272 ($273=M^+$ - CNH_2 , M^+ -CO, 17%), 268 (M^+ -SH, 16%), 252 (....., 53%), 241 (M^+ - $CSNH_2$, 40%), 225 (M^+ - $OCSNH_2$, 14%), 213 (M^+ - N_2CSNH_2 , 22%), 168 (M^+ - $CH_3OC_6H_4CN$, 19%), 153 ($C_6H_5ON_2S$, 48%), 140 (C_6H_5ONS , 27%), 133 ($CH_3OC_6H_4CN$, 32%), 114 ($C_3H_4N_3S$, 38%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCHN(CH_2)$, 52%), 94 (C_4H_3OCHN , 13%), 93 (HOC_6H_4 , 20%), 81 (C_5H_5O , 40%), 60($CSNH_2$, 26%). Analiz Hesaplanan $C_{15}H_{15}N_3O_2S$: C, 59.78; H, 5.02; N, 13.94; S, 10.64. Bulunan C, 60.00; H, 5.28; N, 13.98; S, 10.55.

1-N-Metiltiyokarbamoil-3-(4-metoksifenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₃M)

59%; mp 188-188,5°C (Acetone); **¹H-NMR** (400 mHz, $CDCl_3$) d (ppm) (J in Hz): 3.18 (s, 3H, NH- CH_3), 3.39 (dd, 1H, H_A , J_{AB} : 17.2, J_{AX} : 3.6), 3.61 (dd, 1H, H_B , J_{AB} : 17.2, J_{BX} : 11.2), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 6.16 (dd, 1H, H_X , J_{AX} : 3.6, J_{BX} : 11.2), 6.32 (t, 1H, furan H^4), 6.40 (d, 1H, furan H^3), 6.95 (d, 2H, Fenil H^3 , H^5), 7.26 (s, 1H, furan H^5), 7.29 (s, 1H, NH- CH_3), 7.70 (d, 2H, Fenil H^2 , H^6); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 315 (M^+ , 100%), 316 ($M+1^+$, 20%), 298 (M^+ -OH, 7%), 286 (M^+ - NCH_3 , 20%), 282 (M^+ -SH, 13%), 241 (M^+ - $CSNHCH_3$, 53%), 225 (M^+ - $OCSNHCH_3$, 19%), 213 (M^+ - $N_2CSNHCH_3$, 30%), 182 (M^+ - $CH_3OC_6H_4CN$, 24%), 167 ($C_7H_7ON_2S$, 18%), 154 ($C_6H_6ON_2S$, 16%), 141 (C_6H_7ONS , 13%), 133 ($CH_3OC_6H_4CN$, 30%), 128 ($C_4H_6N_3S$, 49%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCH_2N(CH_2)$, 28%), 94 (C_4H_3OCHN , 15%), 93 (HOC_6H_4 , 14%), 81 (C_5H_5O , 42%), 74 ($CSNHCH_3$, 31%). Analiz Hesaplanan $C_{16}H_{17}N_3O_2S$: C, 60.93; H, 5.43; N, 13.32; S, 10.17. Bulunan C, 61.27; H, 5.49; N, 13.55; S, 10.24.

1-N-Etiltiyokarbamoil-3-(4-metoksifenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₃E)

63%; mp 144-145,5°C (Methanol); **¹H-NMR** (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 1.28 (t, 3H, CH₂-CH₃), 3.38 (dd, 1H, H_A, J_{AB}: 17.4, J_{AX}: 3.2), 3.60 (dd, 1H, H_B, J_{AB}: 17.4, J_{BX}: 11.2), 3.66-3.73 (m, 2H, NH-CH₂-CH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 6.17 (dd, 1H, H_X, J_{AX}: 3.2, J_{BX}: 11.2), 6.31 (dd, 1H, furan H⁴), 6.39 (d, 1H, furan H³), 6.95 (d, 2H, Fenil H³, H⁵), 7.26 (s, 1H, furan H⁵), 7.28 (t, 1H, NH-CH₂), 7.70 (d, 2H, Fenil H², H⁶); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 329 (M⁺, 100%), 330 (M+1⁺, 21%), 312 (M⁺-OH, 5%), 300 (M⁺-CH₂CH₃, 20%), 296 (M⁺-SH, 12%), 286 (M⁺-NCH₂CH₃, 10%), 241 (M⁺-CSNHCH₂CH₃, 54%), 225 (M⁺-OCSNHCH₂CH₃, 21%), 213 (M⁺-N₂CSNHCH₂CH₃, 30%), 196 (M⁺-CH₃OC₆H₄CN, 22%), 181 (C₈H₉ON₂S, 14%), 168 (C₇H₈ON₂S, 10%), 153 (C₆H₅ON₂S, 22%), 142 (C₅H₈N₃S, 31%), 133 (CH₃OC₆H₄CN, 32%), 109 (C₆H₇ON, C₄H₃OCHN(CH₂), 20%), 94 (C₄H₃OCHN, 21%), 81 (C₅H₅O, 22%), 44 (NHCH₂CH₃, 25%). Analiz HesaplananC₁₇H₁₉N₃O₂S: C, 61.98; H, 5.81; N, 12.76; S, 9.73. Bulunan C, 61.98; H, 5.72; N, 12.75; S, 9.57.

1-N-Alliltiyokarbamoil-3-(4-metoksifenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₃A)

55%; mp 139-140°C (Metanol-su); **¹H-NMR** (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 3.39 (dd, 1H, H_A, J_{AB}: 17.2, J_{AX}: 3.6), 3.61 (dd, 1H, H_B, J_{AB}: 17.2, J_{BX}: 11.2), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 4.26-4.40 (m, 2H, NH-CH₂-CH), 5.23 (dt, 2H, CH=CH₂, J:.....), 5.92-6.02 (m, 1H, CH=CH₂), 6.17 (dd, 1H, H_X, J_{AX}: 3.6, J_{BX}: 11.2), 6.31 (dd, 1H, furan H⁴), 6.39 (d, 1H, furan H³), 6.95 (d, 2H, Fenil H³, H⁵), 7.26 (s, 1H, furan H⁵), 7.42 (br, 1H, NH-CH₂), 7.70 (d, 2H, Fenil H², H⁶); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 341 (M⁺, 64%), 342 (M+1⁺, 14%), 326 (M⁺-CH₃, 8%), 308 (M⁺-SH, 8%), 285 (M⁺-NHC₃H₅, 24%), 241 (M⁺-CSNHC₃H₅, 28%), 227 (M⁺-NCSNHC₃H₅, 100%), 213 (M⁺-N₂CSNHCH₂CH₃, 27%), 208 (M⁺-CH₃OC₆H₄CN, 11%), 193 (C₉H₉ON₂S, 28%), 152 (C₆H₄ON₂S, 51%), 134 (CH₃OC₆H₄CHN, 42%), 133 (CH₃OC₆H₄CN, 38%), 115 (NHCSNHC₃H₅, 17%), 109 (C₆H₇ON, C₄H₃OCHN(CH₂), 16%), 94 (C₄H₃OCHN, 72%), 81 (C₅H₅O, 15%), 56 (NHC₃H₅, 24%), 41 (C₃H₅, 47%). Analiz HesaplananC₁₈H₁₉N₃O₂S: C, 63.32; H, 5.61; N, 12.31; S, 9.39. Bulunan C, 63.36; H, 5.42; N, 12.36; S, 9.42.

1-N-Feniltiyokarbamoil-3-(4-metoksifenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₃F)

9%; mp 172-173°C (Metanol-su); **¹H-NMR** (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 3.47 (dd, 1H, H_A, J_{AB}: 17.6, J_{AX}: 3.2), 3.68 (dd, 1H, H_B, J_{AB}: 17.6, J_{BX}: 11.2), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 6.28 (dd, 1H, H_X, J_{AX}: 3.2, J_{BX}: 11.2), 6.33 (t, 1H, furan H⁴), 6.46 (d, 1H, furan H³), 6.98 (d, 2H, NH-Fenil H², H⁶), 7.19 (t, 1H, NH-Fenil H⁴), 7.26 (s, 1H, furan H⁵), 7.36 (t, 2H, NH-Fenil H³, H⁵), 7.62 (d, 2H, Fenil H³, H⁵), 7.75 (d, 2H, Fenil H², H⁶), 9.16 (br, 1H, NH-Fenil); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 377 (M⁺, 100%), 378 (M+1⁺, 24%), 360 (M⁺-OH, 3%), 332 (M⁺-C₂H₅, 18%), 328 (M⁺-SH, 18%), 269 (M⁺-NHC₆H₅, 4%), 244 (M⁺-CH₃OC₆H₄CN, 26%), 242 (M⁺-CSNC₆H₅, 48%), 241 (M⁺-CSNHC₆H₅, 32%), 229 (C₁₂H₉ON₂S, 13%), 227 (M⁺-NCSNHC₃H₅, 13%), 225 (M⁺-OCSNHCH₂CH₃, 19%), 213 (M⁺-N₂CSNHC₆H₅, 20%), 190 (C₉H₈N₃S, 32%), 152 (C₆H₄ON₂S, 59%), 135 (CSNC₆H₅, 48%), 133 (CH₃OC₆H₄CN, 35%), 118 (CH₃OC₆H₃C, 7%), 109 (C₆H₇ON, C₄H₃OCHN(CH₂), 24%), 93 (C₄H₃OCN, 26%), 81 (C₅H₅O, 13%), 77 (C₆H₅, 54%). Analiz HesaplananC₂₁H₁₉N₃O₂S: C, 66.82; H, 5.07;

N, 11.13; S, 8.49. Bulunan C, 67.20; H, 5.21; N, 11.22; S, 8.34.

1-Tiyokarbamoil-3-(4-bromofenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₄Q)

36%; mp 229-230°C (Metanol-su); ¹H-NMR (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 3.44 (dd, 1H, H_A, J_{AB}: 17.6, J_{AX}: 3.6), 3.66 (dd, 1H, H_B, J_{AB}: 17.43, J_{BX}: 11.45), 6.16 (dd, 1H, H_X, J_{AX}: 3.6, J_{BX}: 11.4), 6.33 (dd, 1H, furan H⁴), 6.26 (d, 1H, furan H⁵), 7.26 (s, 1H, NH₂), 7.57-7.63 q, 4H, furan H⁵, Fenil H², H³, H⁵, H⁶); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 349 (M⁺, 61%), 350 (M+1⁺, 16%), 351 (M+2⁺, 63%), 334 (M+2⁺-OH, 6%), 332 (M⁺-OH, 6%), 322 (M+2⁺-CNH₂, M+2⁺-CO, 24%), 320 (M⁺-CNH₂, M⁺-CO, 24%), 318 (M+2⁺-SH, 11%), 316 (M⁺-SH, 12%), 291 (M⁺-CSNH₂, 28%), 290 (M⁺-CSNH, 28%), 289 (M⁺-CSNH₂, 27%), 275 (M+2⁺-OCSNH₂, M⁺-NCSNH₂, 10%), 273 (M⁺-OCSNH₂, 9%), 263 (M+2⁺-N₂CSNH₂, 15%), 261 (M⁺-N₂CSNH₂, 14%), 196 (M+2⁺-BrC₆H₄, 8%), 194 (M⁺-BrC₆H₄, 8%), 184 (M+2⁺-BrC₆H₄C, 11%), 183 (BrC₆H₄CN, 11%), 182 (M⁺-BrC₆H₄C, 20%), 181 (BrC₆H₄CN, 16%), 168 (M⁺-BrC₆H₄CN, 36%), 153 (C₆H₅ON₂S, 100%), 152 (M⁺-C₆H₄ON₂S, 45%), 140 (C₆H₆ONS, 44%), 114 (C₃H₄N₃S, 62%), 109 (C₆H₇ON, C₄H₃OCHN(CH₂), 88%), 102 (C₂H₄N₃S, 36%), 94 (C₄H₃OCHN, 29%), 93 (C₄H₃OCN, 31%), 81 (C₅H₅O, 65%), 76 (C₆H₄, 28%), 75 (NHCSNH₂, 25%), 60(CSNH₂, 44%). Analiz HesaplananC₁₄H₁₂BrN₃OS: C, 48.01; H, 3.45; N, 12.00; S, 9.16. Bulunan C, 48.09; H, 3.67; N, 12.13; S, 9.29.

1-N-Metiltiyokarbamoil-3-(4-bromofenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₄M)

55%; mp 172-173°C (Methanol); ¹H-NMR (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 3.18 (d, 3H, NH-CH₃), 3.39 (dd, 1H, H_A, J_{AB}: 17.6, J_{AX}: 3.6), 3.62 (dd, 1H, H_B, J_{AB}: 17.6, J_{BX}: 11.6), 6.19 (dd, 1H, H_X, J_{AX}: 3.6, J_{BX}: 11.6), 6.32 (dd, 1H, furan H⁴), 6.41 (d, 1H, furan H³), 7.26 (s, 1H, furan H⁵), 7.41 (s, 1H, NH-CH₃), 7.56-7.63 (m, 4H, Fenil H², H³, H⁵, H⁶); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 363 (M⁺, 74%), 364 (M+1⁺, 21%), 365 (M+2⁺, 77%), 348 (M+2⁺-OH, 6%), 346 (M⁺-OH, 6%), 336 (M+2⁺-NCH₃, 30%), 334 (M⁺-NCH₃, 28%), 334 (M+2⁺-SH, 11%), 332 (M⁺-SH, 10%), 291 (M+2⁺-CSNHCH₃, 38%), 289 (M⁺-CSNHCH₃, 36%), 275 (M+2⁺-OCSNHCH₃, M⁺-NCSNHCH₃, 17%), 273 (M⁺-OCSNHCH₃, 15%), 263 (M+2⁺-N₂CSNHCH₃, 21%), 261 (M⁺-N₂CSNHCH₃, 22%), 182 (M⁺-BrC₆H₄CN, 77%), 181 (BrC₆H₄CN, 34%), 167 (C₇H₇ON₂S, 46%), 154 (C₆H₆ON₂S, 51%), 153 (C₆H₅ON₂S, 54%), 152 (C₆H₄ON₂S, 43%), 128 (C₄H₆N₃S, 100%), 109 (C₆H₇ON, C₄H₃OCH₂N(CH₂), 59%), 102 (N₂CSNHCH₃, 36%), 94 (C₄H₃OCHN, 36%), 81 (C₅H₅O, 90%), 74 (CSNHCH₃, 72%). Analiz HesaplananC₁₅H₁₄BrN₃OS: C, 49.46; H, 3.87; N, 11.54; S, 8.80. Bulunan C, 49.73; H, 3.94; N, 11.79; S, 8.82.

3.5.18. 1-N-Etiltiyokarbamoil-3-(4-bromofenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₄E)

34,5%; mp 177,5-178,5°C (Metanol-su); ¹H-NMR (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 1.25 (t, 3H, CH₂-CH₃), 3.38 (dd, 1H, H_A, J_{AB}: 17.2, J_{AX}: 3.6), 3.61 (dd, 1H, H_B, J_{AB}: 17.6, J_{BX}: 11.6), 3.66-3.72 (m, 2H, NH-CH₂-CH₃), 6.20 (dd, 1H, H_X, J_{AX}: 3.6, J_{BX}: 11.6), 6.32 (dd, 1H, furan H⁴), 6.40 (d, 1H, furan H³), 7.26 (s, 1H, furan H⁵), 7.33 (br, 1H, NH-CH₂), 7.56-7.63 (m, 4H, Fenil H², H³, H⁵, H⁶); **MS** (70 eV, EI): m/z (%): 377 (M⁺, 96%), 378 (M+1⁺, 30%), 379 (M+2⁺, 100%), 362 (M+2⁺-OH, 7%),

360 (M^+-OH , 6%), 350 ($M+2^+-CH_2CH_3$, 35%), 348 ($M^+-CH_2CH_3$, 34%), 346 ($M+2^+-SH$, 11%), 344 (M^+-SH , 11%), 336 ($M+2^+-NCH_2CH_3$, 10%), 334 ($M^+-NCH_2CH_3$, 11%), 291 ($M+2^+-CSNHCH_2CH_3$, 47%), 289 ($M^+-CSNHCH_2CH_3$, 45%), 275 ($M+2^+-OCSNHCH_3$, 25%), 273 ($M^+-OCSNHCH_3$, 24%), 263 ($M+2^+-N_2CSNHCH_3$, 27%), 261 ($M^+-N_2CSNHCH_3$, 27%), 196 ($M^+-BrC_6H_4CN$, 76%), 182 ($C_8H_{10}ON_2S$, 38%), 181 (BrC_6H_4CN , 56%), 168 ($C_7H_8ON_2S$, 31%), 153 ($C_6H_5ON_2S$, 76%), 152 ($C_6H_4ON_2S$, 48%), 142 ($C_5H_8N_3S$, 69%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCHN(CH_2)$, 49%), 102 ($NCSNHCH_2CH_3$, 42%), 94 (C_4H_3OCHN , 60%), 81 (C_5H_5O , 57%), 44 ($NHCH_2CH_3$, 74%). Analiz Hesaplanan $C_{16}H_{16}BrN_3OS$: C, 50.80; H, 4.26; N, 11.11; S, 8.48. Bulunan C, 50.91; H, 4.33; N, 10.97; S, 8.77.

1-N-Alliltiyokarbamoil-3-(4-bromofenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol (F₄A)

48%; mp 127-128°C (Metanol-su); ¹H-NMR (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 3.39 (dd, 1H, H_A , J_{AB} : 17.4, J_{AX} : 3.6), 3.62 (dd, 1H, H_B , J_{AB} : 17.2, J_{BX} : 11.2), 4.26-4.39 (m, 2H, NH- CH_2 -CH), 5.24 (ddd, 2H, CH= CH_2 , J:.....), 5.93-6.00 (m, 1H, CH= CH_2), 6.20 (dd, 1H, H_X , J_{AX} : 3.6, J_{BX} : 11.2), 6.32 (dd, 1H, furan H^4), 6.41 (d, 1H, furan H^3), 7.26 (s, 1H, furan H^5), 7.42 (br, 1H, NH- CH_2) Fenil), 7.56-7.63 (dt, 2H, Fenil H^2 , H^3 , H^5 , H^6); MS (70 eV, EI): m/z (%): 389 (M^+ , 47%), 390 ($M+1^+$, 13%), 391 ($M+2^+$, 47%), 376 ($M+2^+-CH_3$, 9%), 374 (M^+-CH_3 , 12%), 358 ($M+2^+-SH$, 6%), 356 (M^+-SH , 6%), 335 ($M+2^+-NHC_3H_5$, 25%), 333 ($M^+-NHC_3H_5$, 21%), 292 ($M+2^+-CSNC_3H_5$, 11%), 291 ($M+2^+-CSNHC_3H_5$, 15%), 290 ($M^+-CSNC_3H_5$, 14%), 289 ($M^+-CSNHC_3H_5$, 14%), 277 ($M+2^+-NCSNHC_3H_5$, 50%), 275 ($M^+-NCSNHC_3H_5$, 57%), 263 ($M+2^+-N_2CSNHC_3H_5$, 14%), 261 ($M^+-N_2CSNHC_3H_5$, 16%), 223 ($M^+-BrC_6H_3C$, 11%), 208 ($M^+-BrC_6H_4CN$, 11%), 193 ($C_9H_9ON_2S$, 48%), 182 (BrC_6H_4CHN , 29%), 152 ($C_6H_4ON_2S$, 100%), 138 (C_6H_4ONS , 16%), 115 ($NHCSNHC_3H_5$, 32%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCHN(CH_2)$, 25%), 94 (C_4H_3OCHN , 85%), 81 (C_5H_5O , 22%), 56 (NHC_3H_5 , 43%), 41 (C_3H_5 , 69%). Analiz Hesaplanan $C_{17}H_{16}BrN_3OS$: C, 52.31; H, 4.13; N, 10.77; S, 8.22. Bulunan C, 52.15; H, 3.91; N, 10.85; S, 8.24.

1-N-Feniltiyokarbamoil-3-(4-bromofenil)-5-(2-furil)-4,5-dihidro-(1H)-pirazol(F₄F)

29%; mp 181°C (Metanol-su); ¹H-NMR (400 mHz, CDCl₃) d (ppm) (J in Hz): 3.46 (dd, 1H, H_A , J_{AB} : 17.6, J_{AX} : 3.6), 3.68 (dd, 1H, H_B , J_{AB} : 17.6, J_{BX} : 11.2), 6.30 (dd, 1H, H_X , J_{AX} : 3.6, J_{BX} : 11.2), 6.34 (dd, 1H, furan H^4), 6.47 (d, 1H, furan H^3), 7.20 (t, 1H, NH-Fenil H^4), 7.26 (s, 1H, NH-Fenil H^4), 7.36 (t, 2H, NH-Fenil H^3 , H^5), 7.58-7.61 (m, 4H, Fenil H^2 , H^3 , H^5 , H^6), 7.67 (d 2H, NH-Fenil H^2 , H^6), 9.14 (br, 1H, NH-Fenil); MS (70 eV, EI): m/z (%): 425 (M^+ , 48%), 426 ($M+1^+$, 18%), 427 ($M+2^+$, 52%), 410 ($M+2^+-OH$, 4%), 408 (M^+-OH , 3%), 398 ($M+2^+-C_2H_5$, 22%), 396 ($M^+-C_2H_5$, 22%), 394 ($M+2^+-SH$, 11%), 392 (M^+-SH , 12%), 292 ($M^+-CSNC_6H_5$, 18%), 291 ($M+2^+-CSNHC_6H_5$, 18%), 290 ($M^+-CSNC_6H_5$, 28%), 289 ($M^+-CSNHC_6H_5$, 17%), 275 ($M+2^+-OCSNHCH_3$, 14%), 273 ($M^+-OCSNHCH_3$, 13%), 263 ($M+2^+-N_2CSNHC_6H_5$, 17%), 261 ($M^+-N_2CSNHC_6H_5$, 18%), 244 ($M^+-BrC_6H_4CN$, 50%), 229 ($C_{12}H_9ON_2S$, 19%), 215 (....., 26%), 190 ($C_9H_8N_3S$, 50%), 183 (....., 22%), 182 (BrC_6H_4CHN , 19%), 181 (BrC_6H_4CN , 17%), 152 ($C_6H_4ON_2S$, 100%), 136 ($CSNHC_6H_5$, 22%), 135 ($CSNC_6H_5$, 52%), 109 (C_6H_7ON , $C_4H_3OCHN(CH_2)$, 38%), 94 (C_4H_3OCHN , 19%), 93 (C_4H_3OCN , 41%), 81 (C_5H_5O , 21%), 77 (C_6H_5 , 60%). Analiz

Hesaplanan $C_{20}H_{16}BrN_3OS$: C, 56.34; H, 3.78; N, 9.86; S, 7.52. Bulunan C, 56.18; H, 3.76; N, 9

3.6. Biyokimyasal Çalışmalar:

3.6.1. Materyal:

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan kimyasal bileşikler Sigma-Aldrich (Almanya) ve Merck (USA) firmalarından temin edilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1800 Spektrofotometresinde gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. Sıçan Karaciğer Dokusundan Mitokondrial Pellet Eldesi:

Sıçan karaciğeri, HÜ Kapsamlı Bilimsel Araştırma projesi (Proje no: HÜBAB 04-01-301-005) çerçevesinde edinilen etik kurul izni (No: 1082, 2004) uyarınca sağlanan sıçanlardan elde edilmiştir. Mitokondrial MAO, sıçan karaciğer homojenatının mitokondrial pelletinden elde edilmiştir (**45**). Sıçan karaciğer dokusu (3-5 g) 1:40 (w/v) oranında 0.3 M sükröz içinde homojenize edilmiş, 1,000 xg de 10 dk santrifüjlenmiş; süpernatant alınıp 10,000 xg de 30 dk santrifüjlenerek kaba mitokondrial pellet elde edilmiştir.

Pellet, 3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonyum]-1-propansulfonat (CHAPS) (%1) ile 37°C'de 60 dk inkübe edilecek ve 1,000 xg de 15 dk santrifüjlenmiştir. Pellet, 0.3 M sükröz içinde resüspandeye edilecek; 1.2 M sükröz üstünde tabakalandırılıp 53,000 x g de 2 saat santrifüjlenmiştir. Pellet, potasyum fosfat (KP) tamponu, pH 7.4 de resüspandeye edilip -70°C'de saklanmıştır.

3.6.3. Total MAO, MAO-A ve MAO-B Aktivitelerinin Tayini:

1 mM Vanillik asit, 500 µM 4-aminoantipirin ve 4 U.ml⁻¹ peroksidaz (0.2 M KP tamponu, pH 7.6 içinde hazırlanmış) içeren kromojenik çözelti hazırlanmıştır. Deney karışımı 167 µl kromojenik çözelti, 667 µl substrat çözeltisi (500 µM p-tiramin) ve 133 µl KP tamponundan oluşacak ve pH 7.6'an oluşacaktır. Karışım, enzim eklenmeden önce 37°C'de 10 dk preinkübe edilmiş; reaksiyon 100 µl enzim eklenerek başlatılmış ve absorbans artışı 498 nm'de 60 dakika takip edilmiştir. Reaksiyonun ilk hızı, molar soğurma katsayısı olan 4654 M⁻¹.cm⁻¹ kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol.saat⁻¹.mg⁻¹ olarak ifade edilmiştir (**45**).

MAO-A ve MAO-B aktivitelerinin ölçümünde homojenat ikiye ayrılmıştır. Substrat olarak p-tiramin (MAO-A için 500 µM; MAO-B için 2.5 mM) kullanılmış ve bir izozim ölçülürken diğeri inhibe edilerek izozimlerin aktiviteleri tayin edilmiştir. Tayinden önce enzim, özgül MAO-A inhibitörü **klorgilin** veya özgül MAO-B inhibitörü **L-deprenyl** ile 1:100 oranında 37°C'de 60 dk muamele edilmiştir (son inhibitör derişimleri 1 µM). Daha sonra total MAO aktivitesi tayin edilmiştir.

MAO içeren homojenatların yeni inhibitörlerle etkileşimi ve kinetiğinin tayini Sentezlenen bileşiklerin MAO ile etkileşiminin incelenmesinde, aktivite tayininden önce homojenatlar bileşiklerle 37°C'de 0, 10, 20 ,30, 45 and 60 dakika ön

inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Bileşiklerin MAO izoformlarıyla etkileşim kinetikleri Lineweaver-Burk ikincil resiprokal grafiği, farklı substrat derişimlerinde 1/v nin 1/s'e karşı grafiklenmesi ile hesaplanmıştır. İnhibisyon sabitleri ve diğer kinetik veriler non-regresyon analizi ve excel paket programı kullanılarak hesaplanmış; IC₅₀ değerleri (enzim aktivitesini %50 azaltan inhibitör derişimi) ön inkübasyon yapılmaksızın veya yapılarak ve doz-cevap eğrilerinin non-lineer regresyonu yardımıyla hesaplanmıştır. İnhibisyonların tersinirliği (geri dönebilirliği) dilüsyon tekniğiyle incelenmiştir. Son derişimin 10 katı derişimde hazırlanan enzim örnekleri 37°C'de farklı derişimdeki inhibitörlerle 60 dak. inkübe edilmiştir. Paralel bir deneyde inhibitör yerine distile su girilmiş; örneklerin tümü daha sonra 10 kez dilüe olacak şekilde ölçüm karışımına eklenmiştir. Tüm setlerde MAO aktivitesi tayin edilmiştir.

3.6.4. Protein Tayini:

Örneklerin protein içerikleri Bradford (46) yöntemiyle standart olarak sığır serum albümini kullanılarak belirlenmiştir.

3.6.5. Saflaştırma ve MAO'ın Kinetik Özellikleri:

Sıçan karaciğer dokusu homojenize edilirken her aşamada aktivite ve protein tayini yapılmış, bu değerler kısmi saflaştırma tablosu olarak değerlendirilmiştir. **Tablo 3**'te kısmi saflaştırma tablosu görülmektedir. İlk aşamada elde edilen kaba homojenat hacmi yaklaşık 480 ml idi ve spesifik aktivitesi 3.95 nmol/saat.mg protein olarak hesaplandı. 1000 x g santrifüj sonrası ve CHAPS ile muamele sonrası aşamalarında homojenat miktarı sırasıyla 450 ml ve 10 ml olarak elde edildi ve bu aşamalarda spesifik aktivite 5.32 ve 29.64 nmol/saat.mg protein olarak hesaplandı. Deneylerimizde MAO enzim kaynağı olarak kullanılan 53,000 x g sonrası ürün yaklaşık 22 ml'dir ve substrat olarak p-tiramin kullanıldığında spesifik aktivitesi 54.68 nmol/saat.mg protein olarak tayin edilmiştir. Son aşamaya gelindiğinde MAO spesifik aktivitesi itibarı ile enzim 13.84 kez saflaştırılmış oldu.

TABLO-3 : Sıçan karaciğerinden elde edilen MAO enziminin kısmi saflaştırma tablosu

Aşama	Protein miktarı (mg/ml)	Enzim Aktivitesi (nmol/saat)	Spesifik aktivite (nmol/saat.mg protein)	Saflaştırma (kez)
Kaba Homojenat	3.49	13.80	3.95	1.00
1000 x g sonrası	3.00	14.00	5.32	1.35
CHAPS sonrası	3.92	116.40	29.64	7.50
53000 x g sonrası	3.20	175.00	54.68	13.84

Total MAO, MAO-A ve MAO-B enzimlerinin aktiviteleri yöntemlerde detaylı anlatıldığı şekilde ölçüldü, hesaplandı. Substrat olarak p-tiramin kullanıldı. Elde edilen Km ve Vmax değerleri **Tablo 4**'de gösterildi.

p-tiramin derişimleri total MAO için 50-500 µM, MAO-A için 10-100 µM, MAO-B için 50-500 µM'dir.

TABLO-4 : Sıçan karaciğeri MAO enziminin kinetik özellikleri

İzoform	K _m (µM)	V _{max} (nmol/saat.mg protein)
Total MAO	42,7	73
MAO-A	22	33
MAO-B	205	50

4. ÇALIŞMALARIN SONUÇLARI

4.1.Biyokimyasal Sonuçlar:

4.1.1.Sentezlenen Pirazolin Türevlerinin MAO İzoformları ile Etkileşimlerine İlişkin Sonuçlar:

Sentezlenen pirazolin türevlerinin kimyasal yapıları daha önce yer verdiğimiz **Tablo 2'de**; sıçan karaciğer kaynaklı MAO izo-enzimleri ile etkileşimine ilişkin IC₅₀ değerleri **Tablo 5'de**; hesapsal K_i değerleri **Tablo 6'** da; deneysel K_i değerleri **Tablo 7'** te özetlenmiştir.

TABLO- 5: Sıçan karaciğer MAO izozimlerinin yeni sentezlenen pirazolin türevleri ile inhibisyonuna ilişkin deneysel IC₅₀ değerleri

Bileşik	MAO-A için IC ₅₀ değeri*	MAO-B için IC ₅₀ değeri*	SI** MAO-A/MAO-B	MAO inhibisyonunun seçiciliği
F1A	685.22±35.00 nM	3.2±0.12 µM	0.214	MAO-A için seçici
F1E	690.11±28.00 nM	6.66±0.24 µM	0.103	MAO-A için seçici
F1F	25.30±1.88 nM	777.00±40.90 nM	0.032	MAO-A için seçici
F1M	1.28±0.10 µM	5.55±0.33 µM	0.230	MAO-A için seçici
F1Q	1.18±0.10 µM	1080.00±45.70 µM	0.001	MAO-A için seçici
F2A	225.30±11.00 nM	5.33±0.40 µM	0.042	MAO-A için seçici
F2E	359.20±25.10 nM	3.60±0.20 µM	0.099	MAO-A için seçici
F2F	356.00±14.03 nM	7.90±0.35 µM	0.045	MAO-A için seçici
F2M	875.00±40.33 nM	3.96±0.21 µM	0.220	MAO-A için seçici
F2Q	1.60±0.10 µM	4.40±0.20 µM	0.363	MAO-A için seçici

F3A	240.22±13.50 nM	4.90±0.14 µM	0.049	MAO-A için seçici
F3E	670.19±29.00 nM	8.00±0.35 µM	0.083	MAO-A için seçici
F3F	20.44±0.11 nM	21.00±0.20 µM	9.734x10 ⁻⁴	MAO-A için seçici
F3M	781.00±39.80 nM	4.00±0.20 nM	0.195	MAO-A için seçici
F3Q	800.01±41.00 nM	2.00±0.15 µM	0.400	MAO-A için seçici
F4A	366.00±22.90 nM	2.00±0.11 µM	0.183	MAO-A için seçici
F4E	21.00±1.97 nM	201.00±13.00 nM	0.104	MAO-A için seçici
F4F	29.00±1.99 nM	401.00±25.13 nM	0.072	MAO-A için seçici
F4M	511.00±40.21nM	3.25±0.24 µM	0.157	MAO-A için seçici
F4Q	1.23±0.10 µM	3.80±0.22 µM	0.323	MAO-A için seçici
Selejilin	8.10±0.30 µM	121.80±10.15 nM	66.50	MAO-B için seçici
Moklobemid	33.15±2.05 nM	4.36±0.20 µM	0.007	MAO-A için seçici

*Substrat p-Tiramin, MAO-A ölçülürken 500 µM, MAO-B ölçülürken 2.5 mM derişimde kullanıldı. İzo-ezimlerin tayininde clorgyline (MAO-A inhibitörü) veya l-deprenyl (MAO-B inhibitörü) son derişim olarak 1 µM derişimde kullanıldı. Yeni sentezlenen inhibitörler ve bilinen inhibitörler (selegiline ve moclobemid) homojenatla aktivite tayininden önce 37⁰C de 60 dakika inkübe edildi. Her değer 3 bağımsız deneyin ort±SH sı olarak ifade edildi.

**Selektivite (seçicilik) indeksi. IC₅₀ (MAO-A)/IC₅₀ (MAO-B) olarak ifade edildi.

TABLO-6: MAO izo-enzimlerinin yeni sentezlenen pirazolin türevleri ile inhibisyonuna ilişkin hesapsal K_i değerleri

Bileşik	MAO-A için K _i değeri	MAO-B için K _i değeri	SI* MAO-A/MAO-B	İnhibisyon türü	Tersinirlik	MAO inhibisyonunun seçiciliği
F1A-R	95.60 nM	495.76 nM	0.193	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1A-S	190.25 nM	2.28 µM	0.048	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1E-R	148.73 nM	606.44 nM	0.245	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1E-S	181.54 nM	1.64 µM	0.111	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1F-R	6.90 nM	140.67 nM	0.049	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1F-S	14.63 nM	385.88 nM	0.0379	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1M-R	251.47 nM	645.16 nM	0.389	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1M-S	328.42 nM	1.16 µM	0.283	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici

F1Q-R	371.66 nM	267.99 µM	0.0014	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1Q-S	245.18 nM	1.64 µM	0.149	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2A-R	76.58 nM	1.48 µM	0.052	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2A-S	57.43 nM	1.35 µM	0.043	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2E-R	129.01 nM	516.63 nM	0.249	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2E-S	118.98 nM	1.09 µM	0.109	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2F-R	8.51 nM	74.91 nM	0.114	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2F-S	12.66 nM	69.63 nM	0.182	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2M-R	198.13nM	160.15 nM	0.261	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2M-S	231.10 nM	942.44 nM	0.245	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2Q-R	942.63 nM	2.56 µM	0.368	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2Q-S	902.78 nM	2.58 µM	0.349	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3A-R	77.36 nM	890.14 nM	0.087	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3A-S	66.51 nM	1.84 µM	0.036	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3E-R	173.04 nM	1.82 µM	0.095	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3E-S	378.40 nM	935.86 nM	0.404	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3F-R	5.38 nM	195.35 nM	0.028	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3F-S	9.60 nM	398.17 nM	0.024	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3M-R	161.65 nM	773.58 nM	0.209	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3M-S	442.93 nM	2.33 µM	0.190	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3Q-R	171.93 nM	396.49 nM	0.434	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3Q-S	1510 nM	2.09 µM	0,722	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4A-R	80.34 nM	454.79 nM	0.177	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4A-S	83.49 nM	904.59 nM	0.092	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4E-R	130.04 nM	624.31 nM	0.208	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4E-S	91.34 nM	763.38 nM	0.120	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4F-R	4.28 nM	50.62 nM	0.085	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4F-S	13.26 nM	262.91 nM	0.050	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4M-R	237.59 nM	929.23 nM	0.256	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4M-S	160.09 nM	1.12 µM	0.143	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici

F4Q-R	517.57 nM	1.09 µM	0.475	Yarıřmalđ	Tersinir	MAO-A için seçici
F4Q-S	475.74 nM	2.25 µM	0.211	Yarıřmalđ	Tersinir	MAO-A için seçici
Selejilin	2.06±0.21 µM	30.35±0.12 nM	67.88	Yarıřmalđ	Tersinir	MAO-B için seçici
Moklobemid	8.90±0.27 nM	1.08±3.00 µM	0.008	Yarıřmalđ	Tersinir	MAO-A için seçici

*Selektivite (seçicilik) indeksi. K_i (MAO-A)/ K_i (MAO-B) olarak ifade edildi.

TABLO-7: Sıçan karaciğer MAO izo-enzimlerinin yeni sentezlenen pirazolin türevleri ile inhibisyonuna ilişkin deneysel K_i değerleri

Bileşik	MAO-A için K_i değeri*	MAO-B için K_i değeri*	SI** MAO-A/ MAO-B	İnhibisyon türü	Tersinirlik	MAO inhibisyonunu n seçiciliği
F1A	170.00±9.93 nM	790.00±30.00 nM	0.215	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1E	175.00±11.03 nM	1.68±0.13 µM	0.104	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1F	6.00±0.25 nM	198.00±11.05 nM	0.030	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1M	320.55±16.05 nM	1.18±0.11 µM	0.271	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F1Q	285.00±11.70 nM	270.00±0.13 µM	0.001	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2A	55.00±3.02 nM	1.39±0.01 µM	0.040	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2E	90.79±5.11 nM	880.00±55.00 nM	0.103	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2F	88.00±4.20 nM	2.00±0.12 µM	0.044	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2M	230.10±11.00 nM	970.13±45.00 nM	0.237	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F2Q	400.00±16.00 nM	1.18±0.10 µM	0.339	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3A	60.12±3.80 nM	1.92±0.10 µM	0.031	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3E	165.80±9.00 nM	1.99±0.09 µM	0.083	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3F	5.25±0.35 nM	5.50±0.20 µM	9.54×10^{-4}	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3M	195.00±11.00 nM	1.05±0.10 nM	0.185	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F3Q	190.00±11.20 nM	490.55±18.70 nM	0.387	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4A	80.01±5.30 nM	450.11±20.40 nM	0.178	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4E	5.60±0.22 nM	50.30±2.41 nM	0.111	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4F	7.20±0.33 nM	100.00±5.77 nM	0.065	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4M	177.00±10.25 nM	1.18±0.10 µM	0.150	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
F4Q	395.00±19.80 nM	1.80±0.15 µM	0.219	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici
Selejilin	2.06±0.21 µM	30.35±0.12 nM	67.88	Yarışmalı	Tersinir	MAO-B için seçici
Moklobemid	8.90±0.27 nM	1.08±3.00 µM	0.008	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A için seçici

*Substrat p-Tiramin, MAO-A ölçülürken 500 µM, MAO-B ölçülürken 2.5 mM derişimde kullanıldı. İzozimlerin tayininde clorgyline (MAO-A inhibitörü) veya l-deprenyl (MAO-B inhibitörü) son derişim olarak 1 µM derişimde kullanıldı. Yeni sentezlenen inhibitörler ve bilinen inhibitörler (selegiline ve moclobemid) homojenatla aktivite tayininden önce 37°C de 60 dakika inkübe edildi. Her değer 3 bağımsız deneyin ort±SH sı olarak ifade edildi.

**Selektivite (seçicilik) indeksi. $K_i(\text{MAO-A})/K_i(\text{MAO-B})$ olarak ifade edildi.

Fenil halkasında metil grubu taşıyan grupta (F_1A , F_1E , F_1F , F_1M ve F_1Q) tiyokarbamoil grubunda hiç bir sübstitüent taşımayan F_1Q en etkin MAO-A inhibitör etki gösterirken, bu bileşiğin MAO-A için K_i değeri 285.00 ± 11.70 nM; SI (K_i MAO-A/B) değeri 0.001 olarak hesaplandı. F_1Q , bilinen seçici ve etkin MAO-A inhibitörü Moclobemid'den çok daha etkin bir inhibitör olduğu görülmektedir. Sırasıyla F_1F , F_1E , F_1A ve F_1M seçici ve etkin MAO-A inhibitör etki gösterdiler (**Tablo 7**).

Fenil halkasında klor grubu taşıyan seride (F_2A , F_2E , F_2F , F_2M ve F_2Q), tiyokarbamoil grubunda allil sübstitüenti bulunduran F_2A bileşiği en etkin MAO-A inhibitör etki gösterirken, bu bileşiğin MAO-A için K_i değeri 55.00 ± 3.02 nM; SI (K_i MAO-A/B) değeri 0.040 olarak bulundu. Klor atomunun elektron çekme etkisinin MAO-A selektif etkiyi ve aktif bölge ile etkileşimin gücünü artırdığı düşünülmektedir. Sırasıyla F_2F , F_2E , F_2M ve F_2Q bileşikler de seçici ve etkin MAO-A inhibitör etki gösterdiler (**Tablo 7**).

Fenil halkasında brom taşıyan seride (F_4A , F_4E , F_4F , F_4M ve F_4Q), tiyokarbamoil grubunda fenil sübstitüenti bulunduran F_4F bileşiği en etkin MAO-A inhibitör etki gösterirken, bu bileşiğin MAO-A için K_i değeri 7.20 ± 0.33 nM; SI (K_i MAO-A/B) değeri 0.065 olarak bulundu. Brom atomunun tıpkı klor gibi elektron çekme etkisiyle MAO-A'nın aktif bölgesiyle etkileştiği düşünülmektedir. Ancak bromun klordan daha büyük olması, sterik engel oluşturmuş olabilir ve bu grubun inhibitör etkisinin klorlu gruba oranla zayıflamasına neden olabilir diye düşünmekteyiz. Sırasıyla F_4E , F_4M , F_4A ve F_4Q bileşikler de seçici ve etkin MAO-A inhibitör etki gösterdiler (**Tablo 7**).

Sentezlenen 3-sübstitüefenil-5-(2-furil)-1-sübstitüetiyokarbamoil-2-pirazolin türevlerinin tamamının, MAO-A izozimini **seçici**, **yarışmalı ve tersinir** olarak inhibe ettikleri saptandı. Tüm bileşiklerin inhibitör etkilerinin, enzim-inhibitör karışımının 37°C de 1 saat inkübasyonu ile arttığı gözlemlendi. Burada verilen sonuçlar, 1 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlardır. İnhibitörlerin, enzimin aktif bölgesine ulaşmaları, gerekli bağların oluşarak etkileşimleri ve substratla yer değiştirebilmeleri için bu inkübasyon gerekli görülmektedir.

Bu türevlerden inhibitör olarak en etkin bileşik, fenil halkasında metoksi grubu; tiyokarbamoil yapısında fenil sübstitüenti taşıyan **F_3F** olarak belirdi. Bu bileşiğin IC_{50} değerinin MAO-A için 20.44 ± 0.11 nM; seçicilik değeri olan SI IC_{50} (MAO-A/MAO-B) değerinin ise 9.734×10^{-4} olduğu belirlendi. Bu değerler, IC_{50} değeri MAO-A için 33.15 ± 2.05 nM; SI IC_{50} (MAO-A/MAO-B) değeri 0.007 olarak bildirilen bilinen en etkin MAO-A inhibitörü Moclobemid'den çok daha iyi idi (**Tablo 6**).

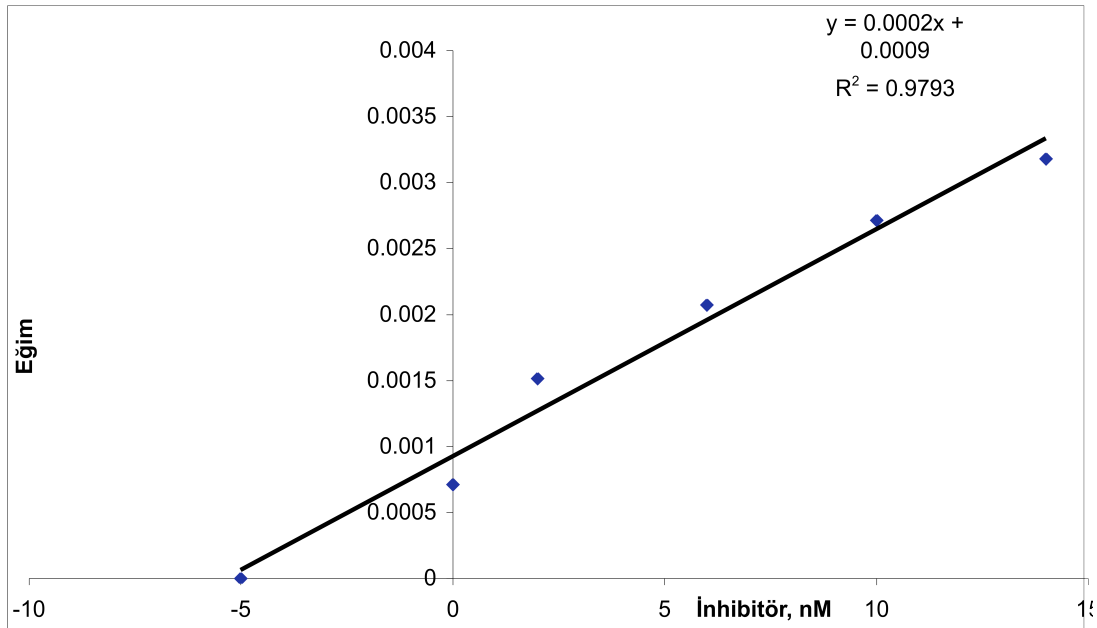
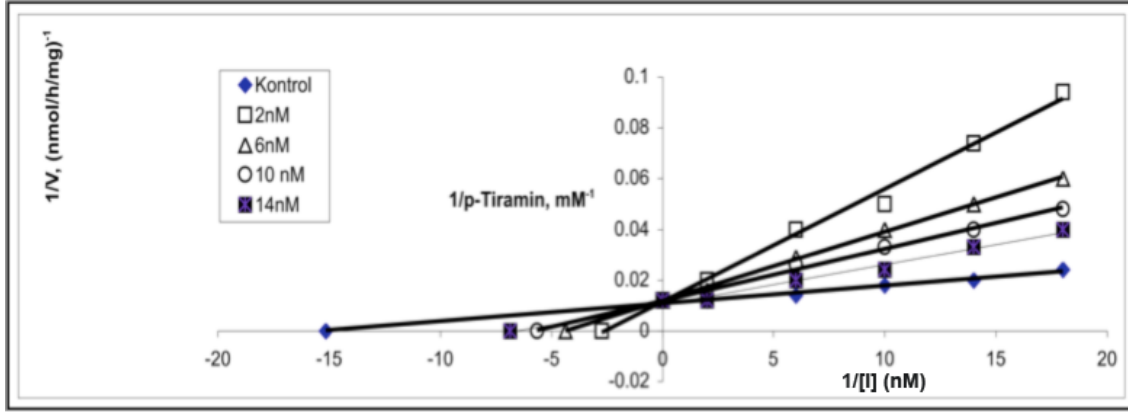
F_3F bileşiğinin MAO ile etkileşiminin kinetiği incelendiğinde bu bileşiğin MAO-A izo-enzimini yarışmalı ve tersinir olarak inhibe ettiği; K_i değerinin MAO-A için 5.25 ± 0.35 nM; seçicilik değeri olan SI K_i (MAO-A/MAO-B) değerinin ise 9.54×10^{-4} olduğu (**Tablo 7**) görüldü. Bu değerler, K_i değeri MAO-A için 8.90 ± 0.27 nM; SI K_i (MAO-A/MAO-B) değeri 0.008 olarak bildirilen bilinen en etkin MAO-A inhibitörü Moclobemid'den çok daha iyi idi (**Tablo 7**). Bu bileşiğin MAO-A ile etkileşimine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği **Grafik 1'de** görülmektedir.

Grafik 1: Sıçan karaciğer MAO-A aktivitesinin F₃F bileşiği tarafından inhibisyonuna ilişkin Lineweaver-Burk grafiği. F₃F bileşiği enzimle 37⁰C'de 60 dakika ön inkübasyona tabi tutulmuştur. İnhibitör derişimleri şekil içindeki kutuda gösterilmiştir. P-Tiramin, 0.01-0.10 mM derişimde kullanılmıştır.

K_i değeri alttaki grafikten hesaplanmıştır.

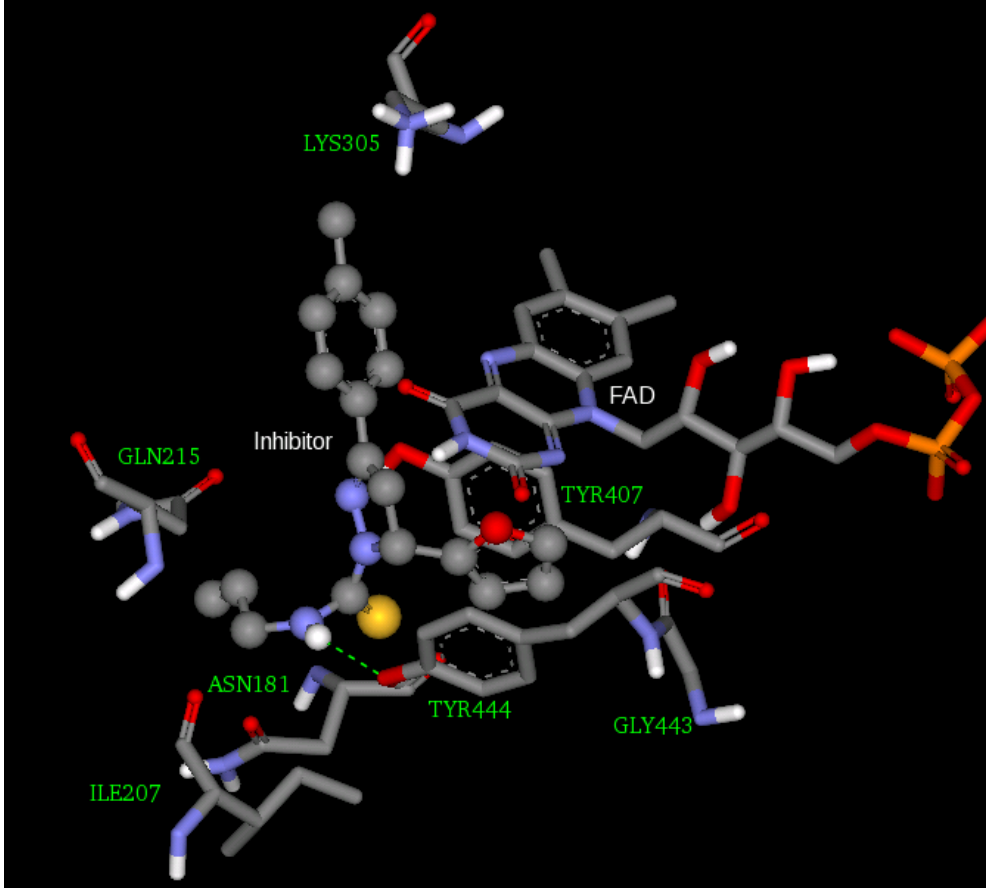
[S] = p-tiramin (mM) v =hız (nmol/saat/mg)

K_i= 5.00 nM

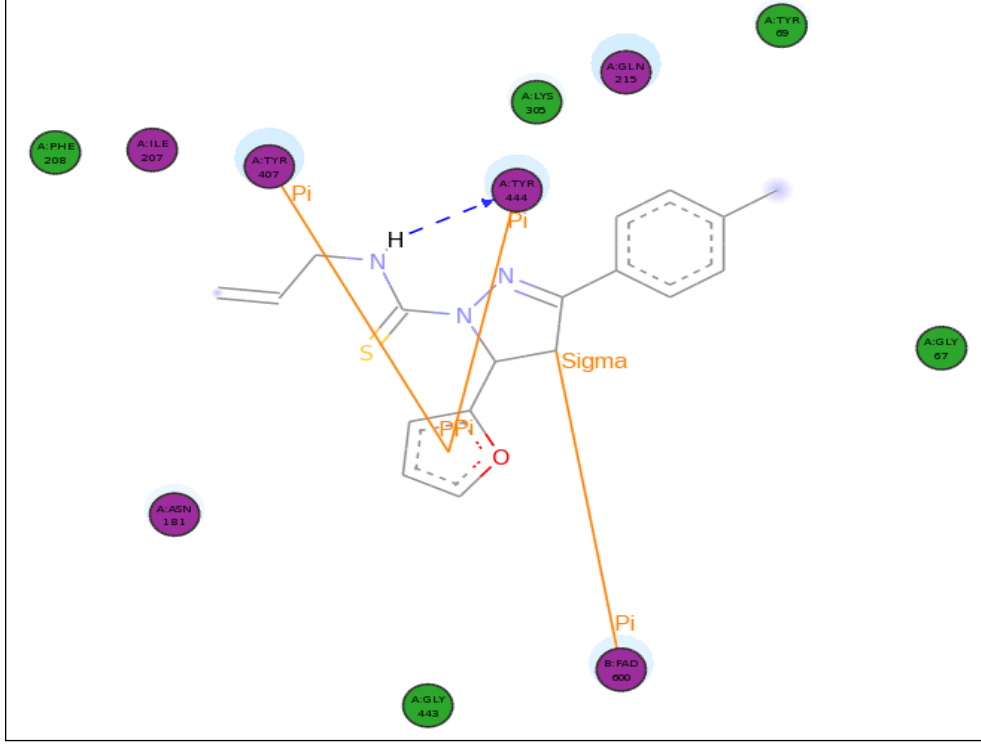


4.2.Moleküler Modellemeye İlişkin Sonuçlar:

4.2.1.Tasarlanan bileşiklerden seçilenlerin iki ve üç boyutlu görüntüleri:

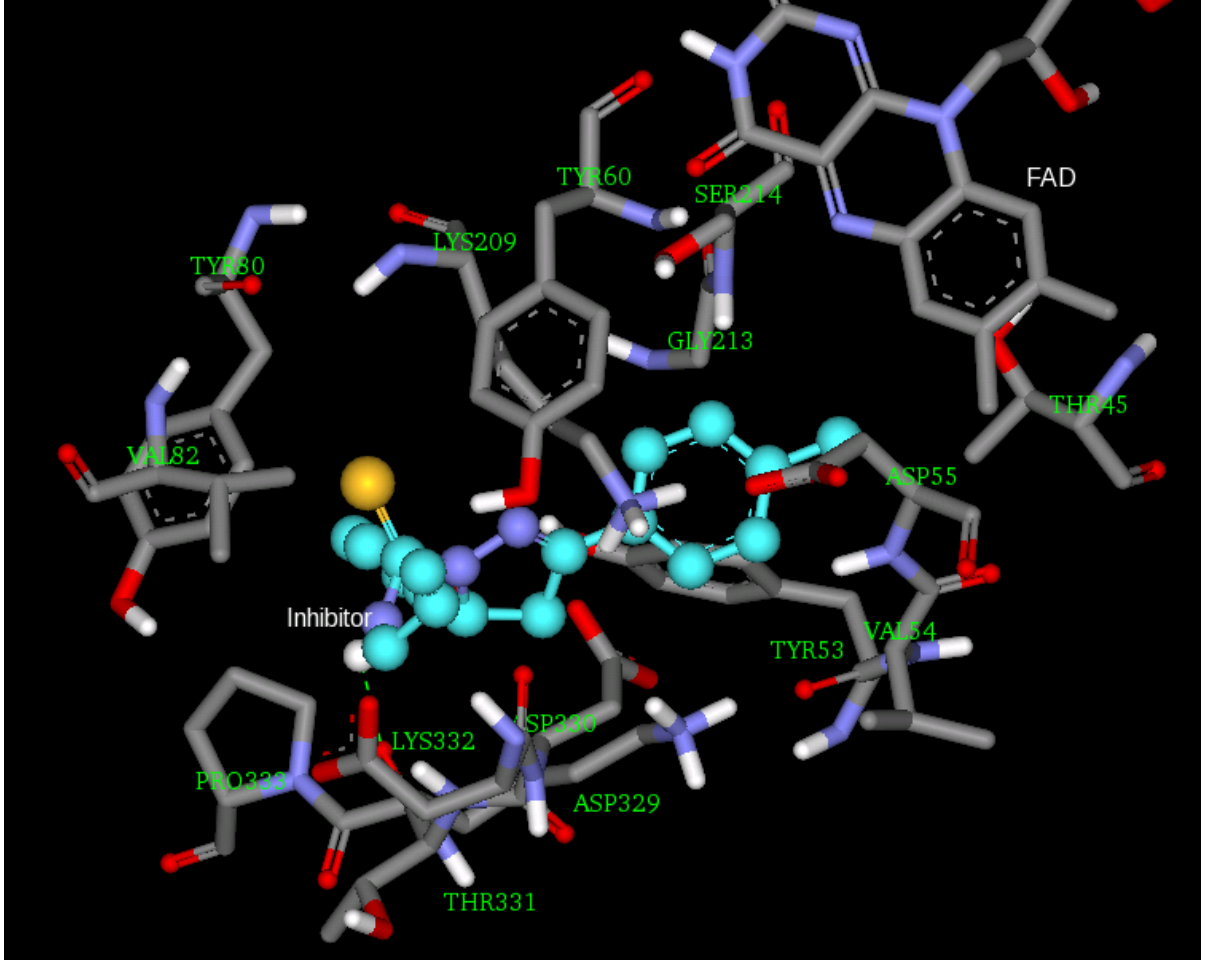


Şekil 20: F1A_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz-A enziminin aktif kısmındaki üç boyutlu görüntüsü

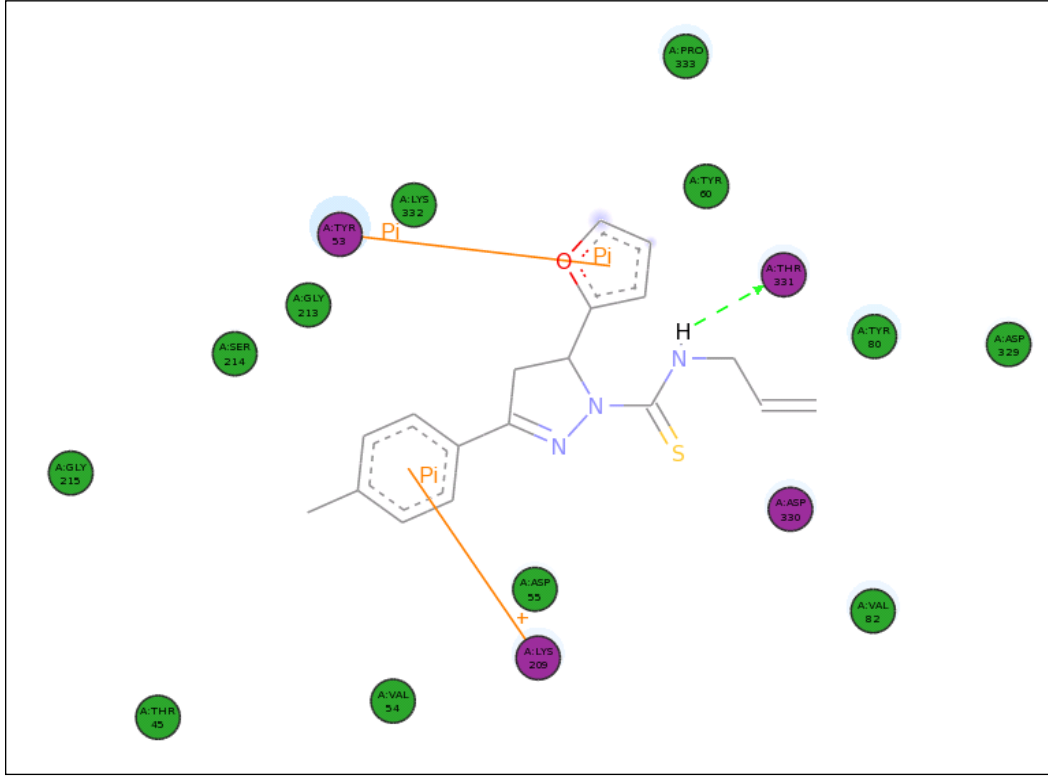


Şekil 21 : F1A_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz A enziminin aktif kısmında iki boyutta (2D) görünüşü.

Bileşik **F1A-R** inhibitörünün MAO-A enziminin aktif kısmına moleküler modelleme yöntemi ile yerleştirilmiş şekli gözükmetedir. İnhibitörün furan halkası Tyr444 ve Tyr407 amino asitleri yan zincirleri arasında residülerin fenil halkasına yatay konumunda p...p girişimi yaparak yerleşmiştir. Tiyoamid grubunun azot atomu ile Tyr444 hidroksil grubu ile bir hidrojen bağı yapmıştır. İnhibitörü çevreleyen diğer amino asit yan zincirleri ise: Phe208, Asn181, Gln215, Lys315, Gly67, ve Gly443 tür. Bu inhibitör tablodan da anlaşılacağı üzere MAO-A enzime moleküler modelleme ile bağlanan iyi bileşiklerden bir tanesidir. Serbest bağlanma enerjisi, $\Delta G = -9.17$ kcal/mol ve inhibisyon katsayısı ise $K_i = 188.62$ nanomolar dır.

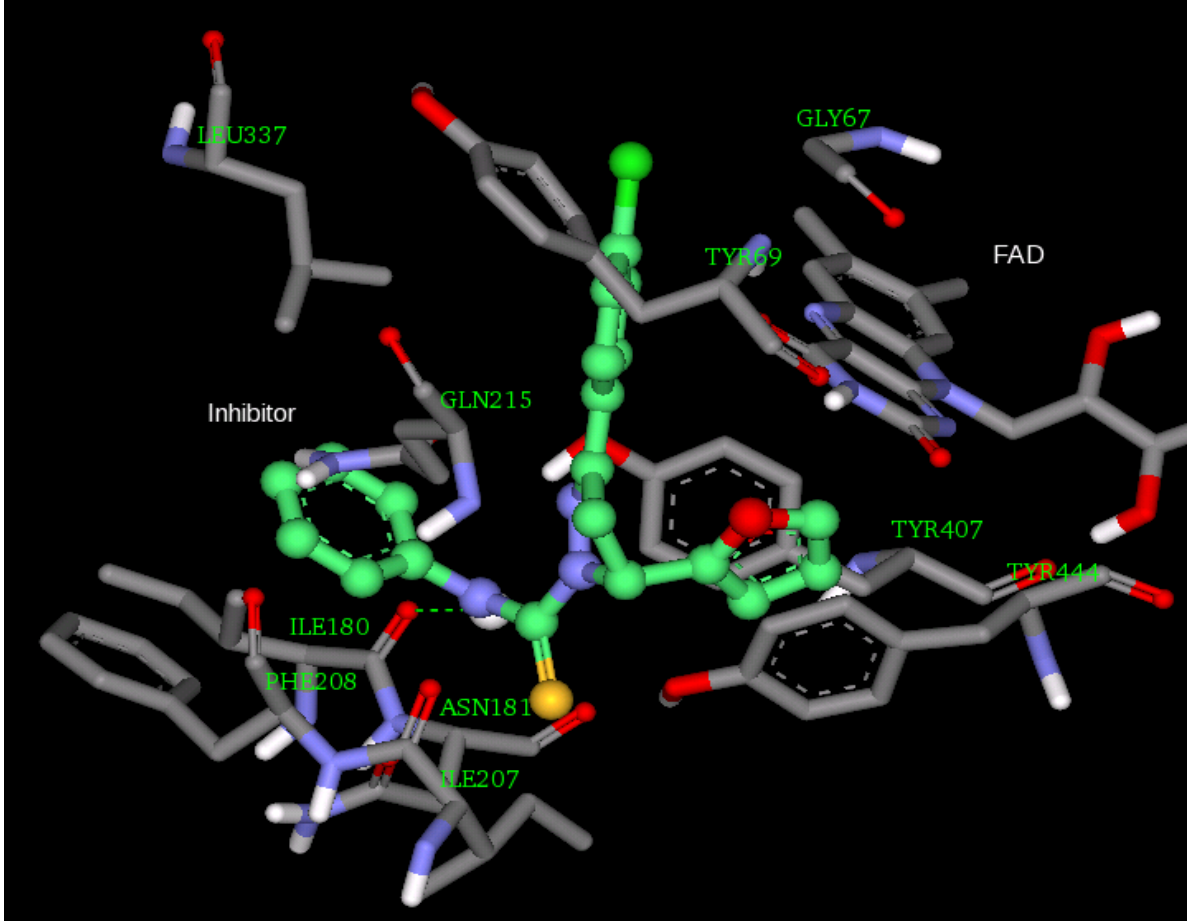


Şekil 22 : F1A_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz B enziminin aktif kısmında üç boyutlu görüntüsü

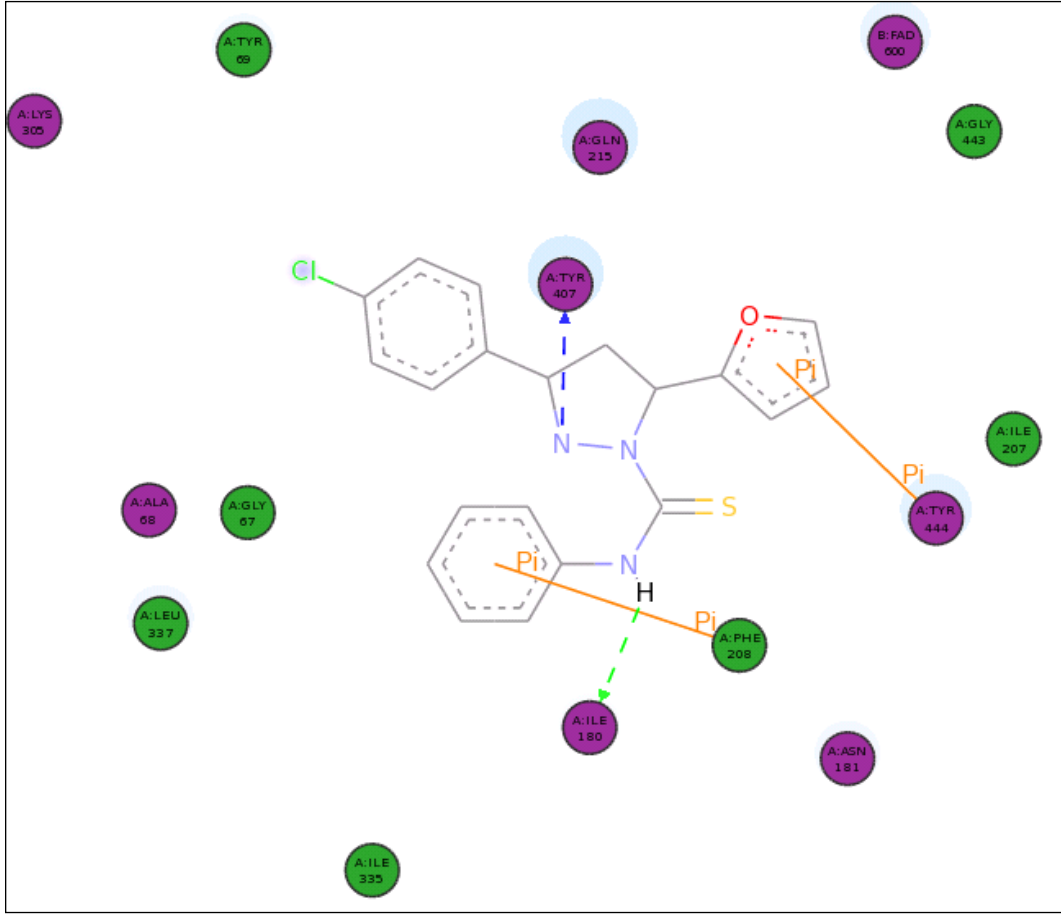


Şekil 23: F1A_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz B enziminin aktif kısmında iki boyutta (2D) görüntüsü

Bileşik **F1A_R** inhibitörünün MAO-B enziminin aktif kısmına moleküler modelleme yöntemi ile yerleştirilmiş şekli gözükmemektedir. İnhibitörün FAD halkasına uzak bir konumda enzimin bağlanma hacminin giriş kısmına yakın bir bölgeye konumlanmıştır İnhibitörün furan halkası Tyr53 ile p...p grişimi, fenil halkası ise Lys209 ile p...p grişiminde bulunmaktadır. Ayrıca yine yan zincir alil grubu da Tyr80 residüsü ile grişimde bulunmaktadır. İnhibitörü çevreleyen diğer amino asit yan zincirleri ise: Asp329, Tyr80, Thr45, Lys332, Asp55, Ser214, Gly215, Val54 ve Pro333'tür. Serbest bağlanma enerjisi, $\Delta G = -7.29$ kcal/mol ve inhibisyon katsayısı ise $K_i = 4.52$ mikroMol'dur. Bu inhibitörün daha iyi bir MAO-A inhibitörü olmasının nedeni inhibitörün furan halkasının MAO-A enziminde daha yakın mesafede ve etkili bağlanması ve yaptığı hidrojen bağıdır.

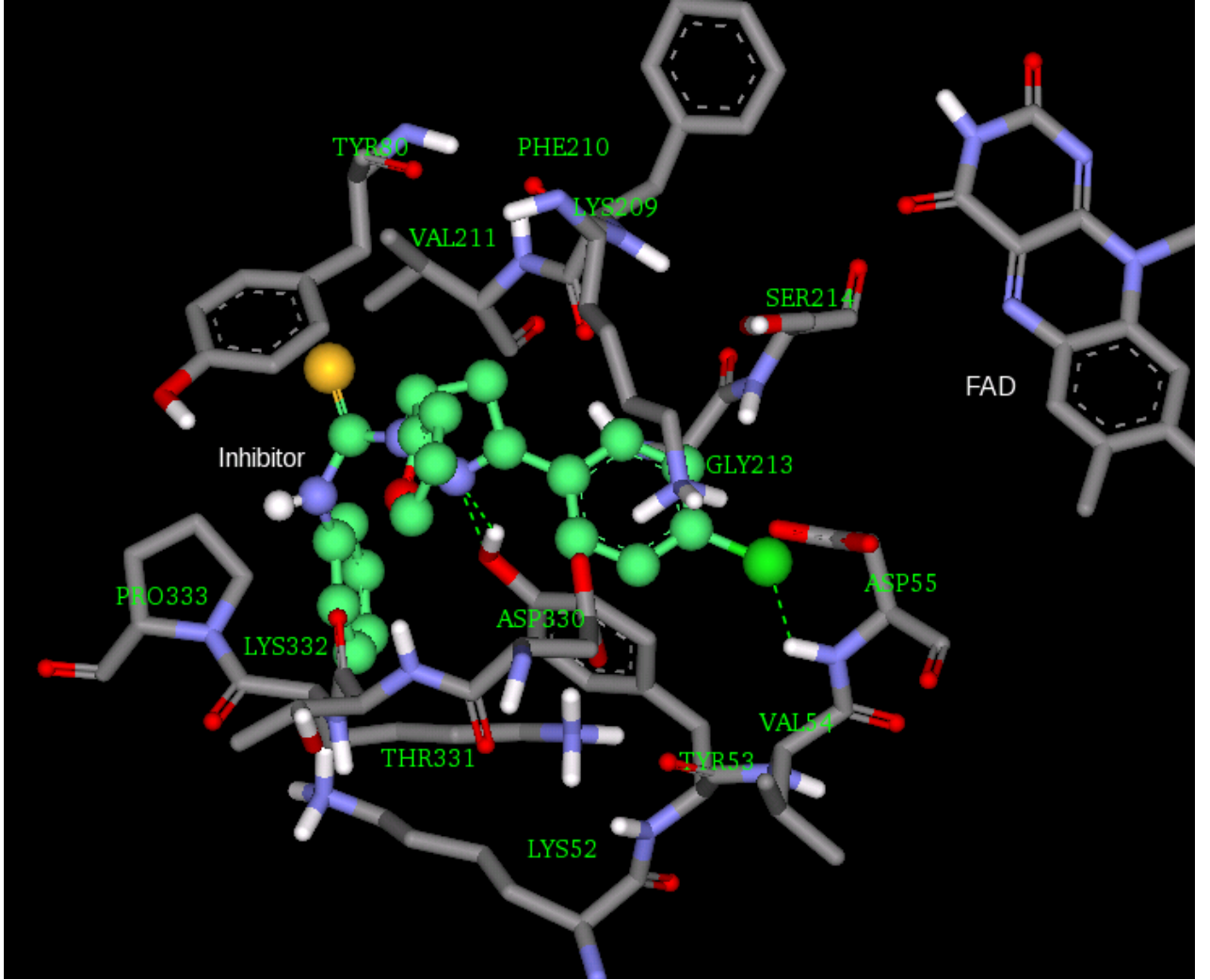


Şekil 24: F2F_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz A enziminin aktif kısmında üç boyutlu görüntüsü

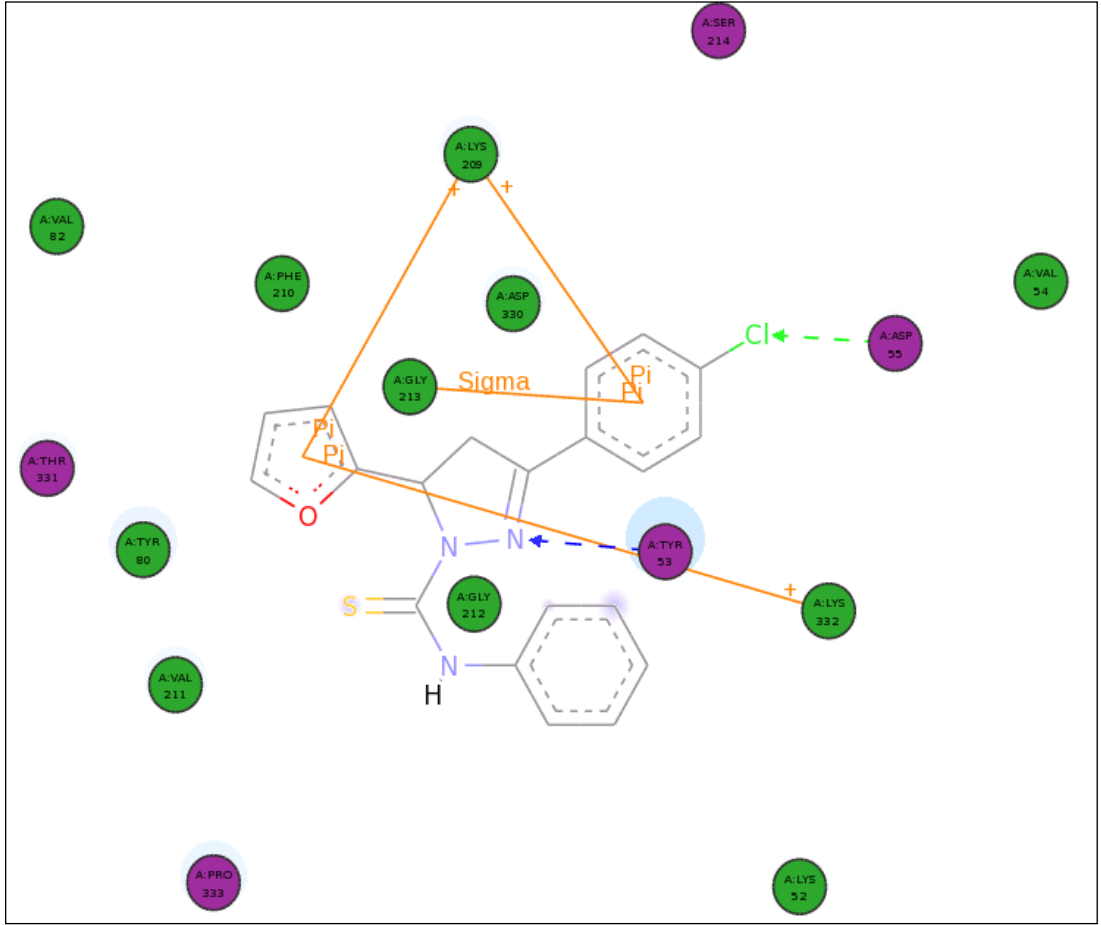


Şekil 25: F2F_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz A enziminin aktif kısmında iki (2D) boyutlu görüntüsü

Bileşik **F2F-R** inhibitörünün MAO-A enziminin aktif kısmına moleküler modelleme yöntemi ile yerleştirilmiş şekli gözükmemektedir. İnhibitörün furan halkası Tyr444 ve Tyr407 amino asitleri yan zincirleri arasında yatay konumda yerleşerek Tyr444 ile bir p...p girişiminde bulunmaktadır. İnhibitörün fenil halkası Phe208 ile yine bir p...p girişiminde bulunmaktadır. İnhibitörün tiyokarbonil grubu yanındaki azot atomu ise Ile180 residüsünün karbonil grubu ile bir hidrjen bağı yapmaktadır. İnhibitörü çevreleyen diğer amino asit yan zincirleri ise: Asn181, Gly67, Gln215, Leu337, Lys305, Tyr69 ve Ile307'dir. Serbest bağlanma enerjisi, $\Delta G = -10.50$ kcal/mol ve inhibisyon katsayısı ise $K_i = 19.98$ nanomolardır.

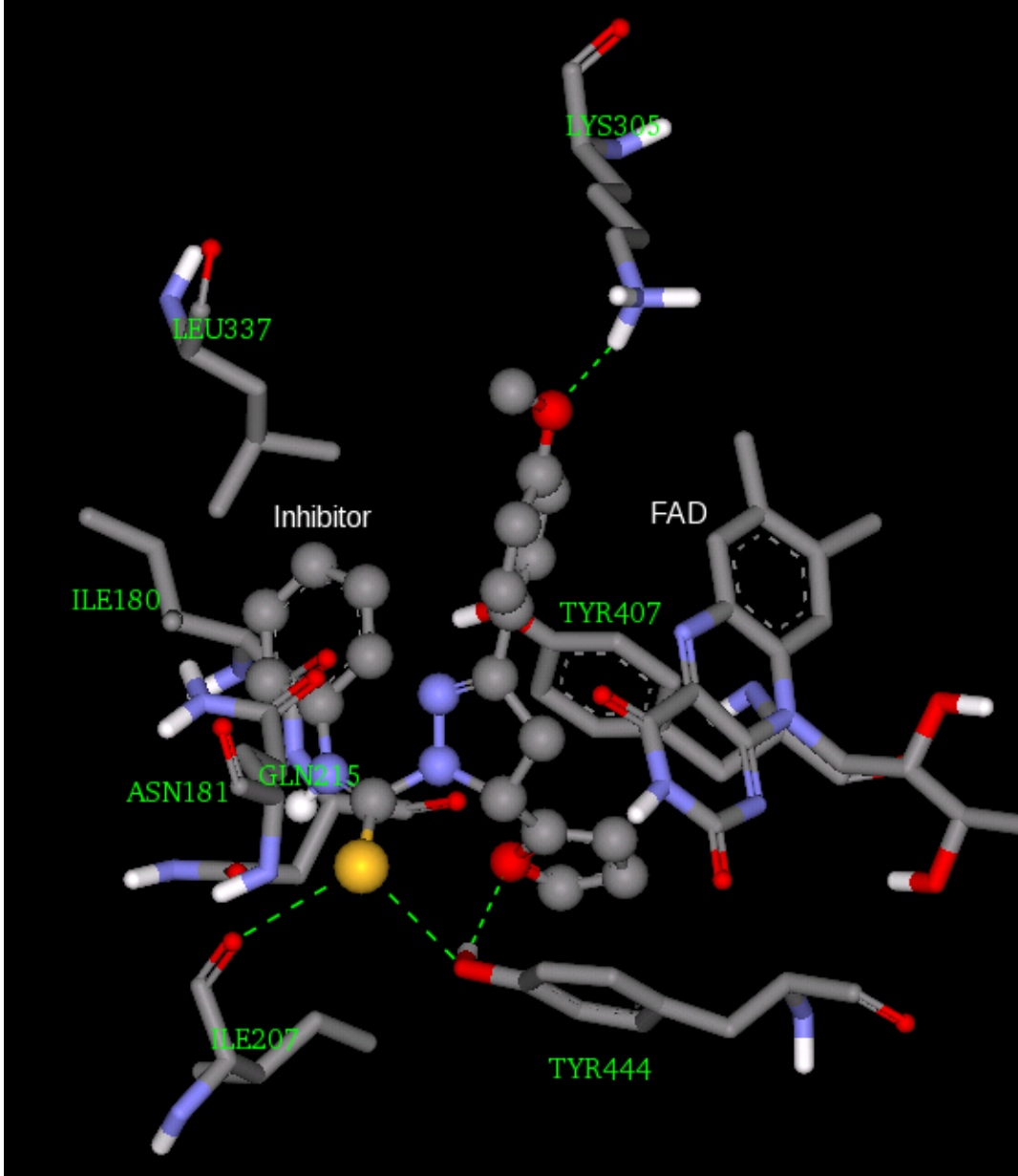


Şekil 26: F2F_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz B enziminin aktif kısmında üç boyutlu görüntüsü

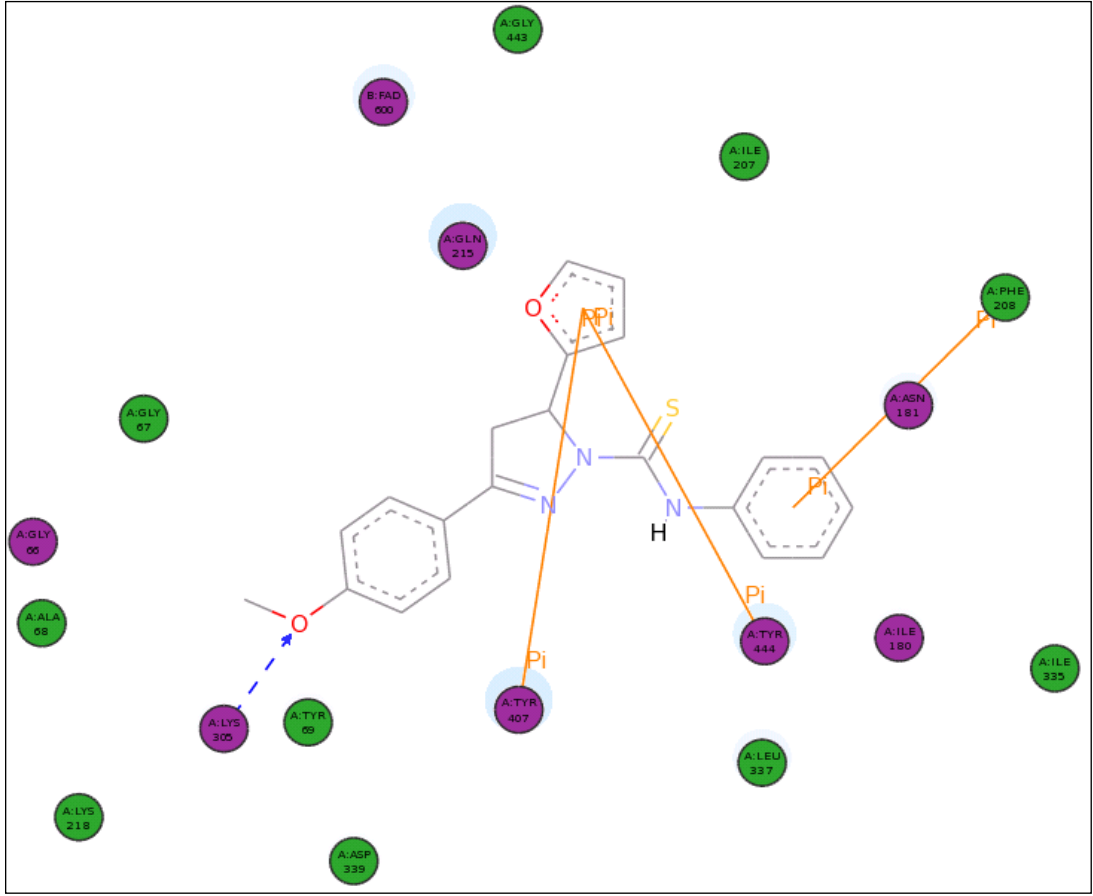


Şekil 27: F2F_R Bileşiğinin Monoamin Oksidaz B enziminin aktif kısmında iki boyutlu görüntüsü

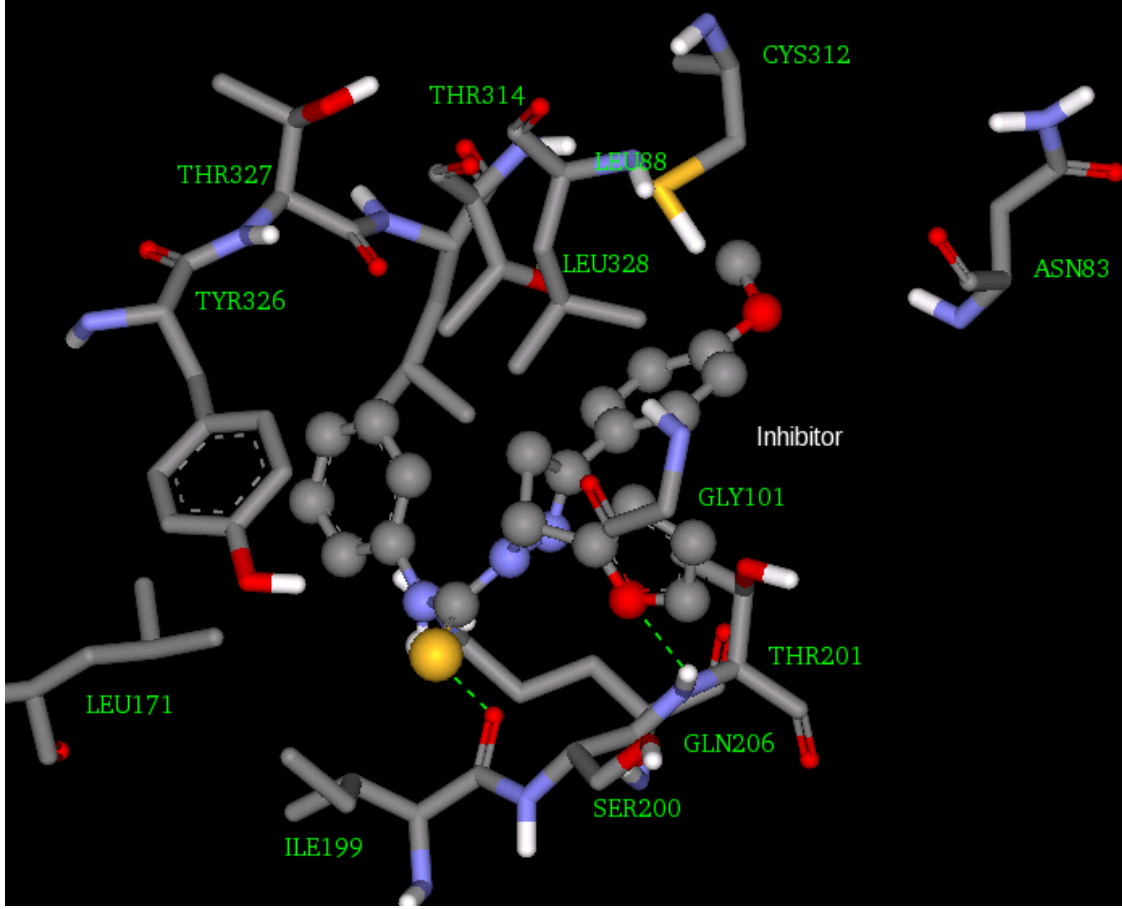
Bileşik **F2F-R** inhibitörünün MAO-B enziminin aktif kısmına moleküler modelleme yöntemi ile yerleştirilmiş şekli gözükmemektedir. MAO-A enzime bağlanma modunun tersine inhibitör enzimin aromatik kafes boşluğunu oluşturan Tyr398, Tyr435 ve FAD'den uzak enzimin daha çok kavitesinin giriş bölgesine yakın bir hacime yerleşmiştir. İnhibitör MAO-B'ye MAO-A'dan daha gevşek bağlandığı için inhibisyon sabiti daha yüksek çıkmıştır. İnhibitörü çevreleyen diğer amino asit yan zincirleri ise: Gly212, Lys332, Lys52, Pro332, Val211, Tyr80, Thr331, Asp330, Lys209, Val82 ve Phe210'dur. Serbest bağlanma enerjisi, $\Delta G = -8.85$ kcal/mol ve inhibisyon katsayısı ise $K_i = 323.30$ nanomolardır.



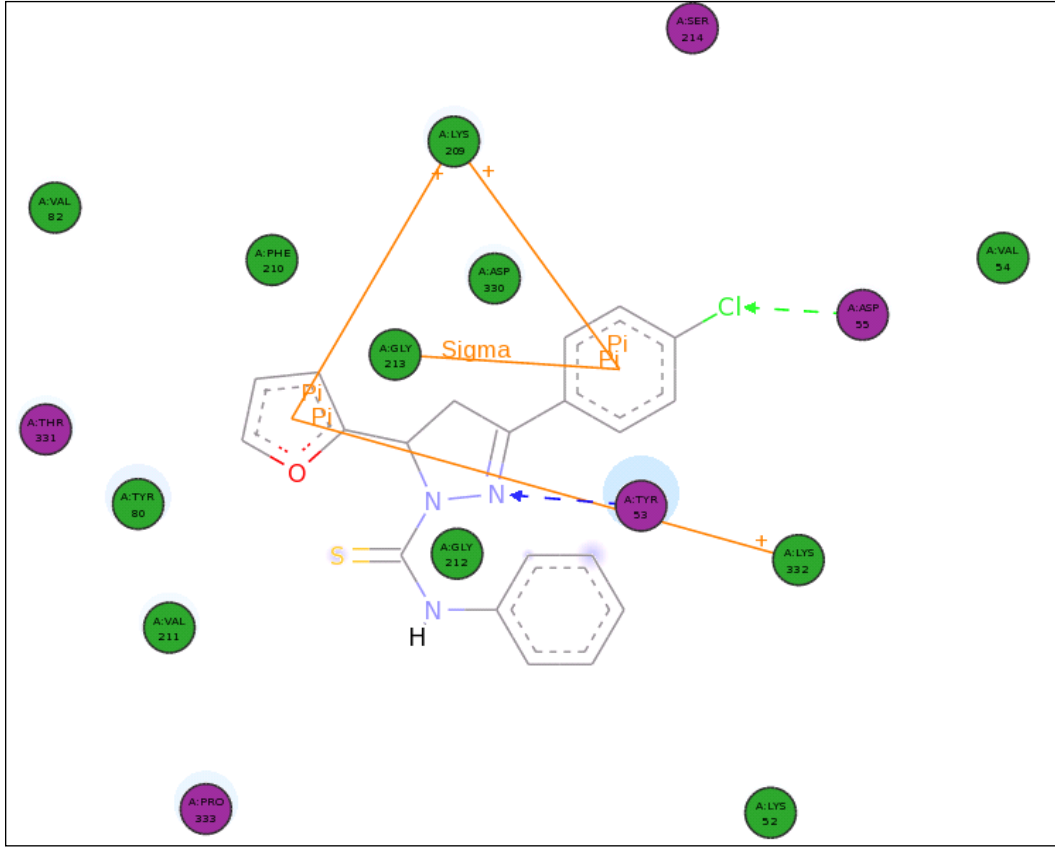
Şekil 28: F3F_R inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü



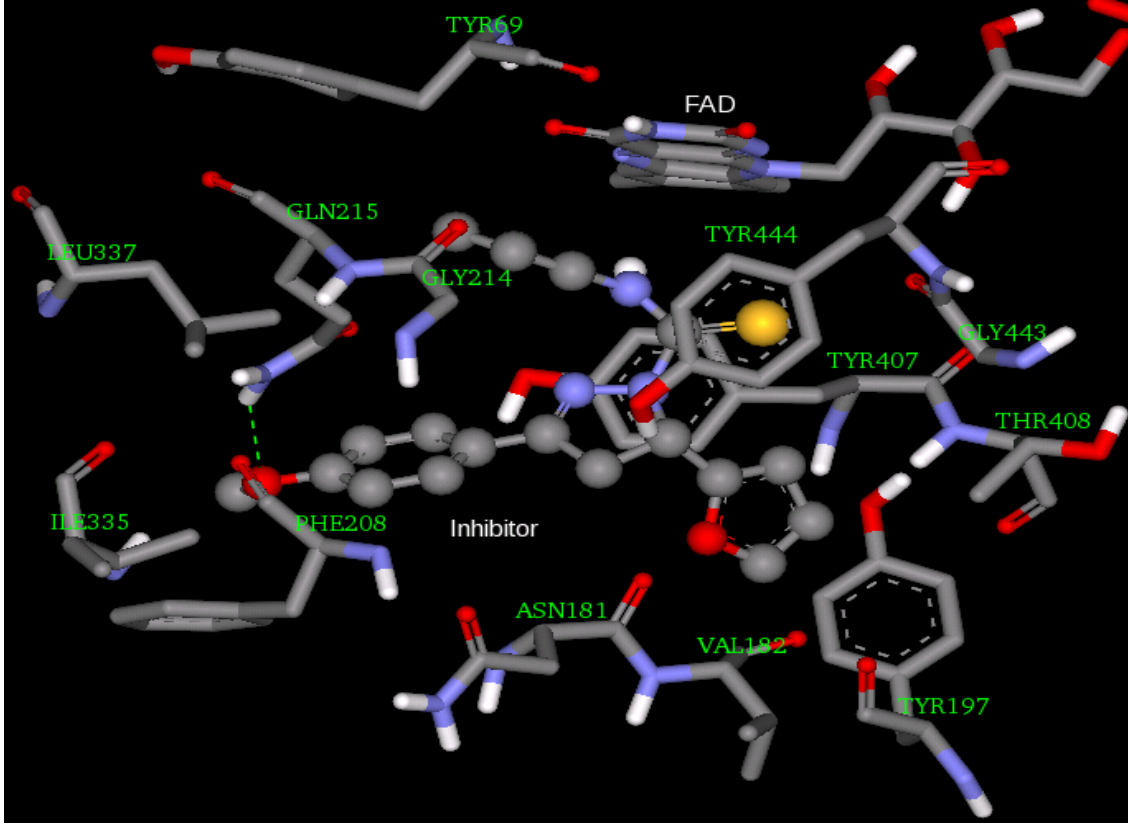
Şekil 29: F3F_R inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü



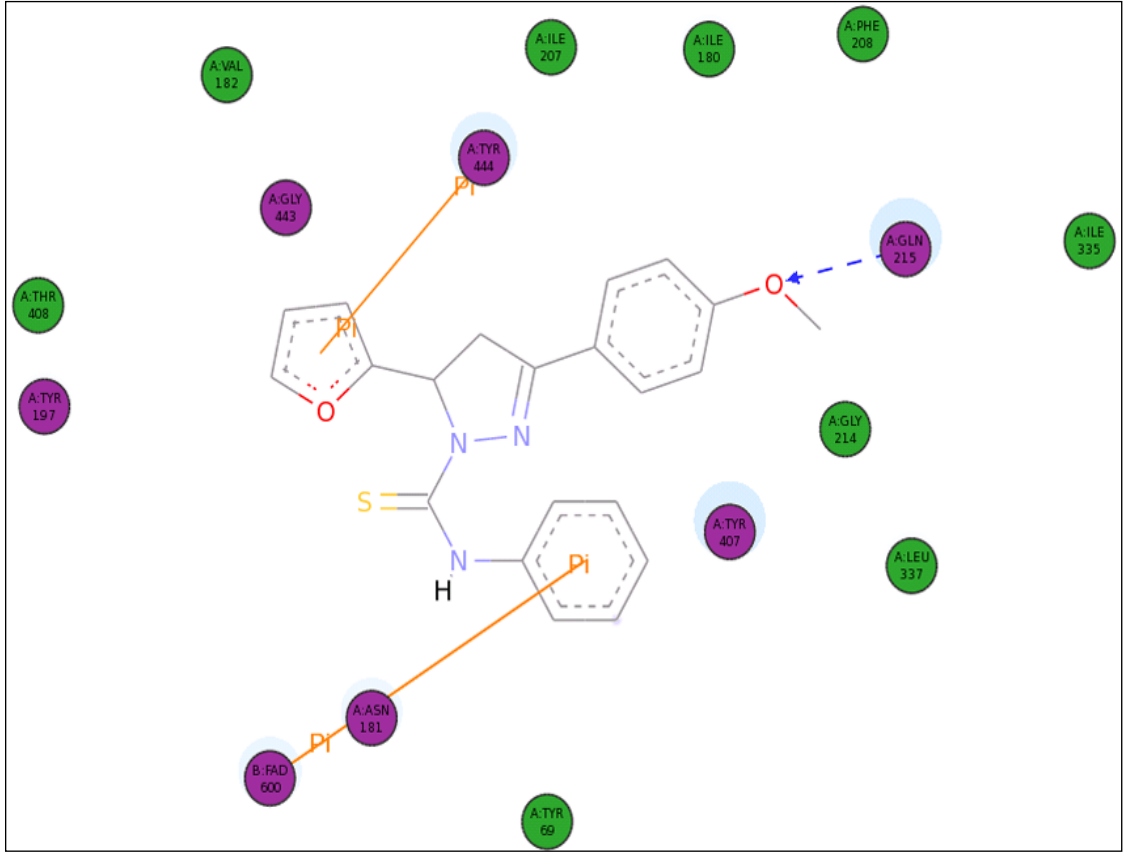
Şekil 30: F3F_R inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü



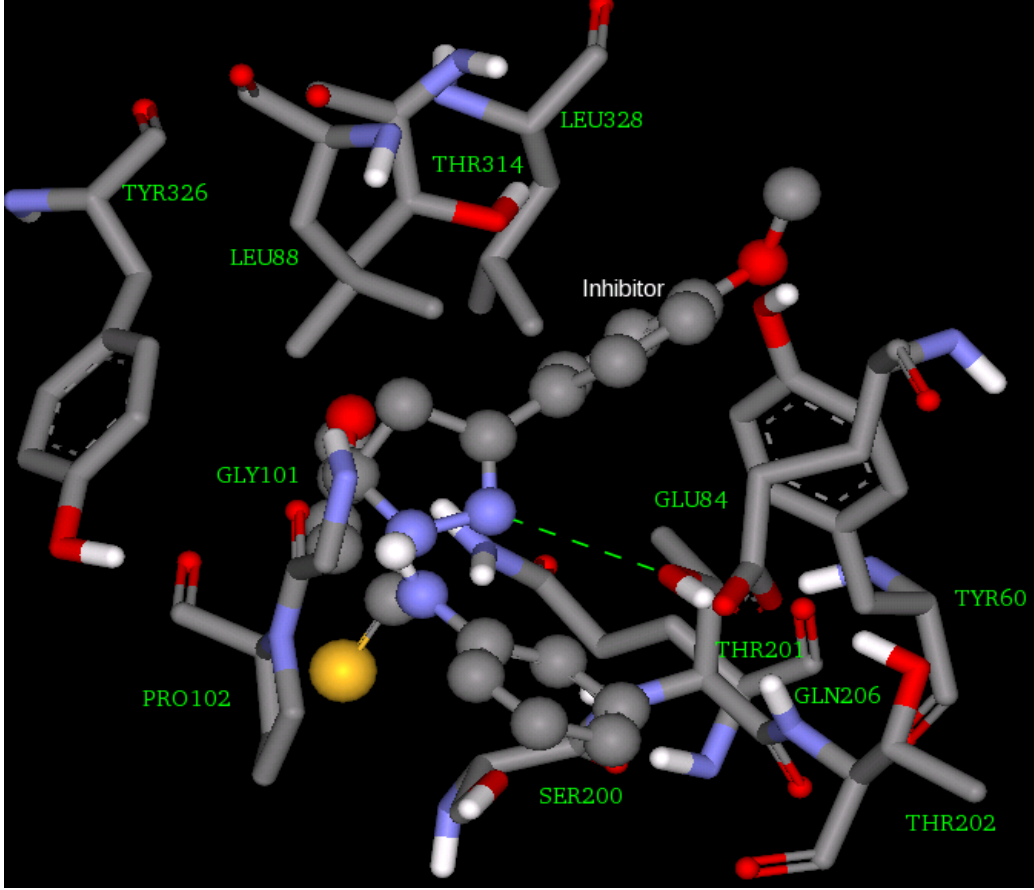
Şekil 31: F3F_R inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü



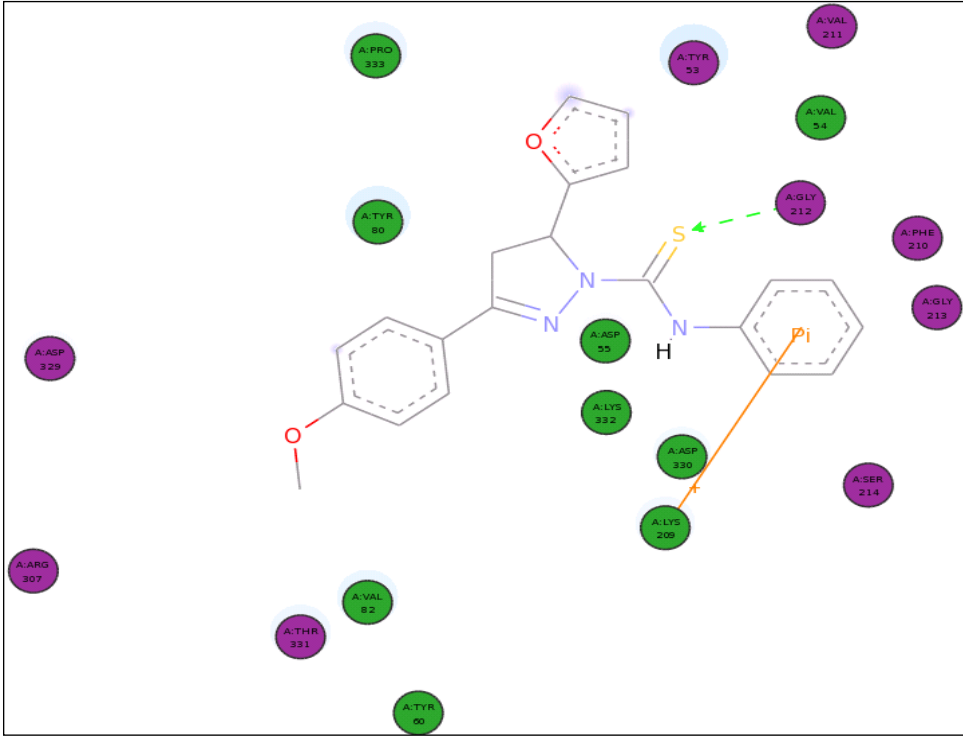
Şekil 32: F3F_S inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü



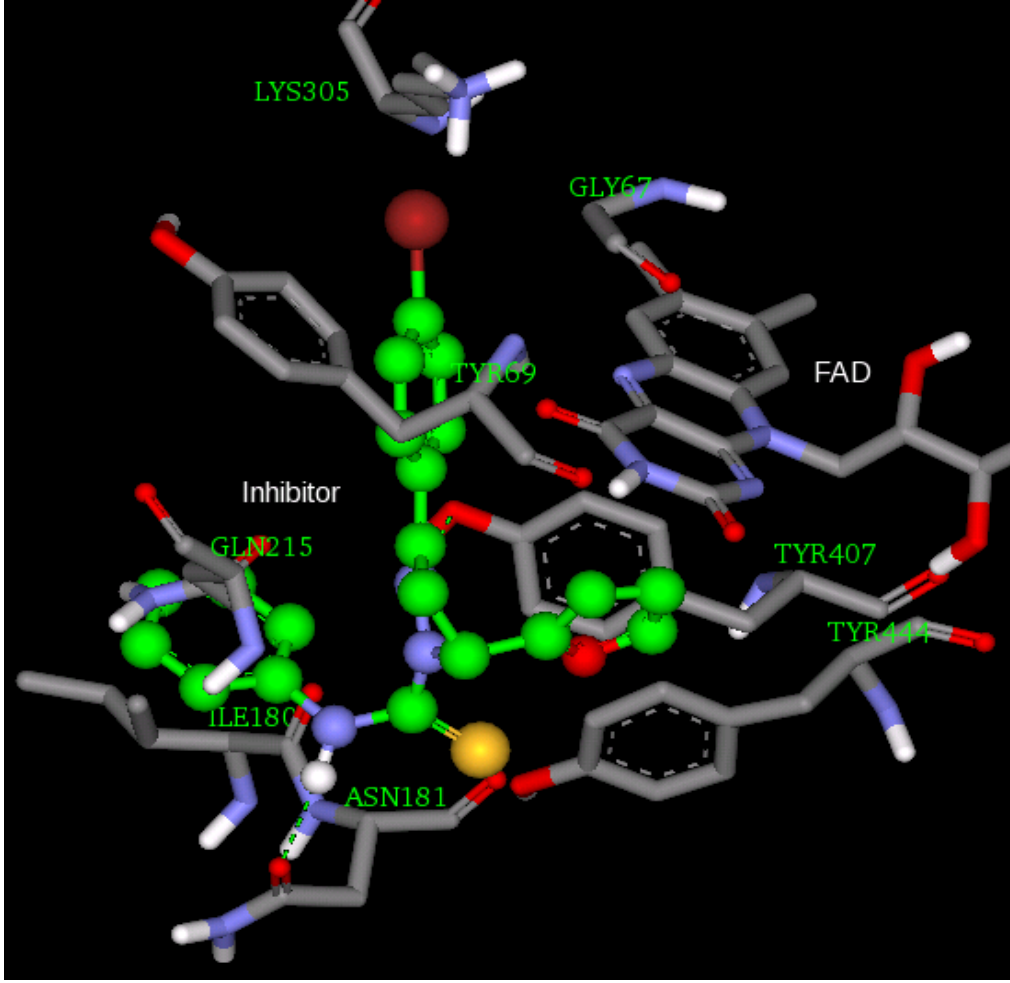
Şekil 33: F3F_S inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu pozunu.



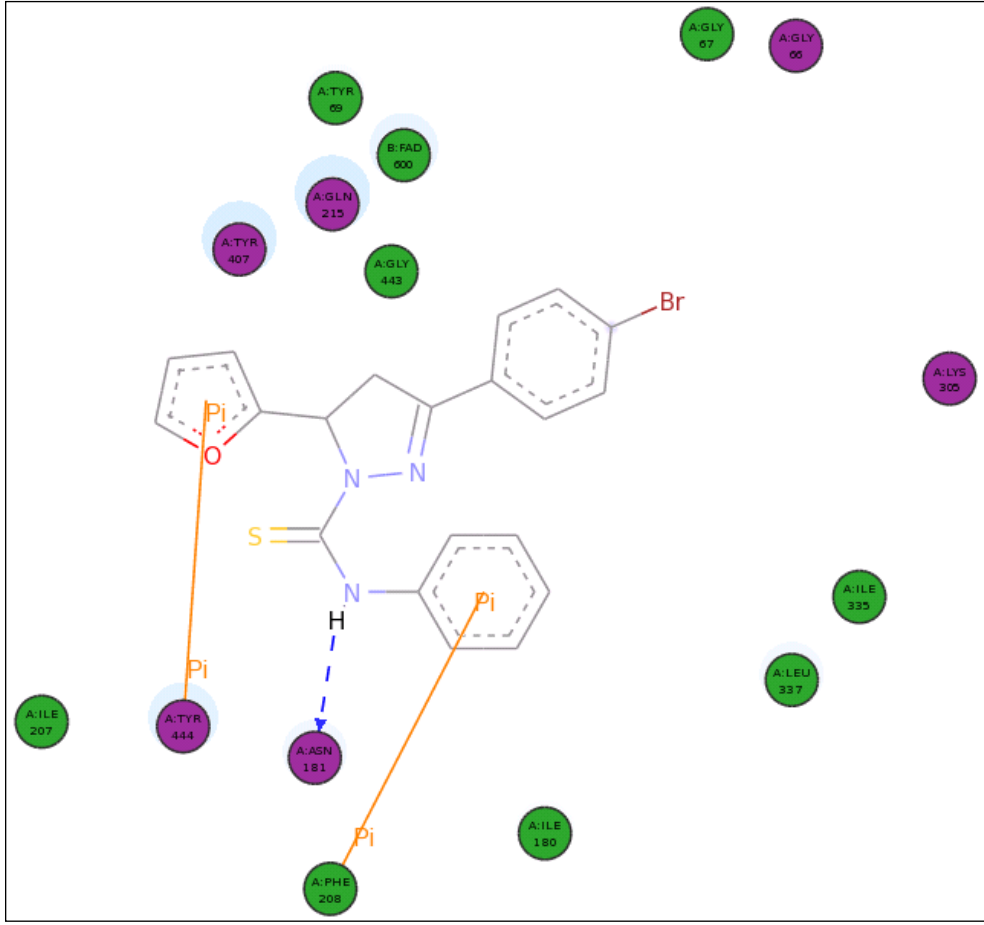
Şekil 34: F3F_S inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü



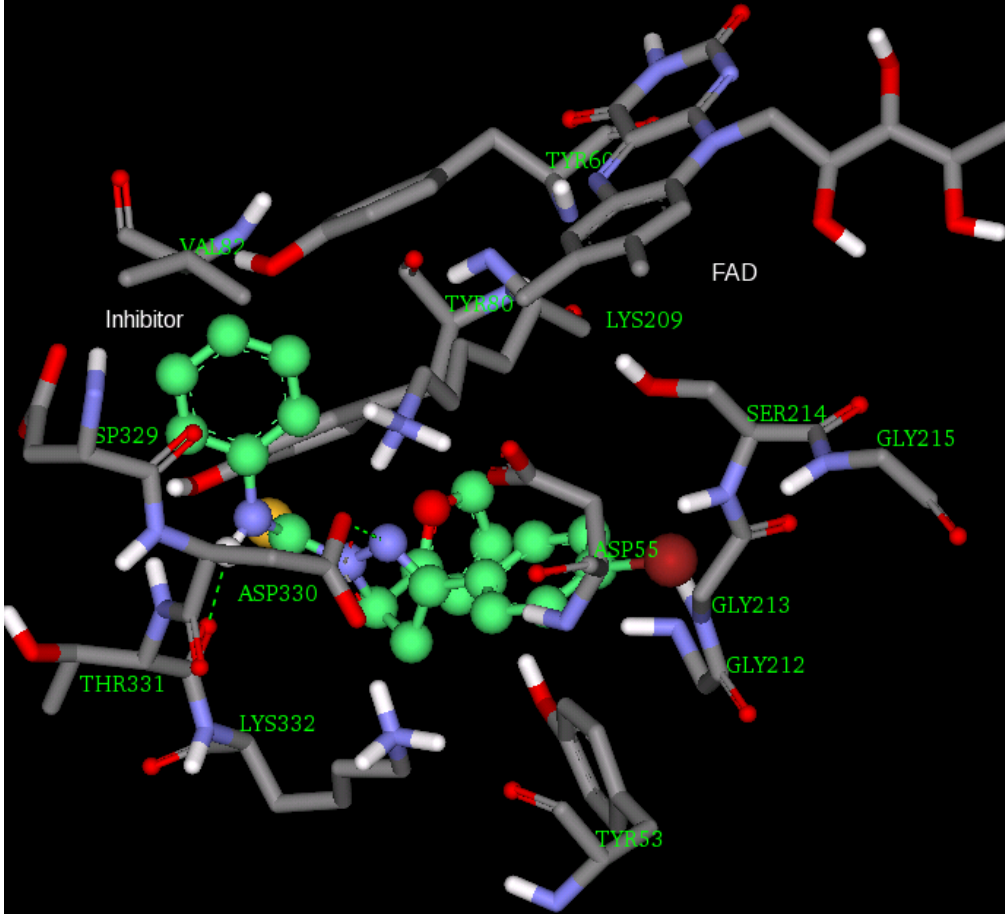
Şekil 35: F3F_S inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü



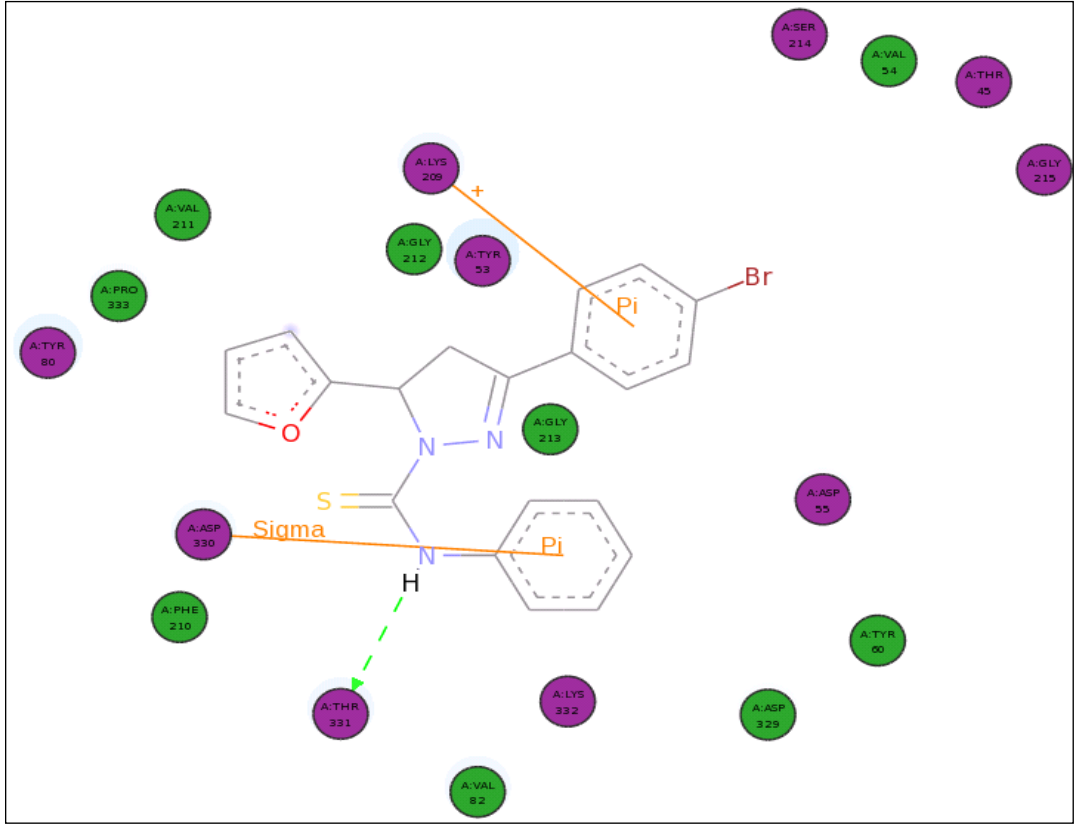
Şekil 36: F4F_R inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü



Şekil 37: F4F_R inhibitörünün MAO-A enziminin aktif bölgesindeki iki (2D) boyutlu görüntüsü



Şekil 38: F4F_R inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki üç boyutlu görüntüsü



Şekil 39: F4F_R inhibitörünün MAO-B enziminin aktif bölgesindeki iki boyutlu görüntüsü

4.2.2. Elde Edilen Verilerin Değişik İstatistiksel Yöntemlerle Yorumlanması:

Hesapsal yöntemlerle elde edilen veriler yukarıda bahsedildiği gibi Serbest bağlanma enerjisi, DG ve inhibisyon katsayısı, K_i dir. K_i değeri Cheng-Prusoff formülü yardımıyla IC_{50} değerine çevrilebilir, ancak [S] substrat ve K_m değerlerinin bilinmesi ve inhibisyonun geriye dönüşebilir olması gerekir. Fakat K_i değerleri yaklaşık olarak elde edilen IC_{50} değerlerinden daha güvenilirdir.

Cheng-Prusoff formülü: $IC_{50} = K_i (1 + S/K_m)$

Elimizde hem deneysel hem de hesapsal K_i değerleri olduğundan enzimlere ait bu iki değer değişik yönleriyle birbiriyle karşılaştırılmıştır.

TABLO-8: MAO- A ve MAO-B Enzimlerinin deneysel K_i değerleri ve K_i 'lerin log değerleri

Bileşik	MAO-A için		MAO-B için	
	K_i değeri	$\log(K_i)$ değeri	K_i değeri	$\log(K_i)$ değeri
F1A	1,70E-07	-6,76	7,90E-07	-6,10
F1E	1,75E-07	-6,75	1,68E-06	-5,77
F1F	6,00E-09	-8,22	1,98E-07	-6,70
F1M	3,21E-07	-6,49	1,18E-06	-5,92
F1Q	2,85E-07	-6,54	2,70E-04	-3,56
F2A	5,50E-08	-7,25	1,39E-06	-5,85
F2E	9,08E-08	-7,04	8,80E-07	-6,05
F2F	8,80E-08	-7,05	2,00E-06	-5,69
F2M	2,30E-07	-6,63	9,70E-07	-6,01
F2Q	4,00E-07	-6,39	1,18E-06	-5,92
F3A	6,01E-08	-7,22	1,92E-06	-5,71
F3E	1,66E-07	-6,78	1,99E-06	-5,70
F3F	5,25E-09	-8,27	5,50E-06	-5,25
F3M	1,95E-07	-6,70	1,05E-09	-8,97
F3Q	1,90E-07	-6,72	4,91E-07	-6,30
F4A	8,00E-08	-7,09	4,50E-07	-6,34
F4E	5,60E-09	-8,25	5,03E-08	-7,29

F4F	7,20E-09	-8,14	1,00E-07	-7
F4M	1,77E-07	-6,75	1,18E-06	-5,92
F4Q	3,95E-07	-6,40	1,80E-06	-5,74

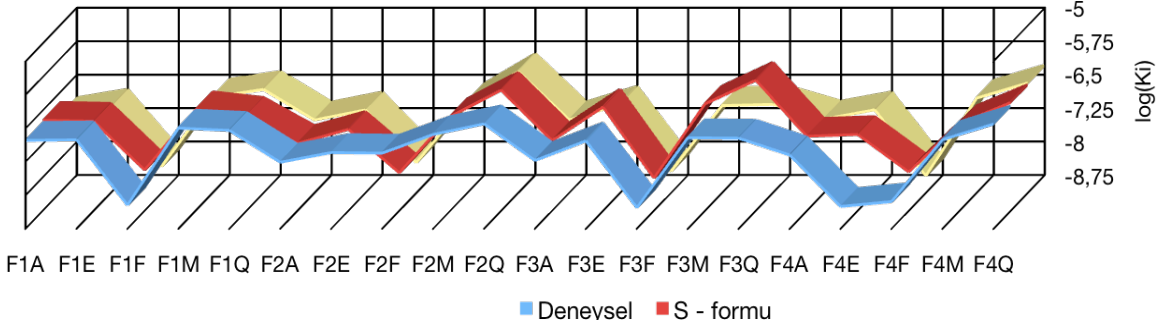
TABLO- 9: MAO- A ve MAO-B Enzimlerinin hesapsal S-izomerleri için K_i değerleri ve K_i 'lerin log değerleri

Bileşik	MAO-A		MAO-B	
	K_i değeri	log(K_i) değeri	K_i değeri	log(K_i) değeri
F1A-S	1,90E-07	-6,72	2,28E-06	-5,64
F1E-S	1,82E-07	-6,74	1,64E-06	-5,78
F1F-S	1,46E-08	-7,83	3,86E-07	-6,41
F1M-S	3,28E-07	-6,48	1,16E-06	-5,93
F1Q-S	2,45E-07	-6,61	1,64E-06	-5,78
F2A-S	5,74E-08	-7,24	1,35E-06	-5,86
F2E-S	1,19E-07	-6,92	1,09E-06	-5,96
F2F-S	1,27E-08	-7,89	6,96E-08	-7,15
F2M-S	2,31E-07	-6,63	9,42E-07	-6,02
F2Q-S	9,03E-07	-6,04	2,58E-06	-5,58
F3A-S	6,65E-08	-7,17	1,84E-06	-5,73
F3E-S	3,78E-07	-6,42	9,36E-07	-6,02
F3F-S	9,60E-09	-8,01	3,98E-07	-6,39
F3M-S	4,43E-07	-6,35	2,33E-06	-5,63
F3Q-S	1,51E-06	-5,82	2,09E-06	-5,67
F4A-S	8,35E-08	-7,07	9,05E-07	-6,04
F4E-S	9,13E-08	-7,03	7,63E-07	-6,11
F4F-S	1,33E-08	-7,87	2,63E-07	-6,58
F4M-S	1,60E-07	-6,79	1,12E-06	-5,95
F4Q-S	4,76E-07	-6,32	2,25E-06	-5,64

TABLO-10 : MAO- A ve MAO-B Enzimlerinin hesapsal R-izomerleri için K_i değerleri ve K_i 'lerin log değerleri

Bileşik	MAO-A		MAO-B	
	K_i değeri	log(K_i) değeri	K_i değeri	log(K_i) değeri
F1A-R	9,56E-08	-7,01	4,96E-07	-6,30
F1E-R	1,49E-07	-6,82	6,06E-07	-6,21
F1F-R	6,90E-09	-8,16	1,41E-07	-6,85
F1M-R	2,51E-07	-6,59	6,45E-07	-6,19
F1Q-R	3,72E-07	-6,42	2,68E-04	-3,57
F2A-R	7,66E-08	-7,11	1,48E-06	-5,82
F2E-R	1,29E-07	-6,88	5,17E-07	-6,28
F2F-R	8,51E-09	-8,07	7,49E-08	-7,12
F2M-R	1,98E-07	-6,70	1,60E-07	-6,79
F2Q-R	9,43E-07	-6,02	2,56E-06	-5,59
F3A-R	7,74E-08	-7,11	8,90E-07	-6,05
F3E-R	1,73E-07	-6,76	1,82E-06	-5,73
F3F-R	5,38E-09	-8,26	1,95E-07	-6,70
F3M-R	1,62E-07	-6,79	7,74E-07	-6,11
F3Q-R	1,72E-07	-6,76	3,96E-07	-6,40
F4A-R	8,03E-08	-7,09	4,55E-07	-6,34
F4E-R	1,30E-07	-6,88	6,24E-07	-6,20
F4F-R	4,28E-09	-8,36	5,06E-08	-7,29
F4M-R	2,38E-07	-6,62	9,29E-07	-6,03
F4Q-R	5,18E-07	-6,28	1,09E-06	-5,96

Grafik 2: MAO-A Enziminin deneysel (mavi), hesapsal S-izomeri (kırmızı) ve hesapsal R (sarı) izomerlerin log Ki değerlerinin karşılaştırılması

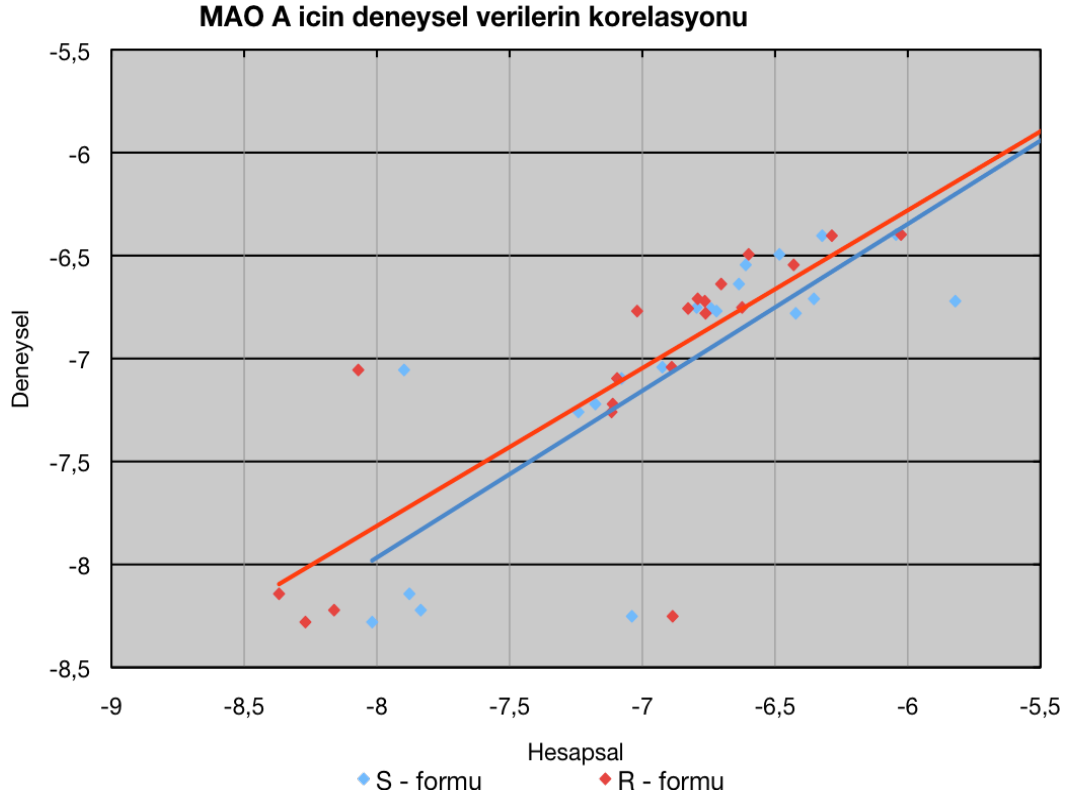


F4E bileşiği hariç deneysel veriler ile hesapsal veriler arasında bir paralellik gözükmemektedir. R ve S izomerleri, F3Q hariç, MAO-A enzimini aynı derecede inhibe etmişlerdir. Deneysel veriler genel olarak iki izomerin ortalama değerlerine yakın değerlerle MAO-A enzimini inhibe etmişlerdir.

TABLO-11: MAO-A enzimine karşı deneysel, S- ve R-izomerlerinin inhibisyon katsayılarının logaritmik değerleri

	Deneysel	S - formu	R - formu
F1A	-6,76	-6,72	-7,01
F1E	-6,75	-6,74	-6,82
F1F	-8,22	-7,83	-8,16
F1M	-6,49	-6,48	-6,59
F1Q	-6,54	-6,61	-6,42
F2A	-7,25	-7,24	-7,11
F2E	-7,04	-6,92	-6,88
F2F	-7,05	-7,89	-8,07
F2M	-6,63	-6,63	-6,70
F2Q	-6,39	-6,04	-6,02
F3A	-7,22	-7,17	-7,11
F3E	-6,78	-6,42	-6,76
F3F	-8,27	-8,01	-8,26
F3M	-6,70	-6,35	-6,79
F3Q	-6,72	-5,82	-6,76
F4A	-7,09	-7,07	-7,09
F4E	-8,25	-7,03	-6,88
F4F	-8,14	-7,87	-8,36
F4M	-6,75	-6,79	-6,62
F4Q	-6,40	-6,32	-6,28

Grafik 3: MAO-A Enziminin deneysel (y-ekseni) , S-izomeri (mavi) ve R (kırmızı) izomerlerin logKi değerlerinin korelasyonu



$$Y = 0.8101X - 1.4854$$

$$R^2 = 0.6358 \text{ (R izomeri için)}$$

$$Y = 0.765X - 1.6805$$

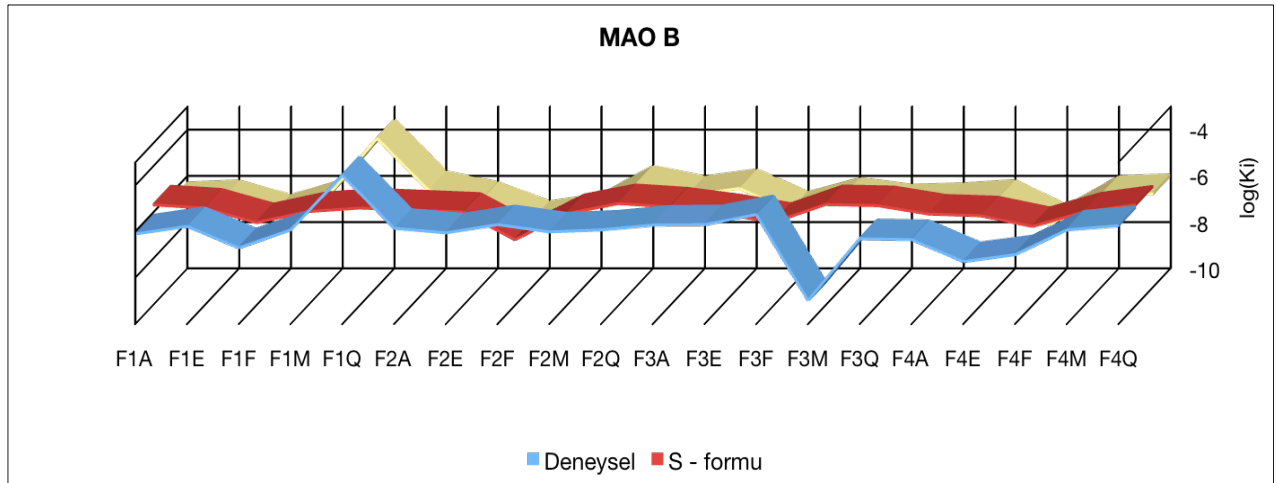
$$R^2 = 0.6374 \text{ (R izomeri için)}$$

Yukarıdaki grafikten ve denklemlerden deneysel inhibisyon katsayıları hem R izomeri hemde S izomerinin hesapsal inhibisyon katsayıları ile için çok yüksek değerde olmasada yeterli derecede korelasyon göstermektedir.

TABLO-12: MAO -B Enziminin deneysel, hesapsal (R ve S izomerleri) Ki değerlerinin log değerleri

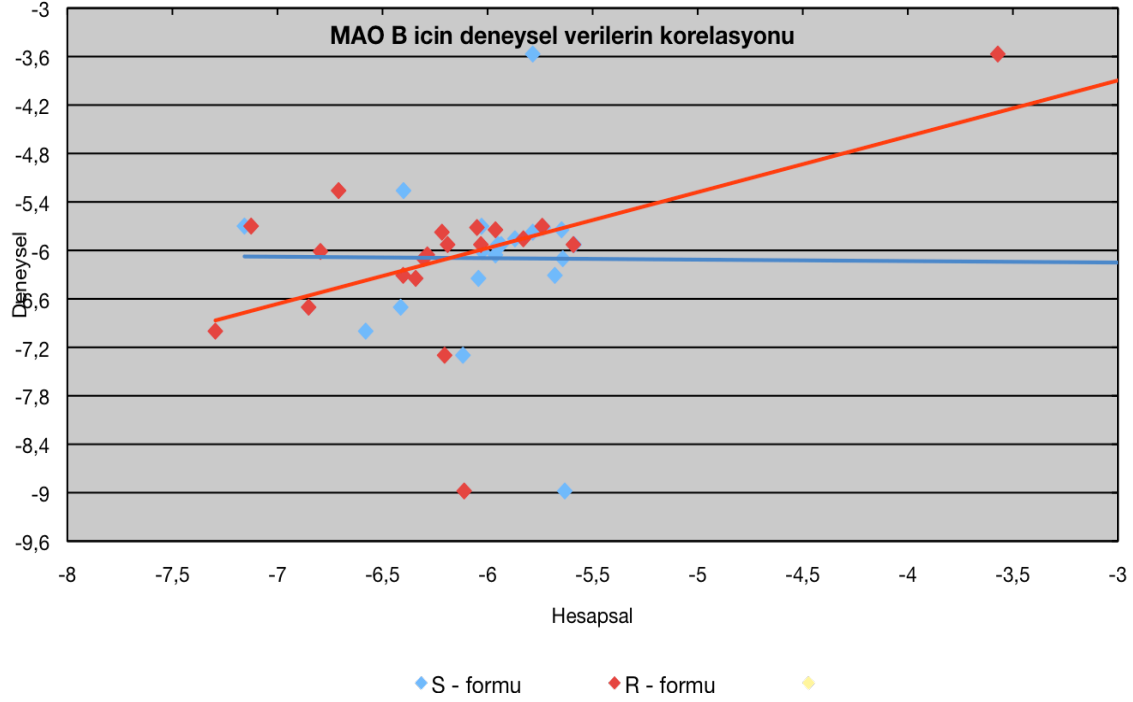
	Deneysel	S - formu	R - formu
F1A	-6,10	-5,64	-6,30
F1E	-5,77	-5,78	-6,21
F1F	-6,70	-6,41	-6,85
F1M	-5,92	-5,93	-6,19
F1Q	-3,56	-5,78	-3,57
F2A	-5,85	-5,86	-5,82
F2E	-6,05	-5,96	-6,28
F2F	-5,69	-7,15	-7,12
F2M	-6,01	-6,02	-6,79
F2Q	-5,92	-5,58	-5,59
F3A	-5,71	-5,73	-6,05
F3E	-5,70	-6,02	-5,73
F3F	-5,25	-6,39	-6,70
F3M	-8,97	-5,63	-6,11
F3Q	-6,30	-5,67	-6,40
F4A	-6,34	-6,04	-6,34
F4E	-7,29	-6,11	-6,20
F4F	-7	-6,58	-7,29
F4M	-5,92	-5,95	-6,03
F4Q	-5,74	-5,64	-5,96

Grafik 4 :MAO-B Enziminin deneysel (mavi), hesapsal S-izomeri (kırmızı) ve hesapsal R (sarı) izomerlerin logKi değerlerinin karşılaştırılması



Yukardaki grafikten de anlaşılacağı üzere F3M bileşiği hariç diğer bileşikler için deneysel veriler ile hesapsal veriler arasında bir paralellik gözlenmiştir. Hesapsal olarak bulunan R ve S izomerleri arasında olağanüstü bir fark tespit edilememiştir.

Grafik 5: MAO-B Enziminin deneysel (y-ekseni) , S-(mavi) ve R (kırmızı) izomerlerin logKi değerlerinin korelasyonu



$$Y = 0.0183X - 6.2053$$

$$R^2 = 0.0001 \text{ (S izomeri için)}$$

$$Y = 0.692X - 1.8186$$

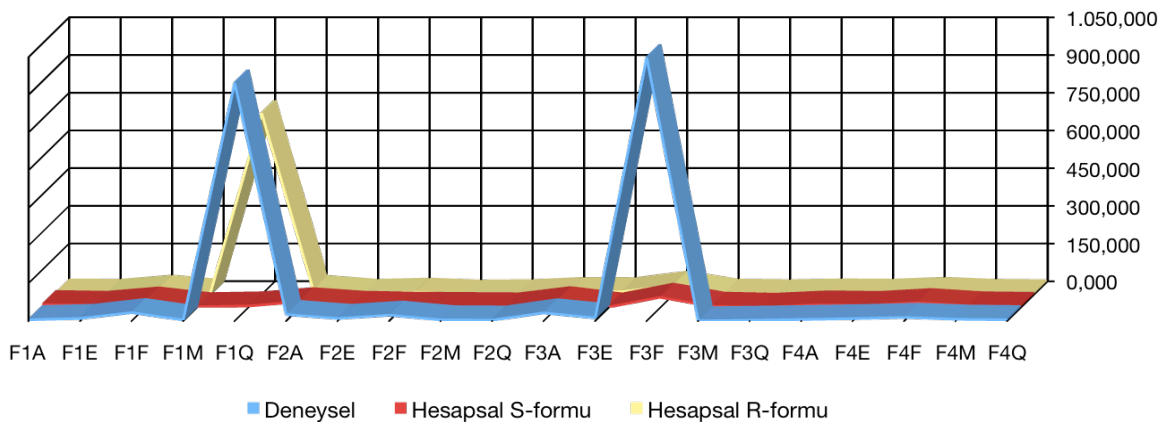
$$R^2 = 0.2753 \text{ (R izomeri için)}$$

Yukarıdaki grafikten ve denklemlerden deneysel inhibisyon katsayıları ile S izomeri hesapsal inhibisyon katsayıları arasında herhangi bir korelasyon tespit edilememiştir. R izomerinin hesapsal inhibisyon katsayıları ile deneysel inhibisyon katsayıları arasında çok düşük değerde yeterli olmayan bir korelasyon gözükmemektedir.

TABLO-13: Deneysel ve Hesapsal Seçicilik Değerleri (MAO-B K_i /MAO-A K_i)

	Deneysel	Hesapsal S-formu	Hesapsal R-formu	R-
F1A	4,64	11,98	5,18	
F1E	9,60	9,03	4,07	
F1F	33,00	26,37	20,38	
F1M	3,68	3,53	2,56	
F1Q	947,36	6,68	721,06	
F2A	25,27	23,50	19,32	
F2E	9,69	9,16	4,00	
F2F	22,72	5,50	8,80	
F2M	4,21	4,07	0,80	
F2Q	2,95	2,85	2,71	
F3A	31,93	27,66	11,50	
F3E	12,00	2,47	10,51	
F3F	1.047,61	41,47	36,31	
F3M	0,005	5,26	4,78	
F3Q	2,58	1,38	2,30	
F4A	5,62	10,83	5,66	
F4E	8,98	8,35	4,80	
F4F	13,88	19,82	11,82	
F4M	6,66	6,99	3,91	
F4Q	4,55	4,72	2,10	

Grafik 6 : Deneysel ve Hesapsal [R izomeri (sarı) ve S izomeri (kırmızı)] Seçicilik indekslerinin karşılaştırılması (MAO-B K_i /MAO-A K_i)



F3F bileşiği grafikten de görüldüğü gibi deneysel olarak iyi bir MAO-A inhibitörüdür. İnhibisyon katsayısı K_i MAO-A için 5.38 nM, MAO-B enzimi için ise 5.50 mikromM dır. Seçicilik indeksi ise $SI=1047$ dir. Hesapsal olarakta bu bileşik MAO-A inhibitörü olmakla birlikte seçicilik indeksi bu kadar yüksek bulunamamıştır. ($SI=36-60$). F1Q bileşiği hem deneysel olarak hemde hesapsal olarak (sadece R izomeri)

yüksek oranda MAO-A inhibitörü olarak bulunmuştur. Diğer bileşikler için çok yüksek değerlerde olmasa bile bileşiklerin MAO-A inhibitörü oldukları hem hesapsal hemde deneysel olarak tespit edilmiştir.

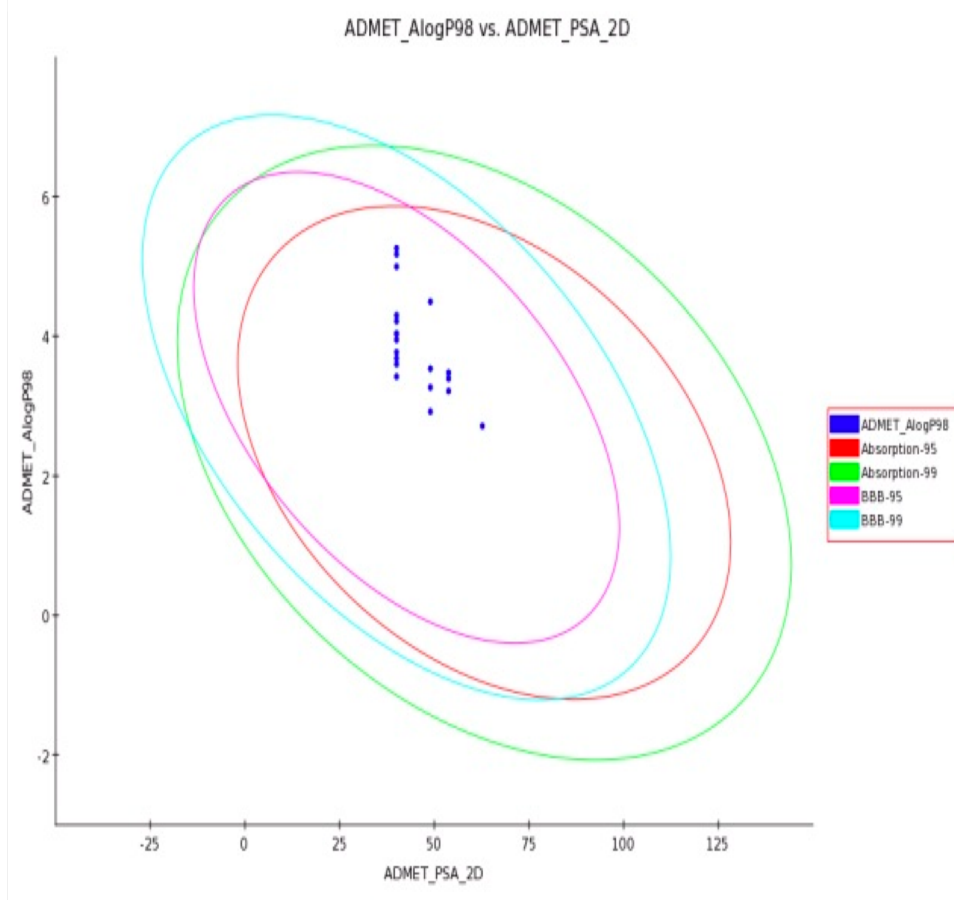
4.2.3.Tasarlanan İnhibitörlere ADMET (Absorbtion, Distribution, Metabolism, Excretion , Toxicity) Testleri:

Klinik deneylerden önce ilaç olarak düşünülen maddelerin güvenilir ADMET testlerinin yapılması bize klinik deneylerde ilacın nasıl davranacağı konusunda önemli ipuçları veririr. Bu da bize sonucu klinik deneylerde sonu hüsrarla bitebilecek bir ilacın klinik deneylere sokulmamasını sağlayarak hem zamandan hemde paradan olağanüstü tasarruflar sağlar. İlaç olarak MAO-A ve MAO-B enzimlerine tasarladığımız 20 maddenin (R ve S izomerleri) ADMET neticeleri verilmiştir.

İncelenen diskriptörler aşağıdaki gibidir:

1. Bağırsaktan emilim (Human intestinal absorption, HIA)
2. Suda çözünürlük (Aqueous solubility, AS)
3. Kan-Beyin-engeli penetasyonu (Blood brain barrier penetration, BBB)
4. Plasma protein bağlanması (Plasma protein binding)
5. Sitokrom P450 2D6 ihhibisyonu
6. Hepatoksisite

Grafik 7: ADMET test sonuçları
Eksenler:



Y – eksenini : AlogP98 : Kurala göre bu değerin $-1 > \text{değer} < 5$ arasında olması beklenir.

X- eksenini: PSA (Polar Surface Area) : bu değerin $-10 > \text{değer} < 130$ olması beklenir.

Grafikteki mavi noktalar bizim tasarladığımız maddelerin yerlerini göstermektedir.

Bu grafiğe göre tasarlanan moleküllerin ADMET değerleri bütün testleri geçmiştir.

4.2.4. Kuantum Kimyası Hesaplamaları:

Enzimler ve polimerler gibi çok büyük sistemlerin hareketlerini modelleyebilmek için kullanılan, moleküler dinamik ve moleküler mekanik yöntemleri olaya global olarak yaklaştıklarından, böyle büyük bir sistemin küçük bir hacmi içinde gerçekleşen elektronik etkileşimleri tespit etmekte yetersizdirler. Kuantum mekaniği prensiplerine dayalı yöntemlerin ise elektronik etkileşimleri başarıyla hesaplayabildikleri bilinmektedir. Bu nedenle, doking çalışmaları ve aktivite ölçümlerinden sonra potansiyel ilaç aktif maddesi olarak tespit edilen ligandların, enzimin aktif bölgesi içinde kuantum mekaniği prensiplerine göre optimize edilmesi hedefine yönelik olarak hesaplamalar yapılmıştır. Input hazırlanması ve output sonuçlarının görüntülenmesi için Accelrys ve GaussView5.0 yazılımlarından faydalanılmıştır.

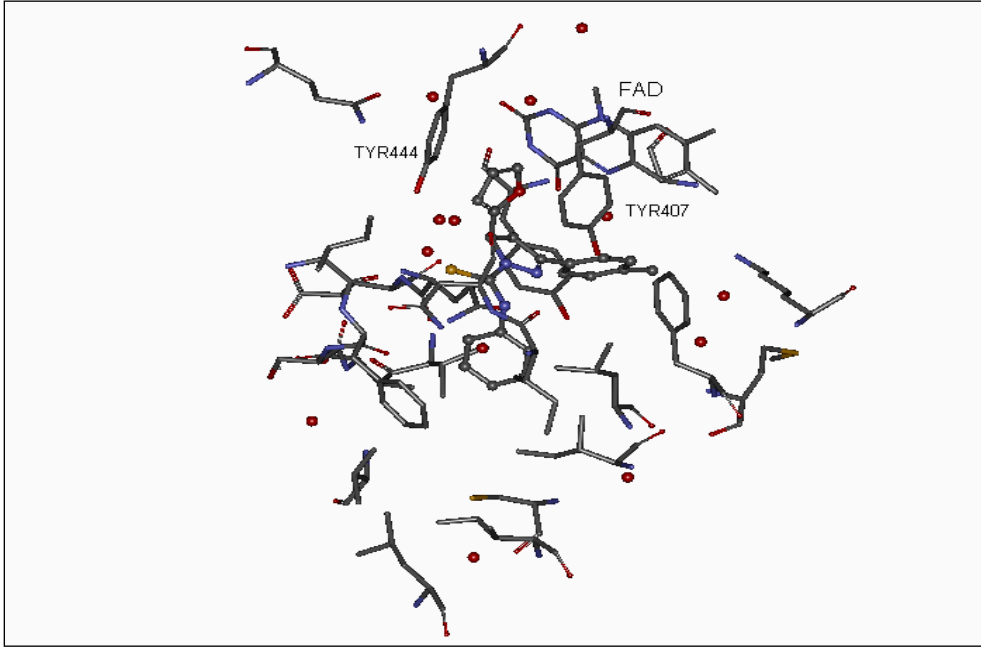
Aşağıdaki metodoloji izlenmiştir:

Doking sonuçlarına göre MAO-A enzimine iyi bağlanan ve potansiyel ilaç aktif maddesi olabileceği düşünülen pirazoller her bileşik grubunun fenil sübstitüe türevleridir ki bunlar F1F, F2F, F3F ve F4F bileşikleridir. MAO-A enzimine dock edilmiş F4F-R, F3F-R ve F1F-R ligandlarının dosyaları Accelrys programında görüntülendi. Bu bileşiklerin enzim aktif bölgesinde docklanmış pozisyonlarını çevreleyen protein zincirindeki amino asit rezidüleri tespit edildi. Bu rezidüler ve FAD halkası haricinde enzimin geri kalan büyük kısmı silinerek yapı yaklaşık 528 (hidrojenler dahil) atoma küçültüldü. Enzimin aktif bölgesindeki bütün aminoasit rezidüleri ve ayrıca ligandın etrafını saran Gly67 ve Leu305 yapıya dahil edildi. Elde edilen yapı *GaussView* programına aktarıldı. Enzimin kristal yapısında aktif bölgede bulunan 8 adet su molekülü aynı konumlarında ve protein zinciri ile hidrojen bağları yapacak şekilde yapıya eklendi. "Feeze" seçeneği kullanılarak FAD halkası 3 atomundan ve her bir aminoasit rezidüsü 2 veya 3 atomundan sabitlendi. ONIOM seçeneği ile yapı 2 katmana ayrıldı. İç katman için çeşitli seviyelerde ab initio yöntemleri, dış katman ise yarı-deneysel PM3, PM6 yöntemleri seçilerek Gaussian09 ile optimizasyonlar denendi. Ancak bu şekilde başlatılan hesaplamalar çok fazla bilgisayar zamanı aldığından (1 ay sonunda) kesmek zorunda kalındı. Hesaplamayı kolaylaştırmak için yapının tamamına yarı-deneysel PM6 yöntemi seçilerek yapılar tekrar düzenlendi.

F1F-R, F2F-R, F3F-R, F4F-R inhibitörleri için docking pozisyonlarından en iyi olanı pdb formatında kaydedilerek *Discovery Studio (Accelrys)* programına aktarıldı. Accelrys programı ile bu hidrojenler eklenerek yapı tekrar düzgün hale getirildi. Ligandın etkileşimde bulunduğu fakat MAO-A'nın aktif bölgesinde bulunmayan Gly67, Gln215, Lys305 aminoasitleri ve MAO-A'nın aktif bölgesinde yer aldığı bilinen 20 aktif bölge aminoasidi ve FAD dışındaki aminoasitler Accelrys ile yapıdan silindi. Daha sonra mol2 formatında kaydedilerek, *Gausview'* da yapı okutuldu. *Gausview'* da açılan yapıya insan MAO-A' sında mevcut olan su molekülleri enzimin kristal yapısındaki konumlara eklendi (14 adet). Geometri optimizasyonu sırasında yapının dağılmasını engellemek amacıyla hazırlanmış olduğumuz dosyadaki 23 aminoasit ve FAD uygun atomlarından donduruldu, ligand ve sular ise serbest bırakıldı. Bu dört inhibitörün hepsinde aktif bölge dışında etkileştikleri aminoasitler aynı (Gly67, Gln215 ve Lys305) olduğundan dördünün hesaplamasında kullanılan aminoasitler ve suların sayısı, dondurulan atomlar ve diğer parametreler aynı olacak şekilde ayarlandı.

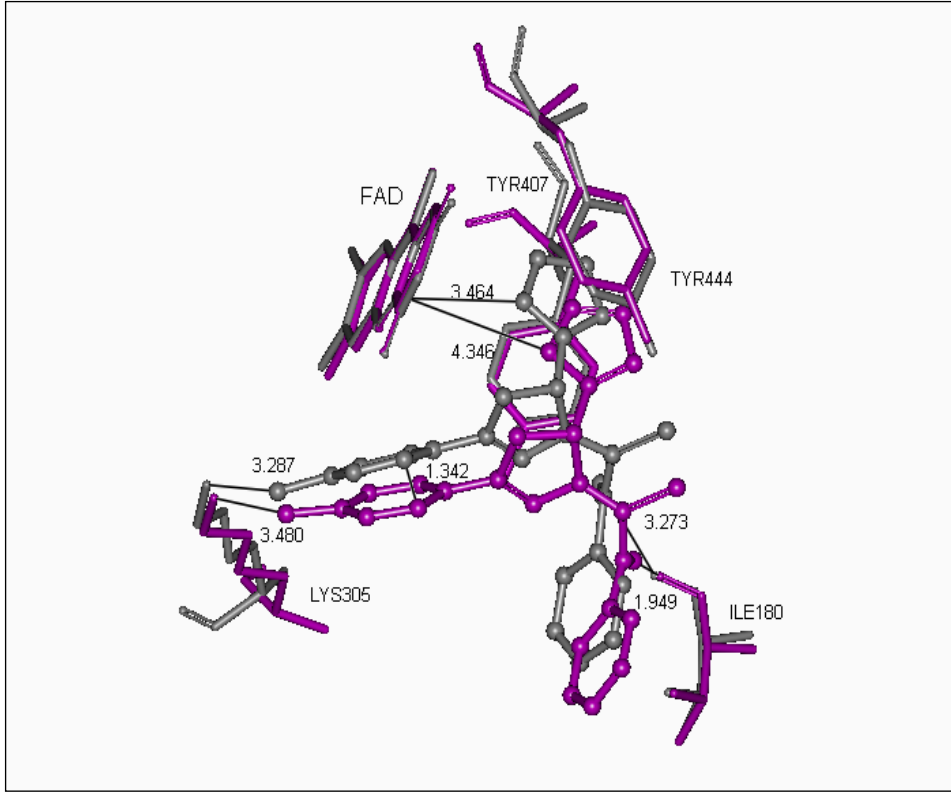
4.2.4.1. F1F-R İnhibitörü-PM6 Hesaplamaları Sonucunda F1F-R İnhibitöründe Gözlemlenen Değişimler:

Doking sonucunda, inhibitörün feniline para konumundan bağlı olan metil grubunun Lys305 yan zincirine 3,29 Å olan mesafesi PM6 optimizasyon hesaplaması sonucunda 3,48 Å'a çıkmıştır. Diğer taraftan inhibitördeki tiyoamid grubunun azoda bağlı hidrojeni Ile180' in karbonil oksijenine docking sonucunda 3,27 Å iken PM6 hesabında bu mesafe 1,95 Å'a azalmıştır. İnhibitördeki furan halkasının ise FAD' ye olan mesafesi 3,46 Å'dan 4,34 Å'a çıkmıştır. Sonuç olarak inhibitör PM6 optimizasyonu sonucunda docking hesaplamasından alınan ilk konumuna göre FAD' den bir miktar uzaklaşmıştır.



Şekil 40: F1F-R inhibitörünün PM6 Hesaplaması sonucunda inhibitörün enzim içinde konumlandığı yer. (İnhibitör top model, enzim ise çubuk model ile gösterilmiştir. Kırmızı noktalar su moleküllerinin oksijenleridir.)

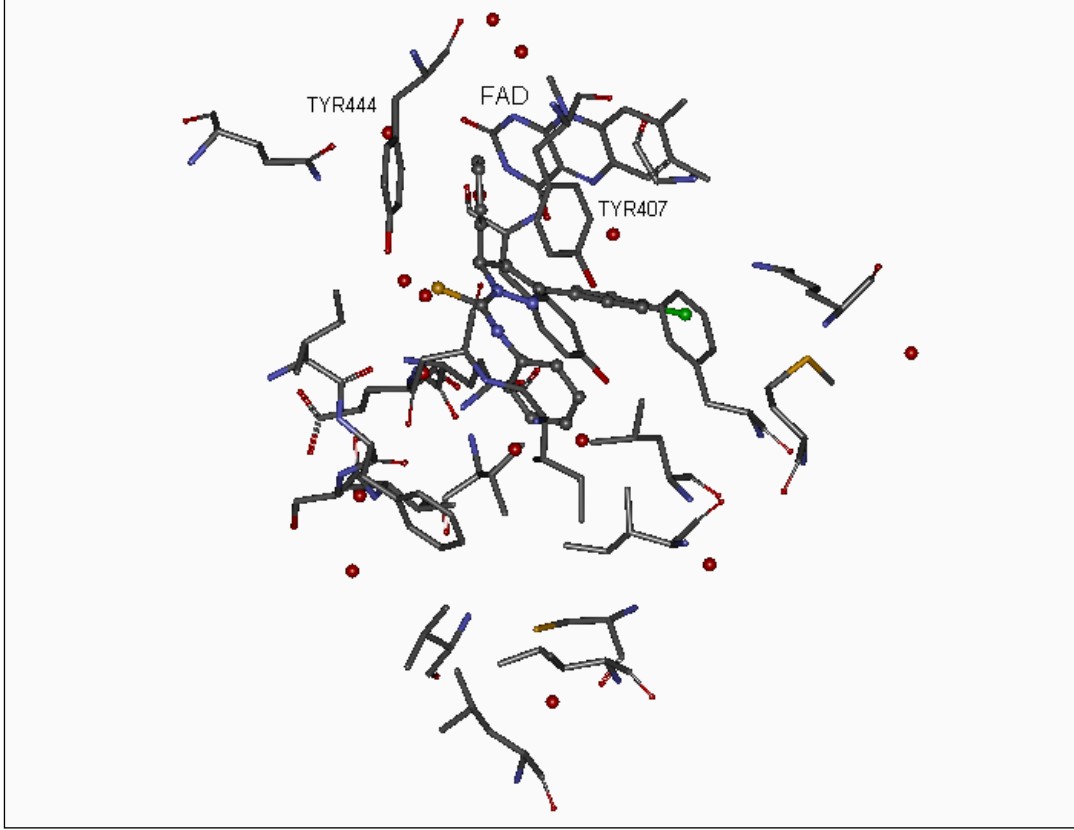
F1F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması. Doking sonucu gri renkle, PM6 sonucu mor renkle gösterilmiştir.



Şekil 41: F1F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması

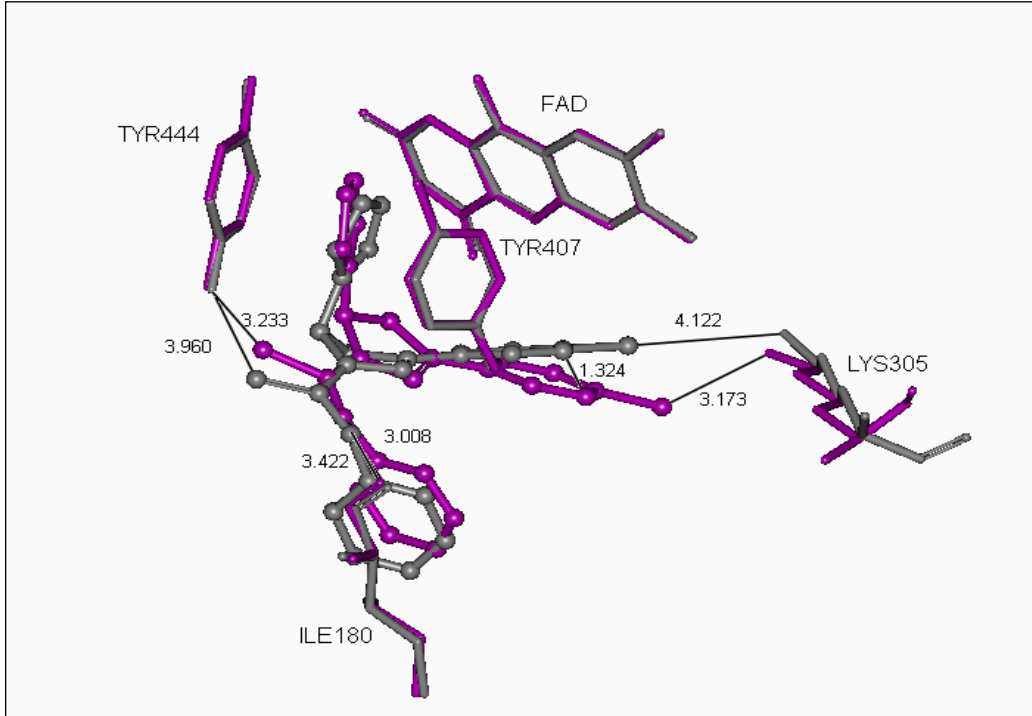
4.2.4.2. F2F-R İnhibitörü- PM6 Hesaplamaları Sonucunda F2F-R İnhibitöründe Gözlemlenen Değişimler:

Doking sonucunda, inhibitörün para konumundaki klor atomuyla Lys305 yan zincirindeki NH_3 azotuyla $4,12\text{Å}$ mesafeye bulunmaktayken, PM6 optimizasyon hesaplaması sonucunda bu mesafe $3,17\text{Å}$ olarak değişmiştir. Diğer taraftan inhibitördeki tiyoamid grubunun kükürt atomu Tyr444' ün hidroksil hidrojenine doking sonucunda $3,96\text{Å}$ mesafedeyken, bu mesafe $3,23\text{Å}$ olarak değişmiştir. İnhibitörün tiyoamidinin azot atomu ile Ile180 doking sonucunda $3,00\text{Å}$ iken, PM6 optimizasyonu sonucunda bu mesafe $3,42\text{Å}$ ' a çıkmıştır. İnhibitördeki furan halkası ise hem doking sonucunda hem de PM6 optimizasyonu sonucunda Tyr407 ve Tyr444' ün arasında paralel konumda durarak "π-π stacking" etkileşimi yapmaktadır. Doking sonucu ile PM6 optimizasyonu sonuçları arasındaki diğer bir fark ise inhibitörün metoksi grubunun bağlı olduğu fenil halkasında görülmektedir. Bu fenil halkası $1,32\text{Å}$ FAD' den uzaklaşmıştır.

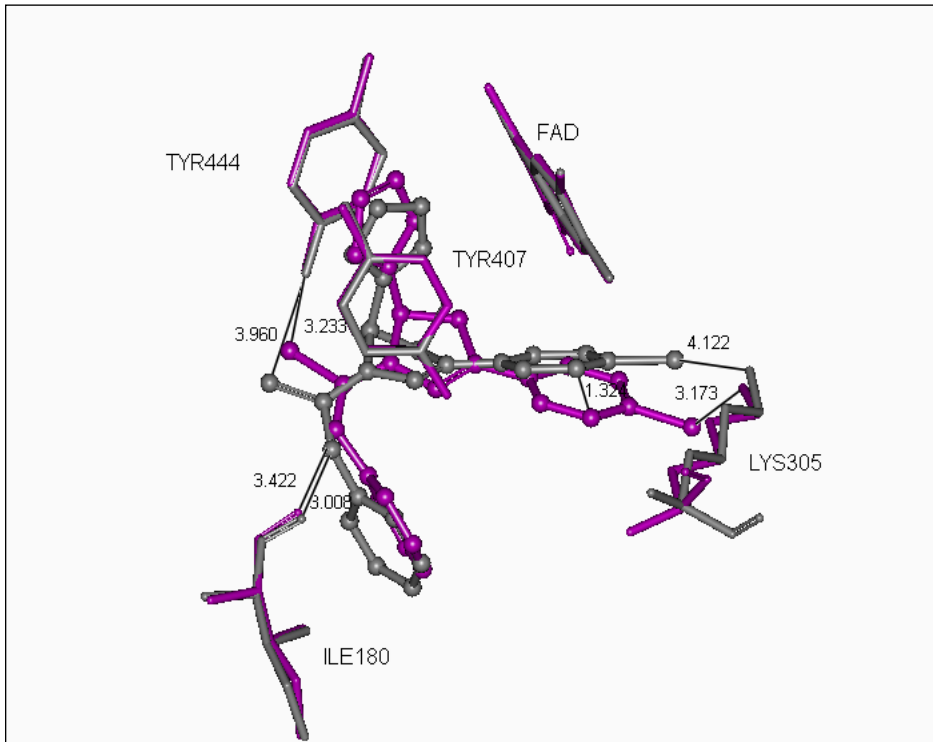


Şekil 42: F2F-R inhibitörünün PM6 Hesaplaması sonucunda inhibitörün enzim içinde konumlandığı yer. (İnhibitör top model, enzim ise çubuk model ile gösterilmiştir. Kırmızı noktalar su moleküllerinin oksijenleridir.)

F2F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması. Doking sonucu gri renkle, PM6 sonucu mor renkle gösterilmiştir.



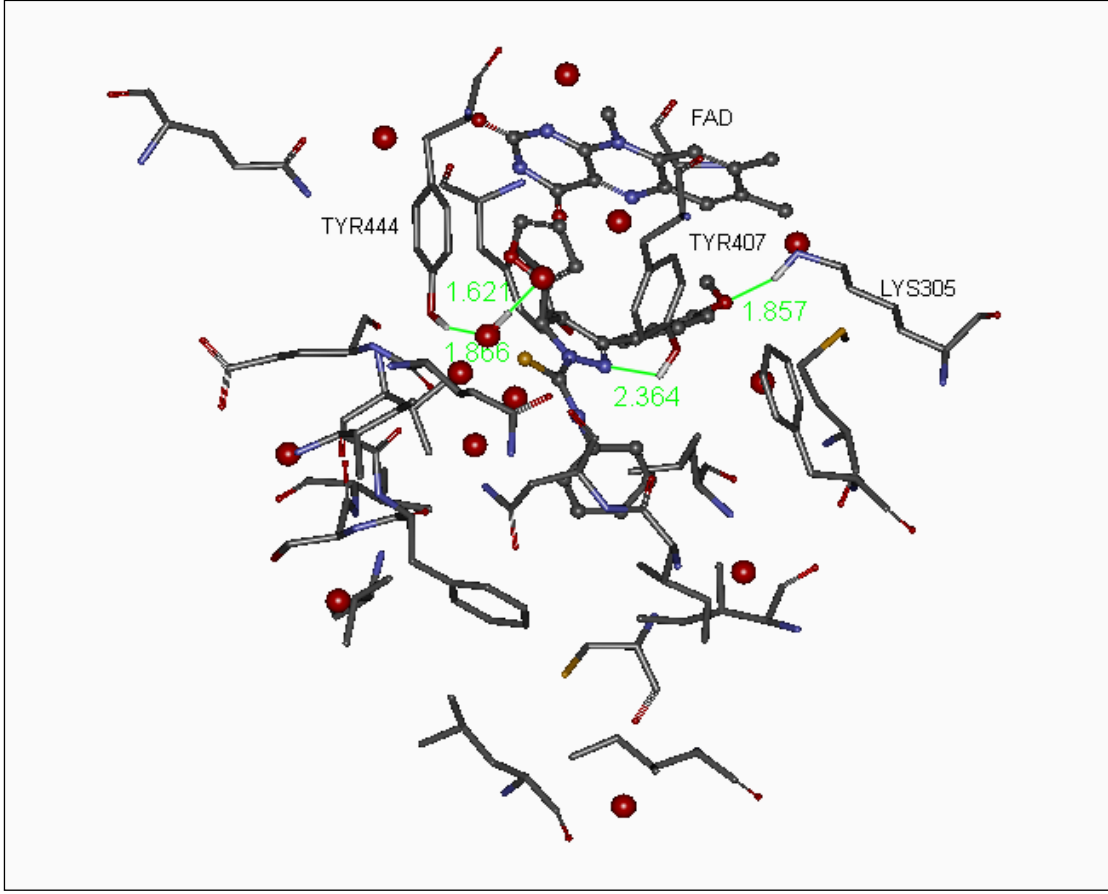
Şekil 43: F2F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması-Poz1



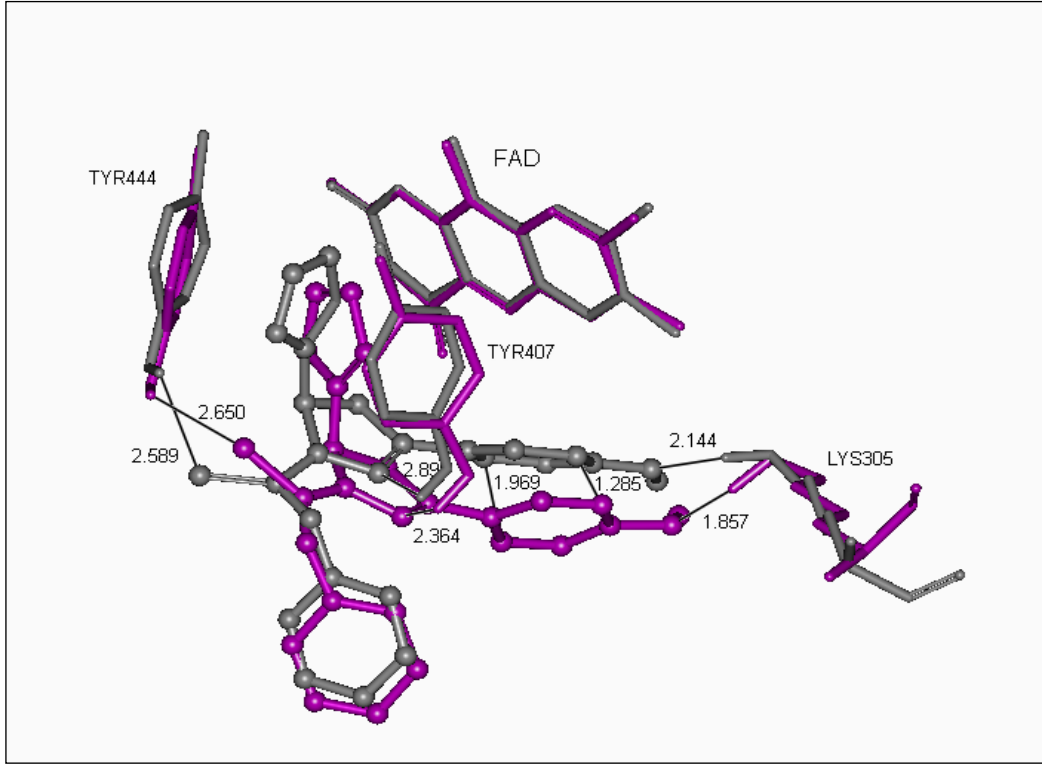
Şekil 44: F2F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması- Poz2

4.2.4.3. F3F-R İnhibitörü-PM6 Hesaplamaları Sonucunda F3F-R İnhibitöründe Gözlemlenen Değişimler:

Doking sonucunda, inhibitörün feniline para konumundan bağlı olan metoksi grubunun oksijen atomuyla Lys305 yan zincirindeki protonlanmış NH_3 hidrojeniyle 2,14 Å mesafeye yerleşmişken, PM6 optimizasyonu sonucunda bu mesafe 1,86 Å'a düşmüştür. Diğer taraftan inhibitördeki tiyoamid grubunun kükürt atomu Tyr444' ün hidroksil hidrojenine doking sonucunda 2,59 Å mesafedeyken, PM6 yöntemi bu mesafeyi 2,65 olarak bulmuştur. Tyr407' nin fenolik halkasındaki hidroksil hidrojeni pirazol grubu azotuna (N-N=C) doking sonucunda 2,89 Å dururken, PM6 optimizasyonu sonucunda bu uzaklık 2,36 Å'a düşmüştür. İnhibitördeki furan halkası ise doking sonucunda Tyr407 ve Tyr444' ün arasında ve fenolik halkalarına paralel konumda dururken, PM6 hesaplaması sonucunda furan halkası yaklaşık 90 derecelik bir dönme hareketi yaparak FAD' ye dik olan konumunu FAD' ye paralel şekilde değiştirmiştir. Ayrıca, furan halkasının oksijen atomu Tyr444' ün fenil halkasına yönelmiştir. Doking sonucu ile PM6 optimizasyonu sonuçları arasındaki en bariz fark ise inhibitörün metoksi grubunun bağlı olduğu fenil halkasında görülmektedir. Bu fenil halkası bir ucundan FAD' den 1,28 Å uzaklaşırken, diğer ucundan 1,97 Å daha aşağıya kaymıştır.



Şekil 45: F3F-R inhibitörünün PM6 Hesaplaması sonucunda inhibitörün enzim içinde konumlandığı yer. (Inhibitör top model, enzim ise çubuk model ile gösterilmiştir. Kırmızı noktalar su moleküllerinin oksijenleridir.)

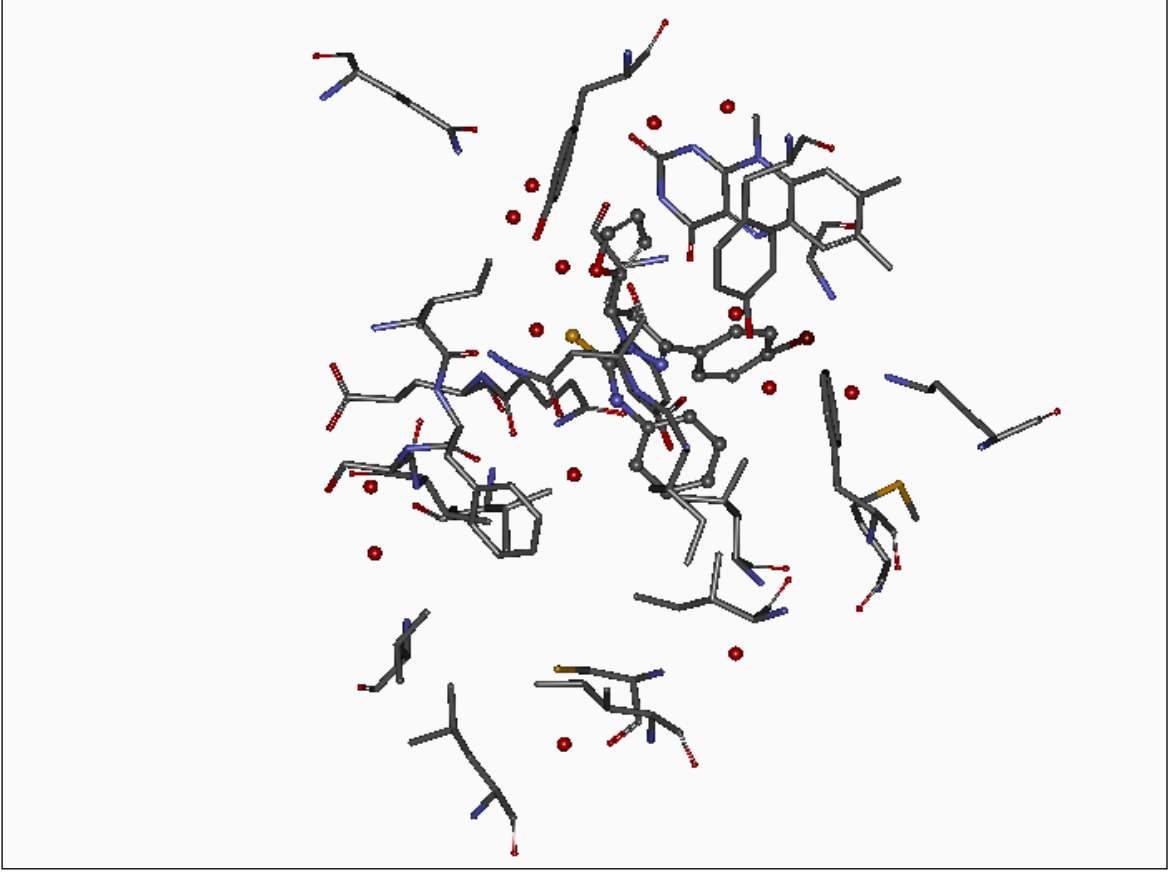


Şekil 46: F3F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması. Doking sonucu gri renkle, PM6 sonucu mor renkle gösterilmiştir.

4.2.4.4. F4F-R İnhibitörü-PM6 Hesaplamaları Sonucunda F4F-R İnhibitöründe Gözlemlenen Değişimler:

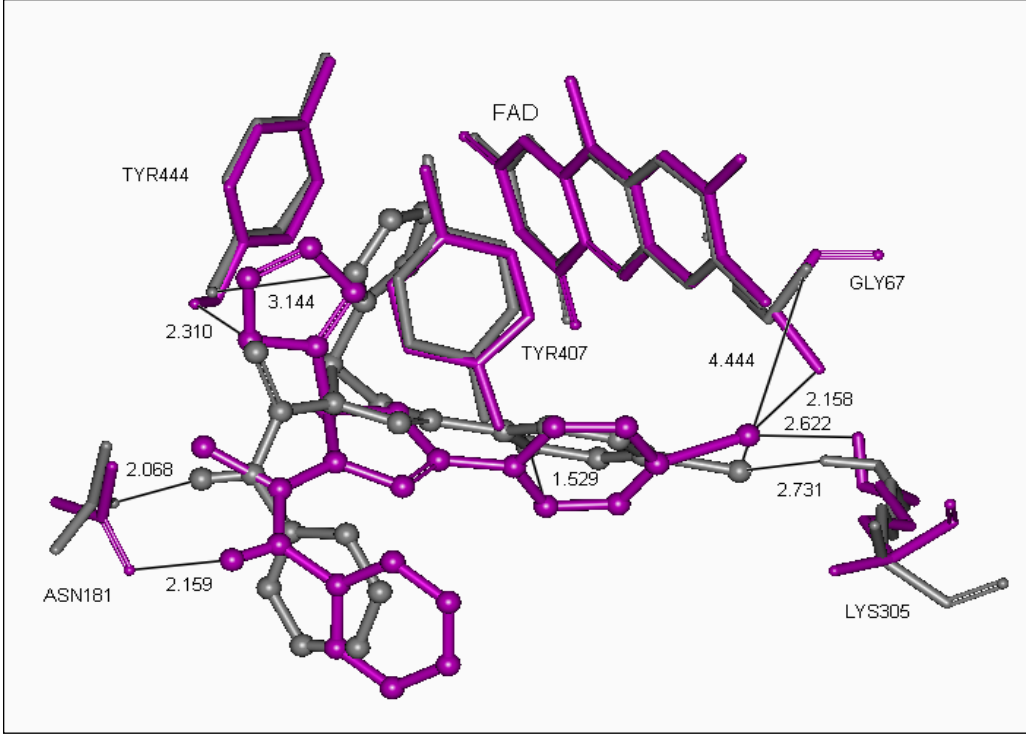
Doking sonucunda, inhibitörün feniline para konumundan bağlı olan brom atomu Lys305 fonksiyonel grubundaki protonlanmış NH_3 hidrojeniyle 2,73 Å mesafeye yerleşmişken, PM6 optimizasyon hesaplaması sonucunda bu mesafe 2,62 Å'a düşmüştür. Brom atomunun ayrıca Gly67 amino asidine olan mesafesi 4,44 Å iken, PM6 optimizasyonu sonucunda bu mesafe 2,15 Å yakınlığındadır. Diğer taraftan inhibitördeki tiyoamid grubunun azota bağlı hidrojeniyle Asn181'in karbonil oksijeni arasında 2,07 Å mesafe bulunurken, PM6 hesaplaması sonucunda bu mesafe 2,16 Å olarak değişmiştir. İnhibitördeki furan halkasının oksijen atomu Tyr444'ün fenolik halkasındaki hidroksil hidrojenine doking sonucunda 3,14 Å, PM6 optimizasyonu sonucunda ise 2,31 Å uzaklıktadır. Furan halkası FAD'den uzaklaşarak aromatik kafesin dışına kaymıştır. Doking sonucu ile Gaussian PM6 optimizasyonu sonuçları arasındaki diğer bir fark ise inhibitörün metoksi grubunun bağlı olduğu fenil halkasında görülmektedir. Bu fenil halkasının doking duruşuyla PM6 hesaplaması sonucunda halkanın 1,53 Å'luk bir hareketi söz konusudur.

Ayrıca bu inhibitörde ortamdaki su molekülünün etkisini de görmek mümkündür. PM6 optimizasyonu öncesinde ortama yerleştirilen (Gly67, Lys305 aminoasitleri civarındaki) su moleküllerinden bir tanesi Lys305 fonksiyonel grubundaki protonlanmış NH_3 hidrojenine 1,6 Å mesafeye yaklaşarak bu protonu Lys305'in azotundan uzaklaştırmıştır. H_2O molekülünün protonu ise inhibitörün fenile bağlı brom atomuyla etkileşerek 2,78 Å mesafeye gelmiştir.

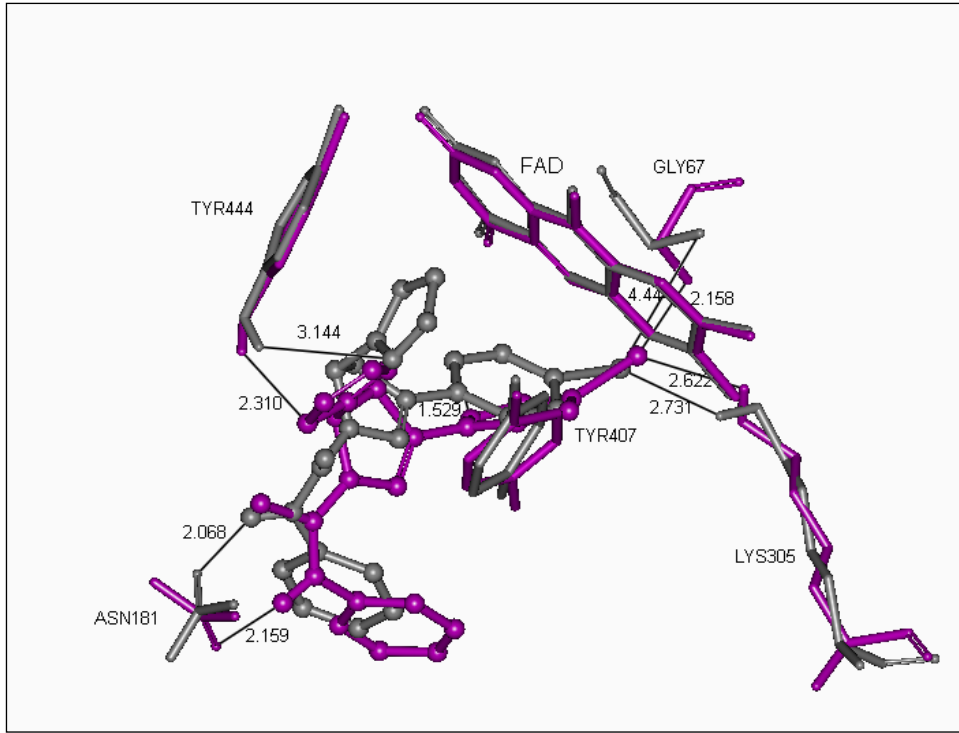


Şekil 47: F4F-R inhibitörünün PM6 Hesaplaması sonucunda inhibitörün enzim içinde konumlandığı yer. (İnhibitör top model, enzim ise çubuk model ile gösterilmiştir. Kırmızı noktalar su moleküllerinin oksijenleridir.)

F4F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması. Doking sonucu gri renkle, PM6 sonucu mor renkle gösterilmiştir.



Şekil 48: F4F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması



Şekil 49: F4F-R inhibitörünün etkileşimlerin karşılaştırılması-poz 2

4.3. CDOCKER:

CDOCKER (CHARMm) programı Discovery Studio-2.5.5'nun bir modülü ve grit tabanlı Moleküler Dinamik "docking" algoritmasına sahiptir. Böylece daha hızlı bir şekilde inhibitörün de hareketliliğini sağlayarak (bağlar, açılar ve dihedraller), daha tutarlı ve güvenilir sonuçlar veren CHARMM "force fields" kullanarak inhibitörleri aktif kısma yerleştirir.

AutoDock "docking" programı ile enzimlerin aktif kısmına yerleştirilen inhibitörlerden çok iyi bağlanma katyasına sahip olan inhibitörler seçilerek *Accelrys*'in *CDOCKER* programıyla tekrar "dock" edilmişlerdir. Aynı bileşikler yine *Accelrys* in "De Novo Design" modülü kullanılarak hem MAO-A hem de MAO-B enzimi aktif bölgeleri kullanılarak yapıya dayalı olarak geliştirilerek bu enzimlere daha spesifik ve etkili hale getirilmişlerdir (**Tablo 14**).

4.4. DS AutoLudi "de novo design":

DS AutoLudi programı "de novo design tool"un altında çalışır. Lider olarak seçilen iskelet (scaffold) ligandını enzimin hedef bağlanma bölgesinde iskelete enzimin aktif bölge boşluğunu dikkate alarak parçalar ekleyerek ligandın reseptöre bağlanma kabiliyetini artırır. "Combinatorial mode", da DS Auto Ludi kendi fragment kütüphanesini kullanır. Elde edilen sonuçları LUDI derecelendirme kuralına göre sıralanır. Burada yüksek değer iyi bağlanıyor demektir.

Tablo 14: De Novo Yöntemiyle Geliştirilen Yüksek Potansiyelli ve Seçimli Geliştirilmiş İnhibitörler

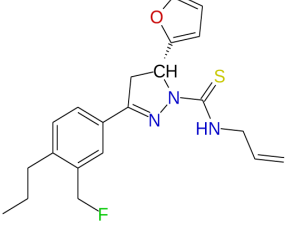
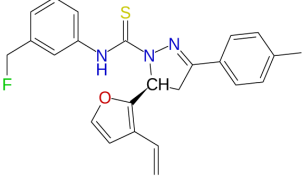
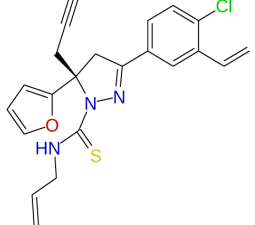
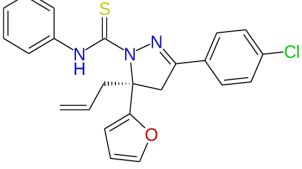
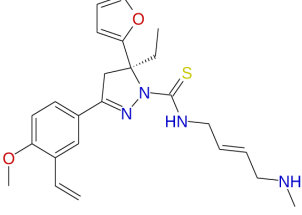
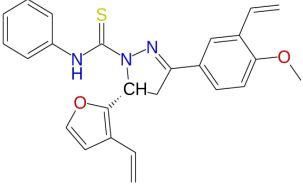
Başlangıç Maddeleri		MAO-A				MAO-B			
Adı	M.A	AutoDock1	LUDI	M.A	AutoDock2	AutoDock1	LUDI	M.A	AutoDock2
F1A-R	325.42	96.6 nM	1366	385.50	55.20 nM	496 nM	1113	363.48	2.28 nM
F1F-S	364.46	14.6 nM	1477	419.51	0.33 nM	386 nM	1306	418.56	1.63 nM
F2A-S	345.84	57.4 nM	1234	409.93	1.42 nM	1.35 µM	944	453.00	1.98 nM
F2F-S	381.87	12.7 nM	1340	421.94	0.40 nM	69.6 nM	1161	419.93	47.59 nM
F3A-S	341.42	66.5 nM	1384	438.59	70.26 nM	1.84 µM	953	440.53	588.84 nM
F3F-R	377.45	5.38 nM	1465	429.54	0.18 nM	195 nM	1425	496.63	13.93 pM
F3F-S	377.45	9.60 nM	1250	476.57	3.99 nM	398 nM	1255	490.59	184.06 pM
F4E-S	378.28	91.3 nM	1188	492.86	0.50 nM	763 nM	681	404.32	13.18 nM

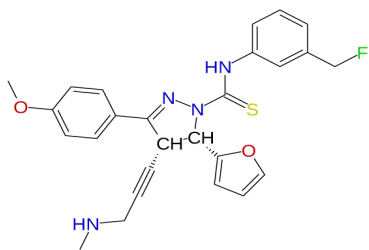
AutoDock1: Başlangıç maddelerinin inhibisyon katsayısı.

LUDI: (De Novo Ludi yöntemiyle geliştirilen inhibitörlerin LUDI skoru. (Yüksek değer daha iyi bağlanmayı gösterir).

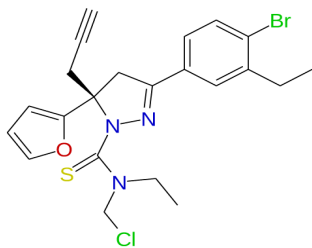
AutoDock2: De Novo Ludi yöntemiyle başlangıç maddelerinden geliştirilen inhibitörlerin inhibisyon katsayısı.

Tablo 15: De Novo Yöntemiyle Geliştirilen Yüksek potansiyelli ve Seçimli Geliştirilmiş İnhibitörlerin Kimyasal Yapısı ve Bileşik Kodları

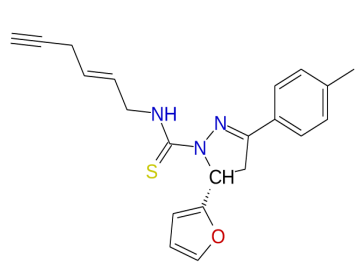
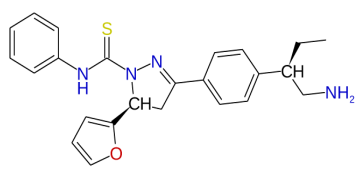
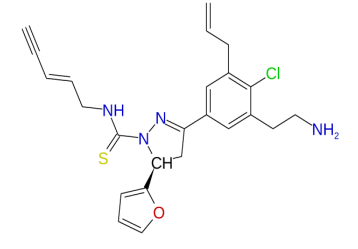
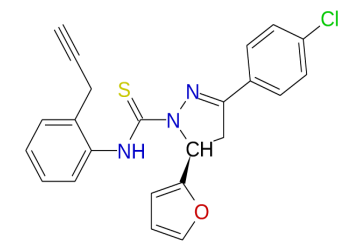
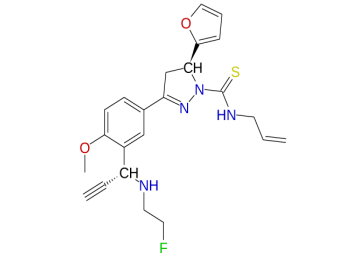
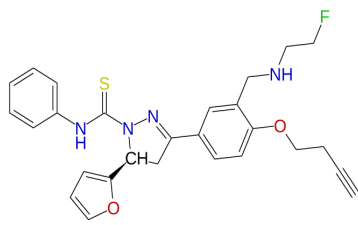
	1	f1arlmaoA	1,366	385.5
	2	f1fslmaoA	1,477	419.52
	3	f2aslmaoA	1,234	409.93
	4	f2fslmaoA	1,340	421.94
	5	f3aslmaoA	1,384	438.59
	6	f3frlmaoA	1,465	429.54

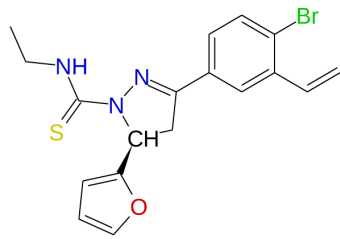


7 f3slmaoA 1,250 476.57

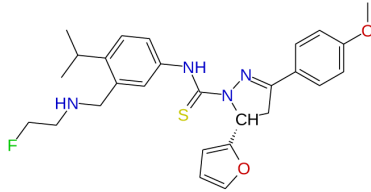


8 f4eslmaoA 1,188 492.86

	1	f1arlmaoB	1,113	363.48
	2	f1fslmaoB	1,306	418.56
	3	f2aslmaoB	944	453
	4	f2fslmaoB	1,161	419.93
	5	f3aslmaoB	953	440.53
	6	f3fslmaoB	1,255	490.59



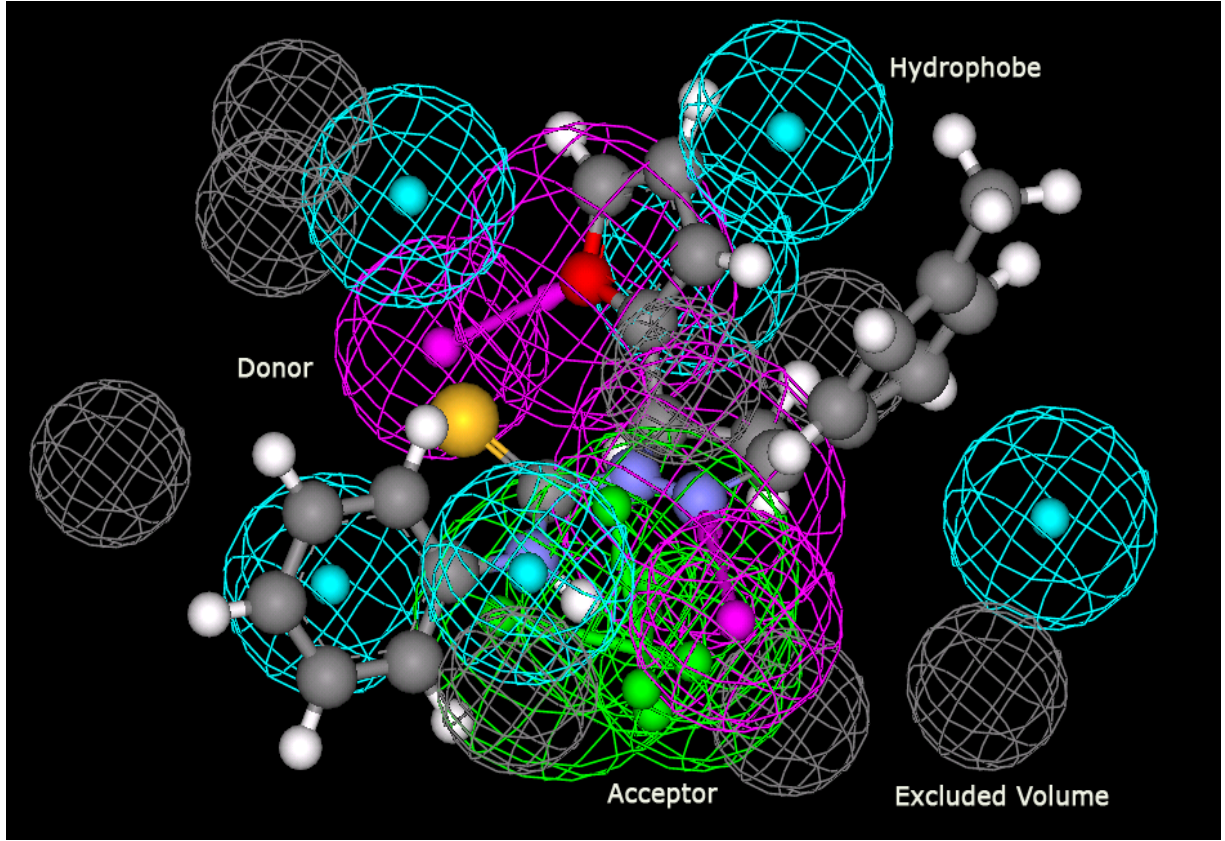
7 f4eslmaoB 681 404.32



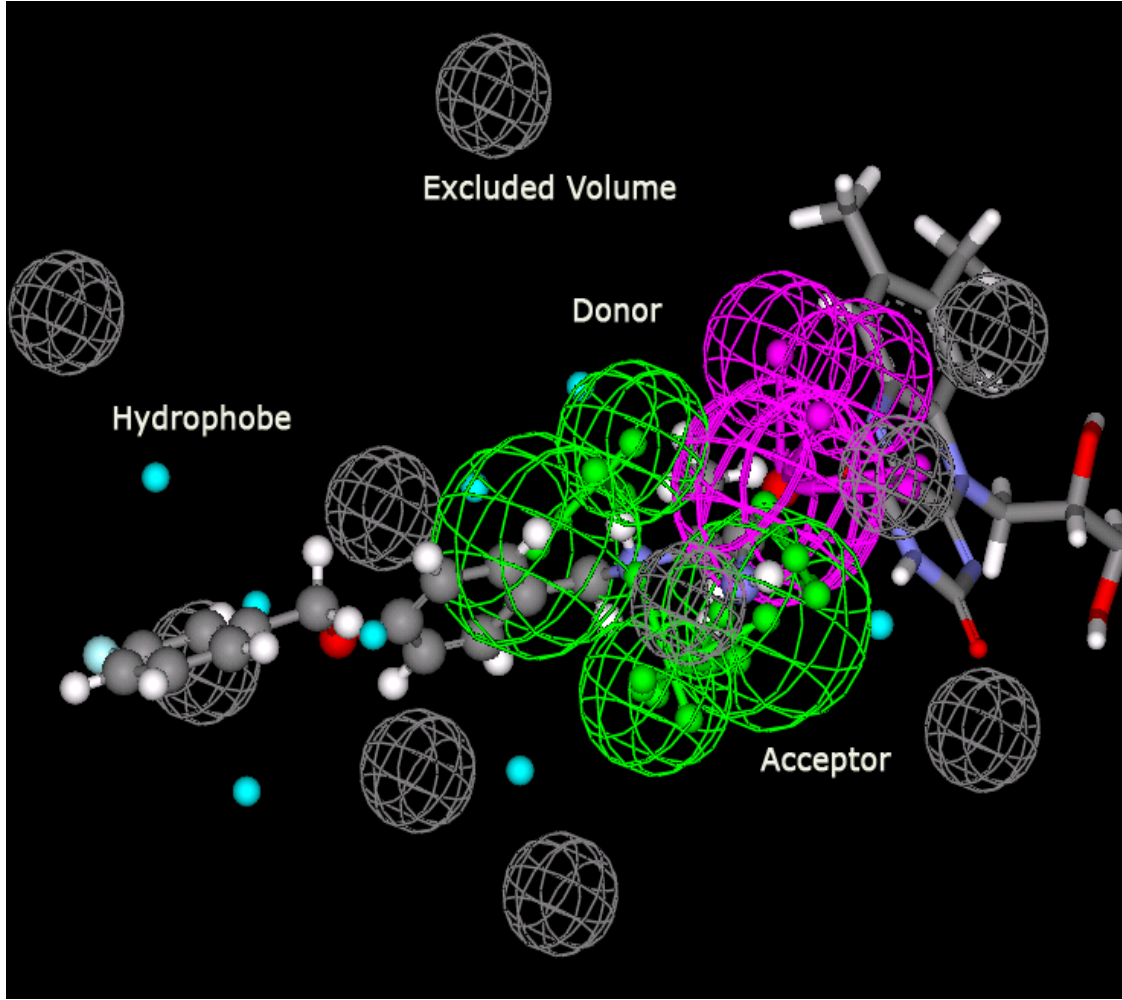
8 f3frlmaoB 1,425 494.63

4.5.FARMAKOFOR MAPPING:

Tanımlanan aktif bölge önce analiz edilerek ligandlarla makul girişimde bulunabilecek aktif bölgedeki farmakoforik kısımlar belirlenir (mapping). Tespit edilen başarılı sonuçlar tekrar analiz edilir. İstlenen özellikleri kapsayacak sayıda diskriptörler belirlenir. Bu şekilde MAO-A ve MAO-B isoenzimlerine en iyi farmakofor modelleri hidrojen bağı vericileri, hidrojen bağı alıcıları, hidrofobik bölgeler ve boş hacimler alınarak üretilmiştir. MAO enzimleri için bu şekilde üretilen farmakofor modelleri binlerce bileşiğin taranmasını (*in silico design*), rasyonel ilaç taramasını olağanüstü bir şekilde kolaylaştırabilmektedir.



Şekil 50: MAO-A aktif bölge farmakofore mapping: Aktif bölgede magenta renkli toplar hidrojen bağı vericilerini, yeşil toplar hidrojen bağı alıcılarını, turkuaz renkte olanlar hidrofobik bölgeleri ve gri renkli bölgeler ise boş hacimleri göstermektedir.



Şekil 56: MAO-B aktif bölge farmakofore mapping: Aktif bölgede magenta renkli toplar hidrojen bağı vericilerini, yeşil toplar hidrojen bağı alıcılarını, turkuaz renkte olanlar hidrofobik bölgeleri ve gri renkli bölgeler ise boş hacimleri göstermektedir.

5.SONUÇ

Moleküler modelleme çalışmalarından elde edilen sonuçlar ve biyokimyasal çalışmalardan elde edilen kinetik bulgular birlikte ele alındığında, bu proje için üretilen kimyasal bileşiklerin hepsinin MAO enzimiyle etkileşime girdiği, fakat izozimlere olan özgüllükleri göz önüne alındığında MAO-B'ye kıyasla MAO-A'yı daha kuvvetli bir şekilde inhibe ettikleri tespit edilmiştir.

Yapılan doking ve kuantum kimya hesaplamalarının sonuçları bunun sebebini açıkça ortaya koymaktadır. Bu inhibitörlerin hepsi MAO-A ile etkileşirken aktif bölgelerdeki FAD nin hemen önüne ve aromatik kafese yerleşmekte ve etrafındaki aminoasitlerle kuvvetli etkileşimler yapmaktadırlar.MAO-B ile etkileşimleri ise aktif bölgenin giriş bölümünde gerçekleşmektedir. MAO-B ile etkileşimleri ise aktif bölgenin giriş bölümünde gerçekleşmektedir. MAO-B nin giriş bölümündeki amino asit rezidüleri inhibitörle etkileşerek onun daha ileriye FAD' nin önüne gitmesine engel olmaktadır.MAO enziminin önerilen amin oksitleme mekanizmalarına göre enzimatik reaksiyon FAD' nin re-yüzünde tam önündeki aromatik kafesin içinde gerçekleşmektedir.Bu nedenle , bu boşluğa yerleşebilen inhibitörler enzimi daha iyi inhibe etmektedir.

Özellikle F1F, F3F, F4E ve F4F bileşikleri mao-A için potansiyel seçilimli ilaç adaylarıdır. Bu bileşiklerin bir sonraki faz denemelerinde kullanılması ümit vaatmektedir. Diğer taraftan F3M ve F4E bileşikleri de mao-B enzimi için bir sonraki fazda denenebilecek önemli ilaç adaylarıdır.

Henüz denenmemiş fakat De Novo Design in Discovery Studio yöntemi ile mevcut potansiyel ilaç adayları mao-A ve mao-B enzimleri daha da aktif ve seçimli hale getirilmişlerdir. Özellikle bazı bileşikler mao-B seçimli değilken (*Tablo-14*) inhibitörlere enzim yapısına dayalı olarak , yeni eklenen farmaforik gruplarla mao-B seçimli hale gelirken aktiviteleri de olağanüstü değişmiştir.

De Novo Design in Discovery Studio yöntemiyle mao-A için geliştirilen F1F-S (0.3356 nM), F2A-S (1.42 nM), F2F-S (0.4037 nM) , F3F-R (0.1885 nM) ve F4E-S (0.5053 nM) ; mao-B için geliştirilen F1A-R (2.28 nM) , F3F-R (13.93 pM) ve F3F-S (184.06 pM) bileşiklerinin ilerdeki projelerde bir an önce sentezlenerek, bu enzimlerle denenmesi görüşündeyiz.

Şimdiye kadar yapılan yayınlarda , bu aktivite ve seçicilikte fazla inhibitör bulunmamaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Coutts, R. T., Baker, G. B., Danielson, T. J. New Developments in Monoamine Oxidase Inhibitors. In Gorrod, J.W., Gibson, G. G., Mitchard, M. (eds) *Developments of Drugs and Modern Medicines* Chichester, Ellis Horwood Ltd., Part I. Drug Design. 40-48 (1986).
2. Powell, J. F. Amines Oxidases: Structure, Function and Expression, *Molecular Biological Studies of Monoamine Oxidase: Structure and Function*. Biochem. Soc. Trans. **19**, 199-201 (1991).
3. Olanow, C. W. MAO-B Inhibitors in Parkinson's Disease. *Adv. Neurol.* **60** (Parkinson's Disease), 666-671 (1993).
4. Sandler, M., Glover, V., Clow, A., Jarman, J. Monoamine Oxidase-B, monoamine oxidase-B inhibitors and Parkinson's disease. A role for superoxide dismutase. *Adv. Neurol.* **60** (Parkinson's Disease), 238-241 (1993).
5. Dostert, P., Strolin Benedetti, M. Structure-modulated recognition of substrates and inhibitors by monoamine oxidases A and B. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 207-211 (1991).
6. Kyburz, E. New developments in the field of monoamine oxidase inhibitors (MAOI). In Von Der Goot, H., Domany, G., Pallos, L., Timmerman, H., (eds.) *Trends in Medicinal Chemistry'88*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V. 523-543 (1989).
7. Youdim, M. B. H., Finberg, J. P. M. New Directions in Monoamine Oxidase A and B Selective Inhibitors and Substrates. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 155-162 (1991).
8. Richards, J. G., Saura, J., Ulrich, J., Da Prada, M. Molecular Neuroanatomy of Monoamine Oxidases. *Psychopharmacology* **106**, 21-23 (1992).
9. Silverman, R. B., Hoffman, S. J., Catus III, W. B. A Mechanism for Mitochondrial Monoamine Oxidase Catalyzed Amine Oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7126-7128 (1982).
10. Silverman, R. B. The use of mechanism-based inactivators to probe the mechanism of monoamine oxidase. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 201-206 (1991).
11. Yu, P. H., Davis, B. A. Stereospecific Deamination of Benzylamine Catalyzed by Different Amine Oxidases. *Int. J. Biochem.* **20**, 1197-1201 (1988).
12. Cesura, M. A., Pletscher, A. The New Generation of Monoamine Oxidase Inhibitors. *Prog. Drug. Res.* **38**, 171-297 (1992).
13. Kayaalp, O., Rasyonel tedavi Yönünden, Ankara, Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş, 10.Baskı, 906 (2002).

14. Tipton, K. F. Inhibition of monoamine oxidase by substituted hydrazines. *Biochem. J.* **128**, 913-919 (1972).
15. Mc Kenna, K. F., Baker, G. B., Coutta, R. T. N2-acetylphenelzine: effects on rat brain GABA, alanine and biogenic amines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **343**, 478-482 (1991).
16. Yamada, N., Takahashi, S., Todd, K. G., Baker, G. B., Paetsch, P. R. Effects of two substituted hydrazine monoamine oxidase (MAO) inhibitors on neurotransmitter amines, gamma-aminobutyric acid, and alanine in rat brain. *J. Pharm. Sci.* **82**, 934-937 (1993).
17. Pignatello, R., Mazzone, S., Castelli, F., Mazzone, P., Raciti, G., Mazzone, G. MAOI activity of thiosemicarbazides and related 2-thiazolyhydrazines. *Pharmazie* **49**, 272-276 (1994).
18. Raciti, G., Mazzone, P., Raudino, A., Mazzone, G., Cambria, A. Inhibition of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by hydrazine-thiazole derivatives: Structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* **3**, 1485-1491 (1995).
19. Cambria, A., Raudino, A., Geronikaki, A., Buemi, G., Raciti, G., Mazzone, P., Guccione, S., Ragusa, S. Thiazole derivatives as inhibitors of purified bovine liver mitochondrial monoamine oxidase-B: Structure-activity relationships and theoretical study. *J. Enzyme Inhib.* **14**, 307-321 (1999).
20. Chimenti, F., Maccioni, E., Secci, D., Bolasco, A., Chimenti, P., Granese, A., Befani, O., Turini, P., Alcaro, S., Ortuso, F., Cardia, M. C., Distinto, S. Selective Inhibitory Activity against MAO and Molecular Modeling Studies of 2-Thiazolyhydrazone Derivatives. *J. Med. Chem.* **50**, 707-712 (2007).
21. Belleau, B., Moran, J. The mechanism of action of the 2-phenylcyclopropylamine type of monoamine oxidase inhibitors. *J. Med. Pharm. Chem.* **5**, 215-219 (1962).
22. Wouters, J., Ooms, F., Jegham, S., Koenig, J. J., George, P., Durant, F. Reversible inhibition of type B monoamine oxidase. Theoretical study of model diazo heterocyclic compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **32**, 721-730 (1997).
23. Frederick, R., Norberg, B., Durant, F., Ooms, F., Wouters, J. Three 5H-indeno[1,2-c]pyridazin-5-one derivatives, potent type-B monoamine oxidase **C60(9)**, o623-o626 (2004).
24. Ooms, F., Frederick, R., Durant, F., Petzer, J. P., Castagnoli, N., Van der Schyf, C. J., Wouters, J. Rational approaches towards reversible inhibition of type B monoamine oxidase. Design and evaluation of a novel 5H-Indeno[1,2-c]pyridazin-5-one derivative. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13(1)**, 69-73 (2003).
25. Kneubuehler, S., Thull, U., Altomare, C., Carta, V., Gaillard, P., Carrupt, P. A.,

Carotti, A., Testa, B. Inhibition of Monoamine Oxidase-B by SH-IndenoE 1,2=clpyridazines: Biological Activities, Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs) and 3D-QSARS. *J. Med. Chem.* **38(19)**, 3874-3883 (1995).

26. Kneubuehler, S., Carta, V., Altomare, C., Carotti, A., Testa, B. Synthesis and monoamine oxidase inhibitory activity of 3-substituted 5H-indeno[1,2-c]pyridazines. *Helvetica Chimica Acta* **76(5)**, 1956-1963 (1993).

27. Korolkovas, A., *Essentials of Medicinal Chemistry*, John Wiley Sons, Second Edition, NewYork 1988.

28. Bilgin, A.A., Yeşilada, A., Palaska, E., Sunal, R. Synthesis and Antidepressant Activity of Some New 8-Thiocarbamoyl-7,8-diazabicyclo[4.3.0]non-6-ene Derivatives, *Arzneim.-Forsch./Drug Re.* **42(II)**, 1271-1273 (1992).

29. Yesilada, A., Gökhan, N., Özer, Y., Vural, K., Erol, K. 5-Methyl-8-N-Substituted Thiocarbamoyl-7,8-Diazabicyclo[4.3.0]non-6-enes: Evaluation as BSAO Inhibitors and Pharmacological Activity Screening. *Il Farmaco* **51(12)**, 775–781 (1996).

30. Gökhan, N., Yeşilada, A., Uçar, G., Erol, K., Bilgin, A. A. 1-N-Substituted Thiocarbamoyl-3-phenyl-5-thienyl-2-pyrazolines: Synthesis and Evaluation as MAO Inhibitors. *Arc. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **336**, 362-371 (2003).

31. Manna, F., Chimenti, F., Bolasco, A., Secci, D., Bizzarri, B., Befani, O., Turini, P., Mondovi, B., Alcaro, S., Tafi, A. Inhibition of Amine Oxidases Activity by 1-Acetyl-3,5-diphenyl-4,5-dihydro-(1H)-pyrazole Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 3629-3633 (2002).

32. Palaska, E., Aytemir, M., Uzbay, İ. T., Erol, D. Synthesis and antidepressant activities of some 3,5-diphenyl-2-pyrazolines. *Eur. J. Med. Chem.* **36**, 539-543 (2001).

33. Uçar, G., Gökhan, N., Yeşilada, A., Yabanoğlu, S., Bilgin, A.A. Interaction of Some 1-N-Substituted thiocarbamoyl-3-phenyl-5-thienyl-2-pyrazolines with Rat Liver Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase (SSAO). Hacettepe University, Journal of Faculty of Pharmacy **25(1)**, 23-34, (2005).

34. Chimenti, F., Maccioni, E., Seci, D., Bolasco, A., et al., Synthesis, Molecular Modeling Studies, and Selective Inhibitory Activity against Monoamine Oxidase of 1-Thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-(1H)- pyrazole Derivatives *J. Med. Chem*, **48**, 7113-7122, 2005.

35. Prasad, Y. R., Rao, A. L., Prasoona, L., Murali, K., Kumar, P. R. Synthesis and antidepressant activity of some 1,3,5-triphenyl-2-pyrazolines and 3-(2"-hydroxynaphthalen-1"-yl)-1,5-diphenyl-2-pyrazolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 5030-5034 (2005).

36. Chimenti, F., Bolasco, A., Manna, F., Secci, D., Chimenti, P., Granese, A., Befani, O., Turini, P., Alcaro, S., Ortuso, F. Synthesis and Molecular Modelling of

Novel Substituted-4,5-dihydro-(1H)-pyrazole Derivatives as Potent and Highly Selective Monoamine Oxidase-A Inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* **67**, 206-214 (2006).

37. Chimenti, F., Bolasco, A., Manna, F., Secci, D., Chimenti, P., Granese, A., Befani, O., Turini, P., Cirilli R., La Torre, F., Alcaro, S., Ortuso, F., Langer, T. Synthesis, biological Evaluation and 3D-QSAR of 1,3,5-trisubstituted-4,5-dihydro-(1H)-pyrazole Derivatives as Potent and Highly Selective Monoamine Oxidase A Inibitors. *Curr. Med. Chem.* **13**, 1411-1428 (2006).

38. Gökhan-Kelekçi, N., Yabanoğlu, S., Küpeli, E., Salgın, U., Özgen, Ö., Uçar, G., Yeşilada, E., Kend, E., Yeşilada, A., Bilgin, A.A. A New Therapeutic Approach in Alzheimer Disease: Some Novel Pyrazole Derivatives as a Dual MAO-B Inhibitors and Antiinflammatory Analgesics. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 5775-5786 (2007).

39. Parmar, S.S., Pandey, B.R., Dwivedi, C., Harbison, R.D., Anticonvulsant Activity and Monoaminoxidase Inhibitory Properties of 1,3,5-Trisubstituted Pyrazolines. *J.Pharm.Sci.*, **63**, 1152-1155 (1974).

40. Soni, N., Pande, K., Kalsi, R., Gupta, T.K., Parmar, S.S., Bartwal, J.P., Inhibition of Rat Brain Monoamine Oxidase and Succinic Dehydrogenase by Anticonvulsant Pyrazolines, *Res.Comm.Chem.Pathol.Pharmacol.*, **56(1)**, 129-132 (1987).

41. Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubálek, F., Edmondson, D. E., Mattevi, A. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 22-26 (2002).

42. De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D. E., Mattevi, A. Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12684-12689 (2005).

43. Dawey W, Tivey DJ. *J.Chem. Soc.* 1958, (1320).

44. Mehra H.S. *J. Indian Chem Soc.* 1968, 45, (178).

45. Holt, A., Sharman, D.F., Baker, G.B., Pelcic, M.M. Continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Anal Biochem*, **244**, 384-392 (1997).

46. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 108T232
Proje Başlığı: Monoamin Oksidaz (MAO) İnhibitör Etkili Yeni Pirazolin Türevlerinin Moleküler Modelleme Yöntemiyle Tasarlanması, Sentezi ve İnhibisyon Kinetiklerinin Hesapsal ve Deneysel Olarak Tayini
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Kemal Yelekçi (Proje yürütücüsü) Prof. Dr. Gülberk Uçar; Prof. Nesrin Gökhan Kelekçi; Prof. Dr. Safiye Erdem Dr. Ayşe Erdem; Umut Salgın Gökşen; Seyhan Türkkkan
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Kadir Has Üniversitesi Cibali Merkez Kampüsü, 34080 Fatih, İSTANBUL
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/08/2008 - 01/08/2010
<p>Öz (en çok 70 kelime) İlaç geliştirilmesi konusundaki geleneksel yaklaşımların genellikle basamaklı sentez prosedürlerine dayanmaları ve aktivite profillerinin optimizasyonu için çok sayıda bileşiğin sentezinin gerekmesi çok masraflı ve zaman alıcı olması nedeniyle araştırmacılar son yıllarda aktivite profillerinin çıkarılmasında bilgisayar tabanlı moleküler modelleme teknikleri kullanmaya başlamışlardır.</p> <p>Bu çalışmada bu yöntemlerden yararlanılarak biyojenik aminlerin oksidatif deaminasyonunda önemli rol oynayan monoamin oksidaz (MAO); MAO-A ve MAO-B olarak isimlendirilen farklı iki izoformdaki enzimle çalışılmıştır. Bu izoformları inhibe eden bileşiklerin duygusal bozukluklar (Örneğin major depresyon) ve nörodejeneratif hastalıklar (Örneğin Parkinson ve Alzheimer Hastalıkları) gibi birçok hastalıkta tedavi edici değeri olduğu bilinmektedir. Bu projede bileşikler önce modellenerek sonra sentez edilmişlerdir. Deneysel olarak elde edilen veriler hesapsal olarak elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır. Elde edilen bu çok önemli veriler MAO enzimlerine seçimli ve potansiyel inhibitörler geliştirme çalışmalarına yol gösterici sonuçlar sağlamıştır.</p>
Anahtar Kelimeler: Monoamin oksidaz (MAO), inhibisyon, pirazolin türevleri, moleküler modelleme, kinetik
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: