



Araştırma

2022; 31(3): 330-335

ALZHEİMER HASTALIĞINA KARŞI YENİ PİPERAZİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
SYNTHESIS AND EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF NEW PIPERAZINE DERIVATIVES
AGAINST ALZHEIMER'S DISEASE

Derya OSMANİYE^{1,2*}, Zafer Asım KAPLANCIKLİ¹

¹Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya ABD, Eskişehir, Türkiye

²Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Doping ve Narkotik Bileşikler Analiz Laboratuvarı, Eskişehir, Türkiye

ÖZ

Alzheimer hastalığı dünyada en sık görülen nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Dünya nüfusunun yaş ortalamasının artması ile artan hasta sayısı, radikal bir tedavinin mevcut olmaması yeni bileşiklerin geliştirilmesine ihtiyaç oluşturmaktadır. Hastalığa karşı kolinesteraz inhibitörleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bilinen iki kolinesteraz, asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE)'dir. AH'dan etkilenen beyinlerde, normal koşullar altında ACh hidrolizinden sorumlu ana enzim olan AChE miktarı azalırken, BChE konsantrasyonu korunur, hatta yükselebilmektedir. Bu çalışma kapsamında 8 yeni bileşikten oluşan 6-(2-(4-sübstütipiperazin-1-il) asetil)-2H-benzo[b][1,4] oksazin-3(4H)-on (1a-1h) serisi sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS spektroskopisi verileri kullanılarak aydınlatılmıştır. Bileşiklerin *in vitro* kolinesteraz (ChE) inhibitör aktivitesi Ellman metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. Sentezlenen bileşikler içerisinde 1b ve 1e kodlu bileşikler asetilkolinesteraza (AChE) karşı önemli düzeyde inhibitör etkinlik göstermiştir. Sentezlenen bileşiklerin asetilkolinesteraz inhibitör potansiyelleri incelendiğinde umut verici sonuçlara ulaşıldığı görülmektedir. Ayrıca aktif türevler ile gerçekleştirilen *in silico* moleküler doklama çalışmaları ile aktif bileşiklerin enzim aktif bölgesine oturduğu ve bu bölgedeki aminoasitler ile etkileştiği görülmektedir. Elde edilen bileşikler üzerinde yapılan modifikasyonlar ile daha etkili yeni bileşiklere ulaşılması planlanmaktadır.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is one of the most common neurodegenerative diseases in the world. The increasing number of patients with the aging of the world population and the absence of a radical treatment create a need for the development of new compounds. Cholinesterase inhibitors are frequently used against the disease. The two known cholinesterase's are acetyl cholinesterase (AChE) and butyryl cholinesterase (BChE). In AD-affected brains, the amount of AChE, the main enzyme responsible for ACh hydrolysis, is reduced under normal conditions, while the concentration of BChE is maintained or even increased. The 6-(2-(4-substitutedpiperazin-1-yl) acetyl)-2H-benzo[b][1,4] oxazin-3(4H)-one (1a-1h) series consisting of 8 new compounds was synthesized. The structures of the obtained compounds were elucidated using ¹H-NMR, ¹³C-NMR and HRMS spectroscopy data. The *in vitro* cholinesterase (ChE) inhibitory activity of the compounds was evaluated using the Ellman's method. Among the synthesized compounds, the compounds 1b and 1e showed significant inhibitory activity against acetyl cholinesterase (AChE). When the acetyl cholinesterase inhibitory potentials of the synthesized compounds are examined, it is seen that promising results have been achieved. Additionally, *in silico* molecular docking studies with active derivatives show that active compounds have settled in the enzyme active site and interact with amino acids in this region. It is planned to reach more effective new compounds with the modifications made on the obtained compounds.

Anahtar kelimeler: Alzheimer; Asetilkolin; Piperazin

Keywords: Acetylcholine; Alzheimer; Piperazine

Makale Geliş Tarihi : 05.08.2021
Makale Kabul Tarihi: 29.04.2022

Corresponding Author: Derya OSMANİYE, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya ABD, 26470, Eskişehir, Türkiye, dosmaniye@anadolu.edu.tr; ORCID: 0000-0002-0499-436X

Telefon: (0222)3350580-3778

Prof.Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLİ; zakaplan@anadolu.edu.tr; 0000-0003-2252-0923

GİRİŞ

Dünya nüfusunun yaş ortalamasının artmasıyla beraber, günümüzde 50 milyondan fazla insan demansla yaşamaktadır ve daha korkutucu tablo ise bu sayının 2050 yılına kadar 152 milyona çıkmasının beklenmesidir. Demans, toplum üzerinde büyük sosyal, tıbbi ve ekonomik yükler oluşturmaktadır. Demansın önde gelen nedenlerinden biri ise, bilişsel bir bozukluk olan Alzheimer hastalığıdır (AH) (1). AH, sinisi başlangıçlı ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır ve şu anda hastalığın ilerlemesini durduran ya da tersine çeviren bir ilaç yoktur. AH'nın etiyojisi karmaşıktır ve oluşumu birden çok faktörün etkileşiminin sonucudur. Bu nedenle, çok hedefli ligandlara (MTDL'ler) sahip anti-AH ilaçları geliştirmek, AH'nın karmaşıklığını çözmek için bir yol olabilir (2). AH'nın da en önemli risk faktörü yaşlanmadır, bu nedenle dünya genelinde yaşam süresindeki artış prevalansını artırmaktadır. Ancak "tanıdık vakalar" olarak bilinen hastalığın ortaya çıkışını hızlandıran genetik varyasyonlar da vardır (3). Erken evrelerde, AH'den muzdarip insanlar, kısa süreli hafıza kaybı olarak da adlandırılan son olayları hatırlamakta zorluk çekerler. İlerleyen evrelerde dil yoluyla iletişimde sorunlar, yönelim bozukluğu, motivasyon kaybı, öz bakımında ihmal, uyku bozuklukları ve davranış sorunları gibi başka belirtiler ortaya çıkar ve giderek şiddetlenir. İlerleyen dönemde hastalar, aileyi tanımayabilir ve merkezi sinir sisteminde meydana gelen çeşitli hasarlar nedeniyle yavaş yavaş beyin fonksiyonları kaybolur ve ölümler sonuclanır. Bu semptomların bazıları, merkezi ve periferik sinir sistemi ile ilgili çeşitli davranış değişikliklerine yol açan kolinerjik iletimin dejenerasyonundan kaynaklanır (4).

En yaygın olarak kabul edilen hipotez, AH'nın nedeninin, nöronal ve nöro-kas bölgelerinde yeterli nörotransmitter, asetilkolin (ACh) olmaması olduğunu belirtir. Hastaların beyin dokusundan alınan biyopsi raporu, asetilkolin transferaz aktivitesinde azalma, ACh sentezinde, alımında ve salınımında azalma göstermiştir. Beyindeki yetersiz ACh, ya sentezin azalmasından ya da asetilkolinesterazın (AChE) ACh üzerindeki enzimatik aktivitesinden kaynaklanmaktadır (5). Alzheimer hastalarında, ACh konsantrasyonu sağlıklı bireylere kıyasla çok daha düşüktür (6).

~45 Å × 60 Å × 65 Å boyutuna sahip olan AChE enzimi, elips şeklindedir ve 14 α-helikis ile çevrili 12 iplikli merkezi karışık β-tabakasına sahip bir α/β protein polimeridir. Diğer serin proteazların katalitik bölgesine benzer şekilde, AChE'nin katalitik alanı da AChE'de ki asidik kalıntının olağan aspartat yerine glutamat olması dışında bir serin-histidin-glutamat üçlüsünden oluşmaktadır (7-9). İnsan AChE kristal yapısı, katalitik aktif bölgenin aromatik kalıntılarla kaplı olduğunu ve katalitik üçlü olmak üzere iki alt bölgeye ayrılabilceğini belirtilmektedir (esteratik alt bölge ve anyonik alt bölge). Esteratik alt bölge glutamik asit, serin, histidinden; anyonik alt bölge isetriptofandan oluşur. Katalitik üçlü, nörotransmitter asetilkolinin hidrolizinden sorumludur, kolin kısmının kuaterner nitrojeni, CAS'ın anyonik alt bölgesinin triptofan ile etkileşime girer. Glisin ve alanin kalıntılarının oluşturduğu "oksianyon deliği" ACh'nin karbonil oksijeni ile etkileşime girer. Triptofan, tirozin ve fenilalanin'den oluşan periferik aktif bölge (PAS), uyuğun kolin esterlerinin AChE'nin katalitik alanına giri-

şini kolaylaştırır (10, 11).

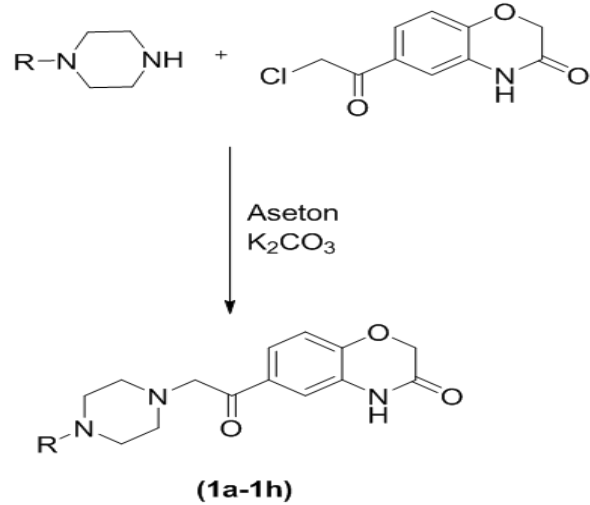
AChE inhibitörü olarak çok az sayıda bileşik kullanılmaktadır. Ve bu bileşikler hastalığın radikal tedavisinden ziyade hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaktadır. Dolayısıyla bu alanda yeni bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla bu çalışma kapsamında 8 adet yeni piperazin türevi bileşik sentezlenmiştir. Elde edilen ürünlerin karakterizasyonları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS spektral verileri kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen türevlerin aktiviteleri AChE ve BChE enzimlerine karşı *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Aktif türevlerin *in siliko* çalışmaları PDB:4EY7 kristali kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Sentez Çalışmaları

Çalışmadaki bileşiklerin sentezi Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Araştırma Laboratuvarında, Bileşiklerin analizi ve aktivitesi ise Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Doping ve Narkotik Maddeler Analiz Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında sentezi gerçekleştirilen 8 adet yeni bileşiğin kimyasal yapıları ¹H-NMR (Hidrojen Nükleer Magnetik Rezonans), ¹³C-NMR (Karbon Nükleer Magnetik Rezonans) ve HRMS (Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektroskopisi) spektroskopik verileri yardımıyla aydınlatılmıştır. Yarılma kısaltmaları şu şekildedir: s: singlet; d:dublet; dd: dubletin dubleti; t:triplet; q:kuartet; m:multipl; y:yayvan).

Şema I. 1a-1h kodlu bileşiklerin sentez şeması



Bileşik	R
1a	Etil
1b	2-Metoksietil
1c	Allil
1d	İzopropil
1e	Propinil
1f	Formil
1g	Sikloheksil
1h	4-Metoksifenil

6-(2-(4-Sübstitüepiperazin-1-il)asetil)-2H-benzo[b][1,4]oksazin-3(4H)-on (1a-1h)

6-(2-Kloroasetil)-2H-benzo[b][1,4] oksazin-3(4H)-on (0.50 g 0.002 mol), 50 mL aseton içerisinde çözülmüştür. Piperazin türevleri (0.002 mol) ortama ilave edilmiş ve potasyum karbonat katalizörlüğünde 20 saat boyunca oda ısısında karıştırılmıştır. Reaksiyon bitimine İTK ile karar verildikten sonra, aseton rotavapor aracılığı ile uçurulmuştur. Ham ürün su ile yıkanarak, süzülmesi, kurutulmuş ve etanolden kristallendirilmiştir.

6-(2-(4-Etilpiperazin-1-il)asetil)-2H-benzo[b][1,4]oksazin-3(4H)-on (1a)

Verim: 79 %. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.97 (3H, t, *J*=7.2 Hz, -CH₃), 2.30 (2H, q, *J*=7.2 Hz, -CH₂-), 2.37 (4H, y, piperazin), 2.48-2.51 (4H, m, piperazin), 3.68 (2H, s, -CH₂-), 4.67 (2H, s, -CH₂-), 7.02 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.54 (1H, d, *J*=2.0 Hz), 7.65 (1H, dd, *J*₁=2.1 Hz, *J*₂=8.4 Hz), 10.87 (1H, s, -NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.41, 52.04, 52.70, 53.20, 64.40, 67.19, 116.03, 116.32, 124.89, 127.57, 130.74, 147.69, 164.64, 195.67. HRMS (m/z): [M+H]⁺hesaplanan C₁₆H₂₁N₃O₃: 304.1656; bulunan: 304.1640.

6-(2-(4-(2-Metoksietil) piperazin-1-il)asetil)-2H-benzo[b][1,4] oksazin-3(4H)-on (1b)

Verim: 81 %. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.41-2.45 (10H, m, piperazin+-CH₂-), 3.21 (3H, s, -OCH₃), 3.40 (2H, t, *J*=5.9 Hz, -CH₂-), 3.67 (2H, s, -CH₂-), 4.67 (2H, s, -CH₂-), 7.02 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.54 (1H, d, *J*=2.0 Hz), 7.65 (1H, dd, *J*₁=2.1 Hz, *J*₂=8.4 Hz), 10.88 (1H, s, -NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 53.25, 53.52, 57.50, 58.43, 64.41, 67.19, 70.35, 116.05, 116.31, 124.87, 127.57, 130.74, 147.68, 164.62, 195.66. HRMS (m/z): [M+H]⁺hesaplanan C₁₇H₂₃N₃O₄: 334.1761; bulunan: 334.1754.

6-(2-(4-Allilpiperazin-1-il)asetil)-2H-benzo[b][1,4] oksazin-3(4H)-on (1c)

Verim: 77 %. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.36 (4H, y, piperazin), 2.48 (4H, y, piperazin), 2.92 (2H, d, *J*=6.3 Hz, Allil), 3.68 (2H, s, -CH₂-), 4.67 (2H, s, -CH₂-), 5.08-5.19 (2H, m, Allil), 5.74-5.80 (1H, m, Allil), 7.02 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.54 (1H, d, *J*=2.0 Hz), 7.65 (1H, dd, *J*₁=2.1 Hz, *J*₂=8.4 Hz), 10.87 (1H, s, -NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 52.95, 53.22, 61.32, 64.40, 67.19, 116.04, 116.31, 117.85, 124.87, 127.57, 130.74, 136.05, 147.69, 164.63, 195.67. HRMS (m/z): [M+H]⁺hesaplanan C₁₇H₂₁N₃O₃: 316.1656; bulunan: 316.1647.

6-(2-(4-İzopropilpiperazin-1-il)asetil)-2H-benzo[b][1,4] oksazin-3(4H)-on (1d)

Verim: 83 %. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.94 (6H, d, *J*=6.5 Hz, -CH₃), 2.43 (8H, y, piperazin), 2.53-2.62 (1H, m, -CH-), 3.65 (2H, s, -CH₂-), 4.67 (2H, s, -CH₂-), 7.01 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.54 (1H, d, *J*=2.0 Hz), 7.65 (1H, dd, *J*₁=2.1 Hz, *J*₂=8.4 Hz). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 18.71, 48.38, 53.74, 54.04, 64.55, 67.19, 116.15, 116.27, 124.82, 127.74, 130.75, 147.70, 164.66, 195.70. HRMS (m/z): [M+H]⁺hesaplanan C₁₇H₂₃N₃O₃: 318.1812; bulunan: 318.1798.

6-(2-(4-(Prop-2-in-1-il) piperazin-1-il)asetil)-2H-benzo[b][1,4] oksazin-3(4H)-on (1e)

Verim: 76 %. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.47-

2.50 (8H, m, piperazin), 3.13-3.15 (1H, m, -CH-), 3.24 (2H, d, *J*=2.4 Hz, -CH₂-), 3.71 (2H, s, -CH₂-), 4.68 (2H, s, -CH₂-), 7.02 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.53 (1H, d, *J*=2.0 Hz), 7.65 (1H, dd, *J*₁=2.1 Hz, *J*₂=8.4 Hz), 10.88 (1H, s, -NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 46.43, 51.47, 53.03, 64.19, 67.19, 76.15, 79.85, 116.02, 116.33, 124.87, 127.59, 130.66, 147.72, 164.62, 195.53. HRMS (m/z): [M+H]⁺ hesaplanan C₁₇H₁₉N₃O₃: 314.1499; bulunan: 314.1506.

4-(2-Okso-2-(3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4] oksazin-6-il)etil) piperazin-1-karbaldehid (1f)

Verim: 88 %. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.44-2.47 (2H, m, piperazin), 2.50-2.50 (2H, m, piperazin), 3.35-3.41 (4H, m, piperazin), 3.80 (2H, s, -CH₂-), 4.68 (2H, s, -CH₂-), 7.03 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.55 (1H, d, *J*=2.0 Hz), 7.64 (1H, dd, *J*₁=2.1 Hz, *J*₂=8.4 Hz), 7.99 (1H, s, -CHO), 10.88 (1H, s, -NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 45.21, 52.39, 53.56, 63.79, 67.19, 115.96, 116.36, 124.78, 127.62, 130.63, 147.74, 161.18, 164.61, 195.43. HRMS (m/z): [M+H]⁺hesaplanan C₁₅H₁₇N₃O₄: 304.1292; bulunan: 304.1278.

6-(2-(4-Sikloheksilpiperazin-1-il)asetil)-2H-benzo[b][1,4] oksazin-3(4H)-on (1g)

Verim: 81 %. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.12-1.17 (5H, m, sikloheksil), 1.53-1.57 (1H, m, sikloheksil), 1.69-1.73 (4H, m, sikloheksil), 2.14-2.16 (1H, m, sikloheksil), 2.46 (8H, y, piperazin), 3.65 (2H, s, -CH₂-), 4.64 (2H, s, -CH₂-), 6.99 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.53 (1H, d, *J*=2.0 Hz), 7.62 (1H, dd, *J*₁=2.1 Hz, *J*₂=8.4 Hz). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.74, 26.39, 28.85, 48.78, 53.91, 62.97, 64.53, 67.17, 116.16, 116.40, 124.54, 128.33, 130.75, 147.79, 164.80, 195.72. HRMS (m/z): [M+H]⁺hesaplanan C₂₀H₂₇N₃O₃: 358.2125; bulunan: 358.2114.

6-(2-(4-(4-Metoksifenil) piperazin-1-il)asetil)-2H-benzo[b][1,4] oksazin-3(4H)-on (1h)

Verim: 85 %. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.61-2.64 (4H, m, piperazin), 2.99-3.03 (4H, m, piperazin), 3.67 (3H, s, -OCH₃), 3.77 (2H, s, -CH₂-), 4.65 (2H, s, -CH₂-), 6.80 (2H, d, *J*=9.2 Hz, 1,4-Disübstitüebenzen), 6.88 (2H, d, *J*=9.2 Hz, 1,4-Disübstitüebenzen), 7.01 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.59 (1H, d, *J*=2.0 Hz), 7.65 (1H, dd, *J*₁=2.1 Hz, *J*₂=8.4 Hz). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 50.05, 53.28, 55.65, 64.20, 67.18, 114.69, 116.21, 116.42, 117.85, 124.52, 128.33, 130.74, 145.89, 147.83, 153.35, 164.79, 195.64. HRMS (m/z): [M+H]⁺hesaplanan C₂₁H₂₃N₃O₄: 382.1761; bulunan: 382.1744.

İTK Çalışmaları ve R_f Değerlerinin Saptanması

Deneysel prosedürde reaksiyonların takibi İTK ile yapılmıştır, Mobil faz olarak petrol eteri: etil asetat (3:1) sistemi kullanılmıştır. Lekelerin saptanmasında, ultraviyole ışığı (254 nm ve 366 nm) kullanılmıştır.

Spektral Analiz

Bu çalışma kapsamında sentezi gerçekleştirilen 8 adet yeni piperazin türevi bileşiğin kimyasal yapıları NMR spektrumları Bruker 300 MHz and 75 MHz dijital FT-NMR spektrometer (Bruker Bioscience, Billerica, MA, USA) cihazı kullanılarak alınmıştır. Numuneler dötero dimetilsülfoksit içerisinde hazırlanmıştır. HRMS sonuçları ise LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto, Japonya) cihazı kullanılarak kaydedilmiştir. Numuneler metanol içeri-

sinde hazırlanmıştır.

Antikolinesteraz Aktivite Çalışmaları

Tüm bileşikler, ChE enzimlerini inhibe etme güçlerini değerlendirmek için daha önce ekibimiz tarafından rapor edilmiş modifiye Elman's methoduna tabi tutulmuştur (12-14).

Moleküler Modelleme Çalışmaları

Bu çalışma kapsamında sentezi gerçekleştirilen bileşikler arasında en yüksek AChE inhibitör potansiyele sahip olan bileşik 1b ve 1e'nin AChE enzim aktif bölgesindeki bağlanma ve etkileşim noktalarını belirlemek amacıyla yapı temelli *in silico* moleküler doklama metodu uygulanmış ve AChE kristal yapısı (PDB Kodu:4EY7) (15) üzerinde protein-ligand etkileşim analizi gerçekleştirilmiştir. Moleküler doklama prosedürü Schrödinger programında yer alan ara yüzler ile tamamlanmıştır (16-19).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Sentez çalışmaları

Bu çalışma kapsamında elde edilen bileşiklerin sentez şeması Şema-1'de sunulmuştur. Sentezi gerçekleştirilen 8 adet yeni 6-(2-(4-Süstitüepiperazin-1-il)asetil)-2H-benzo[b] [1,4] oksazin-3(4H)-on türevi bileşiğin yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS spektroskopik verileri yardımıyla aydınlatılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapısında ortak olarak bulunan 2H-benzo[b] [1,4] oksazin-3(4H)-on halkasına ait protonlar 6.99-7.03 ppm arasında $J=8.4$ değeri ile dublet olarak, 7.53-7.59 ppm arasında $J=2.0$ Hz değeri ile dublet olarak ve 7.62-7.65 ppm arasında $J_1=2.1$ Hz, $J_2=8.4$ Hz değeri ile dubletin

dubleti olarak gözlenmiştir. Halka içinde bulunan -NH yapısı 10.87-10.88 ppm aralığında singlet olarak gözlenmiştir. Piperazin türevlerinin bağlı olduğu metilen grubu protonları 3.65-3.80 ppm arasında singlet olarak kaydedilmiştir. 2H-benzo[b] [1,4] oksazin-3(4H)-on halkasına ait metilen grubu protonları ise 4.64-4.68 ppm aralığında singlet olarak gözlenmiştir.

¹³C-NMR spektrumları incelendiğinde 2H-benzo[b] [1,4] oksazin-3(4H)-on halkasında bulunan karbonil grubunun 164.61-164.80 ppm arasında, diğer karbonil grubunun ise 195.43-195.72 ppm arasında geldiği gözlenmiştir.

Antikolinesteraz Aktivite Çalışmaları

Daha önce grubumuz tarafından çalışılan modifiye Ellman metoduna göre *in vitro* AChE ve BChE aktiviteleri incelenmiştir (12-14). Elde edilen % inhibisyon değerleri Tablo I'de sunulmuştur.

Galantamin BChE enzimi üzerinde 10^{-3} M konsantrasyonda 98.26% ve 10^{-4} M konsantrasyonda 95.47% ile etkinlik göstermiştir. Elde edilen bileşikler (1a-1h) ise BChE enzimi üzerinde her iki konsantrasyon (10^{-3} M ve 10^{-4} M) değerinde %50 üzerinde aktivite gösterebilen bileşik gözlenmemiştir. Fakat AChE enzimi üzerinde bu konsantrasyonlarda umut verici bileşiklere rastlanmıştır. 1b ve 1e kodlu bileşikler her iki konsantrasyonda da %50'nin üzerinde inhibitör etkinlik göstermişlerdir. Bu konsantrasyonlarda donepezil sırası ile 99.25% ve 97.43% değerleri ile etkinlik göstermektedir. Elde edilen bileşikler 1b ve 1e ise 10^{-3} M konsantrasyonda sırası ile 86,20% ve 81.12% değerleri ile etkinlik gösterirken;

Tablo I.1a-1h Kodlu Bileşiklere ait %AChE ve % BChE İnhibisyon Değerleri*

Bileşik	AChE % İnhibisyonu		BChE % İnhibisyonu	
	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-3} M	10^{-4} M
1a	45.20 ± 0.26	29.28 ± 0.22	38.76 ± 0.49	27.32 ± 0.19
1b	86.20 ± 0.55	69.28 ± 0.25	45.40 ± 0.44	30.14 ± 0.29
1c	52.10 ± 0.49	39.13 ± 0.33	36.14 ± 0.28	21.65 ± 0.66
1d	49.25 ± 0.38	28.23 ± 0.61	39.99 ± 0.25	31.79 ± 0.61
1e	81.12 ± 0.61	62.98 ± 0.43	41.85 ± 0.26	37.86 ± 0.20
1f	50.89 ± 0.88	45.25 ± 0.64	39.12 ± 0.41	21.23 ± 0.19
1g	47.16 ± 0.77	37.15 ± 0.71	35.46 ± 0.28	19.79 ± 0.11
1h	36.25 ± 0.22	32.98 ± 0.45	29.17 ± 0.22	15.58 ± 0.11
Donepezil	99.25±2.10	97.43±1.89	-	-
Galantamin	-	-	98.26±1.90	95.47±1.35

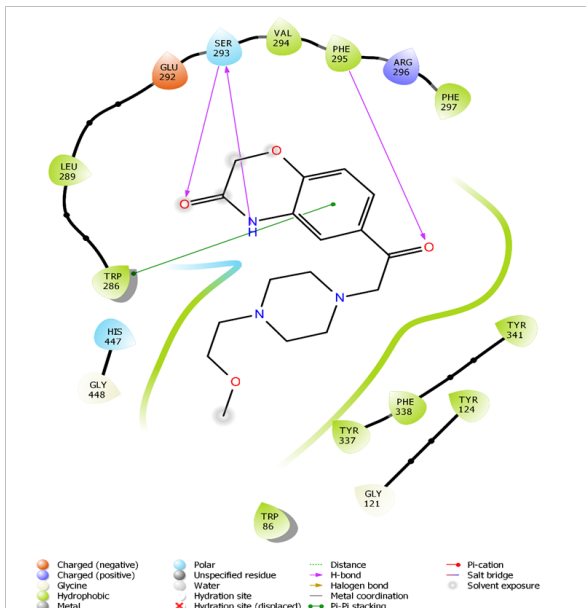
*Deney prosedürü 4 tekrar olacak şekilde çalışılmıştır. Standart sapma (\pm) bu 4 tekrar arasındaki farkı belirtmektedir.

10^{-4} M konsantrasyonda ise 69.28% ve 62.98% değerleri ile etkinlik göstermişlerdir. Ayrıca bu bileşiklerin asetilkolinesteraz enzimine karşı seçicilik göstermeleri dikkat çekmektedir. Bileşikler sırasıyla 2-metoksietil ve propinil sübstitüentleri taşımaktadır. Bu bilgiler ışığında bu iki sübstitüentin aktiviteye pozitif yönde bir katkı sağladığı düşünülmektedir. Bu katkının hangi şekilde gerçekleştiğini belirlemek amacıyla *in siliko* moleküler doklama çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Moleküler Modelleme Çalışmaları

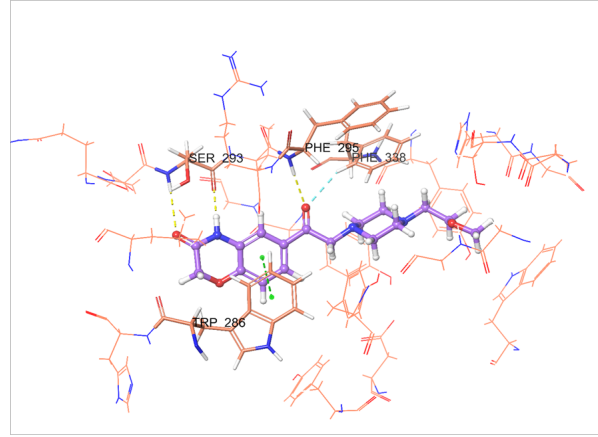
Sentezlenen bileşiklerden aktivite potansiyeli en yüksek olan bileşik 1b ve 1e'nin AChE enzim aktif bölgesi ile olası etkileşimlerini belirlemek için AChE enzimine ait (PDB Kodu:4EY7) (15) kristal yapısı ile moleküler doklama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Glide 7.1 (19) programı ile gerçekleştirilen moleküler doklama tekniği uygulanmış ve Glide Score SP ile en olası pozlar üretilmiştir.

1b bileşiğinin AChE enzimi ile olan moleküler doklama çalışması sonucunda elde edilen iki (Şekil I) ve üç boyutlu (Şekil II) görüntüleri incelendiğinde bu bileşiğin enzim aktif bölgesine uygun bir şekilde bağlandığı görülmektedir. Yapıdaki 2H-benzo[b] [1,4] oksazin-3(4H)-on amin ve karbonil grubu sırasıyla Ser293 aminoasidinin karbonil ve amino grubu ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. Bu halkada bulunan fenil grubu ise Trp286 aminoasidinin indol halkası ile π - π etkileşimi kurmaktadır. Yapıdaki diğer karbonil grubu ise Phe295 aminoasidinin amin grubu ile hidrojen bağı oluştururken, Phe338 aminoasidinin fenil halkası ile de aromatik hidrojen bağı oluşturmaktadır.



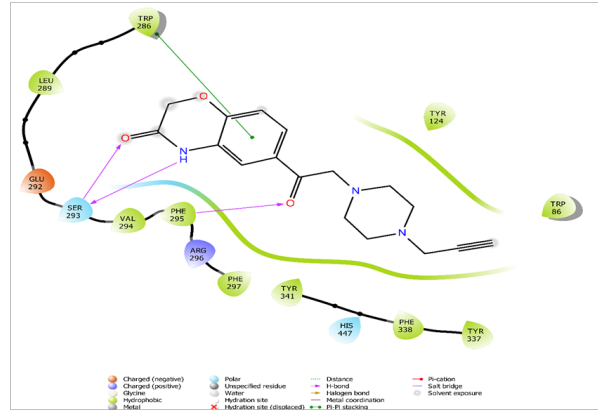
Şekil I. Bileşik 1b'nin AchE Enzim Aktif Bölgesi ile Etkileşiminin İki Boyutlu Görünümü

1e bileşiğinin AChE enzimi ile olan moleküler doklama çalışması sonucunda elde edilen iki (Şekil III) ve üç boyutlu (Şekil IV) görüntüleri incelendiğinde bu bileşiğin enzim aktif bölgesine uygun bir şekilde bağlandığı görülmektedir. Yapıdaki 2H-benzo[b] [1,4] oksazin-3(4H)-on amin ve karbonil grubu sırasıyla Ser293 aminoasidinin karbonil ve amino grubu ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. Bu halkada bulunan fenil grubu ise Trp286

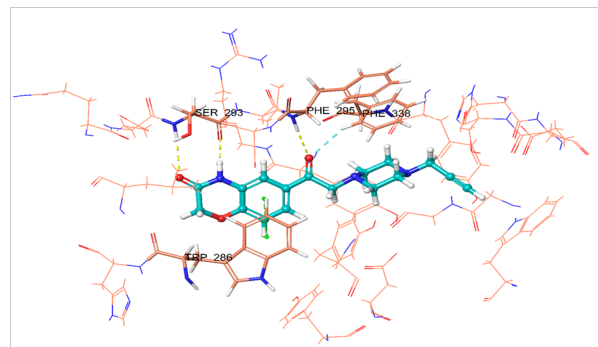


Şekil II. Bileşik 1b'nin AchE Enzim Aktif Bölgesi ile Etkileşiminin Üç Boyutlu Görünümü
(Ser: Serin; Trp:Triptofan; Phe:Fenil alanin)

aminoasidinin indol halkası ile π - π etkileşimi kurmaktadır. Yapıdaki diğer karbonil grubu ise Phe295 aminoasidinin amin grubu ile hidrojen bağı oluştururken, Phe338 aminoasidinin fenil halkası ile de aromatik hidrojen bağı oluşturmaktadır.



Şekil III. Bileşik 1e'nin AchE Enzim Aktif Bölgesi ile Etkileşiminin İki Boyutlu Görünümü



Şekil IV. Bileşik 1e'nin AchE Enzim Aktif Bölgesi ile Etkileşiminin Üç Boyutlu Görünümü

SONUÇ

Özetle bu çalışma kapsamında yeni piperazin türevi bileşikler sentezlenmiş, bileşiklerin yapı tayinler $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve HRMS spektroskopik analizleri yapılarak aydınlatılmış ve bu bileşiklerin *in vitro* ChE inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. Bileşiklerin hiçbirisi BChE enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermez iken; bileşik 1b

ve 1e, AChE enzimine karşı umut vaat edici bir düzeyde aktivite göstermiştir. Yapılan moleküler modelleme çalışmaları ile bileşik 1b ve 1e'nin enzim aktif bölgesindeki bağlanma etkileşimleri incelenmiştir. Yapıda diğer bileşiklerden farklı olarak bulunan süstituentler doğrudan bir etkileşim göstermezken bileşiğin konformasyonunda meydana getirdikleri etki ile bileşiğin enzim aktif bölgesi ile etkileşim düzeyini arttırmışlardır. Aktif olmayan türevler incelendiğinde özellikle sikloheksil ya da fenil gibi büyük hacimli grupların yapıya girmesi aktiviteyi düşürmektedir. Dolayısıyla alifatik grupların kullanılması daha aktif türevlere ulaşmaya yardımcı olabilir. Benzo [b] [1,4] oksazin halkası enzimin periferik anyonik bölgesine yerleşmektedir. İleriki çalışmalarda bu yapı sabit bırakılarak piperazin halkasının piperidin, morfolin, pirolidin halkaları ile yer değişiminin aktiviteye nasıl katkı sağlayacağı incelenebilir.

Etik Beyan:

Bu çalışma Etik Kurul İzni Gerektiren Araştırmalar dışındadır. Bu çalışmanın yazarları olarak çalışmanın Helsinki Bildirgesi ve İnsan Haklarına uygun şekilde gerçekleştirildiğini bildiririz.

Çıkar Çatışması

Yazarların çıkar çatışması yoktur.

Teşekkür

Bu çalışmanın yazarları olarak Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Doping ve Narkotik Maddeler Laboratuvarına destek ve katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Chen Y, Dang M, Zhang Z. Brain mechanisms underlying neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: a systematic review of symptom-general and-specific lesion patterns. *Mol Neurodegener* 2021; 16(1):1-22.
- Zhang L, Zhang G, Xu S, Song Y. Recent Advances of Quinones as a Privileged Structure in Drug Discovery. *Eur J Med Chem* 2021; 113632.
- Michalska P, Buendia I, Barrio LD, Leon R. Novel multitarget hybrid compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* 2017; 17(9):1027-1043.
- Ferreira JP, Albuquerque HM, Cardoso SM, Silva AM, Silva VL. Dual-target compounds for Alzheimer's disease: natural and synthetic AChE and BACE-1 dual-inhibitors and their structure-activity relationship (SAR). *Eur J Med Chem* 2021; 113492.
- Srivastava S, Ahmad R, Khare SK. Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: a review. *Eur J Med Chem* 2021; 113320.
- Mohamed T, PN Rao P. Alzheimer's disease: emerging trends in small molecule therapies. *Curr Med Chem* 2011; 18(28):4299-4320.
- Thapa S, Lv M, Xu H. Acetylcholinesterase: a primary target for drugs and insecticides. *Mini Rev Med Chem* 2017; 17(17):1665-1676.
- Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11(3):315-335.
- Zimmerman G, Soreq H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res* 2006; 326(2):655-669.
- Saxena M, Dubey R. Target enzyme in Alzheimer's disease: Acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2019; 19(4):264-275.
- Nachon F, Carletti E, Ronco C, et al. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochem J* 2013; 453(3):393-399.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7(2):88-95.
- Acar Cevik U, Saglik BN, Levent S, et al. Synthesis and AChE-inhibitory activity of new benzimidazole derivatives. *Molecules* 2019; 24(5):861.
- Osmaniye D, Sağlık BN, Acar Çevik U, et al. Synthesis and AChE inhibitory activity of novel thiazolylhydrazone derivatives. *Molecules* 2019; 24(13):2392.
- Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, et al. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J Med Chem* 2012; 55(22):10282-10286.
- Maestro, Version 10.6, Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, 2021.
- Schrödinger, Version 2021-2, LLC: New York, NY, USA, 2021.
- LigPrep, Version 3.8, Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, 2021.
- Glide, Version 7.1, Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, 2021.