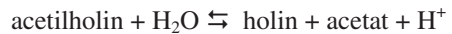


Ispitivanje inhibitorne aktivnosti odabranih derivata piperazina na aktivnost acetilholinesteraze T i H tipa

Acetilholinesteraza je enzim koji katalizuje reakciju hidrolize neurotransmitera acetilholina na acetat i holin. Kod velike grupe oboljenja koje u osnovi imaju poremećaj u normalnom funkcionisanju nervne sinapse dolazi do smanjene neurotransmisije posredovane acetilholinom, te je potrebno inhibicijom acetilholinesteraze omogućiti dužu stimulaciju receptora. U ovom radu je ispitivan uticaj šest derivata piperazina, strukturno sličnih poznatim inhibitorima, na aktivnost acetilholinesteraze T i H tipa. Piperazin i pojedini njegovi derivati koriste se kao prekursori u sintezi nekih poznatih inhibitora, te je poznavanje njihovih uticaja na aktivnost enzima od velikog značaja za optimizaciju i pojednostavljenje sinteze. Molekulskim dokingom pretpostavljena je jačina i mesto vezivanja derivata za acetilholinesterazu, kao i vrste interakcija derivata sa okolnim aminokiselinama. Eksperimentalni rezultati potvrdili su predikcije doking analize, prema kojoj derivat 2 smanjuje aktivnost acetilholinesteraze 70%. Ispitan je i uticaj različitih funkcionalnih grupa i dužine niza na aktivnost enzima i upoređena je aktivnost acetilholinesteraze T i H tipa koje se razlikuju po modifikacijama nastalim alternativnim splajsovanjem, kao i po biološkoj ulozi u organizmu. Povezivanjem dobijenih rezultata sa poznatim protokolima sinteza, kao i daljim ispitivanjima derivata 2, bilo bi moguće razviti novi pristup lečenju velike grupe bolesti, kao i poboljšavati njihovu terapiju.

Uvod

Acetilholinesteraza (AChE) je serin hidrolaza koja pripada grupi esteraza viših eukariota. Jedna od bioloških uloga AChE jeste prekid impulsa u holinergičkoj sinapsi neurona koja se postiže brзом hidrolizom neurotransmitera acetilholina do acetata i holina:



AChE ima visoku specifičnu katalitičku aktivnost, a svaki molekul AChE degradira oko 25000 molekula acetilholina u sekundi, što ga čini jednim od najefikasnijih poznatih enzima (Soreq i Seidman 2001). Poznata su tri tipa AChE: T, H i R.

T-AChE (engl. tail) je glavna forma koja se dominantno nalazi u moždanom i mišićnom tkivu. Acetilholin se oslobađa iz presinaptičkog neurona u sinaptičku pukotinu tokom transmisije i vezuje za acetilholinske receptore na postsinaptičkoj membrani, prenoseći signal iz neurona. T-AChE, locirane na postsinaptičkoj membrani neurona, završavaju signalnu transmisiju hidrolizujući acetilholin. Oslobodeni holin transportuje se u presinaptički neuron i koristi se za ponovnu sintezu acetilholina aktivnošću holinacetiltransferaze.

H-AChE (engl. hydrophobic) je druga forma, nastala alternativnim isecanjem i eksprimirana je primarno u nekim hematopoetskim ćelijama, a

Anđela Petrović (2000), Beograd, učenica 4. razreda XIII beogradske gimnazije

MENTORSTVO:

Nikola Mitović, student Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Katarina Tomić, studentkinja Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Ivona Biočanin, studentkinja Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ne u tkivima koja su direktno inervisana holinergičkim neuronima. Od T-AChE se razlikuje po svom C-terminusu, koji sadrži glukozilfosfatidilinozitol (GPI) zahvaljujući kom se usidrava na membrane eritrocita.

Treća forma, R-AChE (engl. read through) je pronađena samo kod nekih vrsta raža i miševa, iako se pretpostavlja da je rasprostranjenija. Smatra se da ima ulogu u odgovoru na stres i inflamaciju (Nazim *et al.* 2017).

AChE je monomerni molekul, molekulske mase oko 60 kDa, koji se sastoji od 12 nabranih β -ploča, okruženih sa 14 α -heliksa. Poznato je nekoliko domena: aromatično „grlo”, katalitički aktivno mesto i periferno anjonsko mesto. Katalitički aktivno mesto se sastoji od dve podjedinice: esterazne podjedinice koja sadrži katalitičku trijadu sastavljenu od tri aminokiseline (Ser200, His440 i Glu327) i anjonsku podjedinicu, koja vezuje pozitivno naelektrisan kvaternarni amin holinske grupe acetilholina (Lockridge *et al.* 1987) Periferno anjonsko mesto ima važnu ulogu u prepoznavanju konformacija rezidua u katalitičkom mestu i aromatičnom „grlu”. Reakcija hidrolize karboksilnih estara dovodi do formiranja acil-enzima i slobodnog holina. Acil-enzim potom podleže nukleofilnom napadu od strane molekula H_2O , na histidinu 440, oslobađajući sircetnu kiselinu i regenerišući slobodni enzim (Massoulié i Bon 1982).

Dijagnostički i klinički značaj AChE je veoma veliki. Farmakološki inhibitori AChE su važni za kontrolu bolesti kod kojih je neurotransmisija posredovana acetilholinom ometena. Povećana ekspresija AChE uočena je kod nekih vrsta leukemije (Soreq i Seidman 2001), kao i u Grafovima folikulima tokom sazrevanja folikula i ovulacije, što ukazuje na njenu regulatornu ulogu u procesu apoptoze. Ekspresija AChE u mozgu tokom embriogeneze ukazuje da AChE najverovatnije učestvuje u regulaciji rasta neurona i sinaptogenezi. Takođe, zapažen je uticaj AChE na aktivaciju dopaminskih receptora i adheziju ćelija (Nordberg i Svensson 1998). Od posebnog značaja jeste i uloga AChE u ranim stadijumima formiranja amiloidnih plaka kod Alchajmerove bolesti. Tokom Alchajmerove bolesti dolazi do selektivnog gubitka holinergičkih neurona u mozgu, dok kod autoimunskog oboljenja *myas-*

thenia gravis autoantitela dovode do redukcije nikotinskih acetilholinskih receptora na nervno-mišićnoj sinapsi. Inhibicija AChE povećava koncentraciju acetilholina u sinaptičkoj pukotini i omogućava dužu stimulaciju receptora, a time i umanjenje simptome ovih bolesti.

Reverzibilni inhibitori AChE poput donepezila, rivastigmina i galantamina se primenjuju kao terpaija za simptome Alchajmerove bolesti i povećavaju transmisiju holinergičkih neurona u mozgu, nadoknađujući gubitak funkcionalnih ćelija mozga. Pored Alchajmerove bolesti, koriste se i u terapiji simptoma neuroloških poremećaja kao što su *myasthenia gravis*, Parkinsonova bolest i demencija sa Levijevim telima, kao i u prevenciji intoksikacije nervnim otrovima (Giacobini 2004). Karbamatni reverzibilni inhibitori AChE su toksični i koriste se kao insekticidi, fungicidi i herbicidi. Ireverzibilni inhibitori AChE, kao što su organofosfatni nervni agensi, pokazuju toksičnu aktivnost koja se ogleda u akumulaciji acetilholina u sinaptičkoj pukotini i poremećaju neurotransmisije (Chaudhary *et al.* 2006). Sintetički inhibitori acetilholinesteraze, na primer prdonepezil, ispoljavaju neželjene efekte kao što su hepatotoksičnost i gastrointestinalne tegobe. Veoma je teško razviti inhibitore koji bi delovali u mozgu bez efekta na druge organe ili biohemijske procese.

Piperazini su prekursori za sintezu mnogih poznatih inhibitora AChE. Oni su široka klasa jedinjenja koja se sastoji iz piperazinskog šestočlanog prstena koji sadrži dva atoma azota na suprotnim stranama prstena. Piperazin se javlja u obliku malih higroskopskih kristala slanog ukusa, i dobro je rastvoran u vodi i etilen glikolu. Iako su prekursori za sintezu inhibitora AChE, prema našim saznanjima, u literaturi nema podataka o njihovoj inhibitornoj aktivnosti kada je ovaj enzim u pitanju. Zbog toga, cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi kako različiti derivati piperazina utiču na aktivnost AChE T i H tipa. Doking analizom moguće je predvideti jačinu i mesto vezivanja, kao i uticaj različitih funkcionalnih grupa na interakciju sa okolnim aminokiselinama te dobijene rezultate proveriti eksperimentalno, proverom relativne aktivnosti T i H-AChE u prisustvu ispitivanih derivata.

Materijal i metode

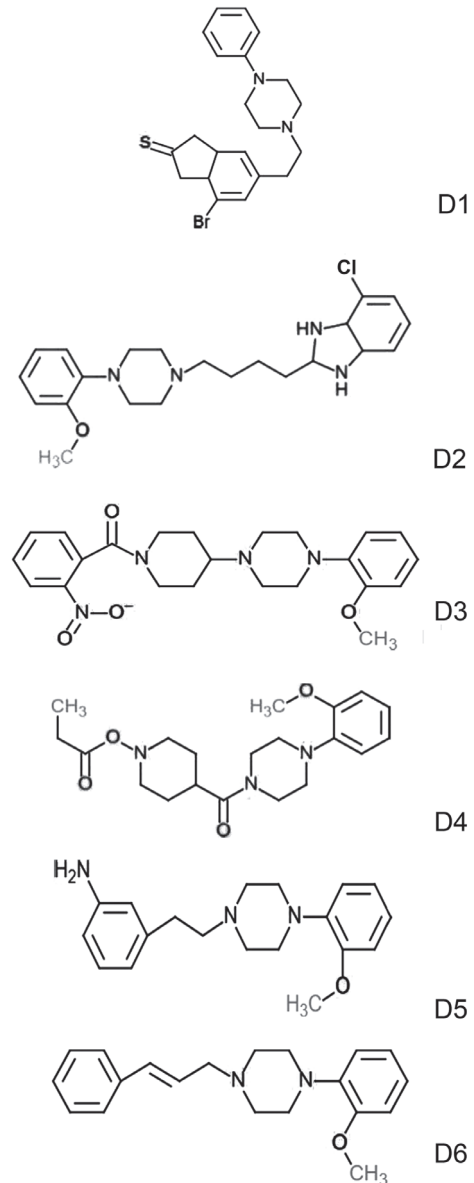
Za predviđanje jačine vezivanja odabranih derivata za AChE izvedena je *in silico* doking analiza koja uzima u obzir fizičke i hemijske osobine derivata i njihovu interakciju sa AChE. Kao izvor T i H AChE korišćeni su goveđi uzorci za pripremu krvne suspenzije u 0.1 M fosfatnom puferu pH 8 i izolovani su proteini iz moždanog tkiva. Derivati piperazina korišćeni su u vidu 70 μ M rastvora u dimetilsulfoksidu (DMSO). Relativna aktivnost T i H tipa acetilholinesteraze u pomenutim ekstraktima određena je Ellmanovim esejem.

Molekulska doking analiza. Doking analizom se uz pomoć računarskih modela predviđa interakcija proteina i njegovih potencijalnih liganda, na osnovu poznatih fizičkih i hemijskih osobina ispitivanih molekula. Za ispitivanje jačine vezivanja derivata piperazina za aktivno mesto AChE korišćen je program Schrödinger Glide (Friesner *et al.* 2006).

Derivati piperazina. Strukture korišćenih derivata piperazina prikazane su na slici 1. Derivati su izabrani na osnovu sličnosti sa prekursorima u sintezi poznatih inhibitora AChE. Međusobno se razlikuju po dužini alkil niza ili po funkcionalnoj grupi, tako da se rezultati mogu lakše analizirati i povezati sa njihovim fizičko-hemijskim osobinama. Nabavljeni su u vidu čistih supstanci, ljubaznošću prof. Deane Andrić sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Priprema enzimskih ekstrakata. Kao izvor T-AChE korišćen je goveđi mozak koji je nakon izolacije čuvan na ledu. Za izvor H-AChE korišćena je krv iste životinje, a uzorci su takode čuvani na ledu. Moždano tkivo je homogenizovano u kuhinjskom blenderu, u 0.1 M fosfatnom puferu pH 8, u odnosu 1:50 (w/v). Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 10000 rpm na 4°C, nakon čega je izdvojen supernatant. Supernatant je do merenja aktivnosti AChE čuvan na ledu. Krvna suspenzija pripremljena je u 0.1 M fosfatnom puferu pH 8, u odnosu 1:600 (v/v).

Određivanje aktivnosti AChE. Za određivanje aktivnosti T-AChE u prisustvu derivata piperazina, 0.4 mL homogenata moždanog tkiva dodato je u epruvetu koja sadrži 2.6 mL 0.1 M fosfatnog pufera pH 8. Derivati piperazina dodati



Slika 1. Ispitivani derivati piperazina

Figure 1. Tested derivatives of piperazine

su u vidu 20 μ L 70 μ M rastvora u dimetilsulfoksidu (DMSO), nakon čega je dodato je DTNB (5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina)) u vidu Ellmanovog reagensa (DTNB, NaHCO₃, fosfatni pufer). Epruvete su potom inkubirane na 15 min

na 37°C. Neposredno pred očitavanje apsorbance, dodato je 20 µL 200 mM rastvora acetiltioholin jodida kao supstrata. Apsorbanca je merena na 412 nm, na svakih 10 s u intervalu od 3 min. Aktivnost H-AChE u prisustvu različitih derivata piperazina određena je dodavanjem 25 µL Ellmanovog reagensa i 20 µL 70 µM rastvora derivata piperazina u 3 mL prethodno napravljene krvne suspenzije. Nakon inkubacije u trajanju od 15 min na 37°C, u kivetu je direktno pre očitavanja apsorbance dodato 20 µL 200 mM rastvora acetiltioholin jodida. Promena apsorbance merena je na 412 nm, na svakih 10 s u intervalu od 6 min, tj. u vremenskom intervalu u kojem se očekuje da se potroši sav supstrat (Ellman *et al.* 1961). Relativna aktivnost, izražena u procentima, računata je po sledećoj formuli:

$$\text{Aktivnost} = \frac{\Delta A_u}{\Delta A_k} \times 100$$

gde je: ΔA_u – promena apsorbance uzorka, a ΔA_k – promena apsorbance kontrole

Rezultati

Molekulska doking analiza

U tabeli 1 prikazane su programom predviđene jačine vezivanja derivata za AChE, na osnovu fizičko-hemijskih osobina derivata i enzima, takve da je vezivanje jače što je broj negativniji.

Tabela 1. Predviđene jačine vezivanja ispitivanih derivata za AChE

Derivat	Energija veze (kcal/mol)
Derivat 1	-3.97
Derivat 2	-4.98
Derivat 3	-3.57
Derivat 4	-3.89
Derivat 5	-3.89
Derivat 6	-4.63

Na slici 2 prikazane su predviđene interakcije AChE i derivata piperazina. Dijagrami prikazuju

Slika 2 (naspramna strana). Predviđene interakcije AChE i ispitivanih derivata.

Dodatne oznake:

H-b – vodonična veza,

π - π – pi-pi steking interakcija,

+ – pozitivno naelektrisano,

- – negativno naelektrisano,

l – nepolarno, *p* – polarno,

s – izloženost rastvaraču.

Figure 2 (opposite page). Predicted interactions of AChE and tested derivatives.

H-b – hydrogen bond,

π - π – pi-pi stacking interaction,

+ – positive charged,

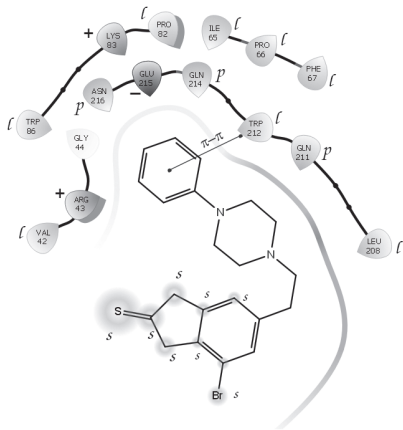
- – negative charged,

l – nonpolar, *p* – polar,

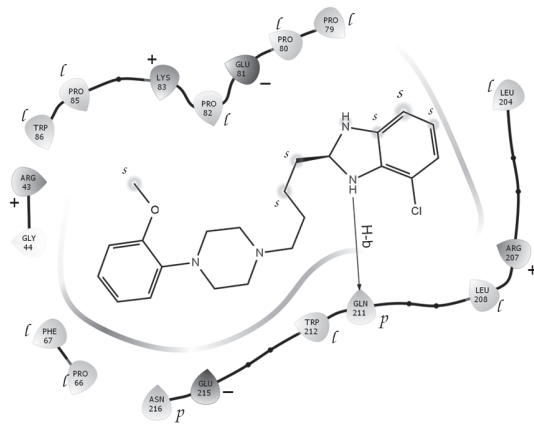
s – solvent exposure.

potencijalni položaji derivata, kao i interakcije derivata, aminokiselina i okruženja.

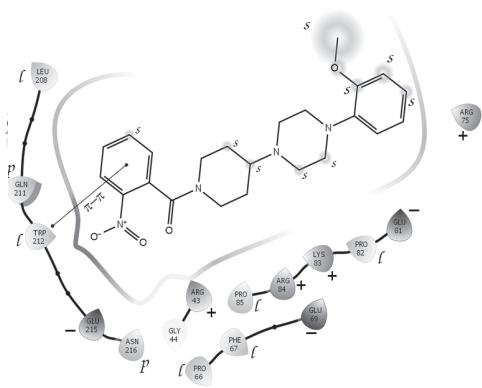
Za derivat 1 (dijagram 2A) je doking analizom predviđeno da sa okolnim aminokiselinama interaguje samo polovinom na kojoj su benzenski i piperazinski prsten, tako da benzenski prsten derivata interaguje steking interakcijama sa benzenskim prestenom na Trp212. Usled konformacije molekula drugi deo derivata nije dostupan enzimu već samo rastvaraču. Za derivat 2 (dijagram 2B) predviđeno je da skoro celom svojom strukturom bude okružen aminokiselinama, odnosno da okružuje aktivno mesto bez izlaganja rastvaraču. Između benzenskog prstena i Leu204 prisutne su hidrofobne interakcije, dok su polarne zastupljene oko piperazinskog prstena. Najvažnija predviđena interakcija derivata 2 i AChE je vodonična veza između amino grupe derivata i Gln211. Derivat 3 (dijagram 2C) je velikom površinom izložen rastvaraču što negativno utiče na njegovu vezivanje za aktivno mesto AChE. Prisutne su elektrostaticke interakcije između nitro grupe derivata 3 i Glu215, koje ometa Arg43 pri baznoj pH te su one zanemarljive. Na dijagramu 2D može se uočiti predviđena vodonična veza između karboksilne grupe derivata 4 i



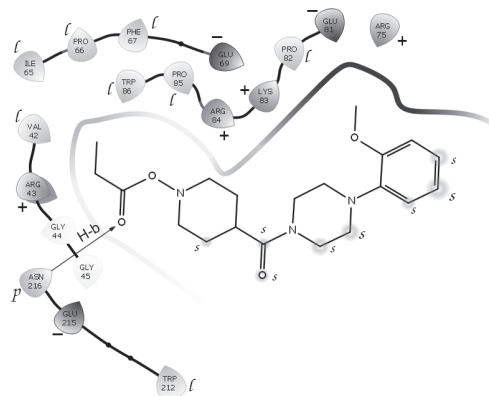
A) Derivat 1



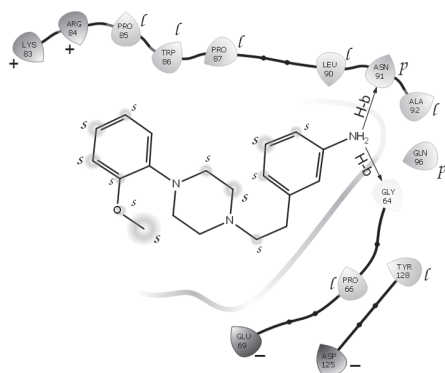
B) Derivat 2



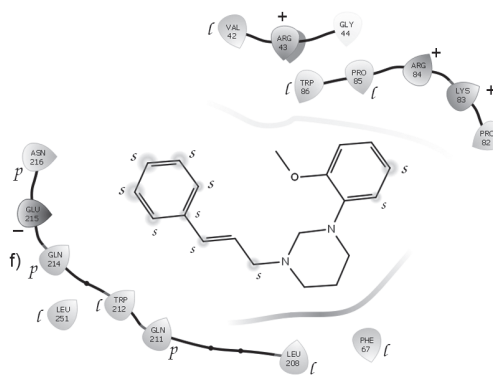
C) Derivat 3



D) Derivat 4

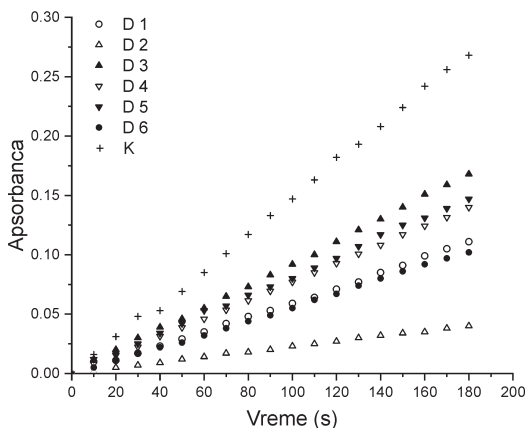


E) Derivat 5



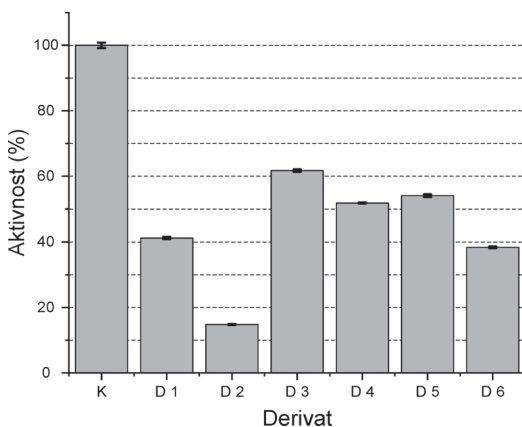
F) Derivat 6

Asn216 ali i sterne smetnje koje stvara dodatni prsten. Dijagram 2F pokazuje da derivat 6 ne ostvaruje značajne interakcije ali da ima veoma pogodnu sternu konformaciju, takvu da derivat nije izložen rastvaraču.



Slika 3. Promena apsorbance u vremenu (T-AChE); D – ispitivani derivati, K – kontrola.

Figure 3. Change in absorbance over time (T-AChE); D – tested derivatives, K – control.



Slika 4. Relativna aktivnost T-AChE. Označene su standardne greške srednje vrednosti.

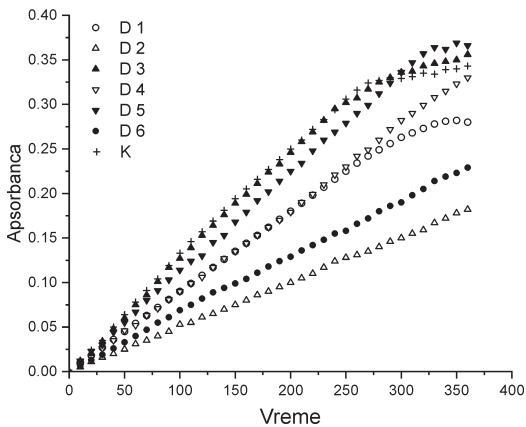
Figure 4. Relative activity of T-AChE. Standard errors of mean are marked.

Relativna aktivnost AChE u moždanom tkivu.

Na slici 3 prikazana je promena apsorbance u zavisnosti od vremena u enzimskim ekstraktima moždanog tkiva koje je korišćeno kao izvor T-AChE, u priustvu 70 μ M derivata piperazina, odnosno odgovarajuće koncentracije DMSO, koji je predstavljao kontrolu. Na slici 4 je prikazana relativna aktivnost T-AChE. Derivat 2 se izdvaja kao najefikasniji potencijalni inhibitor T-AChE, sa relativnom aktivnošću smanjenom za više od 70%.

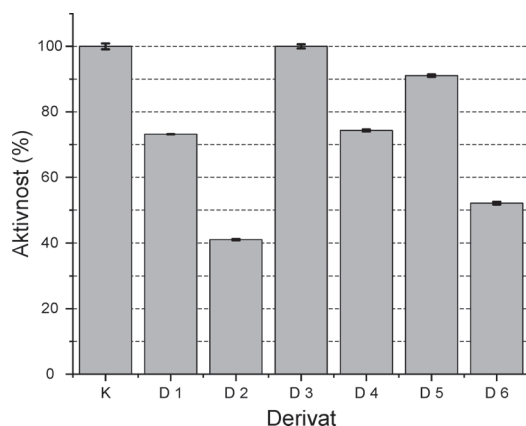
Relativna aktivnost AChE u krvnoj suspenziji

Na slici 5 prikazana je promena apsorbance u zavisnosti od vremena u krvnoj suspenziji koja je korišćena kao izvor H-AChE, u priustvu 70 μ M derivata piperazina, odnosno odgovarajuće koncentracije DMSO koji je predstavljao kontrolu. Na slici 6 prikazana je relativna aktivnost H-AChE. Derivat 2 se izdvaja kao najbolji potencijalni inhibitor, u ovom slučaju sa relativnom aktivnošću smanjenom za više od 50%.



Slika 5. Promena apsorbance u vremenu (H-AChE); D – ispitivani derivati, K – kontrola.

Figure 5. Change in absorbance over time (H-AChE); D – tested derivatives, K – control.



Slika 6. Relativna aktivnost H-AChE. Označene su standardne greške srednje vrednosti

Figure 6. Relative activity of H-AChE. Standard errors of mean are marked.

Diskusija

Potencijal ispitivanih derivata za inhibiciju enzimske aktivnosti je u skladu sa *in silico* predviđanjima na osnovu fizičko-hemijskih osobina derivata. Kao najefikasniji inhibitor pokazao se derivat 2, koji aktivnost T-AChE iz moždanog tkiva umanjuje za 80% u odnosu na netretiranu kontrolu (slike 3 i 4). Zbog predviđene geometrijske strukture koja je povoljna, pretpostavlja se da utiče na promenu sterne konformacije enzima, tako što maskira njegovo aktivno mesto i smanjuje njegovu aktivnost. Inhibitorski potencijal ostalih derivata opada na isti način na koji opada i predviđena jačina njihovog vezivanja za AChE.

Aktivnost AChE u krvnoj suspenziji, gde je pretpostavljeno da je dominantna H forma ovog enzima, takođe je najviše smanjena u prisustvu derivata 2 (slike 5 i 6). Manja odstupanja od *in silico* predviđanja javljaju se u slučaju H-AChE i derivata 1, 4 i 5. Uzimajući u obzir doking predviđanje po kom se derivati ne vezuju tačno za aktivno mesto, već pretežno za okolinu Ser233, gde je u 3D strukturi enzima jasno izražena pogodna sterne konformacija (u vidu „uvala”), pretpostavlja se da derivati ne deluju

kompetitivno, već tako što menjaju konformaciju enzima i na taj način mu smanjuju aktivnost. Znajući da se razlikuju samo po modifikacijama koje H-AChE ima radi usidrenja na membranu eritrocita, možemo pretpostaviti da upravo taj, već pomenuti GPI deo ne dozvoljava promenu konformacije enzima koju izaziva vezivanje derivata, te da zbog toga dolazi do manjih odstupanja od *in silico* predviđanja samo u slučaju H-AChE. Ova odstupanja mogu se uočiti upoređivanjem dobijene relativne aktivnosti H-AChE (slika 5) sa tabelom predviđenih jačina interakcija enzima i derivata (tabela 1).

Prethodna doking istraživanja pokazala su da amino supstituenti različitih molekula dosežu do aktivnog mesta AChE dok indanonski i slični supstituenti bivaju izloženi rastvaraču (Costanzo *et al.* 2016). To je potvrđeno i doking predviđanjem u slučaju derivata piperazina (slika 2). Kao izrazito nepovoljno izdvaja se prisustvo metoksi grupa, dok je dvostruka veza alkil niza izrazito povoljna zbog delimične rigidnosti (derivat 6). Kao veoma povoljno izdvaja se i prisustvo β -laktamskih prstena u strukture inhibitora AChE, što je potvrđeno prisustvom vodonične veze između –NH grupe derivata 2 i Gln211 (Atmaca *et al.* 2019).

Sinteza trenutno najefikasnijeg inhibitora AChE, donepezila, zasnovana je na aldolnoj kondenzaciji/dehidrataciji između indanona i piperazina ili piperidina i kasnijoj asimetričnoj hidrogenizaciji. Upravo njemu strukturno najslabiji, derivati 1 i 2 su pokazali najveći inhibitorski efekat. Najveća mana donepezila je ta što potencijalno interaguje sa produktima metabolizma CYP familije enzima, što ne mora biti slučaj sa derivatima 1 i 2 zbog različite strukture. Takođe, derivati piperazina mogu biti sintetisani korišćenjem DABCO (1,4-diazabicyklo-[2.2.2]oktan) reagensa kao supstrata, čije kvartene amonijum soli predstavljaju veoma dobre elektrofile za stvaranje C–O, C–S, C–N, C–P i C–C veze jednostavnim i efikasnim sintetskim putem (Halimehjani i Badali 2019). Soli piperazina i njegovi derivati su u upotrebi u veterinarskoj i humanoj medicini, a njihov toksičan efekat pokazan je jedino na akvatičnim organizmima. Nije zabeležena njihova biodegradibilnost ali je pokazano da ne dolazi do njihove bioakumulacije.

Za dalje ispitivanje uticaja derivata 2 na AChE, koji je pokazao najveći procenat inhibicije, bilo bi potrebno razmatrati i sintezu derivata koji bi se razlikovao samo po dužini alkil niza, u cilju još bolje sterne geometrije i uklapanja u pokazanu pogodnu sternu konformaciju enzima. Uzimajući u obzir da derivat 2 nije u bazi podataka ChemSpider, potrebno je ispitati njegov uticaj na vijabilnost neuroblastoma. Takođe, potrebno je i razmatrati način transporta kroz krvno-moždanu barijeru, gde bi pogodno bilo derivatu 2 pridružiti PAMAM (poli(amidomamin)) polimerni nosač.

Zaključak

Od šest ispitanih derivata piperazina, kao najefikasniji inhibitor AChE, kako u moždanom tkivu, za koje je pretpostavljeno da u njemu dominira T forma ovog enzima, tako i u krvnoj suspenziji za koju je pretpostavljena dominacija H forme enzima, pokazao se derivat 2. Njegov veliki inhibicioni potencijal je u skladu sa predviđanjima na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika molekula. Kao najvažnija interakcija između derivata 2 i AChE izdvaja se građenje vodonične veze, a kao veoma povoljne pokazale su se i steking interakcije. Doking predviđanje po kom se derivati ne vezuju tačno za aktivno mesto, već pretežno za okolinu Ser233 gde je u 3D strukturi enzima jasno izražena pogodna sterna konformacija, ukazuje na to da ispitivani derivati ne deluju kompetitivno, već da menjaju konformaciju enzima i na taj način mu smanjuju aktivnost. Efikasnost ostalih ispitivanih derivata je u skladu sa predviđenim jačinama veze.

Imajući u vidu potrebu za nalaženjem novih terapijskih protokola za lečenje relativno učestalih neurodegenerativnih oboljenja, dizajniranje novih, efikasnih i bezbednih inhibitora AChE je od velikog značaja. Ovakav istraživački pristup je veoma koristan u savremenim farmakološkim istraživanjima, jer se na osnovu *in silico* analiza sinteza novih potencijalnih lekova može usmeriti, čime se može značajno uštedeti na sredstvima i vremenu koje je potrebno uložiti u sintezu i predklinička i klinička istraživanja novih lekova. Pored dobijenih podataka za efikasnost derivata 2 u inhibiciji AChE, potrebno

je buduća istraživanja bazirati na ispitivanju njegove citotoksičnosti i proslasku bioloških barijera kao što je krvno-moždana, kao i uporediti efikasnost različitih sintetskih puteva.

Zahvalnost. Zahvaljujem se prof. Deani Andrić sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za ustupljene derivate piperazina koji su korišćeni u ovom istraživanju, kao i za pomoć pri analizi istih. Takođe, zahvaljujem se Luki Velimirovu za usmeravanje na *in silico* analizu derivata, kao i svojim mentorima za svakodnevnu podršku.

Literatura

- Atmaca U., Kaya R., Karaman H. S., Celik M., Gülçin I. 2019. Synthesis of oxazolidinone from enantiomerically enriched allylic alcohols and determination of their molecular docking and biologic activities. *Bioorganic chemistry*, **88**: 102980.
- Chaudhary P., Kumar R., Verma A. K., Singh D., Yadav V., *et al.* 2006. Synthesis and antimicrobial activity of N-alkyl and N-aryl piperazine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **14** (6): 1819.
- Costanzo P., Cariati L., Desiderio D., Sgammato R., Lamberti A., *et al.* 2016. Design, synthesis, and evaluation of donepezil-like compounds as AChE and BACE-1 inhibitors. *ACS medicinal chemistry letters*, **7** (5): 470.
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres Jr. V., Featherstone R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, **7** (2): 88.
- Friesner R. A., Murphy R. B., Repasky M. P., Frye L. L., Greenwood J. R., *et al.* 2006. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, **49**: 6177.
- Giacobini E. 2004. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological research*, **50** (4): 433.
- Halimehjani A. Z., Badali E. 2019. DABCO bond cleavage for the synthesis of piperazine derivatives. *RSC advances*, **9** (62): 36386.
- Lockridge O., Bartels C. F., Vaughan T. A., Wong C. K., Norton S. E., Johnson L. L. 1987. Complete

amino acid sequence of human serum cholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, **262** (2): 549.

Massoulie J., Bon S. 1982. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annual review of neuroscience*, **5** (1): 57.

Nazim M., Masuda A., Rahman M. A., Nasrin F., Takeda J. I., *et al.* 2017. Competitive regulation of alternative splicing and alternative polyadenylation by hnRNP H and CstF64 determines acetylcholinesterase isoforms. *Nucleic acids research*, **45** (3): 1455.

Nordberg A., Svensson A. L. 1998. Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Drug safety*, **19** (6): 465.

Soreq H., Seidman S. 2001. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, **2** (4): 294.

Anđela Petrović

Investigating the Inhibitory Potential of Selected Piperazine Derivatives on Acetylcholinesterase Type T and H Activity

Acetylcholinesterase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis reaction of the neurotransmitter acetylcholine to acetate and choline. In a large group of diseases based on a disturbance in the normal functioning of nerve synapses, acetylcholine-mediated neurotransmission is reduced,

and it is necessary to enable longer receptor stimulation by inhibiting acetylcholinesterase. In this work, the effect of six piperazine derivatives, structurally similar to known inhibitors, on the activity of acetylcholinesterase type T and H was investigated. Piperazine and some of its derivatives are used as precursors in the synthesis of some known inhibitors, and knowledge of their effects on enzyme activity is of great importance for the optimization and simplification of inhibitor synthesis. Molecular docking presupposes the strength and site of binding of derivatives to acetylcholinesterase, as well as the types of interactions of derivatives with surrounding amino acids. The influence of different functional groups and array lengths was also examined. Activities of acetylcholinesterase type T and H were compared, because they differ in modifications caused by alternative splicing and by their biological role in the organism. The potential of the tested derivatives for enzymatic activity inhibition is consistent with *in silico* predictions based on physicochemical derivative properties. The most effective inhibitor was derivative 2, which reduced T-AChE activity by 80% compared to the untreated control (Figures 4 and 6). Because of the predicted favorable geometric structure, it is thought to affect the change in steric enzyme conformation by masking its active site and thus reducing its activity. The inhibitory potential of other derivatives decreases in the same way predicted by *in silico* analysis. By connecting the obtained results with known synthesis protocols, it would be possible to develop a new approach to the treatment of a large group of diseases, as well to improve their therapy. ◻