

**Atf İçin:** Türkan, F. ve Akil, K. (2024). Piperidin Halkası İçeren Bazı Moleküllerin Glutasyon S-Transferaz ve Kolinesteraz Enzimleri Üzerine Etkilerinin Teorik ve Deneysel Olarak İncelenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 14(2), 812-821.

**To Cite:** Türkan, F. & Akil, K. (2024). Theoretical and Experimental Investigation of the Effects of Some Molecules Containing Piperidine Ring on Glutathione S-Transferase and Cholinesterase Enzymes. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 14(2), 812-821.

### **Piperidin Halkası İçeren Bazı Moleküllerin Glutasyon S-Transferaz ve Kolinesteraz Enzimleri Üzerine Etkilerinin Teorik ve Deneysel Olarak İncelenmesi**

Fikret TÜRKAN<sup>1\*</sup>, Kübra AKİL<sup>2</sup>

#### **Öne Çıkanlar:**

- 1-(2-Furylmethyl) piperidine-3-carboxylic acidhydrochloride molekülünün BChE, AChE ve GST enzimi için etkin bir inhibitör olduğu ortaya çıkmıştır.
- 3-Chloro-4-(3,5-dimethyl-1-piperidinyl) aniline molekülünün BChE, AChE ve GST enzimleri için önemli bir inhibitör olduğu görülmüştür.
- 1-(2-Furylmethyl) piperidine-3-carboxylic acidhydrochloride GST enzimi için diğer molekül ve bilinen çoğu molekülden daha iyi bir inhibitör olarak gözlemlenmiştir.

#### **Anahtar Kelimeler:**

- İnhibisyon
- Moleküler doking
- Piperidin
- Kolinesteraz
- Glutasyon S-Transferaz

#### **ÖZET:**

Bu çalışmadaş bünyesinde piperidin halkası bulunduran 1-(2-Furylmethyl) piperidine-3-carboxylic acidhydrochloride (molekül 1), ve 3-Chloro-4-(3,5-dimethyl-1-piperidinyl) aniline (molekül 2) moleküllerinin asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) ve glutasyon s-transferaz (GST) enzimleri için inhibisyon etkileri incelendi. İnhibitörler için hem IC<sub>50</sub> hem de Ki çalışmaları yapıldı. Tüm moleküllerin her üç enzim için de iyi birer inhibitör olduğu bulundu. 2.9987±0.2555 Ki değeriyle AChE enzimi için, 1.9301±0.2563 Ki değeriyle de BChE enzimleri için molekül 2' nin etkin inhibitör olduğu bulundu. GST enzimi için ise en etkili inhibitör 4.217±0.3759 değeriyle molekül 1 tespit edilmiştir. Çalışmada etakrinik asit (EA) GST enziminin, takrin (TAC) ise kolinesteraz enzimlerinin pozitif inhibitörü olarak kullanıldı. Moleküllerin standartlardan daha etkin oldukları ve sonucuna ulaşıldı. Ayrıca moleküler doking yapılarak enzim inhibitör etkileşimi teorik olarak incelendi.

### **Theoretical and Experimental Investigation of the Effects of Some Molecules Containing Piperidine Ring on Glutathione S-Transferase and Cholinesterase Enzymes**

#### **Highlights:**

- It turns out that molecule 1-(2-Furylmethyl) piperidine-3-carboxylic acidhydrochloride is an effective inhibitor of BChE;AChE and GST enzyme.
- Molecule 3-Chloro-4-(3,5-dimethyl-1-piperidinyl) aniline has been shown to be a significant inhibitor of BChE, AChE and GST enzymes.
- 1-(2-Furylmethyl)piperidine-3-carboxylic acidhydrochloride has been observed to be a better inhibitor of the GST enzyme than other molecules and most known molecules.

#### **Keywords:**

- Inhibition
- Molecular docking
- Piperidine
- Cholinesterase
- Glutathione S-transferase

#### **ABSTRACT:**

In this study, the inhibition effects of aniline molecules of 1-(2-Furylmethyl) piperidine-3-carboxylic acid hydrochloride (molecule 1), and 3-Chloro-4-(3,5-dimethyl-1-piperidinyl) aniline (molecule 2), which contain piperidine ring, on the enzymes of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) and glutathione s-transferase (GST) were investigated. The studies of IC<sub>50</sub> and Ki were performed for the inhibitors. All the molecules were found to be good inhibitors for the three enzymes. Molecule 2 was detected to be an effective inhibitory with Ki values of 2.9987±0.2555 for the AChE enzyme and 1.9301±0.2563 for the BChE enzyme. Molecule 1 was found to be another effective molecule with a Ki value of 4.217±0.3759 for the GST enzyme. Ethacrynic acid (EA) and tacrine (TAC) were used as positive inhibitions for enzymes of GST and cholinesterases, respectively. The studied molecules were detected to be more effective compared to the standard compounds. Additionally, enzyme inhibitor interaction was examined theoretically by molecular docking.

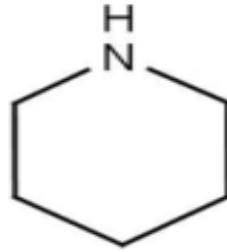
<sup>1\*</sup>Fikret TÜRKAN ([Orcid ID: 0000-0002-0538-3157](https://orcid.org/0000-0002-0538-3157)), İğdır Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, İğdır, Türkiye.

<sup>2</sup>Kübra AKİL ([Orcid ID:0009-0001-8144-3975](https://orcid.org/0009-0001-8144-3975)), Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye.

\***Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Fikret TÜRKAN, e-mail: fikret.turkan@gmail.com

## GİRİŞ

Piperidin halkası içeren moleküllerin toksik etkilerinin daha düşük olması ve bu moleküller biyolojik aktiviteyi artırmalarından dolayı ilaç endüstrisinde sıkça kullanılmaktadırlar( Łazewska ve ark., 2006; Łazewska ve ark., 2008). Açık hali  $C_5H_{11}N$  olan yapıda karakteristik kokuya sahip bir sıvıdır. İşlevselleştirilen piperidinler, doğal ürünlerde ayrıca anopterin, pergolin, skopolamin ve morfin gibi birçok aktif bileşikte en yaygın yapı taşlarından biridir (Buffat, 2004). Piperidin, periferik sinir sistemi üzerinde güçlü nikotin etkisi gibi etkiler gösterir ve ayrıca merkezi sinir sistemi eylemlerine sahip olduğu bilinir. Piperidinlerin davranış düzenlenmesi ve bazı sinirsel işlevlere hizmet etmesi gibi etkileri olan bir madde olduğu düşünülmektedir (Kasé, Kataoka, ve Miyata, 1967). Piperidin molekülleri yapısında azot bulunduran diğer heterosiklik moleküllerden farklı bir öneme sahiptirler. Gıda katkı maddesi olarak kullanılmalarının yanında bazı farmasötiklerin üretiminde de kullanılmaktadırlar. Ayrıca gıda hammaddelerin yapısında ve sebzelerde doğal olarak bulunabilen bir organik moleküldür (Neurath ve ark., 1977).



Şekil 1. Piperidin

Piperidin halkasını barındıran bileşiklerin antihiv, antikanser, antifungal, antibakteriyel gibi farmakolojik aktivitelerinin dışında klinikte kullanılan pek çok ilaç etken maddesinin ana iskeletini oluşturmaktadır. Bunun dışında bu halkayı barındıran paroksetin gibi antidepresan ilacın etken maddesinin ana iskeletini oluşturmaktadır. Endüstride ise katalizör, ara madde, sertleştirici, kompleks yapıcı ajan ve çözücü olarak da kullanılmaktadırlar (Abrunhosa-Thomas ve ark., 2013; Kaya, 2018).

Kolinesteraz enzimlerinin insan vücudunda iki çeşidi bulunmaktadır. Bunlar asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) ve bütirikolinesteraz (BChE; EC 3.1.1.8) enzimleridir (Shidore ve ark., 2016). Farklı kromozomlar tarafından kodlanan bu enzimler yaklaşık %65 civarında benzerlik gösterse de yetişkin bir bireyde AChE enzimi BChE enziminden daha fazla oranda bulunmaktadır. Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80'inden AChE enzimi sorumludur (Greig, 2001).

Asetilkolinesteraz enziminin vücuttaki görevleri, sinaps ve miyonöral kavşakta asetilkolinin çok hızlı hidrolizini gerçekleştirmektir; bu da sinir impulsunu sonlandırılarak gereksiz uyarılmaların önüne geçilmesini sağlar. 537 amino asit içeren bir polipeptitmonomer olan asetilkolinesteraz enzimi (AChE), bir saniye içinde 250000 asetilkolin molekülünü parçalayabilmektedir (Demir ve Türkan, 2022). Asetilkolinesteraz (AChE), sinir sisteminin en etkili enzimlerinden biridir ve kolinerjik norötransmisyonunda önemli bir rolü vardır (Umar ve Aisami, 2020).

Glutasyon S-transferazlar (GSTs) önemli antioksidan enzim grubundadır. Glutasyon S-transferazlar (GST'ler), faz II metabolizmasında yer alan mitokondriyal, sitozolik ve mikrozomal enzimlerdendir (Türkan ve Huyut, 2018). Bu enzimler hücreye toksik şekilde etki ederek hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran sitotoksik ajanları canlı organizmadan fizyolojik ve tıbbi olarak uzaklaştırması ve hücre için makromoleküllerin zarar görmemesi gibi büyük önemde rol oynarlar. GST genleri polimorfik özelliğe sahiptirler. Bu da enzimin aktivitesi ve miktarında değişiklikler göstermesine neden olur. Oksidatif stres; kanser, ateroskleroz, diyabet ve benzeri çeşitli hastalıkların

türemesine dolaylı olarak destek olabilmektedir. GST, oksidatif stresin oluşturduğu harabiyete karşı oluşmuş olan defans mekanizmalarındandır (Orhan, 2011).

Bütirilkolinesteraz (BChE) ve Asetilkolinesteraz (AChE) benzer bir yapıya sahiptirler fakat substrat özgülleri ve ACh'yi hidrolize edebilme kabiliyetleri noktasında farklıdırlar. BChE'nin asetilkolin hidroliz etme hızı, AChE'ninkinden daha yavaştır ve ACh'nin bozulmasına katkısı, AChE yokluğunda ikame olarak kullanılmasına neden olur. BChE karaciğerde üretilir. Süksinilkolin, aspirin, ksenobiyotikler, asetanilid ve açlık hormonu ghrelin dahil olmak üzere çeşitli maddelerin hidrolizinde bulunur (Gok, Cicek, Sari, ve Bodur, 2023). Bütirilkolinesterazın fizyolojik işlevi henüz tam öğrenilmemiştir. Butirilkolinesterazın atipik bir formu ya da aktivitesinin yokluğu, kas gevşetici suksametonyumun uygulanmasını takiben uzun süreli apneyeden olur (Allderdice ve ark., 1991). Butirilkolinesteraz gıda ve ilaçlardaki biyoaktif esterlerin metabolize edilmesine yardımcı olur (Brimijoin ve ark., 2016). BChE, düşük dozda organofosfor ve karbamatlı pestisitleri temizler ve böylece insanlara bu zehirlerin toksiklerden koruma sağlar. BChE'nin bu koruyucu görevi, pestisit uygulayıcılarının herhangi bir klinik zehirlenme belirtisi görülmeden BChE aktivitesini azaltabildiğinin bulunmasıyla açıklanmıştır (Lockridge ve Masson, 2000).

Literatürde bu enzimlerin inhibisyonu için ideal özelliklere sahip inhibitörlerin bulunmasına yönelik çalışmalarda farklı bileşik sınıflarından moleküller veya yeni hibrit moleküller kullanıldığı görülmektedir (Esmer, 2022). Bu moleküllerin AChE, BChE ve GST enzimleri üzerine inhibisyon etkileri hem teorik olarak hem de deneysel olarak ilk defa çalışılacaktır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çalışmalar için gerekli olan bütün malzemeler SigmaAldrichCompony'den temin edilmiştir. Çalışma boyunca laboratuvarında kullanılan kimyasallar, 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoik asit (DTNB), asetilkolinilyodat (AChI), trihidroksimetilaminometan (Tris), hidroklorik asit (HCl), Takrin, sodyum fosfat, EDTA, sodyum sitrat; 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB), etakrinik asit, potasyum fosfat dibazik (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Etilendiamintetra asetik asit (EDTA), Glutasyon (GSH), sodyum hidroksit (NaOH), etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), bütirilkolinilyodat (BChI). İnhibisyon çalışmasında kullanılan enzimler Asetilkolinesteraz enzimi (AChE), Glutasyon S-transferaz Enzimi (GST), bütirilkolinesteraz (BChE) SigmaAldrichCompony'den temin edilmiştir.

### İnhibitör çözeltilerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan inhibitörlerin hepsi (molekül 1, molekül 2) için 1mg tartıldı ve 1 ml etanolde çözüldü ve stok çözeltiler hazırlandı. Daha sonra her bir inhibitör için 100 µL alındı ve distile su ile 1000 µL'ye tamamlandı.

### Metot

#### AChE/BChE enziminin aktivite ölçümü

Kolinesteraz enzimlerinin aktivite ölçüm yöntemleri Ellman yöntemi ile sağlandı (Ellman ve ark., 1961). Bu enzimler asetilkolinin (ACh) tiyokoline hidrolizini katalize ederler. Tiyokolinin var olma formülü 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin ortaya çıkışının sebep olduğu sarı bir rengi türeten 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ve tiyokolinin tepkimesinin takibi ile sarı renge sahip olan anyonun oluşum oranı (renk şiddeti) 412 nm'de ölçülerek belirlenmektedir.

### GST enziminin aktivitesi ölçümü

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi, glutasyon molekülü ile aromatik bir elektrofilin birleşmesini katalize eder. CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen) en sık kullanılan aromatik elektrofildir. Bu substratın harcanmasıyla ortaya çıkan dinitrobenzen S-glutasyon (DNB-SG) son ürünü en yoğun 340 nm'de absorbanans göstermektedir. Bu sayede bahsettiğimiz dalga 26 boyundaki absorbanans artışını da kullanarak aktivite hesaplaması sağlanabilir. Belirtilen metot baz alınarak aktivite ölçümlerimizi yapabildik. Tüm toplam hacmin 1mL'i geçmeyeceği şekilde bir karışım aktivite ölçümü yapabilmek amacıyla hazırlandı. Bunun için kör olarak hazırlanan küvete 0.1 M 200 µl fosfat tamponu ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH:7.0) 25 mM 20 µl %95'lik CDNB (etanol içinde), 20 mM 50 µl GSH ve 730 µl saf su ilavesi gerçekleştirdik. Aktivite ölçümü yapılacak küvetlere ise 0.1 M 200 µl ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH:7.0) 25 mM 20 µl %95'lik CDNB (etanol içerisinde) ve 20 mM 50 µl GSH katıldı ve çalkalandı. Ardından enzim örneği 20 µl'lik olacak şekilde vakit kaybedilmeden dahil edildi. Sonrasında küvet spektrofotometreye konuldu ve okumaya geçildi. Tüm okumalar 3 dakika içerisinde 60 saniyede bir yapıldı. Elde edilen absorbanans değerleri hesaplandı ve not alındı (Habig ve ark., 1974).

### Moleküler kenetleme yöntemi

Bu moleküllerin moleküler yerleştirme skorlarını hesaplamak için Molecular Graphics Laboratory yazılım paketinin bir parçası olan AutoDock aracı kullanılmıştır. Izgara kutuları asetilkolinesteraz (AChE), bütirilkolinesteraz (BChE) ve glutasyon S-transferaz (GST) enzimlerinin tüm yüzeyini kapsayacak şekilde tanımlanmıştır. AChE (pdb kodu: 7XN1, 2.85 Å) ve GST (pdb kodu: 3DK9, 0.95 Å) ve BChE (pdb kodu: 4BDS, 2.10 Å) enzimlerinin 3 boyutlu x-ışını kristal yapısı, Protein Data Bank'dan pdb formatında elde edildi (Cetin ve ark., 2021). Proteinlerden su molekülleri uzaklaştırıldı, ardından polar hidrojen bağları eklenerek ve Kollman yükleri atanarak proteinler moleküler kenetleme işlemine hazır hale getirildi. Seçilen enzimlerin inhibitör ile kompleks halindeki yapıları Autodock Vina yazılımı kullanılarak hazırlandı (Huey ve ark., 2012). Seçilen moleküllerin 3 boyutlu yapıları Chemdraw Ultra 8.0 yazılımı ile çizildi. Bu moleküllerin 3 boyutlu yapıları sdf formatında kaydedildi. Çıktı dosyaları Babel-2.4.0 yazılımı kullanılarak pdb formatına dönüştürüldü ve pirazol moleküllerinin enerji minimizasyonu Avogadro yazılımı tarafından gerçekleştirildi ve pirazol moleküllerine hidrojen bağları eklendi ve Autodock 1.5.6 kullanılarak dönebilen bağlar ve Gasteiger yükleri atandı. Yazılım ve daha sonra pirazol molekülleri daha sonraki yerleştirme işlemleri için pdbqt'ye kaydedildi. Bağlanma ceplerinin koordinatları, seçilen her bir enzime özgü boyutlarla ayarlanmıştır. Docking simülasyonları için kullanılan parametreler 50 çalıştırma ve 300 popülasyon boyutunu içeriyordu. Kullanılan moleküler kenetleme için doğruluğunu ve güvenilirliğini doğrulamak için standart bir validasyon süreci uygulandı. Bu geçerlilik süreci, tanımlı bir protein-ligand kompleksi seti üzerinde yapılan kenetleme işlemlerinin sonuçlarını dikkatlice karşılaştırarak gerçekleştirildi. Enzim-pirazol molekülü komplekslerinin 2D ve 3D pozları BIOVIA Discovery Studio yazılımı kullanılarak görselleştirildi. Daha sonra, enzim-pirazol molekül komplekslerinin ligand verimlilikleri, bağlanma enerjileri, inhibisyon aktiviteleri, hidrojen bağları ve bağ uzunlukları AutoDock Tools yazılımı (sürüm 1.5.6) kullanılarak analiz edilmiştir (Trott ve Olson, 2010).

### BULGULAR VE TARTIŞMA

1-(2-Furylmethyl) piperidine-3-carboxylic acidhydrochloride (**molekül 1**), ve 3-Chloro-4-(3,5-dimethyl-1-piperidinyl) aniline (**molekül 2**) molekülleri inhibitör olarak kullanıldı. İnhibisyon çalışmaları tüm enzimler için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  olmak üzere iki basamakta gerçekleştirildi.

**Molekül 1'in** IC<sub>50</sub> değerleri AChE enzimi için 5.25 µM ve R<sup>2</sup> değeri 0.9438; BChE enzimi için 3.98 µM ve R<sup>2</sup> değeri 0.9928; GST enzimi için 4.78 µM ve R<sup>2</sup> değeri 0.9923 olarak bulundu. **Molekül 2'in** IC<sub>50</sub> değerleri AChE enzimi için 4.97 µM ve R<sup>2</sup> değeri 0.9917; BChE enzimi için 4.75 µM ve R<sup>2</sup> değeri 0.9728; GST enzimi için 4.39 µM ve R<sup>2</sup> değeri 0.9984 olarak bulundu. Kolinesteraz enzimleri için standart olarak Takrin (TAC) molekülü çalışıldı (Boy ve ark., 2021; Turan ve ark., 2021). IC<sub>50</sub> değerleri AChE için 5.87 µM ve R<sup>2</sup> değeri 0.9962; BChE enzimi için 6.02 µM ve R<sup>2</sup> değeri 0.974 olarak bulundu. GST enziminin standart inhibitörü olan Etakrinik Asit (EA) çalışıldı (Aydın, Yurtvermez, Şentürk, Kazaz, ve Çakır, 2019; Adnan Cetin ve ark., 2021) ve IC<sub>50</sub> değeri 4,05 µM ve R<sup>2</sup> değeri 0.9955 olarak bulundu (**Tablo 1**).

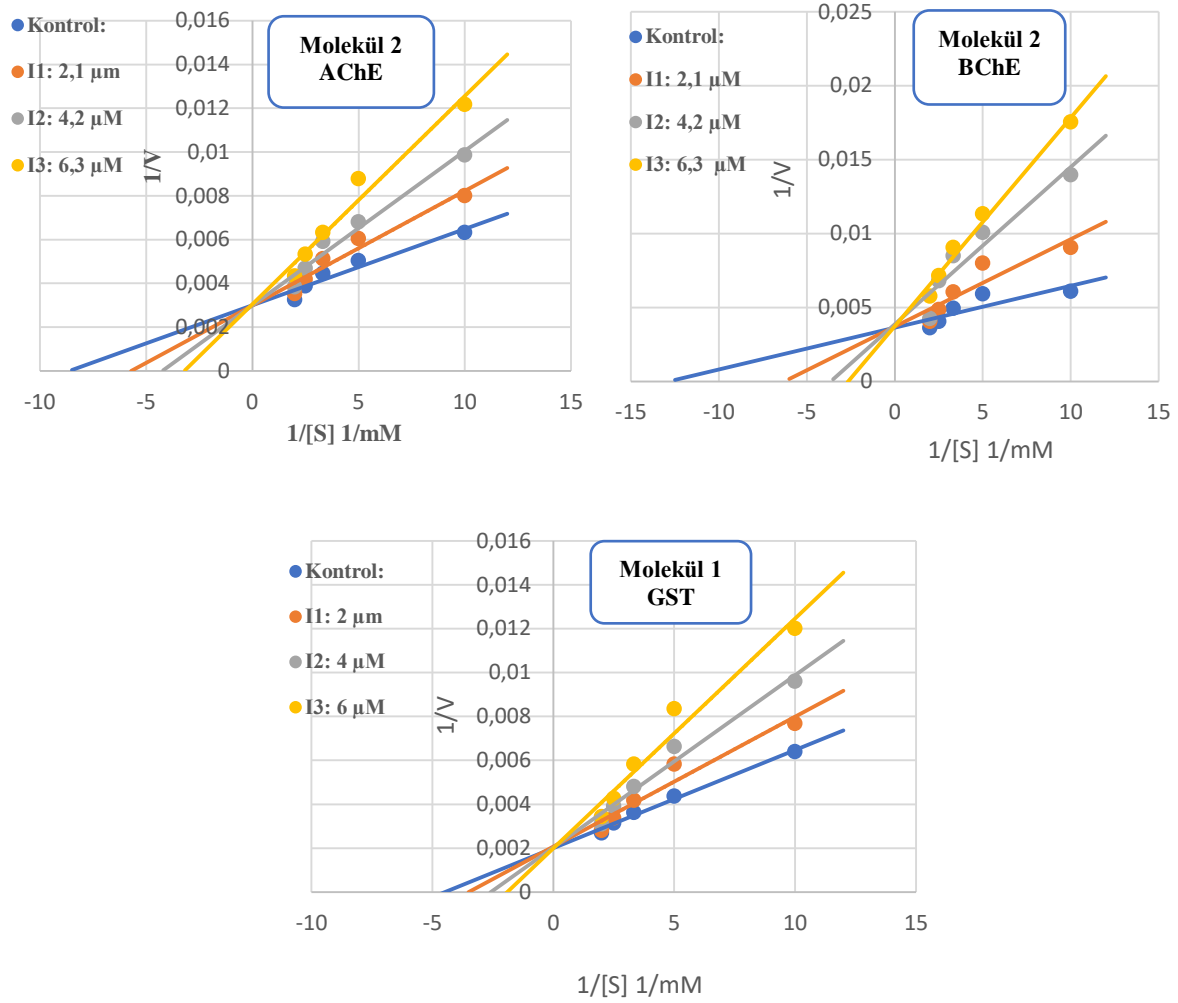
İnhibisyon çalışmasının ikinci basamağında AChE enzimi üzerine molekül 1 ve molekül 2'nin Ki değerleri 5.8517±1.2057 ve 2.9987±0.2555; BChE enzimi sonuçları 2.3637±0.7802 ve 1.9301±0.2563 olarak bulundu. Pozitif kontrol olarak Takrin molekülü çalışıldı ve sonuçlar sırasıyla 6.0973±1.6961 ve 2.564±0.05667 şeklinde belirlendi. Değerler incelendiğinde her iki molekülünde standarttan daha iyi birer inhibitör olduğu görülmektedir. GST enzimi üzerine moleküllerin Ki sonuçları ise sırasıyla 4.217±0.3759 ve 6.5307±0.8824 olarak bulundu. Her üç enzim için en iyi Ki değerini gösteren moleküllerin Lineweaver Burk grafikleri Şekil 2' de gösterilmiştir. Standart inhibitör olarak Etakrinik asit çalışıldı ve Ki değeri 5.9117±0.811 olarak bulundu. Molekül 1'in hem molekül 2' den hem de standart inhibitörden daha etkin olduğu görüldü. Tüm bulgular **tablo 1' de** verildi. Sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında sonuçlarımızla uyumlu mikromolar düzeyde inhibisyon sonuçlarının elde görülmektedir. Ayrıca çalışmalarda kullanılan pozitif kontrollerinde sonuçlarımızı desteklediği görülmektedir (Turkan ve ark., 2019a; Turkan ve ark., 2019b; Türkan ve ark., 2020; Turkan ve ark., 2021, Balcı ve ark., 2023).

**Tablo 1.** İnhibisyon Çalışma Bulguları

Moleküller	AChE			BChE			GST		
	IC <sub>50</sub> (µM)	R <sup>2</sup>	Ki (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	R <sup>2</sup>	Ki (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	R <sup>2</sup>	Ki (µM)
<b>Molekül 1</b>	5.25	0.9438	5.8517±1.2057	3.98	0.9928	2.3637±0.7802	4.78	0.9923	4.217±0.3759
<b>Molekül 2</b>	4.97	0.9917	2.9987±0.2555	4.75	0.9728	1.9301±0.2563	4.39	0.9984	6.5307±0.8824
<b>Takrin*</b>	5.87	0.9962	6.0973±1.6961	6.02	0.9740	2.564±0.05667	-	-	-
<b>Etakrinik asit**</b>	-	-	-	-	-	-	4.05	0.9955	5.9117±0.811

\*AChE ve BChE enzimlerinin standart inhibitör, \*\* GST enziminin standart inhibitörüdür.

Pirozol moleküllerini içeren ve AChE ile GST enzimleri içeren bir çalışmada yapılan inhibitör değerleri beklenen değerlerden daha standart çıkmıştır. Yapılan çalışma için Cetin ve ark. ikame edilmiş pirozol bileşikleri ile enzim inhibitör deneylerinin yeni ilaç araştırmalarında önemli bir araç olduğunu kanıtlamışlardır. İnhibitör maddelerin yeteri kadar bilinmemesi ve çalışmalarla ortaya çıkacak olması çalışmaların artırılmasının getirdiği zorunluluğu göstermektedir (Cetin ve ark., 2022). Glutatyon S-transferaz enzimleri endojen moleküller, kemoterapik ilaçlar, çevresel karsinojenler olmak üzere ksenobiyotiklerin geniş spektrumunu toksinlerinden ayırabilirler. Glutatyon transferazlar, belirli metabolitleri toksiklik miktarı daha minimal olan maddelere dönüşmesini katalize etmektedirler. Çoğunlukla detoksifikasyonla sonuçlanmış olan faz II reaksiyonları içerisinde organizmayı çok yoğun olan reaktif elektrofilik cisimlerin ataklarına karşı koruyan GST enzimleri yardımıyla gerçekleşen glutatyonun konjugasyon reaksiyonlarıdır. Bir çalışmada bazı antibiyotiklerin az miktarda olan dozlarda GST enzimini inhibe edebildiği sonucuna ulaşılmıştır. GST enzimi inhibasyon maddesinin çeşitliliğinin yeteri kadar bilinip bilinmediğini düşündürmektedir (Türkan ve Atalar, 2018).



Şekil 2. AChE, BChE ve GST enzimleri için en iyi inhibitörün Lineweaver Burk grafikleri

Sıçanlar ile ilgili yapılan bir çalışmada ise BChE'nin uzun süreli inhibisyonu ve ACh seviyesinin yükselmesi durumunda uzun vadeli güçlenme görülmüştür. Bu olgular aynı zamanda yaşlı sıçanların bilişsel yeteneklerini (labirente gezinebilme gibi) geliştirmiştir. Bu çalışmaya GST inhibisyon etkileri de eklenirse bu ve benzeri çalışmalar değişebilir (Greig ve ark., 2005). AChE inhibitörlerinin potansiyel bir kaynağı kesinlikle doğadaki bitkilerin bolluğu tarafından karşılanmaktadır ve bir çalışmada farklı bitkiler ele alınarak bilinen inhibitör sayısını artırmak istemiştir. Bu iletişimde çok sayıda bitki bileşeni ve AChE inhibitörleri olarak gelecek vaat eden bitki türleri rapor edilmiştir. Daha geniş araştırmalarla araştırılmayan bitkilerden de çok sayıda inhibitör elde edileceği düşüncesi netleşmiş ve daha çok araştırmaya yönelmemiz gerektiği de vurgulanmıştır (Mukherjee ve ark., 2007).

### Moleküler kenetleme çalışmaları

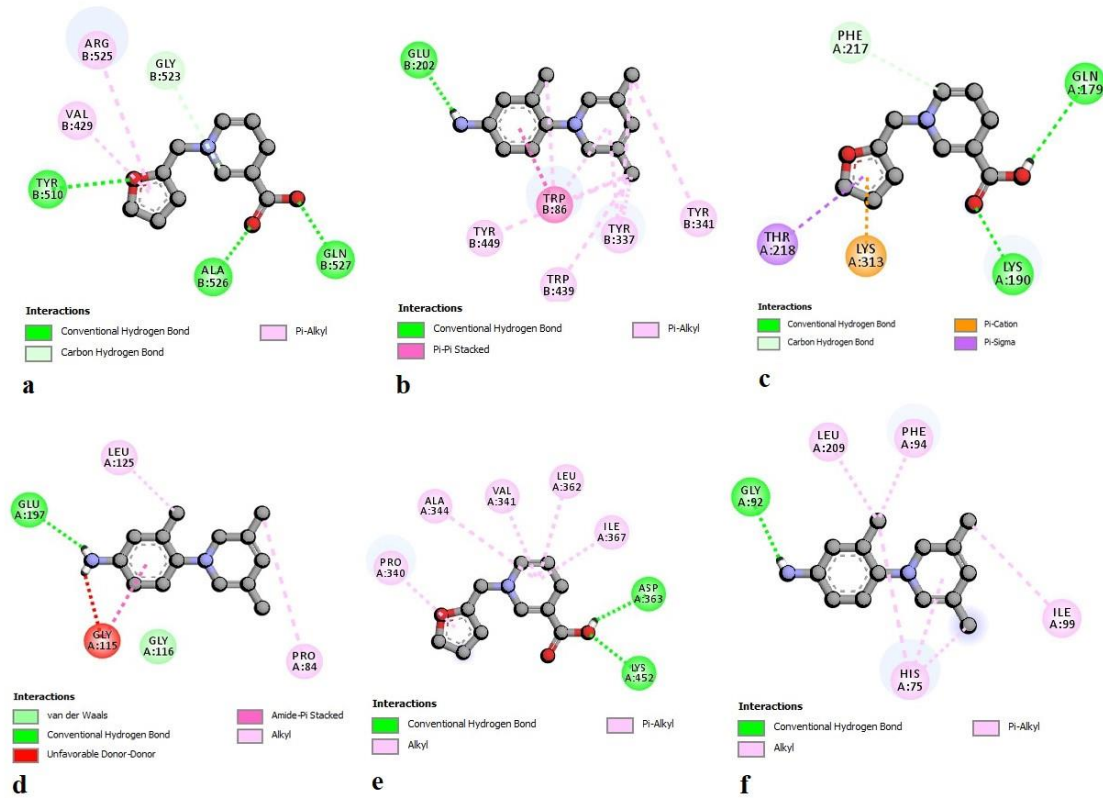
Moleküler kenetleme çalışmaları, ilaç keşfi ve geliştirme süreçlerinde kritik bir rol oynar. Bu yöntem, potansiyel ilaç moleküllerinin biyolojik hedeflerle nasıl etkileşime girebileceğini anlamamıza olanak tanır (Yuriev ve Ramsland, 2013). Ayrıca, biyolojik moleküller arasındaki etkileşimleri ve bağlanma modellerini anlamak için kullanılır. Bu sayede, hastalıkların temelinde yatan biyolojik süreçleri hedefleme ve yeni tedavilerin geliştirilmesi mümkün olur. Aynı zamanda, ilaç tasarımı ve optimizasyonunda da önemli bir araç olan moleküler kenetleme, daha etkin ve seçici ilaçların

geliştirilmesine de olanak sağlar. Bu nedenle, moleküler kenetleme çalışmaları, tıp ve biyoteknoloji alanlarında büyük bir öneme sahiptir. Bu yüzden bu moleküllerin üç farklı enzimle oluşturduğu komplekslerin bağlanma enerjileri ve etkileşimleri detaylı incelenmiştir. Tablo 1 de görüldüğü gibi, AChE ve Molekül 1/Molekül 2 bileşiklerinin oluşturduğu komplekslerin bağlanma enerjileri sırasıyla -5.7 ile -7.1 kcal/mol olarak ölçüldü. Sadece Molekül 2 kompleksi, standart ilaç olan Takrin ile (-6.4 kcal/mol) kıyaslandığında daha yüksek bir bağlanma enerjisine sahip olduğu belirlendi. Molekül 1 ve Molekül 2 bileşikleri, AChE amino asit kalıntıları Tyr510, Ala526 ve Glu202 ile konvansiyonel ve geleneksel hidrojen bağları oluşturdu (Şekil 1). Molekül 2 ve AChE kompleksi arasında oluşan amino asit kalıntısı Trp86 ile pi-pi stacked bağı gözlemlendi. Ayrıca, her iki kompleksin Val 429, Arg525, Gly523, Tyr449, Trp439, Tyr337, Tyr341 amino asit kalıntılarıyla alkil ve pi-alkil bağları yaptıkları belirlendi.

**Tablo 2.** Enzim ve Moleküllerin Komplekslerinin Bağlanma Enerjileri ve Moleküler Etkileşimleri

Kompleks	Bağlanma Afinitesi (kcal/mol)	Etkileşim türü	Etkileşen kalıntılar
AChE-1	-5.7	Konvansiyonel hidrojen, geleneksel hidrojen ve alkil bağları	Tyr510, Ala526, Gln527, Val 429, Arg525, Gly523
AChE-2	-7.1	Geleneksel hidrojen, pi-pi stacked ve pi-alkil bağları	Glu202, Trp86, Tyr449, Trp439, Tyr337, Tyr341
BChE-1	-5.2	Konvansiyonel hidrojen, Karbon hidrojen, pi-kasyon ve pi-sigma bağları	Gln179, Phe217, Lys313, Lys190, Thr218
BChE-2	-6.1	Van der Waals, Konvansiyonel hidrojen, amide-pi stacked ve alkil bağları	Gly116, Glu197, Gly115, Pro84, Leu125
GST-1	-6.4	Konvansiyonel hidrojen, pi-alkil ve alkil bağları	Asp363, Lys452, Ile367, Leu362, Val341, Ala344, Pro340
GST-2	-6.6	Konvansiyonel hidrojen, pi-alkil ve alkil bağları	Gly92, Phe94, Leu209, His75, Ile99

BChE ve Molekül 1/Molekül 2 bileşiklerinin oluşturduğu komplekslerin bağlanma enerjileri sırasıyla -5.2 ile -6.1 kcal/mol olarak ölçüldü. Her iki bileşiğin enzimle oluşturduğu komplekslerin bağlanma enerjileri Takrin ile (-7.0 kcal/mol) kıyaslandığında daha düşük bir bağlanma enerjisine sahip olduğu tespit edildi. Molekül 1 bileşiği, BChE amino asit kalıntıları Gln179, Phe217, Lys313 ile konvansiyonel ve karbon hidrojen bağları oluşturdu. Lys190 ve Thr218 amino asit kalıntılarının Molekül 1 ile pi-sigma ve pi-kasyon bağları yaptığı belirlendi. Molekül 2 ve BChE kompleksi içinde yer alan amino asit Gly116 ile Van der Waals bağı gözlemlendi. GST ve her iki bileşik komplekslerinin bağlanma enerjileri sırasıyla -6.4 ile -6.6 kcal/mol olarak ölçüldü. Molekül 2-GST enzim kompleksi, Molekül 1-GST enzim kompleksinden daha yüksek bir bağlanma enerjisine sahipti. Ancak, standart ilaç olarak Etakrinik asitin (-7.2 kcal/mol) bağlanma enerjisinden daha düşük olduğu belirlendi. Molekül 1 ve Molekül 2 bileşikleri, GST amino asit kalıntıları Asp363 ve Gly92 ile konvansiyonel hidrojen bağları oluştururken, GST amino asit kalıntıları Lys452, Ile367, Leu362, Val341, Ala344, Pro340 ve Phe94, Leu209, His75, Ile99 ile pi-alkil ve alkil bağları kurdu. Deneysel inhibisyon sonuçları ile moleküler kenetleme sonuçlarını karşılaştırdığımızda, elde ettiğimiz bulguların birbirine çok benzeyen özellikler taşıdığı görülmektedir. Örneğin, moleküllerin IC<sub>50</sub> ve Ki değerleri hem birbirine yakın hem de standart bileşiklerden daha düşüktür. Benzer şekilde, moleküler kenetlemede bağlanma enerjileri de bu deneysel sonuçlarla uyumlu olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlar hem deneysel verileri doğrulamakta hem de moleküler kenetleme yönteminin güvenilirliğini desteklemektedir.



Şekil 3. Moleküllerin ve Enzimlerin 3D Etkileşim Diyagramı: a) AChE-Molekül 1 b) AChE-Molekül 2 c) BChE-Molekül 1 d) BChE-Molekül 2 e) GST-Molekül 1 f) GST-Molekül 2

## SONUÇ

Piperidin halkası içeren 1-(2-Furylmethyl) piperidine-3-carboxylic acidhydrochloride (molekül 1), ve 3-Chloro-4-(3,5-dimethyl-1-piperidinyl) aniline (molekül 2) moleküllerinin hem kolinesteraz enzimleri hem de glutatyon s-transferaz enzimi için iyi birer inhibitör olduğu bulundu. Tüm moleküllerin standart inhibitörlerden daha etkin olduğu görüldü. GST enzimi için molekül 1, kolinesteraz enzimleri için molekül 2'nin daha etkin inhibitör oldukları bulundu. Bu moleküller için in vivo çalışmalar ve gerekli diğer faz çalışmaları yapılarak alternatif ilaç olarak piyasaya sunulmasını önerebiliriz.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın deneysel kısmı Iğdır Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim

## Yazar Katkısı

Yazarların makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederim.

## KAYNAKLAR

Abrunhosa-Thomas, I., Plas, A., Vogrig, A., Kandepedu, N., Chalard, P., ve Troin, Y. (2013). Access to 2, 6-disubstituted piperidines: control of the diastereoselectivity, scope, and limitations. applications to the stereoselective synthesis of (-)-solenopsine A and alkaloid (+)-241D. *The Journal of Organic Chemistry*, 78(6), 2511-2526.



- Allderdice, P., Gardner, H., Galutira, D., Lockridge, O., Ladu, B. N., ve McAlpine, P. (1991). The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics*, 11(2), 452-454.
- Aydın, T., Yurtvermez, B., Şentürk, M., Kazaz, C., ve Çakır, A. (2019). Inhibitory effects of metabolites isolated from *Artemisia dracunculus* L. against the human carbonic anhydrase I (hCA I) and II (hCA II). *Records of Natural Products*, 13(3), 225.
- Balcı, N., Çelik, H., Türkan, F., Çelebioğlu, N., Çelik, T., ve Bursal, E. (2023). Schiff Base Synthesis with a New Reliable Method and Investigation of Their Inhibition Effects on Glutathione S-Transferase and Cholinesterase Enzymes. *ChemistrySelect*, 8(18), e202204566.
- Boy, S., Türkan, F., Beytur, M., Aras, A., Akyıldırım, O., Karaman, H. S., ve Yüksek, H. (2021). Synthesis, design, and assessment of novel morpholine-derived Mannich bases as multifunctional agents for the potential enzyme inhibitory properties including docking study. *Bioorganic Chemistry*, 107, 104524.
- Brimijoin, S., Chen, V. P., Pang, Y.-P., Geng, L., ve Gao, Y. (2016). Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. *Chemico-biological interactions*, 259, 271-275.
- Buffat, M. G. (2004). Synthesis of piperidines. *Tetrahedron*, 60(8), 1701-1729.
- Cetin, A., Bursal, E., ve Türkan, F. (2021). 2-methylindole analogs as cholinesterases and glutathione S-transferase inhibitors: Synthesis, biological evaluation, molecular docking, and pharmacokinetic studies. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(12), 103449.
- Cetin, A., Oguz, E., ve Türkan, F. (2022). In Silico and In Vitro Analysis of Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferase Enzymes of Substituted Pyrazoles. *Russian Journal of General Chemistry*, 92(11), 2415-2428.
- Demir, Z., ve Türkan, F. (2022). Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz Enzimlerinin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 12(4), 2386-2395.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., ve Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Esmer, Y. İ. (2022). Bazı yeni hidrazon bileşiklerinin sentezi, karakterizasyonu ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü,
- Gok, M., Cicek, C., Sari, S., ve Bodur, E. (2023). Novel activity of human BChE: Lipid hydrolysis. *Biochimie*, 204, 127-135.
- Greig, N. (2001). Utsuki 1T, Yu QS, Zhu XX, Holloway HW, Perry TA, Lee B, Ingram DK, Lahiri DK: A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin*, 17, 159-165.
- Greig, N. H., Utsuki, T., Ingram, D. K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., . . . Giordano, T. (2005). Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 17213-17218.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., ve Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Huey, R., Morris, G. M., ve Forli, S. (2012). Using AutoDock 4 and AutoDock vina with AutoDockTools: a tutorial. *The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory*, 10550(92037), 1000.
- Kasé, Y., Kataoka, M., ve Miyata, T. (1967). In vitro production of piperidine from pipercolic acid in the presence of brain tissue. *Life Sciences*, 6(22), 2427-2431.
- Kaya, C. (2018). Bazı piperidin türevi bileşiklerin sentezi ve olası antidepresan etkilerinin incelenmesi. Anadolu University (Turkey),
- Łażewska, D., Kuder, K., Ligneau, X., Schwartz, J.-C., Schunack, W., Stark, H., ve Kieć-Kononowicz, K. (2008). Piperidine variations in search for non-imidazole histamine H3 receptor ligands. *Bioorganic ve medicinal chemistry*, 16(18), 8729-8736.
- Łażewska, D., Ligneau, X., Schwartz, J.-C., Schunack, W., Stark, H., ve Kieć-Kononowicz, K. (2006). Ether derivatives of 3-piperidinopropan-1-ol as non-imidazole histamine H3 receptor antagonists. *Bioorganic ve medicinal chemistry*, 14(10), 3522-3529.

- Lockridge, O., ve Masson, P. (2000). Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*, 21(1-2), 113-126.
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., ve Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289-300.
- Neurath, G., Dünger, M., Pein, F., Ambrosius, D., ve Schreiber, O. (1977). Primary and secondary amines in the human environment. *Food and Cosmetics Toxicology*, 15(4), 275-282.
- Orhan, O. (2011). Glutatyon S-transferaz gen polimorfizmi ve gestasyonel diabetes mellitus ile ilişkisi. Bursa Uludag University (Turkey).
- Trott, O., ve Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Turan, N., Buldurun, K., Adiguzel, R., Aras, A., Turkan, F., ve Bursal, E. (2021). Investigation of spectroscopic, thermal, and biological properties of FeII, CoII, ZnII, and RuII complexes derived from azo dye ligand. *Journal of Molecular Structure*, 1244, 130989.
- Turkan, F., Cetin, A., Taslimi, P., Karaman, H. S., ve Gulçin, İ. (2019a). Synthesis, characterization, molecular docking and biological activities of novel pyrazoline derivatives. *Archiv Der Pharmazie*, 352(6), 1800359.
- Turkan, F., Cetin, A., Taslimi, P., Karaman, M., ve Gulçin, İ. (2019b). Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel pyrazole derivatives as potent carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 86, 420-427.
- Türkan, F., ve Atalar, M. N. (2018). Glutatyon S-Transferaz Enzim Aktivitesi Üzerine Amoksilin ve Vankomisin Hidroklorid Hidratın Etkisi: Bir in vitro çalışma. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 8(2), 141-148.
- Türkan, F., Calimli, M. H., Kanberoğlu, G. S., ve Karaman, M. (2021). Inhibition effects of isoproterenol, chlorpromazine, carbamazepine, tamoxifen drugs on glutathione S-transferase, cholinesterases enzymes and molecular docking studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3277-3284.
- Türkan, F., ve Huyut, Z. (2018). Inhibition behaviour of some antibiotics on glutathione S-transferase and acetyl cholinesterase activities: in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Neuroscience ve Oxidative Stress*, 10(2).
- Türkan, F., Huyut, Z., Taslimi, P., Huyut, M. T., ve Gülçin, İ. (2020). Investigation of the effects of cephalosporin antibiotics on glutathione S-transferase activity in different tissues of rats in vivo conditions in order to drug development research. *Drug and chemical toxicology*, 43(4), 423-428.
- Umar, A. M., ve Aisami, A. (2020). Acetylcholinesterase enzyme (AChE) as a biosensor and biomarker for pesticides: A mini review. *Bulletin of Environmental Science and Sustainable Management (e-ISSN 2716-5353)*, 4(1), 7-12.
- Yuriev, E., ve Ramsland, P. A. (2013). Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *Journal of Molecular Recognition*, 26(5), 215-239.