

2-pirazolin yapısındaki yeni bir bileşiğin sentezi, moleküler modellemesi ve monoaminoksidaz inhibitörü etkisinin araştırılması

Investigation of synthesis, molecular modelling and monoaminoxidase inhibitor activity of a new 2-pyrazoline compound

Begüm EVRANOS-AKSÖZ¹, Gülberk UÇAR², Kemal YELEKÇİ³

ÖZET

Amaç: Nöromediatörlerin yıkımından sorumlu olan monoamin oksidaz (MAO) enziminin izoformlarının (MAO-A ve -B) birçok hastalık ile yakından ilişkili olduğu; MAO inhibitörlerinin depresyon, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Grubumuzca daha etkin, tersinir ve az yan etkili yeni bir MAO inhibitörü (SH2U bileşiği) sentezlenmiş ve bu bileşiğin insan MAO enzimini (hMAO) inhibe etme yeteneği incelenmiştir. Ayrıca bu yeni bileşiğin hMAO ile etkileşimi, moleküler modelleme çalışmaları ile detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Sentezlenen yeni bileşiğin hMAO'yu kuvvetli bir şekilde yarışmalı ve tersinir olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Söz konusu bileşiğin Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının tedavisinde ümit verici bir ilaç etken maddesi olabileceği düşünülmektedir.

Yöntem: 3',5'-Dikloro-2'-hidroksi asetofenon ile p-tolualdehit'in metanol içinde KOH varlığında reaksiyona girmesiyle 1-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-3-p-tolil prop-2-en-1-on (3',5'-Dikloro-2'-hidroksi-4-metil şalkon) bileşiği sentez edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu bileşiğin etanol içerisinde geri çeviren soğutucu altında izonikotinik asit hidrazit ile muamele

ABSTRACT

Objective: Isoforms of monoamine oxidase (MAO-A and -B) which are responsible for the degradation of neuromediators are involved in many diseases, and MAO inhibitors are used for the treatment of some diseases such as depression, Alzheimer's and Parkinson's diseases. Thus, a novel compound, SH2U was synthesized and its ability for the inhibition of human MAO (hMAO) activity was investigated by our group. In addition, the interaction of SH2U with hMAO isoforms have been investigated in detail using molecular modelling technics. It has been found that SH2U inhibited hMAO-B potently, selectively, competitively and reversibly suggesting that the novel compound may be a promising drug agent for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases.

Methods: 1-(3,5-dichloro-2-hydroxyphenyl)-3-p-tolylprop-2-ene-1-on (3',5'-Dichloro-2'-hydroxy-4-methyl chalcone) was prepared via the reaction of p-tolualdehyde and 3',5'-Dichloro-2'-hydroxy acetophenone in methanol in the presence of KOH. Then, the obtained chalcone was treated with

¹Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Analiz ve Kontrol Laboratuvarları, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

³Kadir Has Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyoinformatik ve Genetik Bölümü, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Begüm EVRANOS-AKSÖZ

Sağlık Mahallesi Prof. Dr. Nusret Fişek Cad. HSGM, C Blok - Sıhhiye 06100 Ankara - Türkiye
Tel : +90 530 285 17 73 E-posta / E-mail : begumevranos@gmail.com]

Geliş Tarihi / Received : 24.08.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.59219

Evranos-Aksöz B, Uçar G, Yelekcı K. 2-pirazolin yapısındaki yeni bir bileşiğin sentezi, moleküler modellemesi ve monoaminoksidaz inhibitörü etkisinin araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(3): 253-264

edilmesiyle [3-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-5-p-tolil-4,5-dihidropirazol-1-il] (piridin-4-il) metanon bileşiği sentez edilmiştir. Yapısı doğrulanmış bu bileşiğin hMAO enzimi ile etkileşimi, ticari tayin kiti kullanılarak fluorometrik bir yöntemle incelenmiştir. Ayrıca, söz konusu yeni bileşik ile hMAO arasındaki etkileşimler, moleküler modelleme çalışmaları ile aydınlatılmıştır.

Bulgular: Sentezlenen bileşiğin yapısı, IR, Mass, 1H-NMR ve elemental analiz yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır. Yapısı doğrulanmış bu bileşiğin etkin, seçici, tersinir, toksik olmayan bir hMAO-B inhibitörü olduğu ve inhibisyonun yarışmalı olduğu görülmüştür. Moleküler yerleştirme programı kullanılarak bileşiğin hMAO-B enziminin aktif bölgesinde hangi amino asit yan zincirleri ile ne tür girişimleri yaptığı belirlenmiştir.

Sonuç: Yeni sentezlenen SH2U bileşiği, hMAO-B enzimini kuvvetle, seçici, yarışmalı ve tersinir olarak inhibe etmiştir. Sentezlediğimiz bileşik, bilinen seçici ama tersinmez MAO-B inhibitörü olan selegilin'den daha etkin ve seçici, tersinir olarak hMAO-B enzimini inhibe etmiştir ve Parkinson ile Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılabilecek bir ilaç etken maddesi olarak ümit vadetmektedir.

Anahtar Kelimeler: Monoamin oksidaz (MAO), pirazolin, alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı

isonicotinic acid hydrazide under reflux in ethanol to give (3-(3,5-Dichloro-2-hydroxy phenyl)-5-p-tolyl-4,5-dihydropyrazol-1-yl) (pyridin-4-yl) methanone. The interaction of SH2U with hMAO isoforms was investigated fluorometrically using commercial kits. The interaction between SH2U and hMAO was also analyzed using AutoDock 4.2.6 program.

Results: The structure of compound SH2U was confirmed using IR, Mass, 1 H-NMR and elemental analysis methods. SH2U appeared as a potent, selective, reversible and nontoxic hMAO-B inhibitor. Mode of inhibition was found to be competitive. Interactions of the new compound with the active site of hMAO-B were clarified using molecular modelling studies.

Conclusion: Compound SH2U inhibited hMAO-B potently, selectively, competitively and reversibly. The synthesized compound is found to be more potent and selective than selegiline, the known irreversible MAO-B inhibitor, indicating that SH2U appears as a promising active molecule to be used in the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases.

Key Words: Monoamine oxidase (MAO), pyrazoline, alzheimer's disease, parkinson's disease

GİRİŞ

Monoamin Oksidaz (MAO), karaciğer, beyin, bağırsak mukozası ve diğer organların mitokondrilerinin dış membranında yer alan ve flavinadenozin dinükleotid içeren bir enzimdir. MAO, serotonin, dopamin, norepinefrin, tiramin, triptamin gibi biyojenik aminlerin oksidatif deaminasyonundan sorumludur (1); ancak histamin gibi diaminlere afinitesi düşüktür (2). Memelilerde MAO, MAO-A ve MAO-B olmak üzere substrat ve inhibitör özellikleri farklılık gösteren iki izoform halinde bulunmaktadır (3). Özellikle MAO-B tarafından katalizlenen oksidatif deaminasyon

reaksiyonu, hidrojen peroksit ve aldehitler gibi nörotoksik maddelerin oluşumuna neden olmaktadır ve nöron hasarına yol açmaktadır (4). Yaşlanma ile birlikte beyinde MAO-B enziminin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir ve yüksek MAO-B düzeyinin özellikle yaşlılarda ortaya çıkan nörodejeneratif bozukluklardan sorumlu olabileceği fikrine varılmıştır. MAO-B enzim aktivitesinin artışı ile dopamin metabolizmasının artışı paralellik göstermektedir (5). Bu nedenle dopaminin terapötik sürdürülebilirliğinin yaşlılıktaki bilişsel fonksiyonların düzeltilmesinde

etkin rol oynayabileceği düşünülmektedir. Beyindeki dopaminerjik nöronlarda meydana gelen oksidatif hasarın, alzheimer ve parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli rolü olduğu bilinmekte (6, 7); MAO-B inhibitörleri bu nedenle parkinson ve alzheimer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (8, 9).

Bu çalışmada, grubumuzun daha önce yaptığı çalışmaların verilerine dayanarak kuvvetli MAO-B inhibitör etki göstermesi beklenen bir bileşik (SH2U) moleküler modelleme yöntemi kullanarak tasarlanmış; sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmış; bileşiğin MAO inhibitör etkisi insan MAO (hMAO) enzimi kullanılarak araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasal yöntemler

Kullanılan kimyasallar

3',5'-Dikloro-2'-hidroksi asetofenon, izonikotinik asit hidraziti, p-Tolualdehit, KOH, HCl, etanol, metanol.

Kimyasal yapı aydınlatmasında kullanılan cihazlar

Sentez çalışmaları Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. IR spektrum ölçümleri Jasco FT/IR 420 Spektrofotometresinde (Easton, USA) (4000-400 cm⁻¹) KBr (Merck) diski hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. NMR ölçümleri, internal standart TMS sıfır sinyaline göre CDCl₃ veya DMSO-d₆ içinde Varian Mercury-400 MHz FT-NMR Spektrometresinde (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) gerçekleştirilmiştir. Mass spektrumları; Waters ZQ micromass LC-MS spektrometresinde (Waters Corporation, Milford, MA, USA), elektropray iyonizasyon (ESI) yöntemi uygulanarak çekilmiştir. C, H, N tayinleri, Leco CHNS 932 analizör (Leco-932, St. Joseph, MI, USA) cihazı ile yapılmıştır. Erime noktası tayinleri Electrothermal 9100 (Eng. Ltd., Essex, UK) aletinde, kapiller yöntemle yapılmış ve sonuçlar düzeltilmeden verilmiştir. Sentez çalışmaları sırasında reaksiyonlardaki gelişmeyi izlemek ve elde edilen

maddelerin saftık derecelerini belirlemek amacıyla ince tabaka kromatografisinden yararlanılmıştır. Bu amaçla adsorban olarak (Kieselgel-60 F254, Merck) ile kaplanmış alüminyum plaklar kullanılmıştır. Uygun çözücü sistemi ile sürüklenme işlemi tamamlandıktan sonra açık havada kurutulan plaklardaki lekeler, UV lambası altında, 254 nm dalga boyunda incelenmiştir.

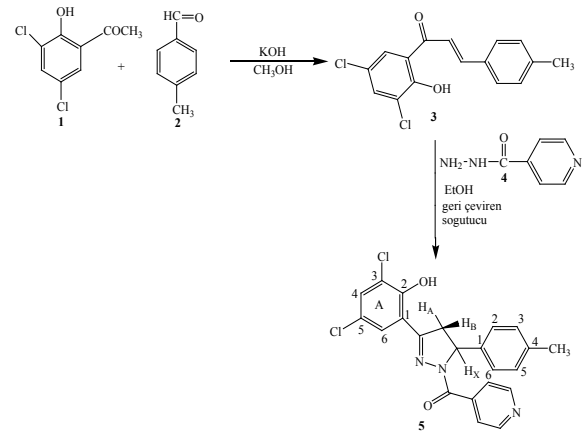
Sentez yöntemleri

Şalkon Sentezi

4.99 mmol 3',5'-Dikloro-2'-hidroksi asetofenon'un 20 ml metanoldeki çözeltisine %50 (a/h) KOH çözeltisi (5ml) damla damla buz banyosunda eklendi ve karışım oda sıcaklığında yarım saat karıştırıldı. Sonra üzerine 6.018 mmol (0.723g, 0.71ml) p-tolualdehit ilave edildi (10, 11). Bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılan reaksiyon ortamı buza döküldü, 1N HCl çözeltisi ile asitlendirildi (12), süzülerek etanolden kristallendirildi.

Pirazolin Türevi Bileşiğin Sentezi

3',5'-Dikloro-2'-hidroksi-4-metil şalkon (500 mg; 1.63 mmol), izonikotinik asit hidrazit (230 mg; 1.63 mmol) 20 ml etanol içinde 78 °C' de 32 saat ısıtıldı. Katı halde ayrılan ham ürün etanolden kristallendirildi (13). Beyaz renkli 310 mg ürün elde edildi. Verim % 44.68 E.N. 246.3 °C. Çözücü sistemi: n heksan(1): etil asetat(9). Bileşiklerin sentez basamakları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. (3-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-5-p-tolil-4,5-dihidropirazol-1-il)(piridin-4-il)metanon sentez basamakları.

Moleküler Modelleme Çalışmaları

Moleküler modelleme çalışmaları, Kadir Has Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyoinformatik ve Genetik Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

Protein sistemi

hMAO-A (PDB giriş kodu: 2BXS, inhibitör klorjilinde birlikte kristalize) ve hMAO-B (PDB giriş kodu: 1S3E inhibitör 6-hidroksi-N-proparjil-1(R)-aminoindanla birlikte kristalize) enzimlerinin kristal yapıları, Protein Data Bank'tan elde edilmiştir (www.rcsb.org). Çalışmalar, enzimlerin sadece bir alt birimi olan B zincirleri üzerinde yürütülmüştür.

Kristal yapının gerilimini düşürmek ve proteinleri Autodock doklama simülasyon programında kullanılmaya elverişli hale getirmek için tüm polar hidrojenler Accelrys Discovery Studio 4.6 modelleme paketiyle eklenmiştir. Elde edilen yapı, vakum ortamında minimize edilmiş; minimizasyon boyunca, ağır atomlar başlangıç kristal koordinatlarında sabitlenmiş; hidrojenler hareket etmelerine imkan verecek şekilde serbest bırakılmıştır. AutoDockTools (ADT) grafiksel kullanıcı ara yüzü programı, enzimleri ve inhibitörleri hazırlamak için kullanılmıştır. Gasteiger yükleri hesaplanmış ve non-polar hidrojenler karbon atomlarıyla birleştirilmiştir. Makromoleküller için, oluşturulmuş pdbqt dosyaları kaydedilmiştir.

Yeni sentezlenen bileşiğin 3 boyutlu yapısı hazırlanmış, (PM3) seviyesinde optimize edilmiş ve Spartan (Wavefunction Inc.) moleküler modelleme programının yardımıyla mol2 formatında kaydedilmiştir. Bu dosyaların kısmi yükleri sonradan ADT paket programı (versiyon 1.5.6) kullanılarak modifiye edilmiş, böylece non polar hidrojen atomlarının yükleri hidrojenin bağlı olduğu atoma atanmıştır. Sonuç dosyaları, pdbqt dosyaları halinde kaydedilmiştir.

Moleküler Modelleme

AutoDock 4.2.6 kullanılmıştır. Doklama veri girişi

dosyalarını oluşturmak için AutoDockTools programı kullanılmıştır. Tüm doklamalarda x, y, z yönlerinde 80x80x80 nokta boyutlarında karelere ayrılmış bir küp oluşturulmuş ve komplekste inhibitörün yeri bilindiği için eşlemelerde proteinin katalitik bölgesindeki flavinin (FAD) N5 atomu merkez olarak alınmıştır. 0.375 Å'luk bir uzunluk (karbon-karbon kovalent bağının yaklaşık dörtte biri uzunluğunda) ve dielektrik sabitinin mesafe bağımlı bir fonksiyonu eşlemelerin enerji hesaplanmasında kullanılmıştır. Lamarckian genetik algoritma mantığı kullanılarak 10 işlem yürütülmüştür. Başlangıç popülasyonu 50 olan rastgele yerleştirilmiş parçalar, maksimum 2.5×10^6 enerji değerleriyle ve maksimum 2.7×10^4 oluşumla kullanılmıştır. 0.02 mutasyon oranı ve 0.8 genetik değişim oranı seçilmiştir. Root mean square deviation (RMSD)'da 0.5 Å' dan daha az farklılık gösteren sonuçlar bir araya toplanmış ve bağlanmanın en uygun serbest enerjisinin sonuçları, nihai kompleks yapılar olarak seçilmiştir.

Biyokimyasal Yöntemler

Enzimatik çalışmalar Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. ELISA temelli çalışmalarda BMG LABTECH MULTIMOD Microplate Reader; spektrofotometrik tayinler için Shimadzu UV-1800 spektrofotometresi kullanılmıştır. hMAO-A ve -B rekombinant enzimleri (expressed in baculovirus infected BTI insect cells), ve diğer kimyasallar Sigma-AldrichTM, Almanya'dan satın alınmıştır. Amplex®-Red MAO Assay Kit, Molecular Probes, ABD'den sağlanmıştır.

hMAO İzoformlarının Aktivitelerinin Tayini

hMAO izoform aktivitesinin tayini substrat olarak p-tiramin (0.05-1.00 mM) kullanılarak belirlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin hMAO izoformları ile etkileşimleri, daha önce tanımlanan ve modifiye edilen fluorometrik bir yöntem ve kit kullanılarak tayin edilmiştir (14-16). SH2U bileşiğinin değişik miktarlarını, bilinen MAO-A ve -B inhibitörlerini (selejilin ve moklobemid) ve rekombinant hMAO-A

veya hMAO-B enzimlerini içeren 0.1 mL sodyum fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.4) 15 dakika boyunca 37°C'de 1.5 ml'lik semi-mikro fluorimetre küvetlerinde karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında 200 µM Amplex Red reaktifi, 1U/ml yaban turbu peroksidazı ve MAO-A ve MAO-B türleri için substrat olan 1 mM p-tiramin eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Oluşan H₂O₂, dolayısıyla oluşmuş olan rezorufin, eksitasyon 545 nm, emisyon 590 nm de izlenmiştir. Bu sürede başlangıca göre fluoresans doğrusallığında artış gözlenmiştir.

SH2U bileşiği ile Amplex red reaktifi arasındaki olası etkileşimler yalnızca Amplex red reaktifi içeren sodyum fosfat tampon çözeltisine bileşiğin eklenmesiyle tayin edilmiştir. MAO izoformları hariç tutularak diğer tüm bileşiklerin bulunduğu MAO izoformları yerine sodyum fosfat tamponu eklenen küvetten tayin edilen arka plan aktivitesi çıkarıldıktan sonra spesifik fluoresans emisyonu elde edilen son sonuçlarla hesaplanmıştır.

Kinetik Çalışmalar

SH2U, DMSO içinde, maksimum derişimi %1 olacak şekilde hazırlanmış ve 0.01-10.00 µM derişim aralığında kullanılmıştır. İnhibisyon, Lineweaver-Burk grafiği ile gösterilmiştir. İnhibisyon sabiti (K_i) değerleri Lineweaver-burk grafik eğimlerinin inhibitör konsantrasyonuna karşı grafiklenmesi ile x eksenini kestiği noktadan belirlenmiş ve bu grafiklerin korelasyon katsayıları (R₂) en az 0.98 olarak hesaplanmıştır. Özgüllük indeksi (SI), K_i(hMAO-A)/K_i(hMAO-B) olarak hesaplanmıştır. Protein, Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir (17).

Tersinirlik Çalışmaları

SH2U ile MAO inhibisyonun tersinirliği diyaliz metodu kullanılarak tayin edilmiştir (18). 16x25 mm çapındaki diyaliz tüpleri kullanılmıştır (SIGMA, Almanya). Tüplerin, 12 000'e kadar molekül ağırlığı sınırı vardır ve 0.5-10 mL arası örnek hacmine sahiptir. Yeterli miktarda rekombinant enzim (hMAO-A veya B, 1 U/mL) ile SH2U (derişimi potasyum fosfat

tamponu, 0.05 M, pH 7.4, %1 DMSO içeren %5'lik sukroz, içerisinde hMAO-A ve-B'yi inhibe eden IC50 değerlerinin dört katına eşit olacak şekilde) 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Başka bir set ise aynı miktarda enzim ve bildirilen IC50 değerlerine uygun olarak referans inhibitörler (moklobemid, selejilin ve lazabemid) ile hazırlanmıştır. Moklobemid'in IC50 değeri hMAO-A için 4 µM olarak alınmıştır (19). Selejilin ve lazabemid'in IC50 değerleri hMAO-B inhibisyonu için sırasıyla 0.079 µM ve 0.03 µM olarak alınmıştır (20). Enzim inhibitör karışımları daha sonra, 4°C'de 80 ml diyaliz tamponu (100 mM potasyum fosfat, pH 7.4, % 5 sakaroz) içerisinde diyaliz edilmiştir. Diyaliz tamponu diyalizin 3. ve 7. saatlerinde yenilenmiştir. Diyalizin 24. saatinde, kalan MAO aktiviteleri ölçülmüştür. Bütün reaksiyonlar, üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar ortalama ±SEM olarak ifade edilmiştir.

Sitotoksosite Çalışmaları

Sentezlenen bileşiğin hücre üzerindeki olası toksik etkisi, MTT (metiltiazol difenil tetrazolyum) testi ile ölçülmüştür (21). Bu çalışmada hücre kaynağı olarak insan hepatoma HepG2 hücre hattı (Invitrogen) kullanılmıştır. İnsan hepatoma HepG2 hücre hattı, çabuk çoğalabilme, deneylere iyi uyum, nispeten ucuz ve kolay erişilebilir olması gibi nedenlerle özellikle akut ve ana bileşik sitotoksosite taramalarında tercih edilmektedir (22, 23). HepG2 hücreleri, 2 mM L-Glutamine, %10 ısıyla inaktive edilmiş fetal siğir serumu (FBS), 100 U/mL penisilin, ve 100 µg/mL streptomisin ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içinde ekilmiştir. Hücreler 37 °C de, %5 CO₂ ve %95 hava karışımında büyütülüp plakalara aktarılmıştır. SH2U bileşiği (1, 5 ve 25 µM derişimde, %0.1 DMSO içinde) 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kuyucuklara son derişim 5 mg/mL olacak şekilde MTT eklenmiştir. 4 saatlik inkübasyon sonunda oluşan formazan 100 µL DMSO ile çözülmüş ve MTT redüksiyonu 590 nm de ölçülmüştür. Kontrol olarak hücreler %1 DMSO ile muamele edilmiş; kontrolün canlılık miktarı %100 canlılık olarak kabul

edilmiştir (24). Sonuçlar, ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar arası fark, student's t testi ile analiz edilmiş; ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

Senteze İlişkin Bulgular

3',5'-Dikloro-2'-hidroksi asetofenon ile p-tolualdehitin metanol içinde KOH varlığında reaksiyona girmesiyle 1-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-3-p-tolilprop-2-en-1-on bileşiği sentez edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu bileşiğin etanol içerisinde geri çeviren soğutucu altında izonikotinic asit hidraziti ile muamele edilmesiyle (3-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-5-p-tolil-4,5-dihidropirazol-1-il)(piridin-4-il) metanon bileşiği sentez edilmiştir. Sentez edilen bu bileşiğin yapısı IR, Mass, ¹H-NMR ve elemental analiz yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır. SH2U bileşiğine ait aşağıdaki fiziksel ve spektral bulgular elde edilmiştir.

(3-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-5-p-tolil-4,5-dihidropirazol-1-il)(piridin-4-il)metanon (SH2U): Beyaz toz. - Verim: %44.68. -E.N. 246.3 °C. - IR (KBr): $\nu = 3411(\text{OH})$, 1671 (amid C=O) cm^{-1} . ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 Mhz): $\delta = 2.33$ (s, 3H, -CH₃), 2.99 (dd, 1H, HA, JAB=12 Hz, JAX= 12 Hz), 3.55 (dd, 1H, HB,

JAB=2.8 Hz, JBX= 2.8 Hz), 5.39 (dd, 1H, HX, JAX=2.8 Hz, JBX=2.4 Hz), 7.26-8.75 (10H, Aromatik-H), 11.26 (s, 1H, -OH). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 Mhz): $\delta = 21.23$, 32.05, 77.75, 122.42, 123.10, 123.39, 124.95, 125.62, 126.29, 126.96, 129.55, 131.18, 136.28, 138.47, 143.06, 150.53, 151.95. -MS (ESI): $m/z = 426$ [M+H]⁺, 428 [M+H+2]⁺, 429 [M+H+3]⁺, 430 [M+H+4]⁺. -C₂₂H₁₇Cl₂N₃O₂ : C 61.84, H 4.11, N 10.00; hesaplanan C 61.98, H 4.02, N 9.86.

Moleküler Modelleme Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Öncelikle, moleküler modellemede kullanılan insan MAO-A ve B enzimleri ile bilinen MAO-A ve MAO-B inhibitörlerinin etkileşimlerine ilişkin doğrulama çalışmaları yapılmış ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Elde edilen bağlanma enerjilerinden (Tablo 1) de anlaşıldığı üzere SH2U bileşiği MAO-B enzimine MAO-A enziminden daha kuvvetli bağlanmaktadır. İki boyutlu (2D) şekillerde bileşiğin enzimin aktif kısmında hangi amino asit yan zincirleri ile hangi tür girişimleri yaptığı farklı renklere gösterilmiştir.

MAO-A: 2-Hidroksi 3,5-diklorofenil halkası, TYR444 ve TYR407 yan zincirleri arasına girerek P-P girişimi, diğer fenil halkası da PHE208 ile P-P girişimi yapmaktadır. Piridil halkası ise CYS323, PHE362, LEU337, TYR69 ve ILE335 amino asitleri ile etkileşmektedir (Şekil 2).

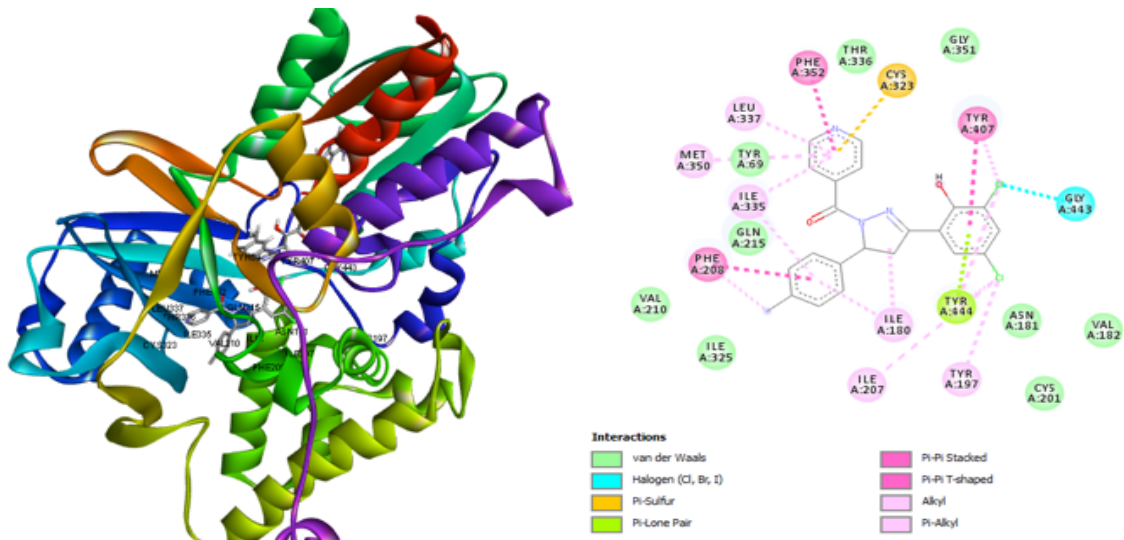
Tablo 1. SH2U bileşiğinin insan MAO-A ve MAO-B enzimleri ile etkileşimine ilişkin hesapsal bulgular

| Bileşik | hMAO-A için hesaplanan DG (kcal/mol) | hMAO-A için hesaplanan K _i (μM) | hMAO-B için hesaplanan DG (kcal/mol) | hMAO-B için hesaplanan K _i (μM) | SI* | Seçicilik |
|------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--|--------|-----------|
| SH2U (R) | -8.85 | 9.55 | -9.88 | 0.057 | 167.54 | MAO-B |
| SH2U (S) | -7.40 | 3.76 | -9.96 | 0.051 | 73.73 | MAO-B |
| Moklobemid | -8.04 | 1.28 | -7.25 | 4.83 | 0.265 | MAO-A |
| Safinamid | -7.60 | 2.68 | 9.42 | 0.124 | 21.61 | MAO-B |

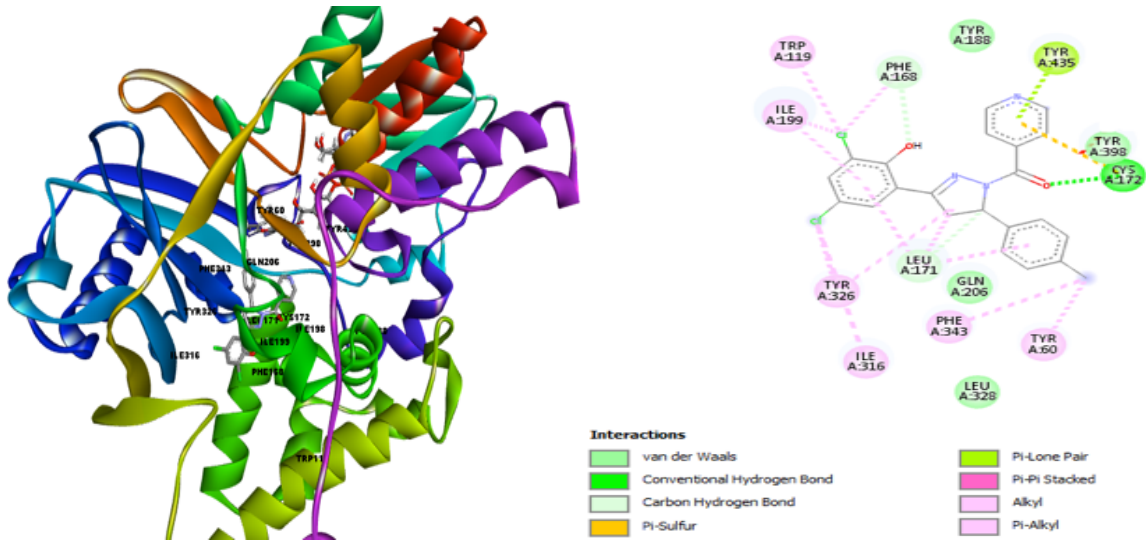
*Seçicilik indeksi (SI): K_i (MAO-A)/ K_i (MAO-B) olarak hesaplanmıştır.

MAO-B: SH2U inhibitörünün piridil halkası TYR398 ve TYR435 amino asitleri arasında sandviç etkileşmesi bazında P-P girişiminde bulunmaktadır. Karbonil grubu, CYS172 ile etkili bir hidrojen bağı yapmaktadır. 2-Hidroksi 3,5-diklorofenil halkası ise TYR326, ILE199, TRP119 ve PHE168 amino asitleri ile değişik şiddetlerde

girişimlerde bulunmaktadır. Diğer taraftan pirazolin halkası ise TYR326 ve LEU171 amino asitleri ile etkili girişimler yapmaktadır. Bütün bu bağların şiddetleri bir arada değerlendirildiğinde, SH2U inhibitörünün MAO-B enzimine MAO-A enziminden daha güçlü bir şekilde bağlandığı görülmektedir (Şekil 3).



Şekil 2. SH2U bileşiğinin 3D (solda) ve 2D (sağda) MAO-A enzimi bağlanma bölgesindeki duruşu ve yaptığı girişimler.



Şekil 3. SH2U bileşiğinin 3D (solda) ve 2D (sağda) MAO-B enzimi bağlanma bölgesindeki duruşu ve yaptığı girişimler.

Biyokimyasal Çalışmalara İlişkin Bulgular

Daha önce yapılan çalışmalar, şalkon ve türevlerinin MAO enziminin inhibitörü olduğunu göstermiştir (25, 26). Bu çalışmada, önceki çalışmalarımızın ışığında sentezlediğimiz SH2U bileşiğinin insan rekombinant MAO izoformları ile etkileşimi, moleküler modelleme ve biyokimyasal çalışmalarla incelenmiştir.

Rekombinant enzimlerin spesifik aktiviteleri hMAO-A ve hMAO-B için sırasıyla 0.175 ± 0.012 nmol/mg/dk ve 0.134 ± 0.010 nmol/mg/dk olarak bulunmuştur. Deneysel bulgular Tablo 2’de sunulmaktadır.

SH2U bileşiği, insan MAO-B enzimini kuvvetli, seçici ve yarışmalı olarak inhibe etmiştir. Bileşiğin MAO-B enzimine olan ilgisini gösteren K_i değeri bilinen tersinmez ve intihar tip MAO-B inhibitörü olan selejilin’in ve tersinir, yarışmalı inhibitör olan lazabemid’in K_i değerleriyle karşılaştırıldığında SH2U bileşiğinin etkisinin selejilin’den çok daha kuvvetli olduğu ancak lazabemid’den düşük olduğu görülmüştür (selejilin’in hMAO-B için K_i değeri 0.31 ± 0.02 μ M, lazabemid’in K_i değeri 0.005 ± 0.001 μ M, SH2U bileşiğinki ise 0.046 ± 0.001 μ M dır). SH2U

bileşiğinin hMAO-B izoformuna ilgisi, $SI=272.83$ olarak bulunmuştur. SH2U bileşiğinin MAO-B izoformuna ilgisi selejilin’den çok daha fazladır (Tablo 2).

SH2U bileşiğinin hMAO-B enzimi ile etkileşiminin kinetiği Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak inhibitör yokluğunda ve değişik derişimlerdeki inhibitör varlığında incelenmiştir. Grafikte doğruların y ekseninde kesiştiği; maksimum hızın değişmediği ancak K_m değerinin değiştiği görülerek inhibisyonun yarışmalı olduğu fikrine varılmıştır. İkincil grafikte SH2U’nun derişimlerine karşı doğruların eğimi tekrar grafiklenerek K_i değeri hesaplanmıştır. K_i değeri grafikte görüldüğü gibi 46.00 nM olarak bulunmuştur (Şekil 4).

hMAO enziminin SH2U bileşiği ile inhibisyonunun tersinirliği dializ yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla hMAO-A ve B izoformları, SH2U ile (IC_{50} değerinin 4 katı derişimde hazırlanmıştır) inkübe edilmiş, daha sonra 24 saat diyalize tabi tutulmuştur. Diyaliz sonrasında inhibisyonun geri dönüşümü, kalan aktivitenin ölçülmesi ile bulunmuştur. SH2U bileşiğinin MAO enzimini inhibe edici aktivitesinin tersinir olduğu görülmüştür (Tablo 3). SH2U bileşiğinin bu özelliğinin,

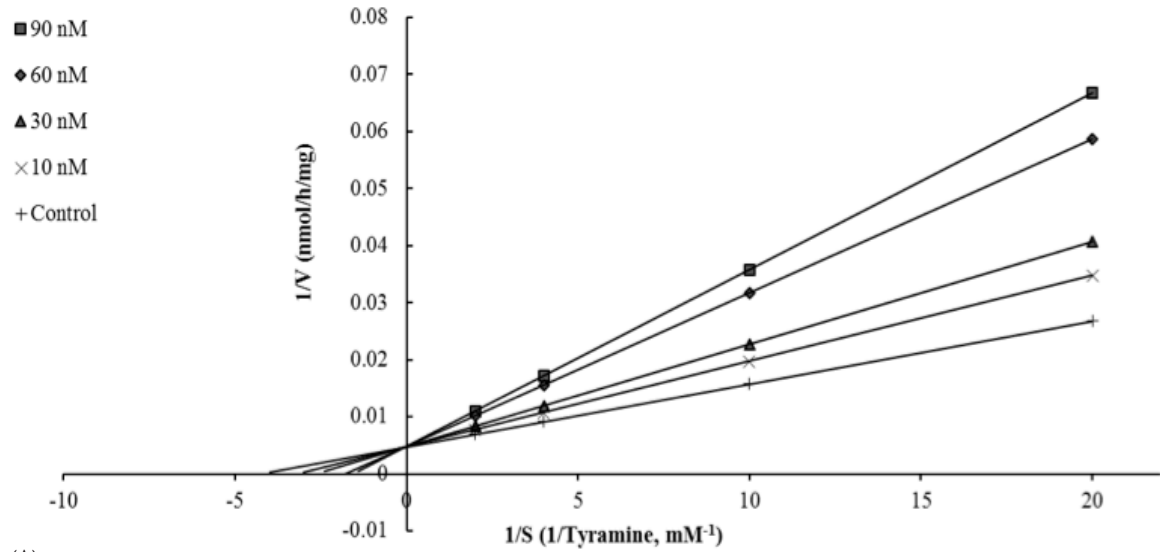
Tablo 2. SH2U bileşiğinin insan MAO-A ve MAO-B enzimleri ile etkileşimine ilişkin deneysel bulgular*

| Bileşik | K_i (MAO-A) [μ M]** | K_i (MAO-B) [μ M]** | SI*** | İnhibisyon Tipi | Tersinirlik | Seçicilik |
|------------|----------------------------|----------------------------|---------|------------------------|-------------|-----------|
| SH2U | 12.55 ± 1.06 | 0.046 ± 0.001 | 272.83 | Yarışmalı | Tersinir | MAO-B |
| Selejilin | 17.50 ± 1.49 | 0.31 ± 0.02 | 56.45 | İntihar tipi inhibitör | Tersinmez | MAO-B |
| Lazabemid | 6540.50 ± 220.00 | 0.005 ± 0.001 | 1308.00 | Yarışmalı | Tersinir | MAO-B |
| Moklobemid | 0.010 ± 0.001 | 1.52 ± 0.11 | 0.007 | Yarışmalı | Tersinir | MAO-A |

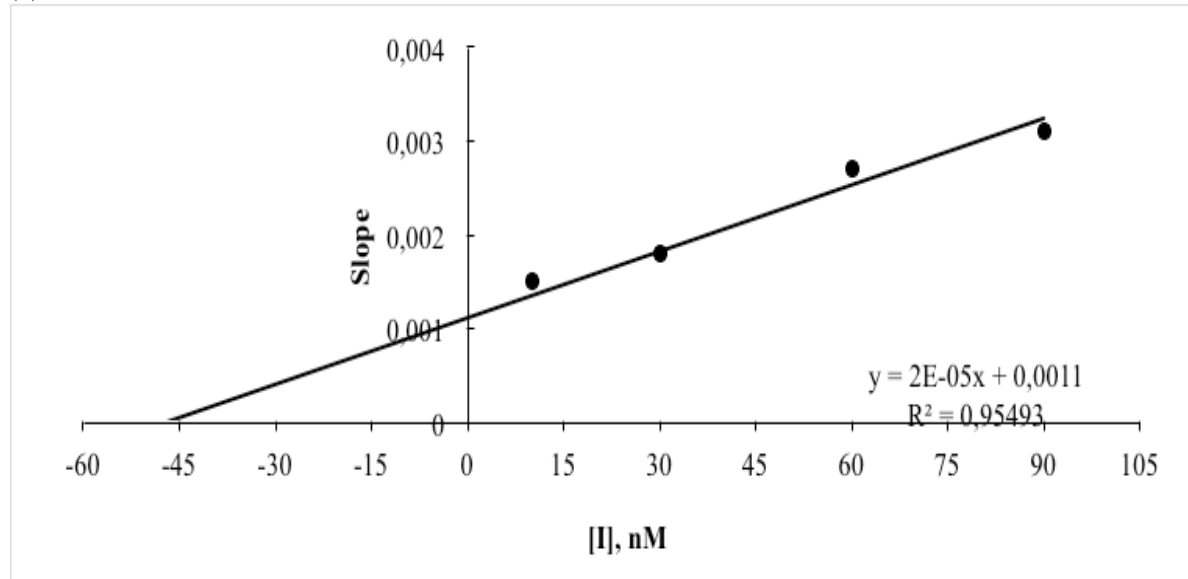
* Deneylerde rasemik bileşikler kullanılmıştır.

**Bulgular, 3 bağımsız deneyin ortalama \pm standart hatası olarak ifade edilmiştir.

*** Seçicilik indeksi (SI): K_i (MAO-A)/ K_i (MAO-B) olarak hesaplanmıştır. SI büyüdükçe MAO-B izoformuna afinite artmaktadır.



(A)



(B)

Şekil 4. (A) hMAO-B izoformunun SH2U bileşiği ile inhibisyonuna ilişkin Lineweaver-Burk grafiği. İnhibitör derişimleri grafiğin sol tarafında gösterilmiştir.

(B) Lineweaver-Burk grafiğinde elde edilen doğruların SH2U bileşiğinin derişimlerine karşı grafiklenmesi sonucu bulunan $K_i = 46.00$ nM.

bileşiğın ilaç olarak geliştirilmesi ile ilgili yapılacak çalışmalarda bir avantaj olduğu fikrine varılmıştır.

SH2U bileşiğının sitotoksitesi, MTT testi ile tayin edilmiştir. In vitro sitotoksite çalışmasında insan HepG2 hücreleri kullanılmış; SH2U bileşiği

1, 5 ve 25 μ M derişimlerde hazırlanarak hücrelerle muamele edilmiş ve hücre canlılığı ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Tablo 4’de sunulmuştur. Görüldüğü üzere, SH2U bileşiği uygulanan derişimlerde hücreler üzerinde toksik etki göstermemiştir.

Tablo 3. hMAO enziminin inhibisyonunun tersinirliği*

| Bileşikler | Dializ öncesi | Dializ sonrası | Dializ öncesi | Dializ sonrası | Tersinirlik |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------|
| | hMAO-A aktivitesi (%) | hMAO-A aktivitesi (%) | hMAO-B aktivitesi (%) | hMAO-B aktivitesi (%) | |
| İnhibitör yokluğunda | 100±0.00 | 100±0.00 | 100±0.00 | 100±0.00 | - |
| Moklobemid | 23.66±1.12 | 92.00±4.01 | 85.22±2.78 | 96.02±5.01 | Tersinir |
| Selejilin | 91.87±3.07 | 97.00±3.56 | 44.80±1.99 | 45.02±2.30 | Tersinmez |
| Lazabemid | 89.22±3.01 | 94.55±2.76 | 12.45±1.06 | 94.22±1.92 | Tersinir |
| SH2U | 80.26±3.11 | 97.00±4.19 | 18.50±1.52 | 97.26±3.47 | Tersinir |

*Bulgular, 3 bağımsız deneyin ortalama ± standart hatası olarak ifade edilmiştir.

Tablo 4. *In vitro* sitotoksosite bulguları

| Bileşikler | % Canlılık | | |
|------------|--------------|---------------------------|----------------------------|
| | 1 µM | 5 µM | 25 µM |
| SH2U | 97.55±3.01 | 96.74±2.10 | 92.45±1.98 |
| Moklobemid | 96.21 ± 2.78 | 78.44 ± 2.33 [*] | 57.95 ± 1.87 ^{**} |
| Selejilin | 94.26 ± 3.02 | 85.24±1.78 [*] | 62.20±3.16 ^{**} |
| Lazabemid | 96.33 ± 1.85 | 89.24±2.30 [*] | 59.64±2.00 ^{**} |

Hücre canlılığı, kontrol değerini % si olarak belirtilmiştir. Bulgular, 3 bağımsız deneyin ortalama ± standart hatası olarak ifade edilmiştir. p<0.05 istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

TARTIŞMA

Daha önceki çalışmalarımızın sonuçlarına göre (25, 26) pirazolin yapısındaki bileşikler monoamin oksidaz enzim inhibisyonu yapmaktadırlar. Bu amaçla 3',5'-Dikloro-2'-hidroksi-4-metil şalkon ile izonikotinik asit hidrazinin etanol içinde reaksiyona girmesi sonucu 3-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-5-p-tolil-4,5-dihidropirazol-1-il(piridin-4-il)metanon (SH2U) bileşiği elde edilmiştir. Elde edilen bu madde orijinal olup yapı aydınlatması IR, ¹H NMR ve elemental analiz yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bileşiğin IR spektrumunda 3411 cm⁻¹'de -OH ve 1671

cm⁻¹'de de karakteristik amid karbonil (C=O) pikleri görülmüştür. ¹H NMR spektrumunda 2.99 ppm'de HA, 3.55 ppm'de HB ve 5.39 ppm'de HX olmak üzere dublet dublet olarak görülen üç pik karakteristik pirazolin yapısını kanıtlamaktadır. Yine kütle spektroskopisi verilerinden görülen moleküler iyon piki ([M]⁺) SH2U bileşiğinin yapısını kanıtlamaktadır. [M+2] izotop pikleri bileşiğin bir halojen atomu taşıdığını gösterirken, [M+4] izotop piklerinin varlığı bileşiğin iki halojen atomu taşıdığını göstermektedir (26). Elemental analiz verileri de bileşiğin yapısını kanıtlamaktadır.

Tablo 1’de görülen bağlanma enerjileri ve moleküler modelleme çalışmalarındaki bağlanma özellikleri SH2U bileşiğinin MAO-B enzimine MAO-A enziminden daha güçlü şekilde bağlandığını göstermektedir. hMAO-B enzimi ile etkileşimin genellikle hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağı ile olduğu rapor edilmiştir (27). Moleküler modelleme çalışmaları göstermiştir ki, SH2U bileşiğinin hMAO-B enzimiyle etkileşiminde hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağı rol oynamaktadır. Bileşiklerin yapısında bulunan hidrojen atomlarının halojen atomları ile yer değiştirmesinin molekülün hidrofobitesini ve hacmini artırarak hMAO-B enzime bağlanma gücünü yükselttiği düşünülmektedir (27). Bileşimizde A halkasında bulunan iki klor atomunun, molekülü daha hidrofobik bir hale getirerek hMAO-B enzimiyle etkileşimi artırdığı kanısına varılmıştır. Chen ve ark., bileşiklerin hMAO-B enzime olan seçiciliğinin temelde en az iki amino asit tarafından belirlendiğini ve bu amino asitlerin ile 199 ve Cys 172 olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu iki amino asit, hMAO-A enzimde Phe 208 ve Asn 181 olarak bildirilmiştir (27). hMAO-B enziminin seçiciliğinde rol oynayan diğer iki amino asit Tyr 326 ve Leu 171’dir (27, 28). Tüm bu veriler dikkate alındığında SH2U bileşiğinin hem ile 199 ile hem de Cys 172 amino asitleri ile etkileşime girerek hMAO-B enzime bağlandığını düşünebiliriz. Yine hMAO-B enziminin seçiciliğinde rol alan Tyr 326’nın A halkasının 5. konumundaki klor atomu ve 2- pirazolin halkası ile etkileştiği görülmektedir. Leu 171’in ise 2-pirazolin halkası ve B halkası ile etkileştiği görülmektedir. Oysa bileşimiz, hMAO-A enzimindeki iki amino asitten sadece Phe 208 ile etkileşime girmektedir. Bu da

bileşimizimizin hMAO-A enzimiyle daha az etkileşime girerek hMAO-B seçici etki göstermesine neden olmaktadır. hMAO enziminin A ve B izoformlarının, dizilim kimliği açısından %70 oranında benzerlik gösterdiği düşünüldüğünde bağlanma ceplerinde sadece birkaç amino asitin farklı olduğu görülmektedir. hMAO-A ve hMAO-B enziminin bağlanma ceplerindeki amino asitlerinin farkı dikkate alınarak hMAO izoformlarına özgül inhibitörler tasarlanabilmektedir (27). Çalışmamızda, biyokimyasal verilerimizin moleküler modelleme sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Sentezi gerçekleştirilen bu orijinal bileşiğin MAO-B izoformunu seçici, tersinir ve yarışmalı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. SH2U bileşiği, bilinen MAO-B inhibitörü olan selejiline göre daha iyi bir inhibisyon gücüne ve seçiciliğe sahiptir. Bileşiğin MAO-B enzimi için Ki değeri $0.046 \pm 0.001 \mu\text{M}$ ve seçicilik indeksi değeri ise 272.83 olarak bulunmuştur. Selejilinin MAO-B enzimi için Ki değeri $0.31 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ve seçicilik indeksi değeri 56.45’dir. Diğer seçici MAO-B inhibitörü olan lazabemidin MAO-B enzimi için bulunan Ki değeri 0.005 ± 0.001 ve seçicilik indeksi 1308.00’dir. Lazabemidin SH2U bileşiğine göre daha seçici ve inhibisyon gücünün daha yüksek olduğu görülmektedir. SH2U bileşiğinin $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ ve $25 \mu\text{M}$ dozlarda toksik olmadığı gösterilmiştir.

Tüm bu sonuçlar SH2U bileşiğinin etkin bir MAO-B inhibitörü olduğunu ve Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi önemli nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek yeni bileşiklerin keşfi açısından ümit verici olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Boppana K, Dubey PK, Jagarlapudi SARP, Vadivelan S, Rambabu G. Knowledge based identification of MAO-B selective inhibitors using pharmacophore and structure based virtual screening models. *Eur J Med Chem*, 2009; 44: 3584-90.
2. Finberg JPM. Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacol Ther*, 2014; 143(2): 133-52.
3. Fioravanti R, Bolasco A, Manna F, Rossi F, Orallo F, Yanez M, et al. Synthesis and molecular modelling studies of prenylated pyrazolines as MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010; 20: 6479-82.
4. Joubert J, Foka GB, Repsold BP, Oliver DW, Kapp E, Malan SF. Synthesis and evaluation of 7-substituted coumarin derivatives as multimodal monoamine oxidase-B and cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer’s disease. *Eur J Med Chem*, 2017; 125: 853-64.

5. Mertens MD, Hinz S, Muller CE, Gutschow M. Alkynyl-coumarinyl ethers as MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2014; 22: 1916-28.
6. Secci D, Bolasco A, Carradori S, D'Ascenzio M, Nescatelli R, Yáñez M. Recent advances in the development of selective human MAO-B inhibitors: (Hetero)arylidene-(4-substituted-thiazol-2-yl)hydrazines. *Eur J Med Chem*, 2012; 58: 405-17.
7. Rojas RJ, Edmondson DE, Almos T, Scott R, Massari ME. Reversible and irreversible small molecule inhibitors of monoamine oxidase B (MAO-B) investigated by biophysical techniques. *Bioorg Med Chem*, 2015; 23: 770-78.
8. Gökhan-Kelekçi N, Yabanoglu S, Küpeli E, Salgın U, Özgen Ö, Ucar G, et al. A new therapeutic approach in Alzheimer disease: Some novel pyrazole derivatives as dual MAO-B inhibitors and antiinflammatory analgesics. *Bioorg Med Chem*, 2007; 15: 5775-86.
9. Gokhan-Kelekci N, Koyunoğlu S, Yabanoğlu S, Yelekci K, Ozgen Ö, Ucar G, et al. New pyrazoline bearing 4(3H)-quinazolinone inhibitors of monoamine oxidase: Synthesis, biological evaluation, and structural determinants of MAO-A and MAO-B selectivity. *Bioorg Med Chem*, 2009; 17: 675-89.
10. Li Y, Luo Y, Huang W, Wang J, Lu W. Total synthesis of mallotophilippen C. *Tetrahedron Lett*, 2006; 47: 4153-55.
11. Sato S, Akiya T, Nishizawa H, Suzuki T. Total synthesis of three naturally occurring 6,8-di-C-glycosylflavonoids: phloretin, naringenin, and apigenin bis-C-b-Dglucosides. *Carbohydr Res*, 2006; 341: 964-70.
12. Kamara BI, Manong DTL, Brandt, EV. Isolation and synthesis of a dimeric dihydrochalcone from *Agapanthus africanus*. *Phytochemistry*, 2005; 66: 1126-32.
13. Ali MA, Shaharyar M, Siddiqui AA. Synthesis, structural activity relationship and anti-tubercular activity of novel pyrazoline derivatives. *Eur J Med Chem*, 2007; 42: 268-75.
14. Anderson MC, Hasan F, Mc Crodden JM, Tipton KF. Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. *Neurochem Res*, 1993; 18: 1145-49.
15. Yáñez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F. Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 344: 688-95.
16. Chimenti F, Maccioni E, Secci D, Bolasco A, Chimenti P, Granese A, et al. Synthesis, stereochemical identification, and selective inhibitory activity against human monoamine oxidase-B of 2-methylcyclohexylidene-(4-arylthiazol-2-yl)hydrazones. *J Med Chem*, 2008; 51: 4874-80.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248-54.
18. Petzer A, Pienaar A, Petzer JP. The interactions of caffeine with monoamine oxidase. *Life Sci*, 2013; 93: 283-87.
19. Jayaprakash V, Yabanoglu S, Sinha BN, Ucar G. Pyrazoline-based mycobactin analogues as dual inhibitors of MAO/cholinesterase. *Turk J Biochem*, 2010; 35 (2): 91-98.
20. Mostert S, Petzer A, Petzer JP. Inhibition of monoamine oxidase by benzoxathiolone analogues. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016; 26: 1200-4.
21. Mathew A, Haridas A, Ucar G, Baysal I, Adebayo AA, Soliman MES, Joy M, Mathew GE, Lakshmanan B, Jayaprakash V. Exploration of chlorinated thienyl chalcones: A new class of monoamine oxidase-B inhibitors. *Int J Biol Macromol*, 2016; 91: 680-95.
22. Schoonen WG, de Roos JA, Westerink WM, Débiton E. Cytotoxic effects of 110 reference compounds on HepG2 cells and for 60 compounds on HeLa, ECC-1 and CHO cells. II mechanistic assays on NAD(P)H, ATP and DNA contents. *Toxicol In Vitro*, 2005; 19(4):491-503.
23. Miret S, Groene EM, Klaffke W. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. *J Biomol Screening*, 2006; 11(2): 184-93.
24. Wu, CF, Bertorelli R, Sacconi M, Pepeu G, Consolo, S. Decrease of brain acetylcholine release in aging freely-moving rats detected by microdialysis. *Neurobiol Aging*, 1988; 9(0): 357-61.
25. Evranos-Aksoz B, Yabanoğlu-Çiftçi S, Ucar G, Yelekci K, Ertan R. Synthesis of some novel hydrazone and 2-pyrazoline derivatives: Monoamine oxidase inhibitory activities and docking studies. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014; 24: 3278-84.
26. Evranos-Aksöz B, Baysal I, Yabanoğlu-Çiftçi S, Djikic T, Yelekçi K, Uçar G, et al. Synthesis and screening of human Monoamine oxidase-A. Inhibitor effect of new 2-pyrazoline and hydrazone derivatives. *Arch Pharm Chem Life Sci*, 2015; 348: 1-14.
27. Chen R, Xiao J, Ni Y, Xu HF, Zheng M, Tong X, Zhang TT, Liao C, Tang WJ. Novel tricyclic pyrazolo[1,5-d][1,4]benzoxazepin-5(6H)-one: Design, synthesis, model and use as hMAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2016; 24: 1741-48.
28. Fioravanti R, Bolasco A, Manna F, Rossi F, Orallo F, Yanez M, Vitali A, Ortuso F, Alcaro S. Synthesis and molecular modelling studies of prenylated pyrazolines as MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010; 20: 6479-82.