

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA LUZNAR

VREDNOTENJE DERIVATOV NITROKSOLINA KOT
POTENCIALNIH MULTIPLIH LIGANDOV ZA ZDRAVLJENJE
ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

THE EVALUATION OF NITROXOLINE DERIVATIVES AS
POTENTIAL MULTIFUNCTIONAL ANTI-ALZHEIMER
AGENTS

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in dr. Borisa Brusa, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Ob tej priložnosti se iskreno zahvaljujem dr. Borisu Brusu, mag. farm., za vso strokovno pomoč in podporo pri delu ter praktične nasvete pri pisanju. Posebno zahvalo izrekam prof. dr. Stanislavu Gobcu mag. farm., za pripravljenost in napotke pri izdelavi magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Janezu Mravljaku mag. farm., za pomoč pri vrednotenju antioksidativnih lastnosti in asist. Damijanu Knezu mag. farm., za usmerjanje pri delu v laboratoriju.

Najlepše pa se zahvaljujem svoji družini, fantu in prijateljem, ki ste bili ob meni in me podpirali na čudoviti študijski poti.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorja dr. Borisa Brusa, mag. farm.

Eva Luznar

Ljubljana, 2016

Mentor: prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

Somentor: dr. Boris Brus, mag. farm.

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Mirjam Gosenca, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1. Holinergična hipoteza	3
1.2. Amiloidna hipoteza	4
1.3. Kovinski ioni	5
1.4. Oksidativni stres	6
1.5. Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni	7
1.6. Strategija oblikovanja multiplih ligandov	8
2. NAČRT DELA	10
3. MATERIALI IN METODE	11
3.1. MATERIALI	11
3.2. METODE	16
4. EKSPERIMENTALNO DELO	20
4.1. Določanje topnosti	20
4.2. Kelacija kovinskih ionov	20
4.3. Antioksidativne lastnosti spojin	22
4.4. Zaviralna aktivnost proti holin-esterazam	23
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	25
5.1. Rezultati in razprava o topnosti	25
5.2. Rezultati in razprava o kelaciji kovinskih ionov	28
5.3. Rezultati in razprava o antioksidativnih lastnostih	39
5.4. Rezultati in razprava o zaviralni aktivnosti holin-esteraz	41
5.4.1. Zaviralna aktivnost huBChE	41
5.4.2. Zaviralna aktivnost mAChE	43
5.5. Delovanje preiskovanih spojin v CŽS	43
5.6. Pregled rezultatov biokemijskega vrednotenja nitroksolinskih derivatov	45
6. ZAKLJUČEK	46
7. LITERATURA	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz vzročnih dejavnikov, ki vplivajo na propad nevronov in vodijo v razvoj AB. Povzeto po (33).	7
Slika 2: Strukturne formule odobrenih zdravil za zdravljenje AB	8
Slika 3: Spojina 1 z nanomolarno srednjo zaviralno koncentracijo proti huBChE	9
Slika 4: Strukturni prikaz nastanka preiskovanih spojin (7) z združitvijo fragmenta za afiniteto do holin-esteraz s fragmentom za kelacijo kovinskih ionov in antioksidativnim delovanjem	9
Slika 5: Shematski prikaz redukcije DPPH'	17
Slika 6: Shematski prikaz Ellmanove reakcije	18
Slika 7: Shematski prikaz vezave kovinskih ionov Cu^{2+} v kompleks s spojino 12	22
Slika 8: Grafičen primer absorbančnega spektra spojine 7 v 0.1 M fosfatnem pufru	26
Slika 9: Graf odvisnosti absorbance spojine 7 od naraščajočega molarne razmerja [Cu^{2+} / spojina 7]	28
Slika 10: Graf odvisnosti absorbance spojine 8 od naraščajočega molarne razmerja [Cu^{2+} / spojina 8]	29
Slika 11: Graf odvisnosti absorbance spojine 9 od naraščajočega molarne razmerja [Cu^{2+} / spojina 9]	29
Slika 12: Graf odvisnosti absorbance spojine 12 od naraščajočega molarne razmerja [Cu^{2+} / spojina 12]	29
Slika 13: Grafičen prikaz selektivne vezave Cu^{2+} v kompleks s spojino 7, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} spojini 7, predhodno inkubirani z Mg^{2+}	30
Slika 14: Grafičen prikaz selektivne vezave Cu^{2+} v kompleks s spojino 7, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} spojini 7, predhodno inkubirani s Ca^{2+}	31
Slika 15: Grafičen prikaz selektivne vezave Cu^{2+} v kompleks s spojino 12, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} spojini 12, predhodno inkubirani z Mg^{2+}	31
Slika 16: Grafičen prikaz selektivne vezave Cu^{2+} v kompleks s spojino 12, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} spojini 12, predhodno inkubirani s Ca^{2+}	31
Slika 17: Grafičen prikaz premika maksimuma absorbančnega spektra kompleksa spojine 7 z različnimi kovinskimi ioni na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 7, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+}	32
Slika 18: Grafičen prikaz premika maksimuma absorbančnega spektra kompleksa spojine 9 z različnimi kovinskimi ioni na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 9, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+}	33
Slika 19: Grafičen prikaz premika maksimuma absorbančnega spektra kompleksa spojine 10 z različnimi kovinskimi ioni na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 10, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+}	34
Slika 20: Grafičen prikaz premika maksimuma absorbančnega spektra kompleksa spojine 12 z različnimi kovinskimi ioni na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 12, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+}	35
Slika 21: Grafičen prikaz premika maksimuma absorbančnega spektra kompleksa spojine 11 z različnimi kovinskimi ioni na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 11, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+}	36
Slika 22: Grafičen prikaz absorbančnega spektra kompleksa spojine 4 z različnimi kovinskimi ioni pred in po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} , brez premika na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 4	37
Slika 23: Grafičen prikaz absorbančnega spektra kompleksa spojine 6 z različnimi kovinskimi ioni pred in po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} , brez premika na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 6	38
Slika 24: Graf odvisnosti procenta radikalov DPPH' [%] od koncentracije [μM] spojine 8	40
Slika 25: Graf odvisnosti procenta radikalov DPPH' [%] od koncentracije [μM] spojine 12	40
Slika 26: Kristalna struktura spojine 7 vijolične barve, vezane v kompleks s huBChE. Povzeto po (35).	42

POVZETEK

Uporaba multiplih ligandov v terapiji predstavlja vse bolj privlačno in obetavno strategijo za zdravljenje kompleksnih bolezni osrednjega živčevja. Mednje uvrščamo tudi Alzheimerjevo bolezen, ki prizadene predvsem starejše in se razvije iz prepleta številnih okoljskih ter genetskih dejavnikov. Njena neozdravljivost predstavlja izziv za razvoj več-funkcijskih zdravil s ciljanjem na različne tarče, vpletene v razvoj bolezni.

V magistrski nalogi smo prilagodili postopke iz literature in postavili teste za biokemijsko ovrednotenje enajstih nitroksolinskih derivatov. Multiplo delovanje preiskovanih spojin se kaže z združitvijo kelirajočega fragmenta in entitete z aktivnim mestom za vezavo humane butirilholin-esteraze. Čeprav zaviralci holin-esteraz ne ozdravijo in preprečijo napredovanja Alzheimerjeve bolezni, je vrsta raziskav dokazala ugoden učinek na upočasnitev napredovanja kognitivnega upada. Na postopno poslabšanje kognitivne funkcije vpliva izguba živčnega prenašalca acetilholina, ki ga v možganih hidrolizirata encima acetilholin-esteraza in butirilholin-esteraza. Z razvojem bolezni se zaloga specifične esteraze izčrpa, glavno vlogo začne prevzemati nespecifična butirilholin-esteraza. Preiskovanim spojinam smo določili zaviralno aktivnost proti obema encimoma in pri najbolj aktivni spojini **7** potrdili selektivno zaviranje butirilholin-esteraze s srednjo zaviralno koncentracijo 215 nM. S pomočjo spektrofotometričnih metod smo raziskali potencial nitroksolinskega fragmenta za kelacijo kovinskih ionov in preverili antioksidativno aktivnost preiskovanih spojin. Pri vseh derivatih smo potrdili nastanek kompleksa kovinski ion-ligand in dokazali, da nitroksolinski skelet omogoča selektivno kelacijo dvovalentnih ionov bakra, ki v poznih stadijih bolezni pospeši tvorbo agregatov amiloida beta. Izraženo šibko antioksidativno delovanje preiskovanih spojin predstavlja dodatno korist proti oksidativnim poškodbam, ki pogosteje nastajajo v možganih Alzheimerjevih bolnikov. Spojina **7** zavira tudi spontano agregacijo amiloida beta, razrešena kristalna struktura v kompleksu s humano butirilholin-esterazo pa dokazuje vezavo 8-hidroksikinolinskega skeleta v aktivno mesto encima. Rezultati našega dela postavljajo spojino **7** med potencialne več-funkcijske spojine za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni in predstavljajo ugodno izhodišče za nadaljnjo optimizacijo multiplih ligandov.

Ključne besede: Alzheimerjeva bolezen, multipli ligandi, butirilholin-esteraza, derivati nitroksolina

ABSTRACT

Multi-target directed ligand approach is represented as a modern and promising strategy in the treatment of complex neurodegenerative diseases. One such is Alzheimer's disease, a result of numerous changes, caused by aging, genetic and environmental factors. With unsusceptibility of being cured, Alzheimer's disease is now in the pipeline with new multifunctional agents targeting different pathological processes.

With tests adapted from literature procedures, we report on the biological evaluation of a series of nitroxoline derivatives that showed multifunctional activity by merging chelating fragment with entity for inhibition of human butyrylcholinesterase. Even though no cholinesterase inhibitor cures and prevents the progress of Alzheimer's disease, a variety of studies has shown a beneficial effect on slowing the progression of cognitive decline. A gradual deterioration of cognitive functioning is influenced by the loss of the neurotransmitter acetylcholine in the brain, normally hydrolysed by acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. In the later stages of the disease the activity of butyrylcholinesterase increases, while that of acetylcholinesterase decreases. The compounds showed inhibition of cholinesterase function and the compound **7** selectively inhibited butyrylcholinesterase with IC₅₀ value of 215 nM. Metal chelation properties and antioxidative activity of nitroxoline analogs was investigated using spectrophotometric measurements. All derivatives showed the ability to chelate metal ions related to amyloid beta aggregates and the absorption spectra revealed that nitroxoline moiety binds copper selectively. Weak antioxidative activity shown for some of the compounds could have additional benefits against increased oxidative damage in the brain of Alzheimer's patients. Compound **7** also showed inhibition of self-induced amyloid beta aggregation and resolved crystal structure in complex with human butyrylcholinesterase proves binding of 8-hydroxyquinoline in the active site of the enzyme. The result of our work raises compound **7** as a potential multifunctional agent for the treatment of Alzheimer's disease and provides a promising starting point for further optimization of multiple ligands.

Keywords: Alzheimer's disease, multiple ligands, butyrylcholinesterase, nitroxoline derivatives

SEZNAM OKRAJŠAV

AB	Alzheimerjeva bolezen
A β	amiloid beta
ACh	acetilholin
AChE	acetilholin-esteraza
ATC	acetiltioholin jodid
APOE	apolipoprotein E
APP	amiloidni prekuzorski protein
BChE	butirilholin-esteraza
BTC	butiriltioholin jodid
CŽS	centralno živčni sistem
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPH \cdot	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
DTNB	5-5'-ditiobis-2-nitrobenzojska kislina
huBChE	rekombinantna človeška butirilholin-esteraza
KMP	krvno-možganska pregrada
IC ₅₀	srednja zaviralna koncentracija
mAChE	mišja acetilholin-esteraza
RA	rezidualna aktivnost
ROS	reaktivne kisikove zvrsti

1. UVOD

Alzheimerjeva bolezen (AB), prvič opisana pred več kot 100 leti, je napredujoča in nepopravljiva bolezen centralnega živčnega sistema (1). V ospredju so znaki demence in motnje, ki z izgubo spomina bolnika ovirajo pri vsakodnevnih aktivnostih ter sčasoma onemogočijo samostojno življenje (2). Z demenco živi na svetu 46,8 milijonov ljudi in večina jih trpi za AB. Pridobljena motnja višjih spoznavnih funkcij možganov naj bi po zadnjih raziskavah do leta 2050 prizadela več kot 131 milijonov ljudi (2,3). V zgodnji klinični fazi se bolniki s težavo spominjajo nedavnih pogovorov, imen ali dogodkov, pogosto se soočajo z apatijo in depresijo. Kasneje razvijejo znake oslabiljene komunikacije, zmedenosti, slabe presoje in vedenjskih sprememb, katerim se na koncu pridružijo še težave pri govoru, požiranju in hoji ter navsezadnje popolnoma onemogočijo bolnikovo samostojno življenje (4). Značilne spremembe v možganih vključujejo postopno kopičenje proteinskih fragmentov amiloida beta ($A\beta$) zunaj celic v obliki senilnih plakov in znotrajcelično odlaganje čezmerno fosforiliranih filamentov proteina Tau v skupkih, ki tvorijo neurofibrilarne pentlje. Akumulacija nenormalnih struktur znotraj in zunaj nevronov povzroči njihovo disfunkcijo in postopno odmiranje (5). Domneva se, da gre za retrogradno degeneracijo neurotransmiterskih sistemov, ki jo povzročijo patološki procesi v področju živčnih končičev možganske skorje, hipokampusu in amigdaloidnih jeter (2). Kljub intenzivnim raziskavam točnega mehanizma nastanka AB še ne poznamo povsem.

Znana je etiologija le 0,5% primerov bolezni, kot posledica mutacij genov za presenilin-1 na kromosomu 14, presenilin-2 na kromosomu 1 in amiloidni prekursorjski protein (APP) na kromosomu 21 (6). Mutacija kateregakoli izmed treh specifičnih genov vodi v zgoden začetek avtosomno-dominantne AB, ki se običajno izrazi med 40. in 50. letom (7). Velika večina bolnikov razvije bolezen v kasnejši življenjski dobi. Znanstveniki verjamejo, da se bolezenski proces začne dosti prej, preden pri bolniku opazimo kognitivne spremembe, ki jih lahko klinično in nevrološko zaznamo (8). Eden glavnih dejavnikov tveganja za razvoj AB je starost. Staranje prebivalstva že samo po sebi veča tveganje za razvoj degenerativnih bolezni, pri AB pa se po 65. letu tveganje vsako leto dvakrat poveča. Po 85. letu je verjetnost že več kot 50%, vendar starost ni neposreden dejavnik za razvoj bolezni. Tveganje je višje pri ljudeh, ki imajo AB v družini, oziroma tistih, ki so podedovali alel $\epsilon 4$ gena za apolipoprotein E (APOE). Vsak izmed nas podeduje zapis za APOE gen v obliki alela $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ali $\epsilon 4$. Najbolj pogosto podedujemo APOE- $\epsilon 3$, medtem ko ima eno ali dve kopiji APOE- $\epsilon 4$ približno 20-30% ljudi. Poleg vloge pri prenosu holesterola po krvi, APOE sodeluje tudi

pri metabolizmu, prenosu in ciljanju A β v možganih in prav razlike v metabolizmu APOE- ϵ 3 ter APOE- ϵ 4 vodijo v razlike v zaseganju A β (9). Podedovan od obeh staršev, alel ϵ 4 poveča tveganje za AB za osem do dvanajstkrat in vodi v razvoj bolezni v mlajši dobi. Ni pa nujno, da oseba zboli, tudi če ima kopijo ϵ 4. Potencialni začetni kazalec AB je tudi blaga kognitivna motnja (MCI), ki prizadetega sicer ne ovira pri vsakodnevnih opravilih, se pa lahko razvije v Alzheimerjevo ali kakšno drugo obliko demence. Zdravje možganov je tesno povezano s splošnim zdravjem srca in krvnega obtoka. Z večjim tveganjem za razvoj demence so tako povezani različni dejavniki, ki večajo tveganje za razvoj bolezni srca in ožilja: kajenje, debelost, diabetes, hipertenzija in povišan holesterol. Nasprotno pa na srce in možgane varovalno delujeta fizična aktivnost in zdrava prehrana. Tveganje za razvoj AB naj bi zmanjšalo socialno in kognitivno udejstvovanje, ki pri socialno aktivnih skozi vse življenje naredi kognitivno rezervo. Znanstveniki verjamejo, da k lažji kompenzaciji pri spremembah v možganih pripomore tudi izobraženost, saj naj bi več let izobrazbe povečalo število povezav med nevroni. Negativen vpliv na možgane pa imajo ponavljajoče poškodbe glave oziroma travmatske poškodbe možganov z izgubo zavesti za več kot trideset minut. Za posameznike, na primer bokserje, nogometaše, ali udeležence v prometnih nesrečah, ki so take poškodbe doživeli, to pomeni večje tveganje za razvoj demence (4).

Prve smernice in kriterije za diagnosticiranje sta leta 1984 postavili organizaciji »National Institute of Neurological Disorders and Stroke« in »Alzheimer's Association«. Zdravniki so klinično diagnozo podali na podlagi zbranih informacij iz pogovora z bolnikom oziroma njegovimi bližnjimi osebami, na podlagi laboratorijskih preiskav (pozitronska emisijska tomografija, magnetna resonanca, itd.), rezultatov kognitivnih testov (ocena spominjanja, pozornosti, dojetanja, ponavljanja, razumevanja, zmožnosti branja, risanja, itd.) ter splošne nevrološke ocene (orientacija v času in prostoru, vizualno zaznavanje, sposobnost reševanja problemov, spretnost jezika, itd.). Leta 2011 je »National Institute of Aging« skupaj z »Alzheimer's Association« predlagal nova in obnovljena merila, ki omogočajo lažjo obravnavo in postavitvev diagnoz. Nove smernice narekujejo tri stadije AB, kjer 1. predklinični stadij nastopi že pred simptomi izgube spomina (4,10,11). V uporabo so uvedli tudi biološke označevalce, s katerimi določujemo vrednosti nekaterih proteinov v možganski krvi in cerebrospinalni tekočini (raven A β in proteina Tau) (7). Napredovanje v smeri odkrivanja nenormalnosti v možganih pred pojavom kliničnih znakov bolezni in napovedovanje kognitivnega upada vsekakor predstavlja odlično izhodišče za razvoj učinkovitih metod zdravljenja (12).

Zaradi kompleksne narave AB znanstveniki še niso uspeli popolnoma razložiti vseh vidikov bolezni (13). Etiopatogenezo njenega nastanka povezujejo nizke ravni živčnega prenašalca acetilholina (ACh), kopičenje in nalaganje A β , z njima povezan povečan oksidativni stres, odlaganje hiperfosforiliranega proteina Tau in porušeno ravnovesje kovinskih ionov v možganih (14,15).

1.1. Holinergična hipoteza

Holinergična transmisija igra pomembno vlogo v živčnem sistemu, saj sodeluje pri spominu, vedenju in gibalni kontroli. Uravnava jo encima, ki spadata v družino alfa/beta hidrolaz, acetilholin-esteraza (AChE) in butirilholin-esteraza (BChE) (16). Glavna biološka vloga AChE je hidroliza živčnega prenašalca acetilholina (ACh) v holinergičnih sinapsah, ki povzroči prekinitev živčnega prenosa. AChE sestavljata acilni žep in holinski vezavni žep, na dnu katerega se nahaja aktivno mesto iz dveh podenot. Anionska podenota veže kvartarni ligand substrata preko ionske vezi, na estrski podenoti pa katalitska triada iz serina, histidina in glutamata izvede proces hidrolize (17). V zdravih možganih aktivnost AChE prevlada nad aktivnostjo BChE (18). Vloga BChE še ni popolnoma razjasnjena, predvideva pa se, da nespecifična holin-esteraza podpira AChE pri vzdrževanju normalnega holinergičnega prenosa in katalizira hidrolizo različnih estrov holina (19). BChE je strukturno in funkcionalno sorodna AChE, encima izkazujeta kar 65% homologijo aminokislinskega zaporedja (14). Katalitska triada aktivnega mesta BChE prav tako leži na dnu 20 Å dolgega lijaka, po katerem je razporejeno manjše število aromatskih aminokislinskih ostankov kot pri AChE. Pozitivno nabite substrate v aktivno mesto usmerjajo interakcije z Asp70 in Tyr332 periferne anionskega mesta. Pomembna aminokislina holin-vezavnega žepka BChE je Trp82. Namesto fenilalaninskih ostankov (Phe288 in Phe290) v acil-vezavnem žepku AChE, so v žepku BChE ostanki Leu286 in Val288, zato je volumen acilnega žepka BChE večji in omogoča vstopanje večjih acilnih skupin oziroma večjih substratov (19).

AB zaznamuje izrazita degeneracija holinergičnega sistema prozencefalona. Hudo izgubo nevronov, ki običajno izražajo visoko stopnjo ACh in AChE, povzroči sočasno izčrpanje živčnega prenašalca in hidrolizirajočega encima. Holinergična hipoteza je prva, ki je pojasnila nastanek AB z izgubo holinergične aktivnosti in vodila v razvoj večine odobrenih zdravil (20). Trenutno se za zdravljenje AB uporabljajo acetilholin-esterazni zaviralci donepezil, galantamin in rivastigmin, ki okrepijo in podaljšajo razpoložljivost ACh v

proencefalonu. Zdravila izboljšajo kognitivne procese kot sta spomin in pozornost, vendar s simptomatskim zdravljenjem ne odpravijo vzroka, ampak samo upočasnijo potek bolezni (21). V možganih bolnikov z napredovalo AB se namreč ravni AChE v specifičnih možganskih regijah znižajo tudi do 85%. Nasprotno pa ravni BChE v neokorteksu, talamusu in amigdali z napredovanjem bolezni kažejo znatno povečanje, s sočasnim nastajanjem neurofibrilarnih pentelj in plakov amiloida beta v celicah glije. BChE v teh patoloških strukturah kaže spremenjene biokemijske lastnosti in občutljivost na zaviralce holin-esteraz. Ugotovitve o povečani ekspresiji BChE v poznih stadijih bolezni so vodile k iskanju bolj specifičnih zaviralcev BChE, kot so na primer analogi cimserina, ki izboljšajo učenje in spomin pri starih podganah (19,22). Še posebej je zanimivo dejstvo, da specifični zaviralci BChE, poleg izboljšanja kognitivnih sposobnosti s povečanjem ravni ACh in izboljšanjem holinergične transmisije, znižajo tudi nivo amiloidnega prekursorskega proteina (APP), ki je vir A β . Nedavne raziskave z uporabo baterije nevropsiholoških testov so pokazale, da zaviranje BChE korelira s kognitivnim izboljšanjem stanja bolnikov, ki trpijo za AB (19).

1.2. Amiloidna hipoteza

Amiloidna hipoteza predpostavlja, da so plaki A β v različnih predelih možganov glavni vzrok nevrodegenerativnih procesov AB (23). Kopičenje peptidov A β zunaj živčnih celic sproži kaskado pojavov, ki vključujejo poškodbe nevronov, vnetne odzive in nastanek neurofibrilarnih pentelj (24). Amiloidne plake tvorijo 39-43 aminokislin dolgi peptidni ostanki, produkti proteolitične razgradnje amiloidnega prekursorskega proteina (APP). Obstajata dve poti razgradnje APP, kjer glede na mesto cepitve nastanejo različno dolge oblike peptidov. Po ne-amiloidogeni poti nastane topna oblika APP, ki jo cepita α -sekretaza in γ -sekretaza. V amiloidogeni poti pa APP cepi β -sekretaza, ki tvori daljši C-terminalni fragment, vezan na površini živčne celice. Iz daljšega membranskega fragmenta, po cepitvi z γ -sekretazo nastane A β , ki se iz celice izloči (2,23). Pri zdravih ljudeh je najbolj pogosta topna oblika A β ₁₋₄₀, v procesu AB pride do povečanega nastajanja netopnega A β ₁₋₄₂, ki agregira. Povečanemu nastajanju A β ₁₋₄₂ napram A β ₁₋₄₀ sledi zmanjšano odstranjevanje A β in združevanje bolj hidrofobnih depozitov A β ₁₋₄₂ v oligomere. Porušeno razmerje povezujejo tudi z nastankom nenormalnih filamentov proteina Tau, ki se zaradi hiperfosforilacije preko glikogen sintaze kinaze 3 β in ciklin-odvisne kinaze odcepijo s površine mikrotubula in združijo v neurofibrilarne zanke. Postopna agregacija A β ₁₋₄₂ s

hiperfosforilacijo proteina Tau vodi v obširno izgubo funkcije nevronov, ki zaradi primanjkljaja nevrottransmitterjev počasi propadejo (15,23).

Leta raziskovanj so privedla do tesne povezave vpliva genetskih faktorjev na nastanek družinske oblike AB in amiloidne hipoteze. Avtosomno dominantne mutacije genov APP, PSE-1 in PSE-2, vodijo v razvoj nenormalnih oblik A β in neizogibne AB. Zaradi kompleksne patogeneze, ki vključuje tako genetske kot okoljske dejavnike, kljub intenzivnim naporom, znanstveniki še niso uspeli razviti zdravljenja, ki bi vplivalo na spontano tvorbo A β in povečalo odstranjevanje agregiranih plakov iz CŽS (15). V zadnjih dvajsetih letih je bilo razvitih že kar nekaj spojin z delovanjem na zmanjšano nastajanje in agregacijo A β (tramiprosat, tarenflurbil, semagacestat), ki pa niso prešla III. faze kliničnih testiranj (23). Eno izmed potencialnih tarč za izboljšanje kognitivnega upada pri AB predstavlja β -sekretaza, ki pri obolelih cepi β -sekretazno sekvenco APP in povzroči nastanek nevrotoksičnega A β (25). Med zdravili v razvoju trenutno največji up predstavljajo biološka zdravila, usmerjena proti različnim delom A β . V III. fazi kliničnih testiranj sta humani monoklonski protitelesi Aducanumab in Gantenerumab ter humanizirano monoklonsko protitelo Solanezumab; ki z vezavo na A β povečajo njegov očistek v možganih (26,27).

1.3. Kovinski ioni

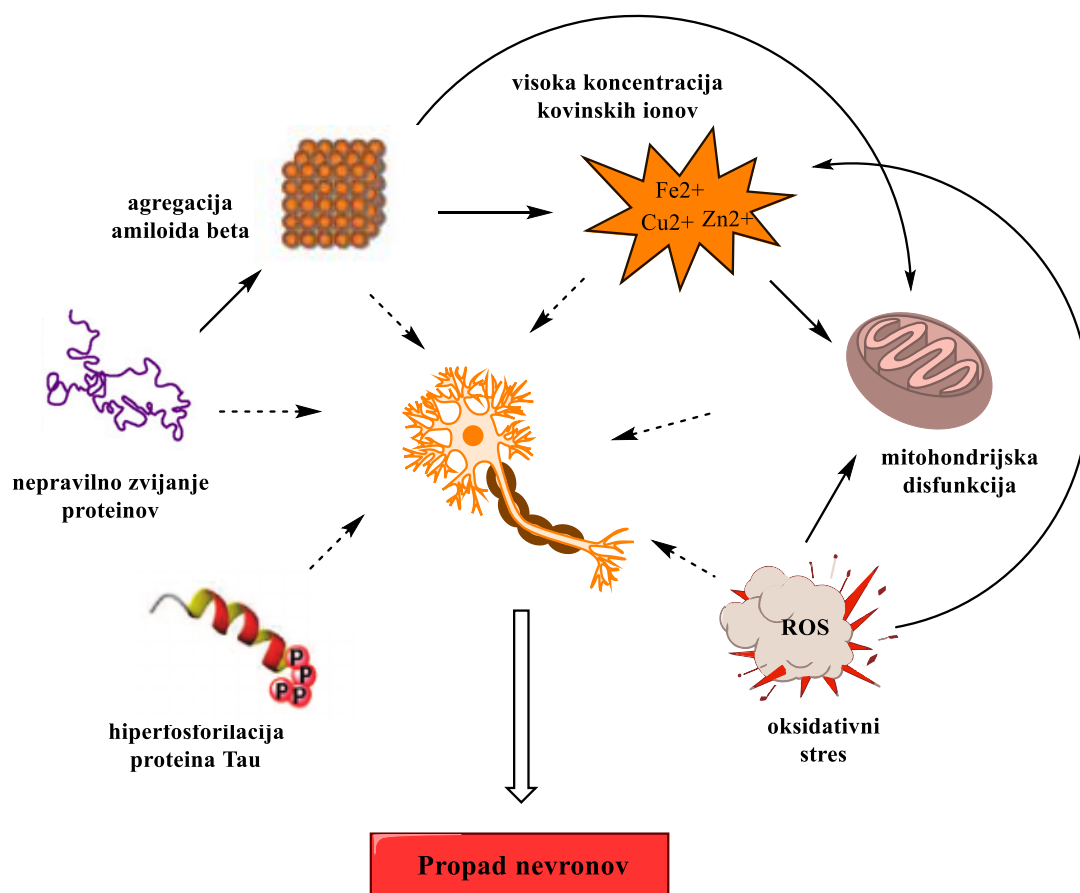
Nenormalno nalaganje kovinskih ionov v možganih je posledica staranja, pojavi pa se tudi pri številnih neurodegenerativnih boleznih. Kovinski ioni bakra (Cu), cinka (Zn) in železa (Fe) so vpleteni v različne procese, povezane z etiologijo AB. Normalno so udeleženi v medcelični komunikaciji in prenosu signalov, preko regulatorjev odzivnih na redoks aktivne ione pa vplivajo tudi na transkripcijo in translacijo neuropeptidov (28,29). Baker je kofaktor številnih encimov in igra pomembno vlogo v razvoju centralnega živčnega sistema. Železo v možganih omogoča transport kisika, sodeluje pri sintezi DNA, mielina in nevrottransmitterjev, Zn pa sodeluje predvsem pri sinaptični nevrottransmisiji (29,30). Pri AB pride do akumulacije kovinskih ionov v različnih predelih možganov in motenj v njihovi funkciji. V amiloidnih plakih so našli visoke koncentracije Cu (400 μ M), Zn (1 mM) in Fe (~ 1 mM), ki močno presegajo normalno stanje v zdravih možganih (70 μ M Cu in 350 μ M Zn) (28). Spremenjena homeostaza Fe, Cu in Zn pospeši tvorbo agregatov A β in vpliva na njihovo nalaganje ter inducira nevrotoksičnost (31). Kompleksi A β s kovinskimi ioni pospešijo nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki vodijo v razvoj oksidativnega stresa.

Progresivna akumulacija kovinskih ionov nastopi predvsem pri prehodu bolezni iz zmerne v hudo obliko (28).

Z uporabo specifičnih kelatorjev so *in vivo* ter *in vitro* že uspeli pokazati potencialno uravnavanje agregacije A β , inducirane s kovinskimi ioni. V kliničnih testiranjih sta spojini kliokinol in derivat 8-hidroksikinolina PBT2, vendar njuna dolgotrajna uporaba zaradi subakutne mielopatije ni možna (31). Kelacija kovinskih ionov bi lahko predstavljala okvir za oblikovanje spojin z multiplim delovanjem. Ob upoštevanju visokih koncentracij Cu²⁺ v amiloidnih plakih bi lahko kombinacija kelacije kovinskih ionov in zaviranja agregacije A β predstavljala novo metodo za oblikovanje več-funkcijskih zaviralcev A β (32).

1.4. Oksidativni stres

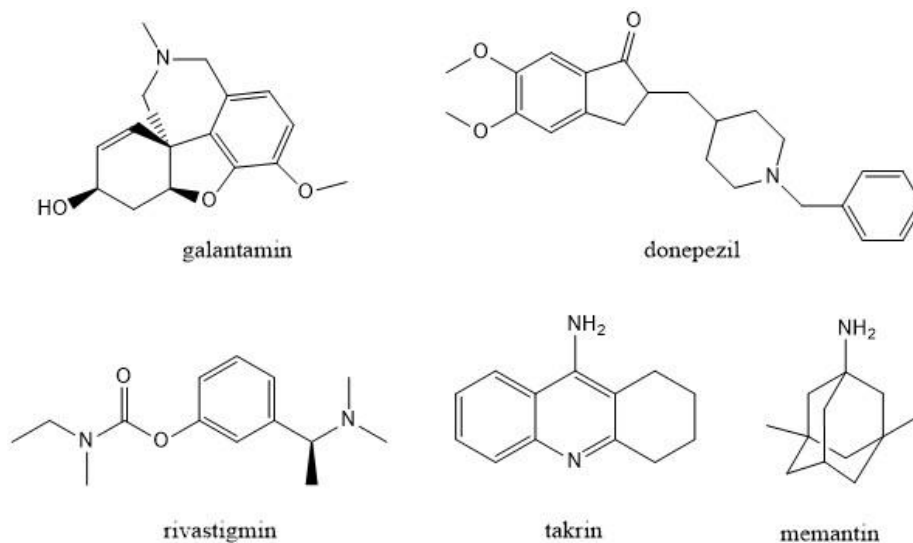
Nevronsko tkivo je posebej občutljivo na oksidativni stres in neravnovesje v homeostazi pro-oxidantov in antioksidantov v ČŽS povzroča nastanek potencialno toksičnih ROS. Novejša hipoteza postavlja oksidativni stres kot dejavnik, ki združuje vse mehanizme kompleksne AB (33). Oksidativne poškodbe so prisotne v možganih bolnikov na vseh ravneh bioloških makromolekul in so posledica prekomernih stresnih stanj, ki jih povzročajo z A β inducirani kisikovi radikali, mitohondrijska disfunkcija, nezadostna oskrba celic z energijo, vnetje nevronov, aktivacija mikroglije, itd. S hipotezo oksidativnih poškodb sovпада dejstvo, da k prekomernemu nastajanju škodljivih ROS pripomorejo tudi redoks aktivni ioni, ki vstopajo v Fentonovo reakcijo. Katalitsko ustvarjen H₂O₂ preko kompleksa A β -Cu²⁺ deluje nevrotoksično *in vitro*. Po različnih mehanizmih nastali kisikovi radikali sprožijo lipidno peroksidacijo, ki poruši funkcijo lipidnih membran in vodi v smrt nevronov (33,34). Kljub ugotovitvam povezave med privzemom antioksidantov in izboljšanjem kognitivnih sposobnosti v starajočih populacijah, klinični pristopi z uporabo antioksidativne terapije zaenkrat še niso uspeli pokazati jasne koristi pri zdravljenju demence (34).



Slika 1: Shematski prikaz vzročnih dejavnikov, ki vplivajo na propad nevronov in vodijo v razvoj AB. Povzeto po (35).

1.5. Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni

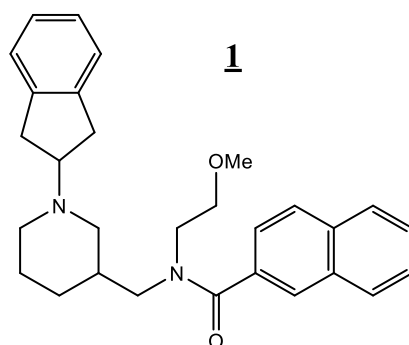
Najmočnejši vpliv na razvoj terapevtskega zdravljenja AB je imela v začetku najstarejša holinergična hipoteza. Acetilholin-esterazni zaviralci se za zdravljenje AB uporabljajo od leta 1993. Prvo odobreno zdravilo takrin zaradi hepatotoksičnih neželenih stranskih učinkov ni več v uporabi. Standardna terapija danes izbira med učinkovinami: donepezil, rivastigmin in galantamin, ki izboljšajo kognitivno funkcijo in omogočajo simptomatsko zdravljenje blage do napredovale AB (33). Za zdravljenje napredovale oziroma hude AB pa se uporablja nekompetitivni antagonist NMDA receptorjev memantin, ki zniža z glutamatom inducirano ekscitacijo in izboljša kognitivno ter mentalno funkcijo (35).



Slika 2: Strukturne formule odobrenih zdravil za zdravljenje AB

1.6. Strategija oblikovanja multiplih ligandov

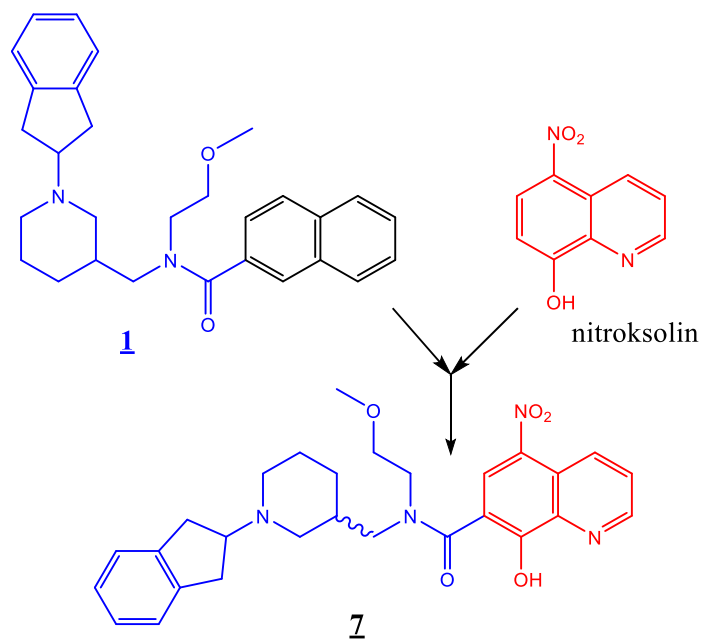
Z obstoječimi zdravili lahko vplivamo na eno tarčo in upočasnimo potek bolezni, kompleksnost AB pa potrjuje, da bi bilo za učinkovito zdravljenje potrebno vplivati na več tarč hkrati. V iskanju spojin, ki vplivajo tako na simptome, kot tudi na sam vzrok bolezni, se je razvila strategija oblikovanja multiplih ligandov, ki stoji za idejo združitve različnih farmakoforov, povezanih z ustreznim distančnikom v eno strukturo (33,36). Številni dejavniki, ključni za razvoj etiologije AB, so znanstvenike spodbudili k iskanju novih učinkovin z dobrim varnostnim profilom, ki vsebujejo farmakofore za vezavo v aktivna mesta različnih tarč patoloških procesov AB (37). V iskanju novih reverzibilnih zaviralcev BChE so raziskovalci na Fakulteti za farmacijo uspešno izvedli virtualno reševanje in določili bazični center (aminska skupina) kot nujno potreben strukturni element za vezavo v aktivno mesto encima. S pomočjo ustreznih programov (FILTER, OBGREP, ROCS) so pripravili kvalitetno in obogateno knjižnico spojin, na katerih so z uporabo razrešene kristalne strukture BChE (PDB koda 1P01 in 1P0M) izvedli strukturno podprto reševanje in dobili serijo novih potencialnih zdravilnih učinkovin. Spojino zadetek je predstavljal selektivni nanomolarni zaviralec rekombinantne človeške butirilholin-esteraze (huBChE) **1** z izkazano dobro zaviralno aktivnostjo spontane agregacije A β (61.7% pri 10 μ M) (14).



$$IC_{50} = 0,021 \pm 0,002 \mu\text{M}$$

Slika 3: Spojina 1 z nanomolarno srednjo zaviralno koncentracijo proti huBChE

Z nadaljnjo optimizacijo so poskušali izdelati spojino, ki bi bila sposobna povečati ravni ACh, zavirati tvorbo in agregacijo A β ter znižati nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti. Na podlagi kristalne strukture kompleksa spojine 1 in huBChE so oblikovali serijo spojin z dušikovim bazičnim centrom (protoniran obroč piperidina), ki preko kation- π interakcij omogoča prepoznavo liganda in vezavo v aktivno mesto encima. Preko tvorbe hidrofobnih in van der Waalsovih interakcij s hidrofobnimi aminokislinskimi preostanki huBChE, so ugotovili popolno prileganje naftalenskega obroča v acil-vezavni žepek. Zaradi nespecifične narave teh interakcij so naftalenski obroč zamenjali z 8-hidroksikinolinskim skeletom nitroksolina, ki poleg dodatnih interakcij z aminokislinskimi preostanki, ponuja tudi fragment za antioksidativno aktivnost in kelacijo kovinskih ionov (Slika 4) (37).



Slika 4: Strukturni prikaz nastanka preiskovanih spojin (7) z združitvijo fragmenta za afiniteto do holin-esteraz s fragmentom za kelacijo kovinskih ionov in antioksidativnim delovanjem

2. NAČRT DELA

V okviru magistrske naloge bomo postavili in izvedli teste za biokemijsko ovrednotenje potencialnih multiplih ligandov za zdravljenje AB. Namen našega dela je optimizacija postopkov iz literature, s katerimi bomo lahko preverili vpliv delovanja multiplih ligandov na različne farmakološke tarče in dokazali vezavo nitroksolinskih analogov v aktivno mesto butirilholin-esteraze.

Preiskovanim spojinam bomo spektrofotometrično preverili topnost za ovrednotenje mejne uporabne koncentracije v različnih pufrskih raztopinah. Zanimala nas bo absorbanca pri 440 nm in 490 nm, za nadaljnje preiskave s fluorescenčnim testom tioflavina-T, s katerim bomo določali zaviralno delovanje na spontano in s kovinskimi ioni inducirano agregacijo A β ₁₋₄₂. V naslednjem koraku bomo raziskali zmožnosti multiplih ligandov za kelacijo dvovalentnih kovinskih ionov. S pomočjo UV-VIS spektroskopskih metod bomo spremljali premike maksimumov absorbančnih spektrov raztopin preiskovanih spojin v prisotnosti različnih kovinskih ionov (Cu, Zn, Co, Ni, Mg, Ca, Fe) in poskušali razrešiti vezavno stehiometrijo kompleksov kovinski ion-ligand. Za zagotovitev nemotene homeostaze esencialnih kovinskih ionov kot sta Ca in Mg, bomo preverili tudi selektivnost nitroksolinskih analogov za Cu. Antioksidativne lastnosti bomo določali z eno najpogosteje uporabljenih metod, testom razbarvanja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH \cdot). Spremembo barve bomo spremljali spektrofotometrično in preko razlike med absorbanca negativne kontrole in vzorca s potencialnim antioksidantom določili koncentracijo spojine, ki reducira 50% radikalov DPPH (EC₅₀). Jakost zaviranja preiskovanih učinkovin proti rekombinantni človeški BChE (huBChE) in mišji AChE (mAChE) bomo določili s pomočjo Ellmanove metode. Z encimskim testom bomo spektrofotometrično spremljali nastanek rumeno obarvanega 5-tio-2-nitrobenzoatnega aniona, ki se tvori tekom reakcije med tioholinom in 5-5'-tiobis-2-nitrobenzojsko kislino (Ellmanov reagent, DTNB) (38). Spojinam z dobro zaviralno aktivnostjo bomo določili srednjo zaviralno koncentracijo (IC₅₀) *in vitro*.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Kemikalije

Topila in reagente smo pridobili iz komercialnih virov: Acros Organics, Aldrich, Merck TCI Europe, Carlo Erba. Fluka, Alfa Aesar, Fluorochem.

Priprava pufrov in reagentov

- 0,1 M fosfatni pufer pH 8.0

Na analitski tehtnici smo v plastični tehtalni čolniček zatehtali 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (MM = 137,99 g/mol), dodali v stekleno posodo in raztopili v 900 mL prečiščene vode. Raztopini smo z 1 M NaOH uravnali pH do 8.0 ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake 1000 mL.

- 150 mM HEPES pufer/150 mM NaCl, pH 7.4

Na analitski tehtnici smo v plastične tehtalne čolničke zatehtali 35,745 g HEPES proste kisline (MM = 2,383 g/mol) in 8,766 g NaCl (MM = 58,44 g/mol). HEPES prosto kislino smo dodali v stekleno posodo in raztopili v 900 mL prečiščene vode. Raztopini smo dodali NaCl in pH uravnali z 1 M NaOH do 7.4 ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake 1000 mL.

- 10 mM HEPES pufer/150 mM NaCl, pH 6.7

Na analitski tehtnici smo v plastične tehtalne čolničke zatehtali 2,383 g HEPES proste kisline (MM = 2,383 g/mol) in 8,766 g NaCl (MM = 58,44 g/mol). HEPES prosto kislino smo dodali v stekleno posodo in raztopili v 900 mL prečiščene vode. Raztopini smo dodali NaCl in pH uravnali z 1 M NaOH do 6.7 ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake 1000 mL.

- 20 mM HEPES pufer/150 mM NaCl, pH 7.4

Na analitski tehtnici smo v plastične tehtalne čolničke zatehtali 4,766 g HEPES proste kisline (MM = 2,383 g/mol) in 8,766 g NaCl (MM = 58,44 g/mol). HEPES prosto kislino smo dodali v stekleno posodo in raztopili v 900 mL prečiščene vode. Raztopini smo dodali NaCl in pH uravnali z 1 M NaOH do 7.4 ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake 1000 mL.

- **Založne raztopine kovinskih ionov**

Za pripravo 6 mM založnih raztopin kovinskih ionov smo na analitski tehtnici v falkonke natančno zatehtali približno količino CuCl_2 , ZnCl_2 , $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 , CaCl_2 oziroma FeCl_2 in raztopili v ustrezno preračunani količini pufru 10 mM HEPES / 150 mM NaCl, pH 6.68 (Preglednica I)

Preglednica I: Kemikalije in potrebne količine za pripravo založnih raztopin kovinskih ionov

Založna raztopina	kemikalija	MM [g/mol]	masa [mg]	V pufru [uL]
Cu^{2+}	CuCl_2	170,5	1,0	977,5
Zn^{2+}	ZnCl_2	136,3	0,8	1202
Co^{2+}	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	237,9	1,5	1050
Ni^{2+}	$\text{NiCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	147,6	0,9	101
Mg^{2+}	MgCl_2	95,2	0,6	1050
Fe^{2+}	$\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	198,81	1,0	838,3 ¹
Ca^{2+}	CaCl_2	110,9	0,9	1351

¹ $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ smo raztopili v 1 mM raztopini askorbinske kisline v 10 mM HEPES / 150 mM NaCl, pH 6.68.

- **1 mM askorbinska kislina v pufru 10 mM HEPES / 150 mM NaCl, pH 6.68**

Na analitski tehtnici smo v falkonko zatehtali 12,4 mg askorbinske kisline (MM = 176,12 g/mol) in raztopili v 7,041 mL pufru 10 mM HEPES / 150 mM NaCl, pH 6.68. Pripravljeno 10 mM raztopino askorbinske kisline smo redčili desetkrat do končne koncentracije 1 mM raztopine antioksidanta.

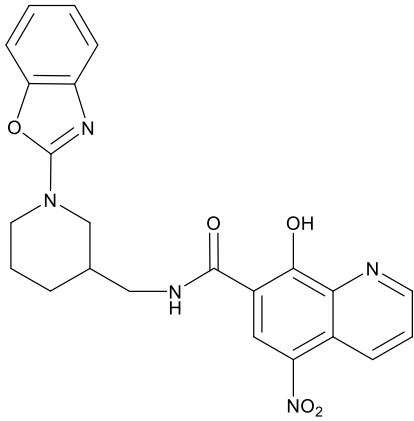
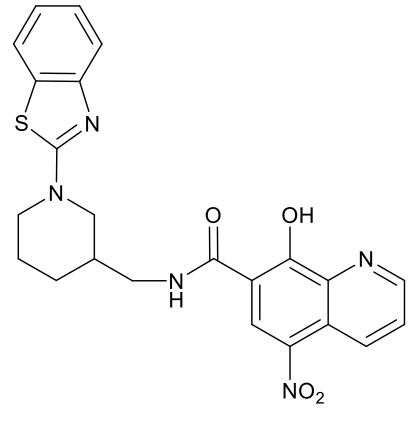
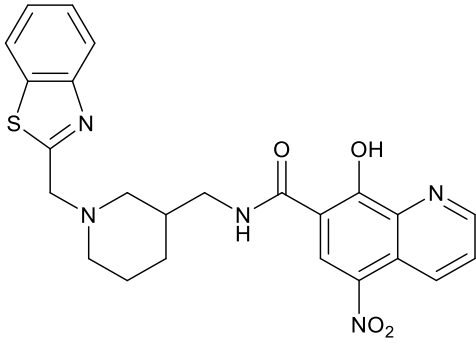
- **Založna raztopina DPPH'**

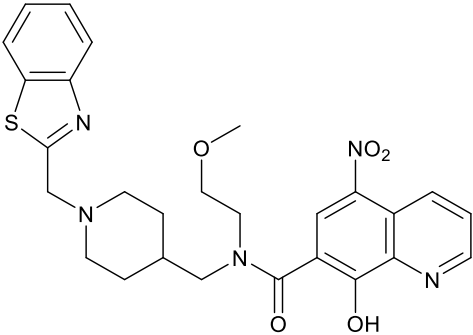
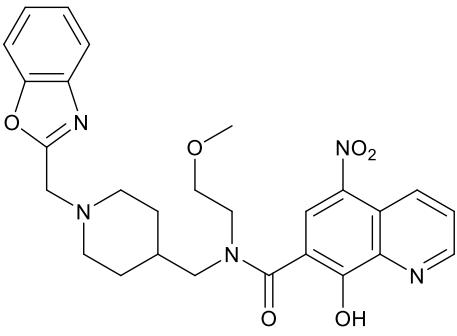
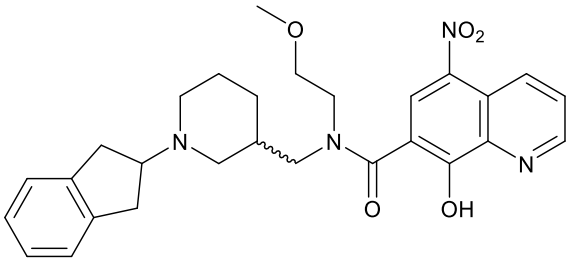
Za pripravo 1,2 mM založne raztopine smo na analitski tehtnici zatehtali 4,73 mg DPPH' (MM = 394,32 g/mol) v 25 mL merilno bučko in dopolnili z EtOH do oznake. Pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku, zaščiteno pred svetlobo. Za meritve kinetike smo uporabili desetkrat redčeno založno raztopino DPPH' (120 μM): v penicilinko, ovito z alufolijo, smo odmerili 9,0 mL EtOH in dodali 1,0 mL založne raztopine.

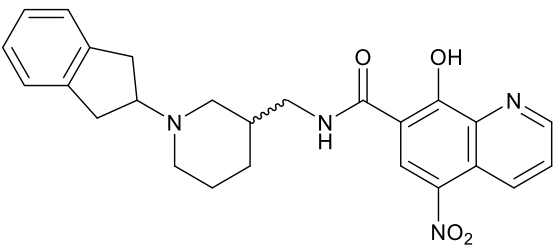
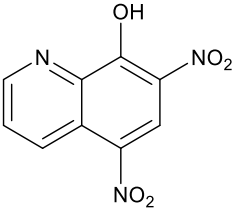
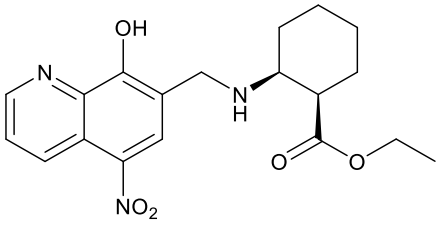
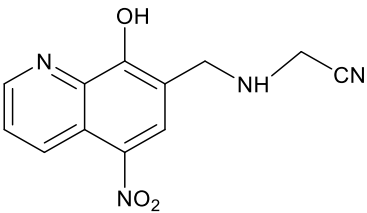
Priprava spojin

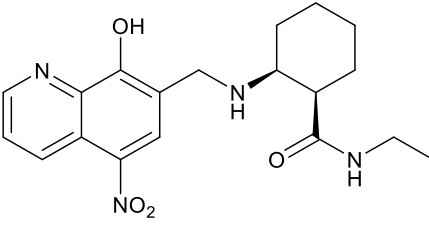
Za pripravo 10 mM založnih raztopin smo sintetizirane učinkovine zatehtali v mikrocentrifugirke na analitski tehtnici in jih raztopili v ustreznem volumnu dimetilsulfoksida (DMSO) (Preglednica II). Za lažje raztapljanje smo jih za 30 sekund postavili na vorteks in za 30 sekund v ultrazvočno kadičko. Iz založnih raztopin smo z redčenjem v DMSO pripravili naslednje koncentracije spojin: 3 mM, 1 mM in 0.3 mM. Organoleptičen izgled: svetlo do živo rumena barva spojin v trdnem agregatnem stanju.

Preglednica II: Strukturne formule nitroksolinjskih derivatov in potrebne količine za pripravo založnih raztopin preiskovanih spojin

Spojina / MM [g/mol]	Struktura	Zatehta [mg]	V (DMSO) [μL]
<p style="text-align: center;"><u>2</u></p> <p>N-((1-benzoksazol-2-yl)piperidin-3-yl)methyl-8-hydroxy-5-nitroquinolin-7-carboxamide</p> <p style="text-align: center;">/ 447,44 g/mol</p>		2,18	487,2
<p style="text-align: center;"><u>3</u></p> <p>N-((1-benzotiazol-2-yl)piperidin-3-yl)methyl-8-hydroxy-5-nitroquinolin-7-carboxamide</p> <p style="text-align: center;">/ 463,51 g/mol</p>		1,02	220,1
<p style="text-align: center;"><u>4</u></p> <p>N-((1-(benzotiazol-2-ylmethyl)piperidin-3-yl)methyl)-8-hydroxy-5-nitroquinolin-7-carboxamide</p> <p style="text-align: center;">/ 477,54 g/mol</p>		0,43	90,0

<p>5</p> <p>N-((1-(benzotiazol-2-ilmetil)piperidin-3-il)metil)-8-hidroksi-N-(2-metoksietil)-5-nitrokinolin-7-karboksamid</p> <p>/ 535,61 g/mol</p>		<p>1,68</p>	<p>313,7</p>
<p>6</p> <p>N-((1-benzoksazol-2-ilmetil)piperidin-3-il)metil)-8-hidroksi-N-(2-metoksietil)-5-nitrokinolin-7-karboksamid</p> <p>/ 519,55 g/mol</p>		<p>2,10</p>	<p>404,2</p>
<p>7</p> <p>N-((1-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)piperidin-3-il)metil)-8-hidroksi-N-(2-metoksietil)-5-nitrokinolin-7-karboksamid</p> <p>/ 504,58 g/mol</p>		<p>1,82</p>	<p>360,7</p>

<p><u>8</u> N-((1-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)piperidin-3-il)metil)-8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-karboksamid</p> <p>/ 446,50</p>		1,40	313,5
<p><u>9</u> 5,7-dinitrokinolin-8-ol</p> <p>/ 235,15 g/mol</p>		1,10	467,8
<p><u>10</u> (1R,2S)-etil-2-(((8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-il)metil)amino)cikloheksan-1-karboksilat</p> <p>/ 373,40 g/mol</p>		0,90	241,0
<p><u>11</u> 2-(((8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-il)amino)acetonitril</p> <p>/ 258,23 g/mol</p>		0,70	271,1

<p style="text-align: center;"><u>12</u></p> <p>(1R,2S)-N-etil-2- (((8-hidroksi-5- nitrokinolin-7- il)metil)amino)cikl ohexsan-1- karboksamid</p> <p>/ 372,40 g/mol</p>		<p style="text-align: center;">1,00</p>	<p style="text-align: center;">268,5</p>
--	--	---	--

Laboratorijska oprema

Pri delu smo uporabljali laboratorijski pribor različnih proizvajalcev. Za redčenje založnih raztopin vzorcev in reagentov smo uporabljali tipse in enokanalne pipete znamke Eppendorf. Kemikalije smo tehtali na analitski tehtnici Sartorius. Za hitrejše raztapljanje smo uporabili vorteks in ultrazvočno kadičko. Za meritve smo uporabili brezbarvne mikrotitrne ploščice z ravnim dnom Thermo Fischer Scientific s 96 vdolbinicami in spektrofotometer Synergy™ H4 Hybrid Reader. Vzorce in reagente smo na mikrotitrne plošče nanašali z večkanalnimi pipetami znamke Eppendorf.

3.2. METODE

Preverjanje topnosti

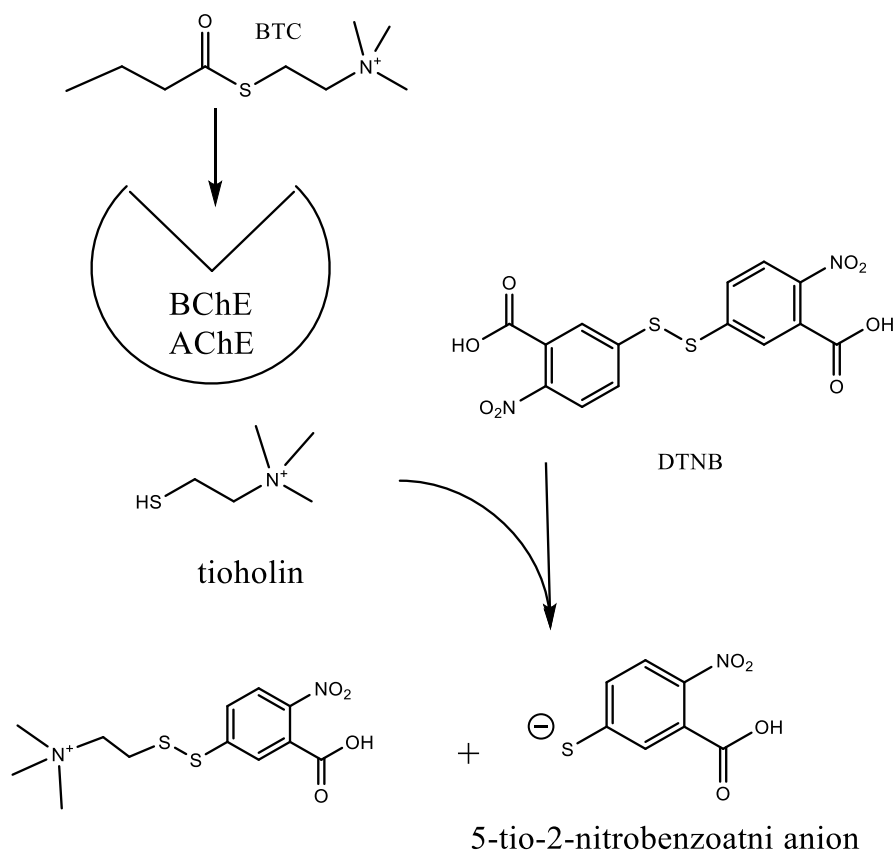
Topnost smo preverjali z merjenjem absorbance preiskovanih učinkovin na spektrofotometru Synergy™ H4 Hybrid Reader (BioTek Instruments), po modificiranem postopku iz literature (39). Absorpcijo nitroksolinskih derivatov smo določali pri 600 nm, 440 nm in 490 nm valovne dolžine, v različnih raztopinah pufrov uporabljenih pri nadaljnjih meritvah.

Vrednotenje zaviranja spontane agregacije A β

Sposobnost preiskovanih spojin za zaviranje spontane agregacije novonastalih fibrilov A β , v katere se tioflavin-T specifično veže, smo določali s prilagojenim testom po LeVinu (40). Intenziteto fluorescence v odsotnosti in prisotnosti testnih spojin smo preverjali na čitalcu mikrotitrskih ploščic Synergy™ H4 Hybrid Reader (BioTek Instruments). Založno raztopino rekombinantnega človeškega peptida A β ₁₋₄₂ (Merck Millipore, Nemčija) smo

Ellmanova metoda

Jakost zaviranja preiskovanih učinkovin proti rekombinantni človeški BChE (huBChE) in mišji AChE (mAChE) smo določili z metodo po Ellmanu (38). Encima v založni koncentraciji 4,6 mg/mL v 10 mM HEPES pufru pH 6.5 so nam podarili raziskovalci Inštituta za strukturno biologijo v Grenoblu. Ustrezne raztopine encimov smo pripravili z redčenjem založnih raztopin v 0.1 M fosfatnem pufru pH 8.0. Za dokazovanje zaviranja huBChE smo kot substrat uporabili butiriltioholin jodid (BTC), ki po reakciji z encimom razpade na butirat in tioholin. Tioholin je produkt encimske hidrolize substrata. Substrat za mAChE je acetiltioholin jodid (ATC), ki hidrolizira na acetat in tioholin. 5-5'-tiobis-2-nitrobenzojsko kislino (Ellmanov reagent, DTNB), BTC in ATC smo pridobili pri Sigma Aldrich, Nemčija. Nastajanje Ellmanovega produkta se kaže kot sprememba absorbance, ki smo jo spremljali na spektrofotometru Synergy™ H4 Hybrid Reader (BioTek Instruments), pri 412 nm. Intenziteta rumene barve je sorazmerna stopnji hidrolize tioholina (44). Bolj kot so naše spojine zavirale huBChE oziroma mAChE, manj rumeno obarvanega produkta je nastalo in manjša je bila izmerjena absorbanca.



Slika 6: Shematski prikaz Ellmanove reakcije

UV-VIS spektrofotometrija

Meritve encimskih testov, antioksidativnih lastnosti, kelacije kovinskih ionov in topnosti smo izvajali na čitalcu mikrotitrskih ploščic Synergy™ H4 Hybrid Reader (BioTek Instruments, Inc., ZDA). S čitalcem, ki se upravlja z računalniškim programom Gen5™, smo merili spremembe absorbanc naših vzorcev. Naprava kot vir svetlobe uporablja ksenonsko žarnico in monokromator za izbiro zelene valovne dolžine od 200 do 999 nm (45).

Risanje in poimenovanje struktur

Strukturne formule smo risali in poimenovali s pomočjo programa ChemDraw Proffesional 15.0, proizvajalca CambridgeSoft.

Obdelava podatkov

Rezultate meritev smo obdelali s programom Excel 2013. Večina obdelanih rezultatov je prikazana grafično.

Določanje fizikalno-kemijskih lastnosti

pKa smo izračunali s programom ChemDraw Proffesional 15.0, proizvajalca CambridgeSoft. Ostale parametre (cLogP, polarna površina molekule (tPSA), molekulska masa, število donorjev in akceptorjev vodikove vezi ter število vrtljivih vezi) smo določili s pomočjo programa Molinspiration Cheminformatics (46).

4. EKSPERIMENTALNO DELO

Eksperimentalni del magistrske naloge obsega prilagojene postopke iz literature, s katerimi smo raziskali lastnosti multiplih ligandov nitroksolina.

4.1. Preverjanje topnosti

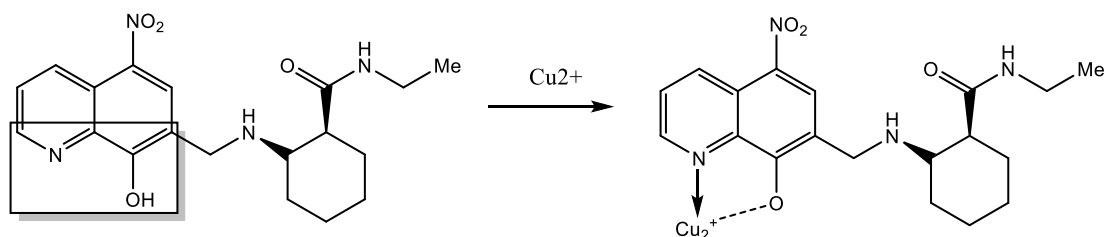
Topnost preiskovanih učinkovin smo preverjali z UV-spektroskopsko metodo, z določanjem absorbance v različnih pufrskih raztopinah. Alikvote (3 μL) 10 mM, 3 mM, 1 mM in 0.3 mM raztopin preiskovanih spojin smo prenesli na čisto mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami (A – H x 12), v katero smo predhodno nanesti 297 μL 0,1 M fosfatnega pufrja pH 8.0. (100-kratno redčenje spojin). Končna koncentracija spojin v testu je bila 100 μM , 30 μM , 10 μM in 3 μM . Topnost spojin **10** in **12** je pri 10 mM presežena, zato smo analizirali le koncentracije, manjše od 3 mM. Ploščo smo na čitalcu mikrotitrskih plošč Synergy™ H4 (BioTek Instruments) inkubirali 5 minut pri zmernem tresenju. Posneli smo absorbančne spektre in izmerili absorbanco spojin pri 600 nm. Ker je absorbanca v mikrotitrskih ploščah odvisna od višine raztopine v vdolbinici, smo pri meritvah uporabili vgrajeno opcijo popravka dolžine poti žarka, ki je absorbanco normiral na dolžino 1 cm (primerljivost z merjenjem v standardni kivet). Meritve smo izvajali pri sobni temperaturi. Izmerjenim absorbancom smo določili povprečne vrednosti in odšteli slepo vrednost (1% DMSO v 297 μL pufrske raztopine). Postopek smo ponovili s pufrom 150 mM HEPES / 150 mM NaCl, pH 7.4. Alikvotom smo izmerili absorbance pri 440 nm, 490 nm in 600 nm. Nadalje smo preverili topnost spojin še v pufru 10 mM HEPES / 150 mM NaCl, z nižjim pH 6.7. Absorbanco spojin smo izmerili pri 600 nm valovne dolžine.

4.2. Kelacija kovinskih ionov

Vezavno stehiometrijo kompleksov Cu^{2+} -ligand smo določali v 10 mM HEPES pufru / 150 mM NaCl pH 6.7. Za test kelacije bakra in določitev stehiometrije, smo pripravili 6 mM založno raztopino CuCl_2 in ter redčili do naslednjih koncentracij pufrnih raztopin: 600 μM , 300 μM , 150 μM , 75 μM , 30 μM in 10 μM . V vdolbinice mikrotitrskih plošč smo nanašali po 2 μL 3 mM raztopin nitroksolinskih analogov, 20 μL različnih koncentracij raztopin CuCl_2 in 180 μL 10 mM pufrja HEPES / 150 mM NaCl pH 6.7. Končne koncentracije Cu^{2+} v reakcijski zmesi so znašale: 60 μM , 30 μM , 15 μM , 7,5 μM , 3,0 μM in 1,0 μM . Končna koncentracija raztopin spojin je bila 30 μM in delež organskega topila v 200 μL vedno 1%.

Na čitalcu mikrotitrskih ploščic Synergy™ H4 (BioTek Instruments) smo pri sobni temperaturi spremljali spremembe absorbančnega spektra v prisotnosti različnih koncentracij Cu^{2+} in jih primerjali z absorbančnim spektrom slepega vzorca, v katerega smo namesto 20 μL raztopine kovinskega iona dodali 20 μL 10 mM pufru HEPES / 150 mM NaCl pH 6.7. Po principu testa kelacije z bakrom smo izvedli tudi test negativne kontrole, kjer smo namesto naših spojin uporabili dve spojini, ki nimata aktivnega mesta za keliranje kovinskih ionov.

Kelirajoče lastnosti nitroksolinskih derivatov z ostalimi redoks aktivnimi ioni smo določali v 20 mM pufru HEPES / 150 mM NaCl pH 7.4. Pripravili smo 6 mM založne raztopine CuCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 in FeCl_2 v 10 mM HEPES pufru / 150 mM NaCl pH 6.7. Raztopino FeCl_2 smo pripravili v prisotnosti 1 mM askorbinske kisline v 10 mM HEPES pufru / 150 mM NaCl pH 6.7. Fe^{2+} v reakcijski zmesi pri aerobnih pogojih oksidira do Fe^{3+} hidroksi derivatov živo rumene barve, ki ligandom preprečijo vezavo Fe^{2+} . Askorbinska kislina drži železo v Fe^{2+} obliki in ga ne kompleksira ter omogoča nastanek kompleksa Fe^{2+} -ligand. Pred izvedbo testa kelacije smo založne raztopine kovinskih ionov redčili do koncentracije 300 μM v pufru s pH 7.4, tako da je bila končna koncentracija raztopin ionov v testu 30 μM . V vdolbinice mikrotitrskih plošč smo nanašali po 2 μL 3 mM raztopin nitroksolinskih analogov, 20 μL 300 μM raztopin CuCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 in FeCl_2 ter 180 μL 20 mM pufru HEPES / 150 mM NaCl pH 7.4. Razmerje koncentracij spojine in kovinskega iona v končni testni raztopini je bilo 1:1. V slepem vzorcu smo namesto 20 μL raztopine kovinskega iona dodali 20 μL pufru 20 mM HEPES / 150 mM NaCl pH 6.7. Po 5 minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo na čitalcu Synergy™ H4 merili spremembe absorpcijskega spektra specifičnega za določen ion, v primerjavi s slepo raztopino. Nadalje smo vrednotili sposobnost selektivne vezave kovinskih ionov Cu^{2+} proti drugim kovinskim ionom. Raztopinam preiskovanih spojin (30 μM , 1% DMSO), predhodno inkubiranim z ostalimi kovinskimi ioni v razmerju 1:1, smo dodali ekvimolarne količine CuCl_2 do končne koncentracije 30 μM . Po 5 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo posneli absorbančne spektre. S premikom maksimumov absorbanc, kompleksa kovinski ion-ligand po dodatku raztopine Cu^{2+} , pri 450 nm, smo potrdili selektivnost bakrovega iona.



Slika 7: Shematski prikaz vezave kovinskih ionov Cu^{2+} v kompleks s spojino 12

4.3. Antioksidativne lastnosti spojin

Test redukcije radikalov DPPH \cdot

Zmožnost lovljenja radikalov smo vrednotili z določanjem jakosti redukcije radikalov 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH \cdot). V etanolu smo pripravili 1,2 mM založno raztopino DPPH \cdot in vzorce različnih koncentracij spojin: 60 μM , 120 μM , 240 μM , 480 μM in 960 μM . Pred izvedbo testa smo na napravi SynergyTM H4 (BioTek Instruments) pomerili absorbanco raztopine DPPH \cdot pri različnih koncentracijah in volumnih (30 μM / 60 μM v 200 μL / 300 μL končnega volumna). Točnost meritev je največja v območju [0.2 - 0.7] nm valovne dolžine, pri koncentraciji DPPH \cdot od 25 μM do 70 μM (42). Izbrali smo najbolj optimalno koncentracijo, ki ima najvišjo absorbanco pri valovni dolžini 517 nm in še ostane v optimalnem merilnem območju instrumenta, tj. 60 μM s končnim volumnom 300 μL . 150 μL etanolne raztopine DPPH \cdot (120 μM) smo dodali 150 μL vzorca raztopine etanola z različnimi koncentracijami preiskovanih spojin (60 – 960 μM) in samega etanola, ki je služil kot negativna kontrola. Končna koncentracija preiskovanih spojin v reakcijski zmesi je bila 30 μM , 60 μM , 120 μM , 240 μM ali 480 μM . Za pozitivno kontrolo smo uporabili quercetin, ki smo ga pripravili pod enakimi pogoji kot preiskovane spojine v testu. Vzorce smo nanegli na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbnicami in ravnim dnom, stresali 1 minuto in pustili v temi na sobni temperaturi. Po 90 minutah smo na čitalcu mikrotitrskih plošč izmerili absorbance preiskovanih spojin pri 517 nm, pri različnih koncentracijskih razmerjih. Absorbanco smo pomerili tudi samemu etanolu in mešanici 150 μL etanolne raztopine preiskovanih spojin v 150 μL etanola, da smo lahko odšteli ozadje za DPPH \cdot in ozadje vzorca. Eksperimente smo izvajali v triplikatih. Procent DPPH \cdot smo izračunali po enačbi:

$$\text{Procent radikalov DPPH } (\%) = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100, \quad (1)$$

kjer A_0 predstavlja absorbanco negativne kontrole in A_1 absorbanco testnega vzorca. Jakost redukcije DPPH \cdot smo izrazili kot koncentracijo spojine, ki reducira 50% DPPH \cdot (EC_{50}) \pm standardna napaka (41).

4.4. Zaviralna aktivnost proti holin-esterazam

Ellmanova metoda

Zaviralne aktivnosti preiskovanih učinkovin proti holin-esterazam smo določili po Ellmanovi metodi. V testu smo uporabili 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojsko kislino (DTNB; Ellmanov reagent), ATC ali BTC in mišjo AChE (mAChE) oziroma rekombinantno človeško BChE (huBChE). mAChE in huBChE smo pripravili z redčenjem založne raztopine encima (4 mg/mL v 10 mM MES pufru, pH 6.5) v 0,1 M fosfatnem pufru, pH 8.0. V istem pufru smo pripravili tudi založne raztopine ATC/BTC (1 mM) in DTNB (874 μ M). Reakcije smo izvajali v končnem volumnu 300 μ L 0,1 M fosfatnega pufra, pH 8.0, vsebujoč 370 μ M DTNB, 5×10^{-4} M acetilholina oziroma butirilholina in 1×10^{-9} ali 5×10^{-11} M mAChE oziroma huBChE. Zelena aktivnost encima v testu je bila približno 500 mAU/min. V vdolbinice mikrotitrskih plošč smo najprej nanesti 127 μ L Ellmanovega reagenta, po 3 μ L ustrezne koncentracije preiskovanih spojin in 20 μ L encima. Pri slepem vzorcu smo dodali 3 μ L DMSO, tako da je bil končni delež organskega topila vedno 1%. Reagent, encim in zaviralec smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi, da smo omogočili popolno uravnoteženje kompleksa encim-zaviralec, reakcijo pa sprožili z dodatkom 150 μ L substrata. Rezultat reakcije DTNB s tioholini je nastanek 5-tio-2-nitrobenzoatnega aniona. Nastanek rumenega produkta smo spremljali 1 minuto na čitalcu mikrotitrskih ploščic Synergy™ H4 (BioTek Instruments), kot spremembo absorbance pri 412 nm. Iz dobljenih meritev smo izračunali začetno hitrost encima v odsotnosti (v_0) in prisotnosti (v_i) testnih spojin, kjer smo vsako meritev ponovili trikrat. Za določitev slepe vrednosti (b) smo raztopino encima zamenjali s fosfatnim pufrom. Zaviralno aktivnost smo izrazili kot rezidualno aktivnost ($RA = (v_i - b) / (v_0 - b)$). Testne spojine za prve meritve pri preverjanju zaviralne aktivnosti na huBChE smo pripravili iz založnih raztopin (3 mM in 1 mM) v DMSO. Končna koncentracija spojin v mikrotitrskih ploščicah je bila 30 μ M in 10 μ M. Spojinam z dobro zaviralno aktivnostjo smo izmerili aktivnost še pri nižjih končnih koncentracijah (3 μ M,

1 μM , 300 nM, 100 nM). Pri preverjanju zaviralne aktivnosti na mAChE smo za meritve uporabili 3 mM založne raztopine, s 30 μM končno koncentracijo spojin.

Spojinam, katerih RA je bila pri 10 μM pod 50 %, smo nadalje določili vrednost IC_{50} . Uporabili smo šest do sedem meritev pri različnih koncentracijah vsake preiskovane spojine (30 μM , 10 μM , 3 μM , 1 μM , 300 nM, 100 nM, 30 nM), s katerimi smo določili encimsko aktivnost med 5 % in 90 %. Eksperimentalne podatke smo vgradili v enačbo (1):

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \times (\text{HillSlope}))}), \quad (2)$$

kjer X predstavlja logaritem zaviralne koncentracije, Y rezidualno aktivnost, Top (RA = 1) in Bottom (RA = 0) ter HillSlope naklon krivulje. Za izračun IC_{50} smo uporabili program Gnuplot in lastno kodo Python, ki prilagodi rezultate iz laboratorijske skale (14,37).

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

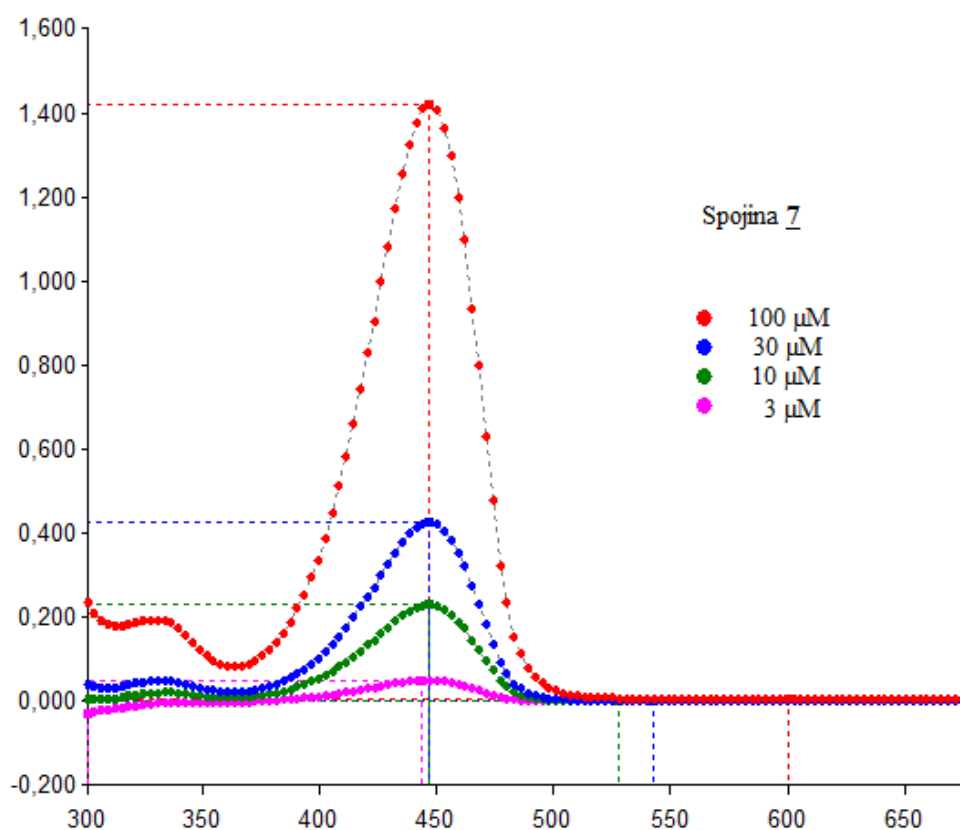
Ovrednotili smo enajst potencialnih zaviralcev butirilholin-esteraze, katerih ogrodje poleg vezave v aktivno mesto encima omogoča privzem reaktivnih kisikovih zvrsti, kelacijo dvovalentnih kovinskih ionov in zaviranje spontane agregacije novonastalih struktur amiloida beta.

5.1. Rezultati in razprava o topnosti

Topnost predstavlja fenomen raztapljanja topljenca v topilu za doseg homogenega sistema in je eden pomembnejših parametrov doseganja željenih koncentracij učinkovin v krvnem obtoku (47). Preiskovanim učinkovinam smo določali topnost v različnih puferskih raztopinah. Iz posnetih absorbančnih spektrov je razvidno, da spojine absorbirajo pri 440 nm, ekscitacija pa se pojavi pri 400 nm valovne dolžine (Slika 8). Absorbance nitroksolinskih derivatov smo merili na sobni temperaturi pri 600 nm in uporabili vrednosti z upoštevanim popravkom dolžine poti žarka na prikaz pri 1 cm. Od določenih povprečnih vrednosti smo odšteli slepo vrednost (1% DMSO v 297 μ L puferske raztopine). DMSO ima minimalen efekt na izmerjeno absorbanco, kar pomeni da je absorbanca posledica sipanja svetlobe netopnih delcev. Koncentracija učinkovine, pri kateri je absorbanca nad predpisano mejo 0.03 AU, je indikacija preseženi topnosti preiskovane substance (39). Ugotovili smo, da so spojine v 0.1 M fosfatnem pufru večinoma uporabne pri 30 μ M koncentraciji (Preglednica III). Primerjava absorbanco spojin pri 600 nm v pufrih 150 mM HEPES / 150 mM NaCl pH 7.4 in 10 mM HEPES / 150 mM NaCl pH 6.7 je pričakovano razkrila boljše topnost spojin pri nižjem pH. Preiskovane spojine so v 150 mM HEPES / 150 mM NaCl pH 7.4 večinoma uporabne pri koncentraciji 30 μ M (Preglednica IV). Iz absorbanco spojin v pufru 10 mM HEPES / 150 mM NaCl pH 6.7 je razvidno, da so spojine v tem pufru uporabne pri najvišji testirani koncentraciji. Vse vrednosti so nižje od 0.03 AU, kar pomeni, da v raztopinah vzorcev ni prihajalo do tvorbe trdnih preostankov, ki se jih s prostim očesom ne vidi (Preglednica V).

Absorbanca preiskovanih spojin v 150 mM HEPES / 150 mM NaCl pH 7.4 pufru pri 440 nm in 490 nm valovne dolžine nas je zanimala zaradi nadaljnjega vrednotenja zaviranja spontane agregacije A β . Intenziteto fluorescence tioflavina-T namreč določamo pri valovni dolžini ekscitacije 440 nm in emisije 490 nm. Iz rezultatov (Preglednica IV) je razvidno, da naše spojine absorbirajo v istem območju valovnih dolžin, kar pomeni, da bi pri izvajanju testa s tioflavinom-T dobili lažno pozitiven rezultat. Zaradi posegov preiskovanih spojin v

ekscitacijo tioflavina-T načrtovanih testov nismo izvajali. Vrednotenje zaviralnega delovanja na spontano agregacijo A β je bilo izvedeno s testom točkovnega nanosa (ang. dot blot) na Inštitutu za strukturno biologijo v Grenoblu, kjer so se za detekcijo poslužili uporabe specifičnega protitelesa za fibrile A β_{1-42} , sklopljene s protitelesom hrenove peroksidaze v prisotnosti 10 μ M koncentracij preiskovanih spojin (37).



Slika 8: Grafičen primer absorbančnega spektra spojine 7 v 0.1 M fosfatnem pufru

Preglednica III: Absorbance preiskovanih spojin v 0.1 M fosfatnem pufru

c [μ M]	Absorbance preiskovanih spojin pri 600 nm valovne dolžine [nm]											
	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	
100 μ M	0,064	0,059	0,047	0,021	0,010	0,004	0,070	-0,001	0,001	0,007	-0,001	
30 μ M	0,010	0,010	0,018	0,016	0,002	0,002	0,023	0,002	0,000	0,002	0,002	
10 μ M	0,002	0,003	0,001	0,001	-0,001	0,002	0,002	0,000	-0,002	0,000	0,001	
3 μ M	0,004	0,002	-0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	-0,001	0,001	

Preglednica IV: Absorbance preiskovanih spojin v pufru 150 mM HEPES / 150 mM NaCl, pH 7.4

c [μ M]	Absorbance preiskovanih spojin pri 440 nm valovne dolžine [nm]										
	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
100 μ M	0,901	0,679	-0,001	1,507	2,164	1,434	n.i. ¹	1,015	0	1,312	1,572
30 μ M	0,491	0,244	0,501	0,374	0,652	0,183	0,63	0,711	1,14	0,374	0,41
10 μ M	0,179	0,064	0,06	0,242	0,302	0,112	0,223	0,227	0,323	0,134	0,121
3 μ M	0,015	0,01	0,056	0,059	0,031	0,021	0,065	0,057	0,1	0,068	0,034
c [μ M]	Absorbance preiskovanih spojin pri 490nm valovne dolžine [nm]										
	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
100 μ M	0,238	0,228	0	0,23	0,281	0,46	n.i. ¹	0,365	0	0,264	0,068
30 μ M	0,082	0,045	0,053	0,076	0,074	0,035	0,07	0,223	0,046	0,083	0,023
10 μ M	0,027	0,012	0,011	0,06	0,035	0,018	0,013	0,07	0,013	0,032	0,008
3 μ M	0,003	0,001	0,009	0,016	0,003	0,003	0,004	0,017	0,004	0,011	0,004
c [μ M]	Absorbance preiskovanih spojin pri 600 nm valovne dolžine [nm]										
	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
100 μ M	0,109	0,113	-0,001	0,065	0,07	0,208	n.i. ¹	0,087	0	0,093	0,003
30 μ M	0,039	0,023	0,023	0,025	0,026	0,016	0,012	0,007	0,003	0,031	0,007
10 μ M	0,013	0,006	0,006	0,021	0,013	0,009	0	0,004	0,003	0,011	0,003
3 μ M	0,005	0,003	0,002	0,007	0,003	0,004	0,002	0,001	0,003	0,007	0,002

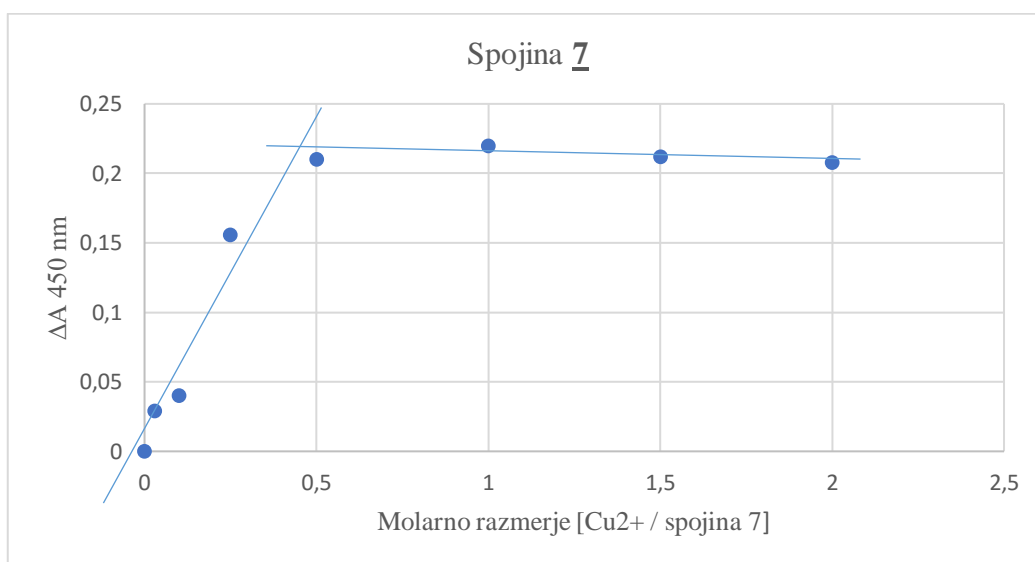
¹n.i.-nismo izmerili**Preglednica V: Absorbance preiskovanih spojin v pufru 10 mM HEPES / 150 mM NaCl, pH 6.7**

c [μ M]	Absorbance preiskovanih spojin pri 600 nm valovne dolžine [nm]										
	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
100 μ M	0,016	0,017	-0,002	0,007	0,004	0,006	0,013	0,001	0,002	0,107	-0,002
30 μ M	0,001	0,007	0,003	0,005	0,005	0,018	0,005	0,003	0,013	0,008	0,003
10 μ M	0,003	0,006	0,006	0,003	0,004	0,004	0,005	0,005	0,004	0,005	0,003
3 μ M	0,004	0,006	0,003	0,002	0,003	0,004	0,004	0,000	0,003	0,004	0,006

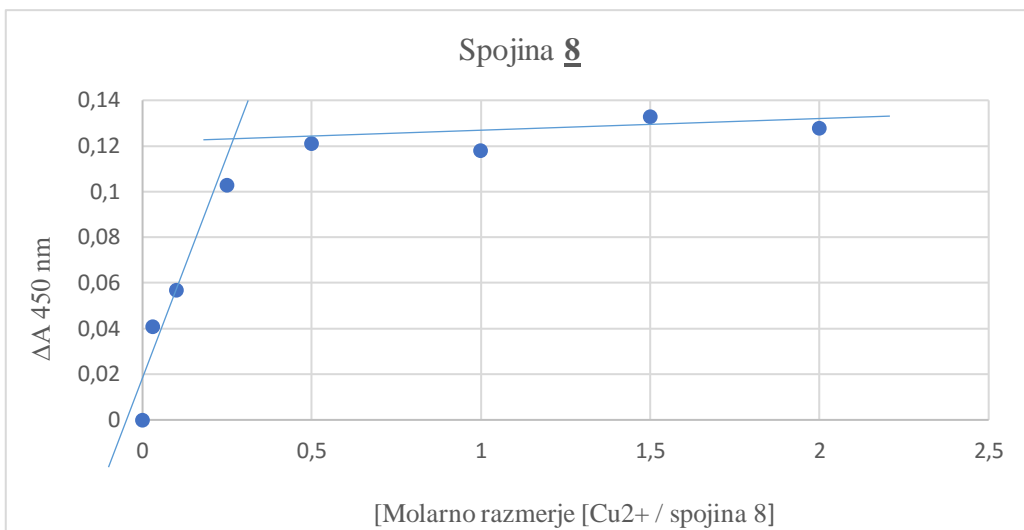
5.2. Rezultati in razprava o kelaciji kovinskih ionov

Vezavno stehiometrijo kompleksov preiskovanih spojin s kovinskimi ioni Cu^{2+} smo raziskali s pomočjo UV-VIS spektroskopskih metod, v 10 mM HEPES pufru / 150 mM NaCl pH 6.7. Spremljali smo spremembe absorbance pri 445 – 450 nm v prisotnosti različnih koncentracij Cu^{2+} , v pufrnih raztopinah ligandov (30 μM , 1% DMSO). S stopnjujočim dodajanjem Cu^{2+} se je zmanjševal maksimum absorpcijskega spektra pri 445 nm oziroma pri nekaterih spojinah pri 450 nm. Trend sprememb v absorbanci, glede na molarno razmerje $[\text{Cu}^{2+}/\text{ligand}]$ je prikazan na slikah 9-12. Grafi prikazujejo točke, iz katerih smo po modificirani Yoe-Jones metodi izrisali premici s presečiščem pri iskanem molarnem razmerju in določili nastanek kompleksa v raztopini (48). S povečevanjem razmerja števila molov Cu^{2+} s številom molov liganda se je razlika absorbanc v primerjavi s slepim vzorcem ($\Delta A_{450 \text{ nm}}$) zviševala, na točki nastanka kompleksa pa dodajanje reaktanta ni povzročilo večjega povišanja absorbance. Prelomno točko smo glede na zmanjšanje nastanka kompleksa določili pri 15 μM koncentraciji Cu^{2+} . Presečišče izrisanih premic pri večini spojin nastopi pri molarnem razmerju 0,5 in sovпада s stehiometrijo vezave, ki ima za kompleks Cu^{2+} -ligand, razmerje 1:2.

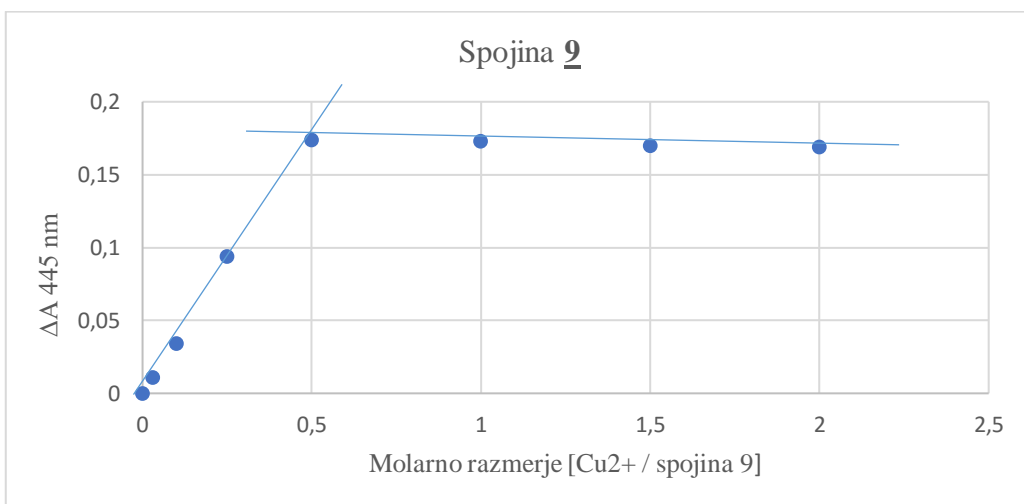
S testom negativne kontrole smo dokazali uporabnost našega testa, torej da dobimo spremembe absorpcijskih spektrov v odvisnosti od koncentracije kovinskih ionov samo pri določenih spojinah, ki vsebujejo aktivno mesto za kovinske ione.



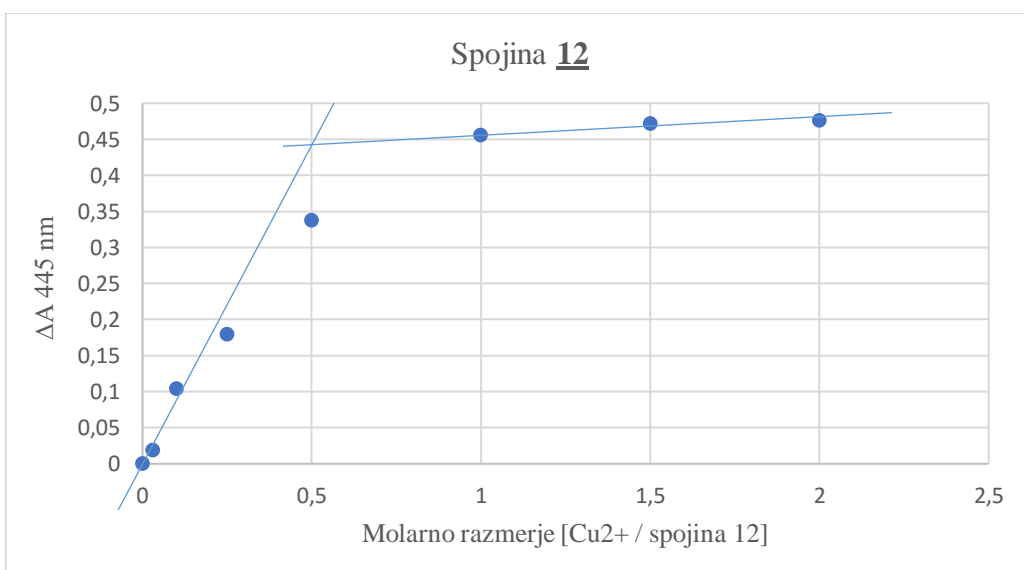
Slika 9: Graf odvisnosti absorbance spojine 7 od naraščajočega molarne razmerja $[\text{Cu}^{2+} / \text{spojina 7}]$



Slika 10: Graf odvisnosti absorbanca spojine 8 od naraščajočega molarnega razmerja [Cu²⁺ / spojina 8]

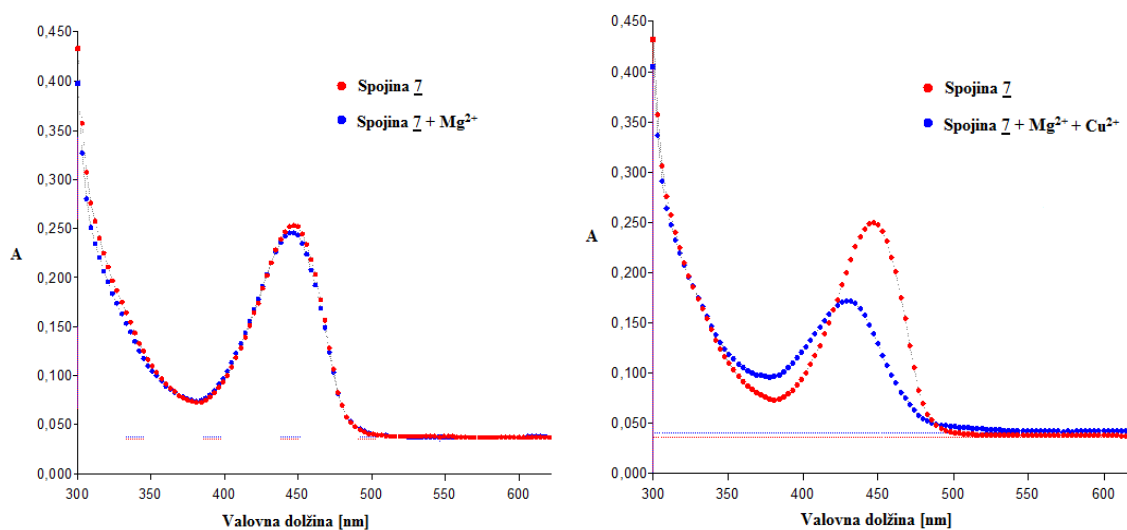


Slika 11: Graf odvisnosti absorbanca spojine 9 od naraščajočega molarnega razmerja [Cu²⁺ / spojina 9]

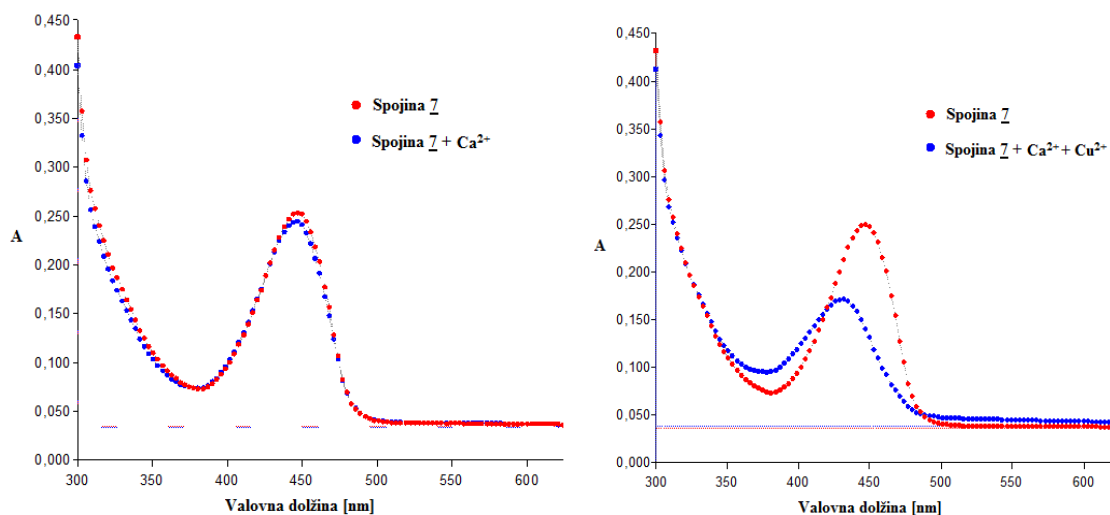


Slika 12: Graf odvisnosti absorbanca spojine 12 od naraščajočega molarnega razmerja [Cu²⁺ / spojina 12]

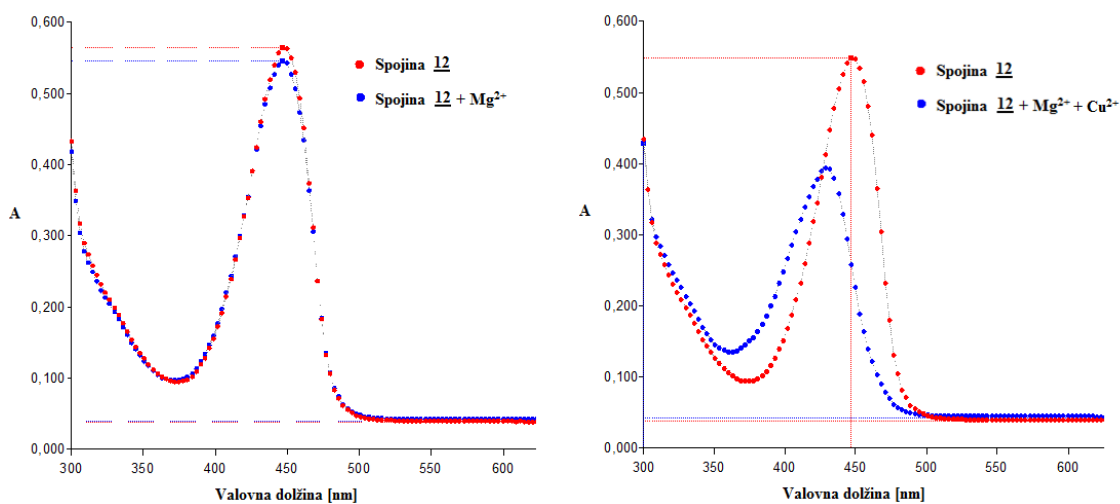
Nadalje smo raziskali zmožnosti nitroksolinskih analogov **2-12** za kelacijo različnih kovinskih ionov. V večini primerov je po dodatku dvovalentnih kovinskih ionov (tj. Cu, Zn, Co, Ni, Mg, Ca in Fe) raztopinam preiskovanih spojin prišlo do premika maksimuma absorbančnega spektra pri 450 nm in zmanjšanja intenzitete v primerjavi s slepim vzorcem, kar kaže na tvorbo kompleksov kovinski ion – ligand. Vse spojine so tvorile komplekse s kovinskimi ioni, ki so v povezavi z agregati amiloida beta (Cu^{2+} , Fe^{2+} in Zn^{2+}), ter s Co^{2+} in Ni^{2+} . Zaradi pomembnosti ohranjanja normalnega delovanja drugih biološko pomembnih ionov, katerih homeostaza ne sme biti motena, smo ovrednotili tudi sposobnost selektivne vezave nitroksolinskih analogov za Cu. Raztopinam spojin **2-12** (30 μM , 1% DMSO), predhodno inkubiranim z ostalimi kovinskimi ioni v molarnem razmerju 1:1, smo dodali ekvimolarne količine CuCl_2 . Primerjava absorpcijskih spektrov kompleksov kovinski ion – ligand v odsotnosti in prisotnosti Cu^{2+} je razkrila, da se Cu^{2+} pri fiziološkem pH veže selektivno pri spojinah **7**, **9**, **10** in **12**. Po dodatku Cu^{2+} se je spojinam **7**, **9**, **10** in **12** absorpcijski spekter iz prej tvorjenih kompleksov z drugimi kovinskimi ioni premaknil na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} (Slika 17-24). Spojini z najbolj izraženim selektivnim delovanjem **7** in **12**, glede na rezultate spektrofotometričnih meritev, ne tvorita kompleksov z Mg^{2+} in Ca^{2+} , kar je pomembno za nemoteno uravnavanje njune homeostaze. (Slika 13-16).



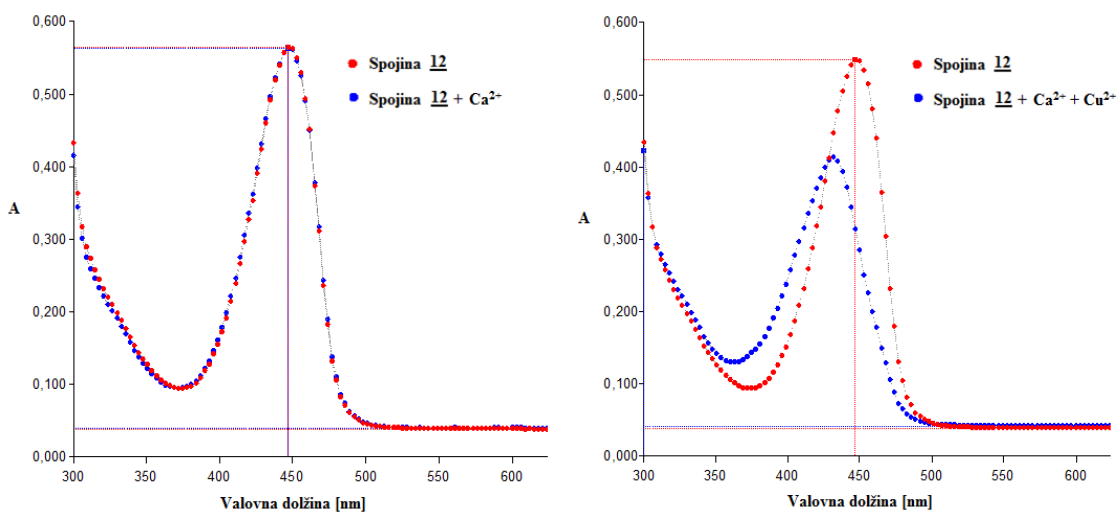
Slika 13: Grafičen prikaz selektivne vezave Cu^{2+} v kompleks s spojino **7**, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} spojini **7**, predhodno inkubirani z Mg^{2+}



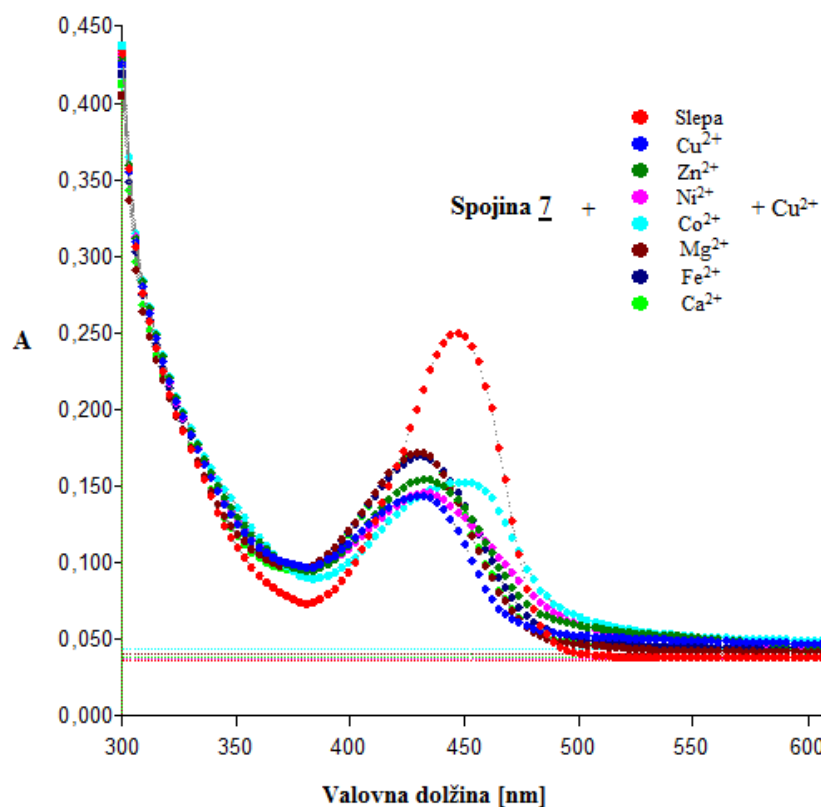
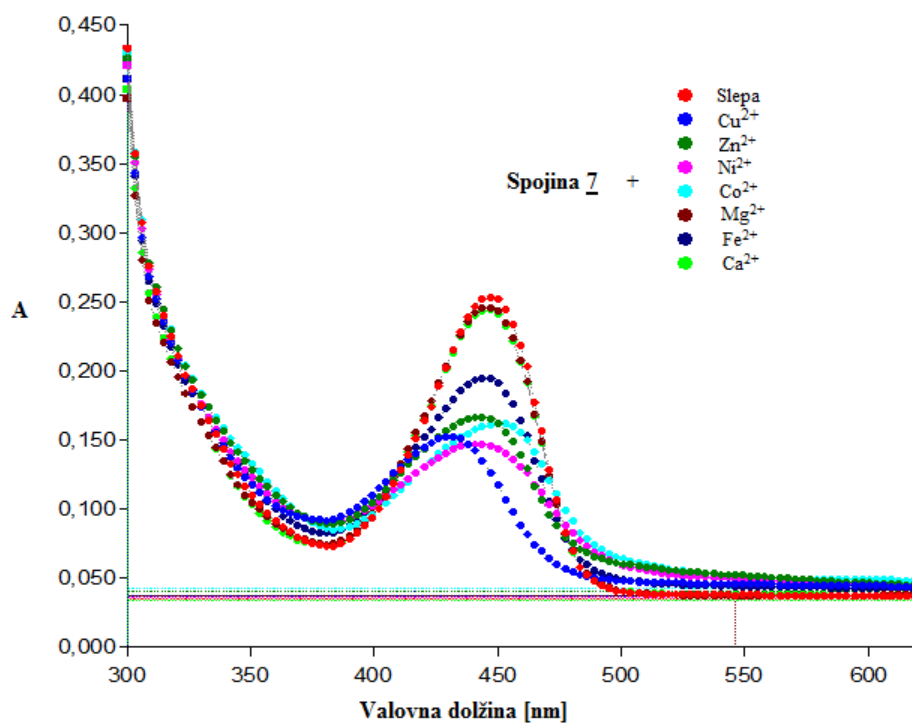
Slika 14: Grafičen prikaz selektivne vezave Cu^{2+} v kompleks s spojino 7, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} spojini 7, predhodno inkubirani s Ca^{2+}



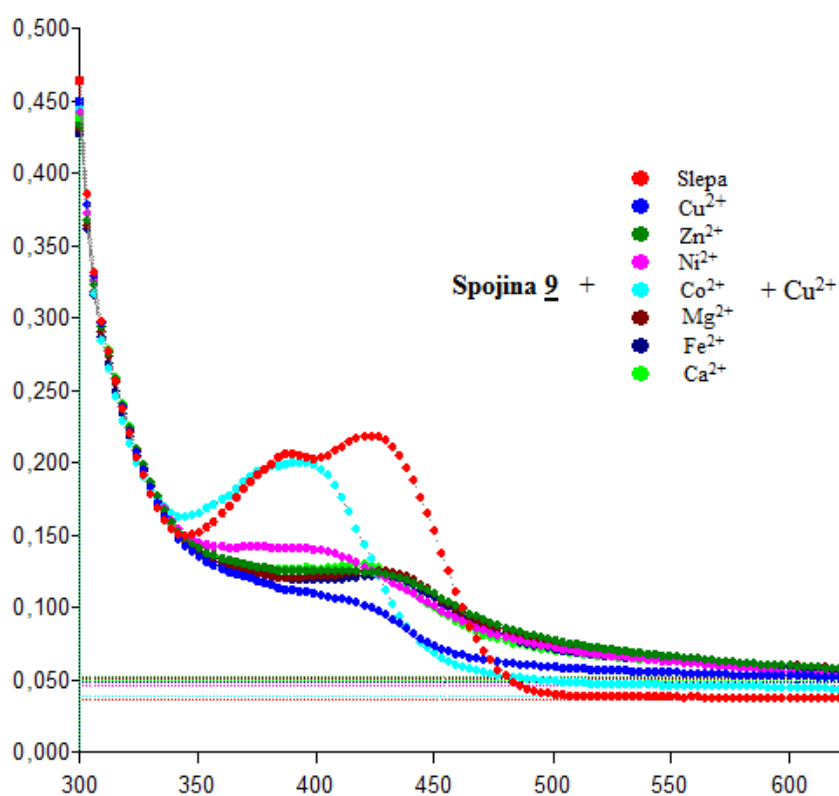
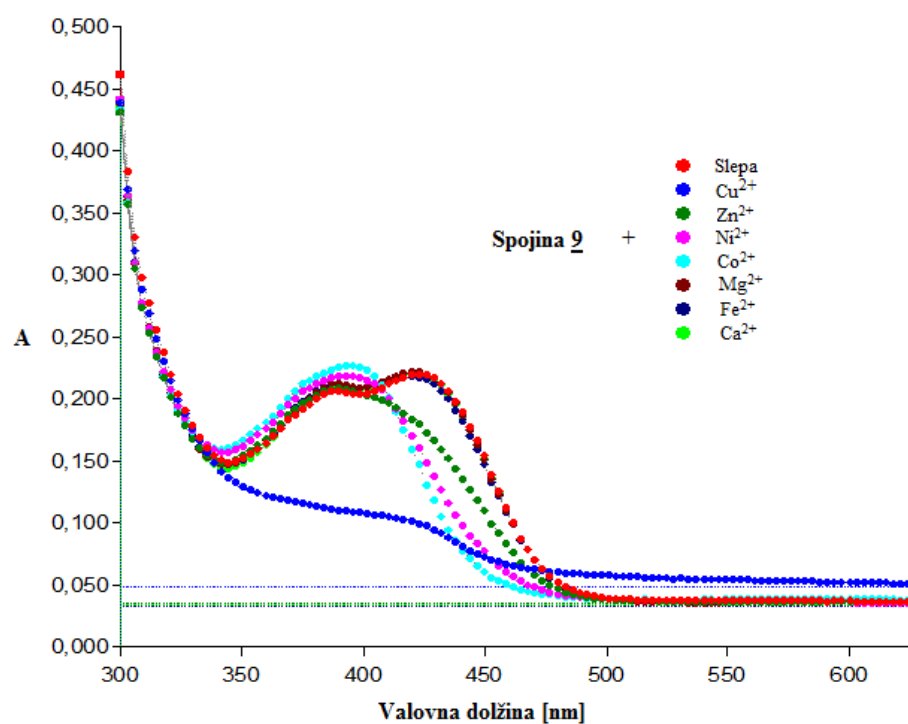
Slika 15: Grafičen prikaz selektivne vezave Cu^{2+} v kompleks s spojino 12, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} spojini 12, predhodno inkubirani z Mg^{2+}



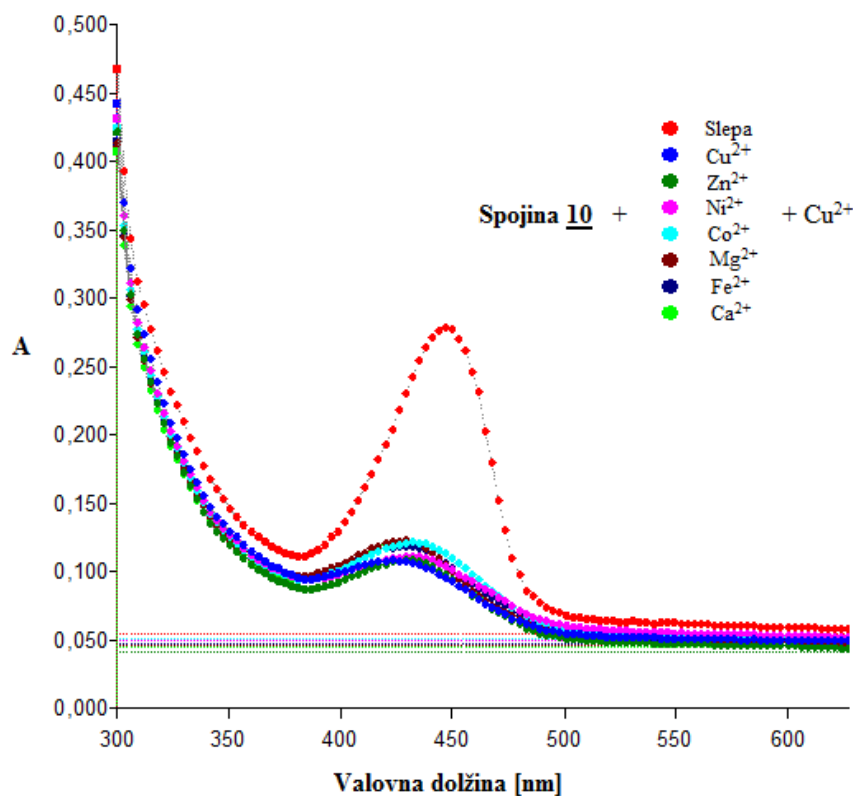
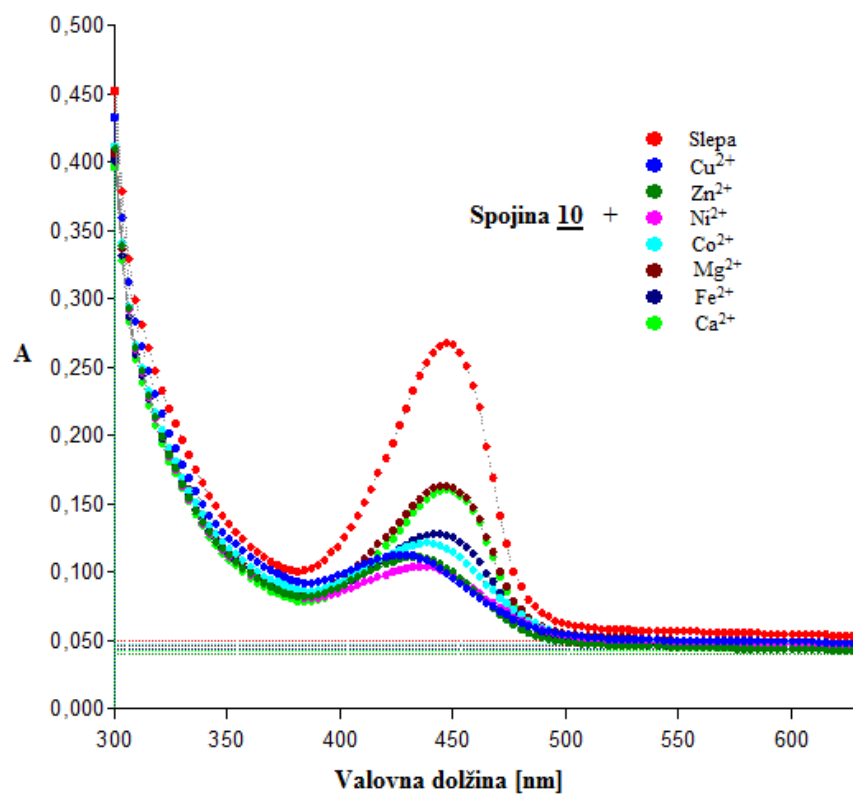
Slika 16: Grafičen prikaz selektivne vezave Cu^{2+} v kompleks s spojino 12, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} spojini 12, predhodno inkubirani s Ca^{2+}



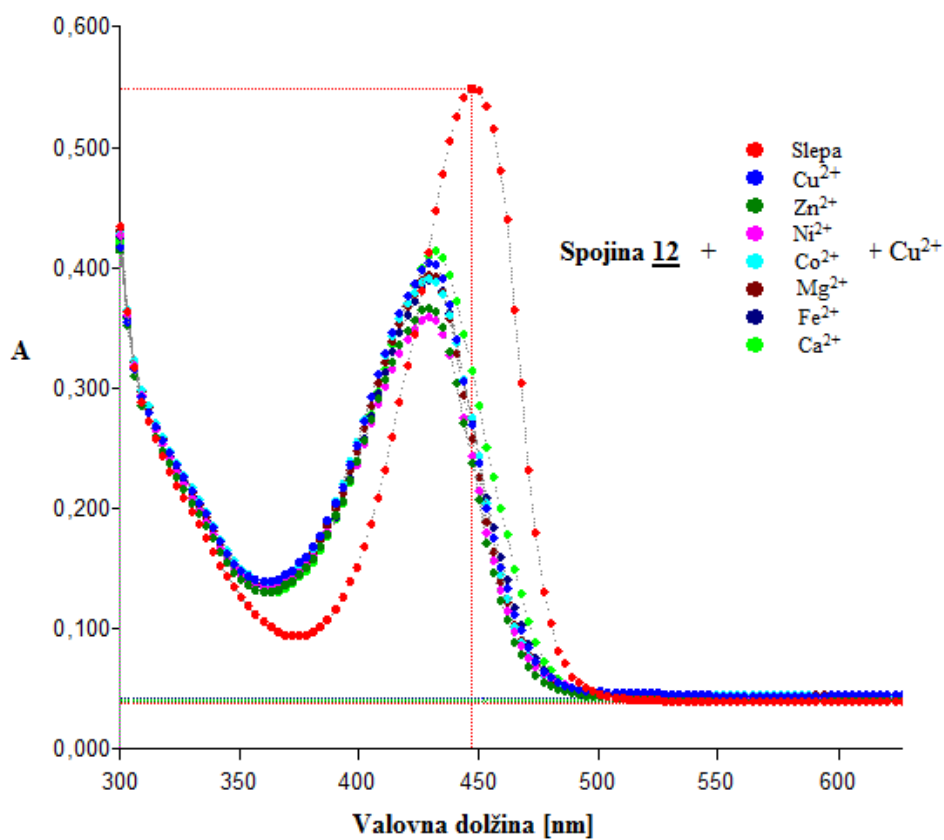
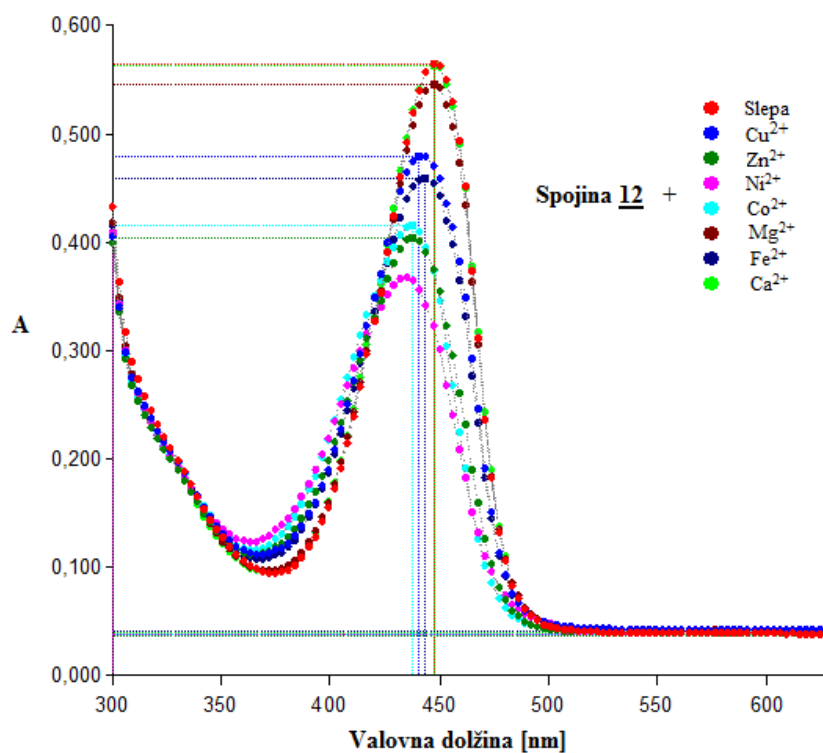
Slika 17: Grafičen prikaz premika maksimuma absorbančnega spektra kompleksa spojine 7 z različnimi kovinskimi ioni na maksimum absorpcije kompleksa Cu²⁺-spojina 7, po dodatku ekvimolarnih količin Cu²⁺



Slika 18: Grafičen prikaz premika maksimuma absorbančnega spektra kompleksa spojine 2 z različnimi kovinskimi ioni na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 2, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+}

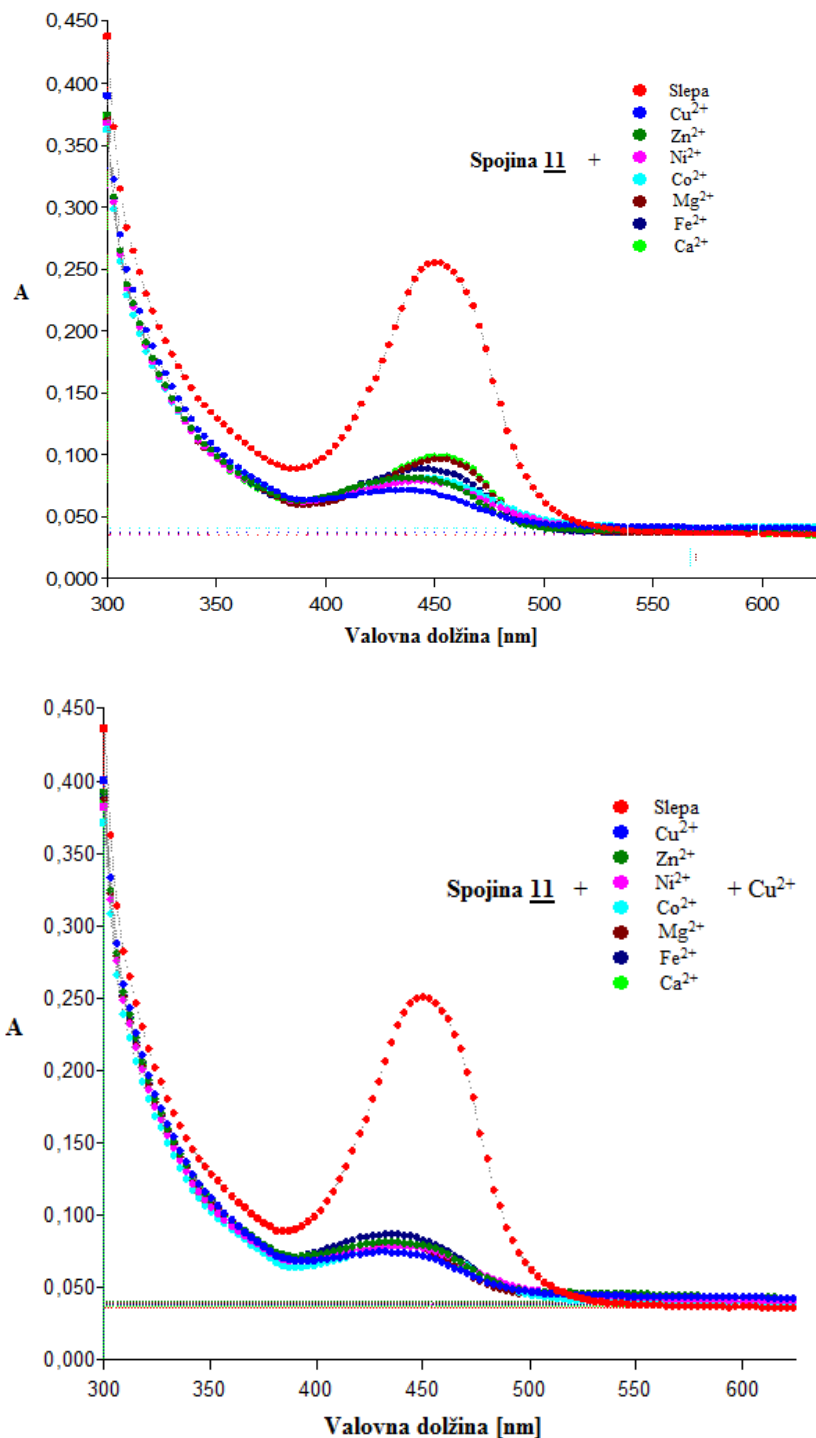


Slika 19: Grafičen prikaz premika maksimuma absorbančnega spektra kompleksa spojine 10 z različnimi kovinskimi ioni na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 10, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+}



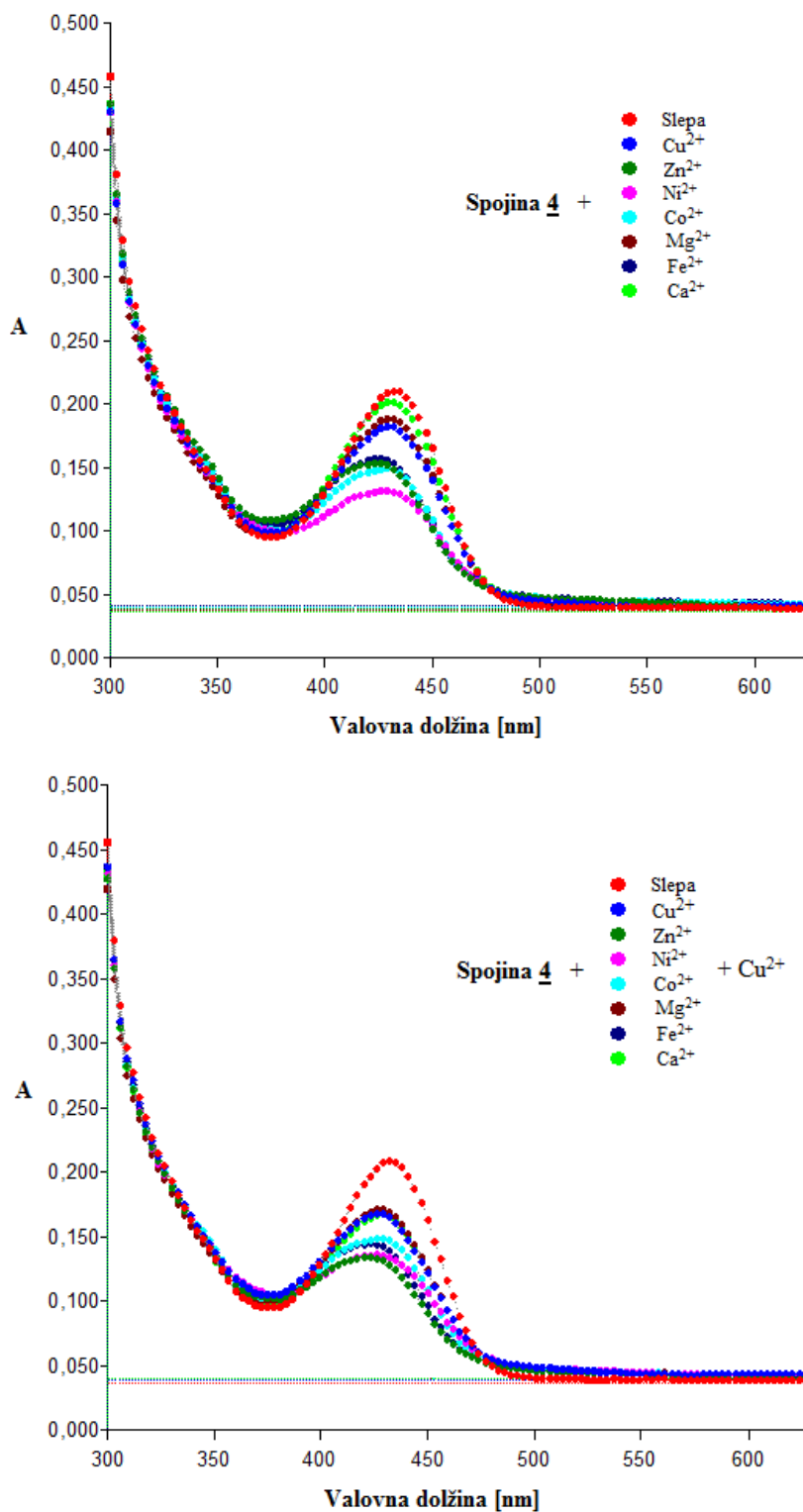
Slika 20: Grafičen prikaz premika maksimuma absorbančnega spektra kompleksa spojine 12 z različnimi kovinskimi ioni na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 12, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+}

Pri spojini **11** je po dodatku Cu^{2+} ostalim redoks aktivnim ionom prišlo do opaznih sprememb spektrov pri Mg^{2+} in Ca^{2+} . Kovinske ione Zn^{2+} , Ni^{2+} in Co^{2+} spojina veže približno enako kakor Cu^{2+} , tako da ne moremo zagotovo trditi, da spojina selektivno veže Cu^{2+} .

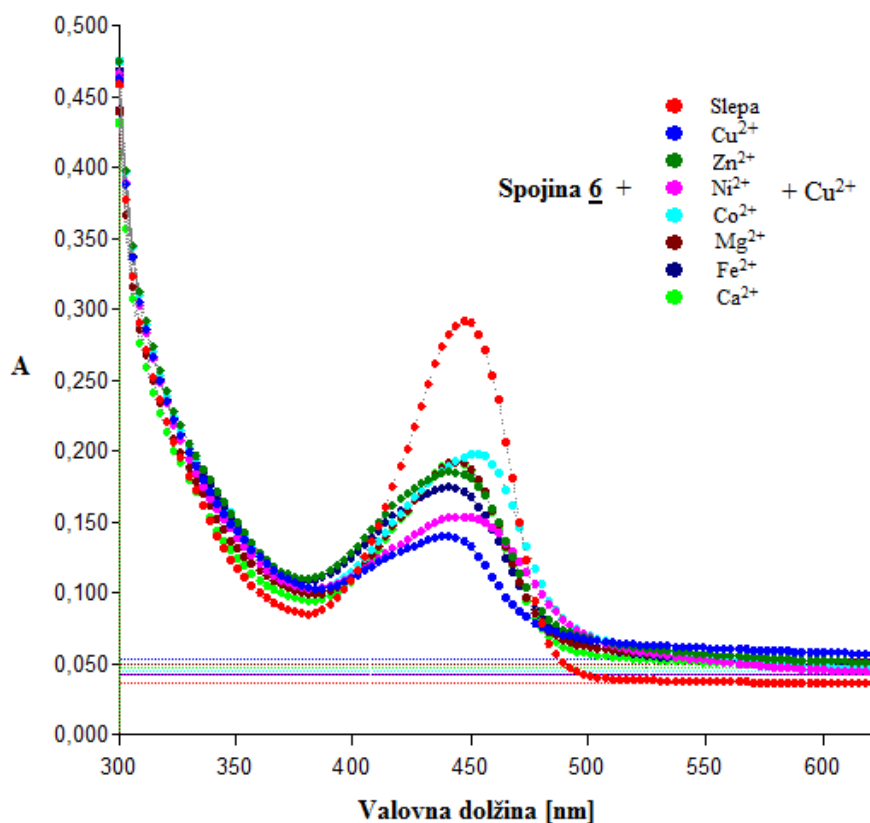
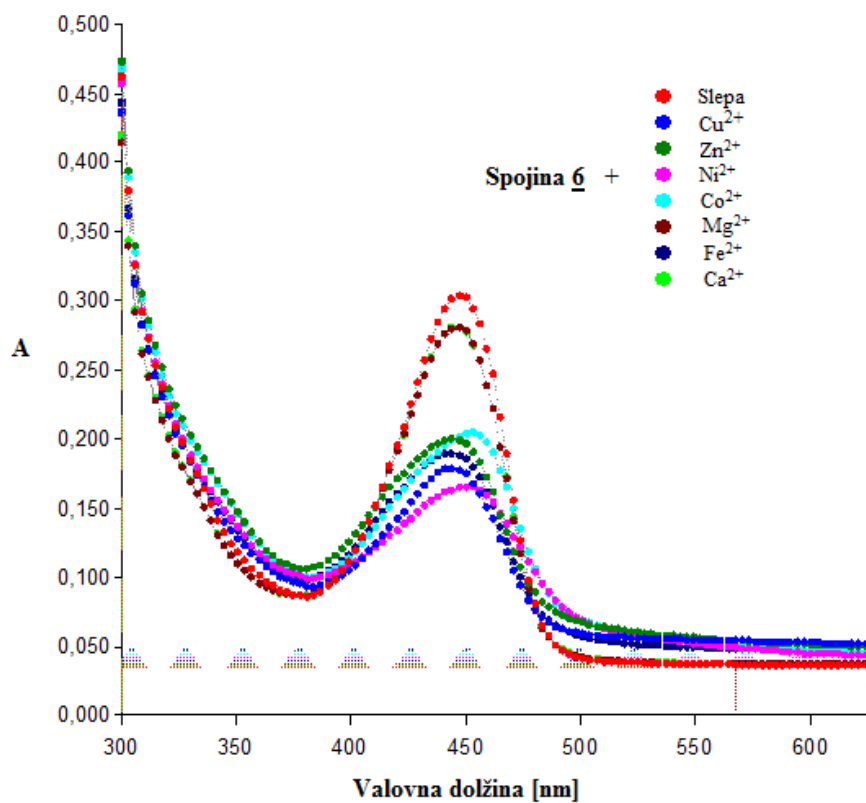


Slika 21: Grafičen prikaz premika maksimuma absorbančnega spektra kompleksa spojine **11** z različnimi kovinskimi ioni na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina **11**, po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+}

Do premika spektralnega pasu na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -ligand po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} ni prišlo pri spojinah 2, 3, 4, 5, 6 in 8. Spojine 2, 3, 5 in 8 so vezale vse testirane kovinske ione (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} in Ca^{2+}).



Slika 22: Grafičen prikaz absorbančnega spektra kompleksa spojine 4 z različnimi kovinskimi ioni pred in po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} , brez premika na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 4



Slika 23: Grafičen prikaz absorbančnega spektra kompleksa spojine 6 z različnimi kovinskimi ioni pred in po dodatku ekvimolarnih količin Cu^{2+} , brez premika na maksimum absorpcije kompleksa Cu^{2+} -spojina 6

Pri spojini **4** ni prišlo do nastanka kompleksa s Ca^{2+} , spojina **6** pa poleg Ca^{2+} ni vezala tudi kovinskih ionov Mg^{2+} . Rezultati absorbančnih meritev kažejo, da je strukturno pomemben fragment za kelacijo kovinskih ionov 8-hidroksi-5-nitrokinolin. Selektivna vezava kovinskih ionov Cu^{2+} je verjetno posledica ravnovesja dvovalentnih ionov in selektivno sposobnih preiskovanih spojin v raztopini, da kelirajo baker v razmerju 1:2 (Cu^{2+} -ligand). Predvidevamo, da je za selektivno vezavo potrebna dovolj majhna in rigidna struktura, ki omogoča vezavo dveh molekul spojine z enim ionom Cu^{2+} .

V slepem vzorcu askorbinske kisline, dodane vzorcu z FeCl_2 , nismo upoštevali, saj je absorbanca askorbinske kisline pri 450 nm komaj znatna (0,039) in ne vpliva na interpretacijo rezultatov, kjer opazujemo razliko v spektrih, ki potrjuje kelacijo Fe^{2+} in selektivnost na kovinske ione Cu^{2+} .

5.3. Rezultati in razprava o antioksidativnih lastnostih

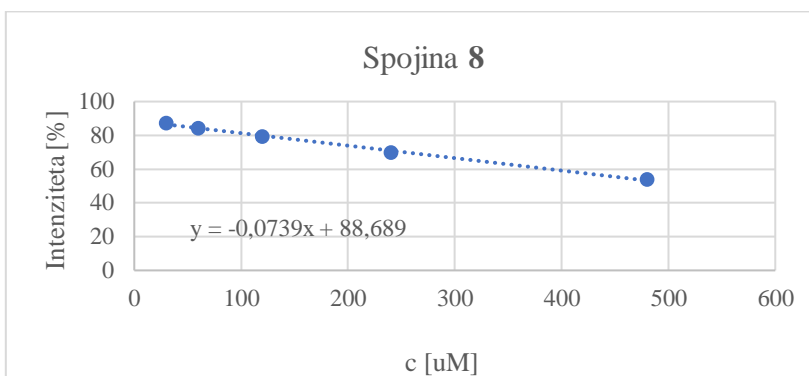
Testiranje nitroksolinskih analogov s testom lovljenja radikalov DPPH je pokazalo šibke reducirajoče lastnosti posameznih spojin. Rezultati so prikazani v preglednici VI. Spojine lahko delujejo kot antioksidanti, tako da donirajo hidroksilni radikal molekuli DPPH \cdot . Med preiskovanimi spojinami sta se najboljše izkazali spojina **10** [$\text{EC}_{50} = 353,89 \pm 15,0 \mu\text{M}$] in spojina **11** [$\text{EC}_{50} = 302,83 \pm 7,1 \mu\text{M}$]. Fenolna skupina na nitrokinolinskem delu molekule spojin **10** in **11** reagira z DPPH \cdot in donira vodikov atom. Višje koncentracije spojin za redukcijo 50% DPPH \cdot so potrebne pri spojinah: **2** [$\text{EC}_{50} = 880,96 \pm 8,4 \mu\text{M}$], **4** [$\text{EC}_{50} = 1325,45 \pm 1,7 \mu\text{M}$], **6** [$\text{EC}_{50} = 770,25 \pm 1,9 \mu\text{M}$], **8** [$\text{EC}_{50} = 523,53 \pm 0,9 \mu\text{M}$] in **12** [$\text{EC}_{50} = 621,35 \pm 4,5 \mu\text{M}$] (Preglednica VI). Spojine **3**, **5**, **7** in **9** so v primerjavi s quercetinom, ki smo ga uporabili kot pozitivno kontrolo [$\text{EC}_{50} = 10,92 \pm 0,0066 \mu\text{M}$], skoraj popolnoma neaktivne: **3** [$\text{EC}_{50} = 3829,65 \pm 4,5 \mu\text{M}$], **5** [$\text{EC}_{50} = 4142,40 \pm 2,3 \mu\text{M}$], **7** [$\text{EC}_{50} = 3448,83 \pm 3,7 \mu\text{M}$], **9** [$\text{EC}_{50} = 4052,87 \pm 4,3 \mu\text{M}$]. Hidroksilna skupina nitroksolinskega skeleta očitno ne reagira z DPPH \cdot in ne donira hidroksilnega radikala, kar je verjetno posledica elektron-privlačnega efekta NO_2 skupine na *para* mestu nitroksolinskega skeleta. Posledično imajo te spojine višjo nagnjenost k darovanju tega protona, namesto hidroksilnega radikala. Spojine **5**, **7**, in **9** v svoji strukturi nimajo druge skupine, ki bi lahko oddala hidroksilni radikal. Iz serije najmanj aktivnih spojin po strukturi izstopa spojina **3**, ki je amid s protonom in bi teoretično lahko donirala vodikov atom. Ostali analogi nitroksolina izkazujejo bolj ali manj šibke antioksidativne lastnosti. V primerjavi s pozitivno kontrolo so bistveno šibkejši antioksidanti. V svoji strukturi imajo amid s protonom spojine **2**, **4** in **8**; sekundarni amin s

protonom pa imajo spojine **10**, **11** in **12**. Oba strukturna elementa sta pogosta pri antioksidantih. V seriji aktivnih spojin po strukturi izstopa spojina **6**, ki nima protona na amidni skupini in po tej logiki ne bi smela biti aktivna.

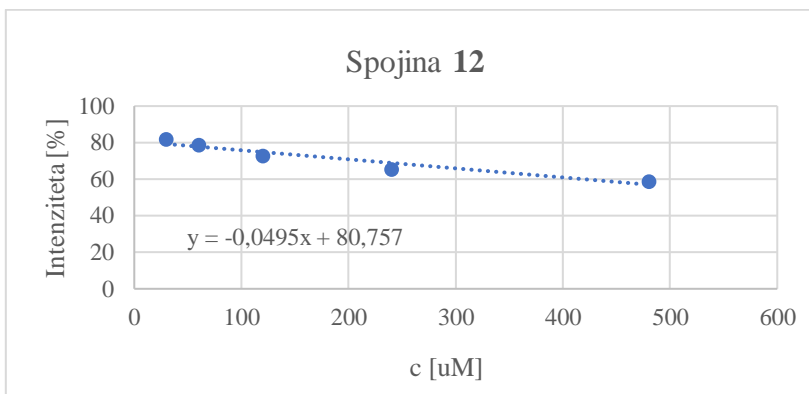
Preglednica VI: Prikaz aktivnosti nitroksolinskih analogov za redukcijo DPPH'

Spojina	EC ₅₀ [μM] ¹
2	880,96 ± 8,4
3	3829,65 ± 4,5
4	1325,45 ± 1,7
5	4142,40 ± 2,3
6	770,25 ± 1,9
7	3448,83 ± 3,7
8	523,53 ± 0,9
9	4052,87 ± 4,3
10	353,89 ± 15,0
11	302,83 ± 7,1
12	621,35 ± 3,0
quercetin	10,90 ± 0,0066

¹ EC₅₀, koncentracija spojin, ki reducira 50% DPPH' ± standardna napaka



Slika 24: Graf odvisnosti procenta radikalov DPPH' [%] od koncentracije [μm] spojine **8**



Slika 25: Graf odvisnosti procenta radikalov DPPH' [%] od koncentracije [μm] spojine **12**

5.4. Rezultati in razprava o zaviralni aktivnosti holin-esteraz

Za ovrednotenje zaviralne aktivnosti nitroksolinskih analogov *in-vitro* in določitev njihove selektivnosti za huBChE in mAChE smo po metodi Ellmana neposredno merili hitrost nastajanja produkta encimske hidrolize. Rezultate absorbančnih meritev spojin pri 30 μM koncentraciji smo izrazili kot rezidualno aktivnost (RA), ki prikaže razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti in odsotnosti zaviralca (Preglednica VII). Spojine, katerih RA je večja od 0,950 (RA \geq 95.0%), ne izkazujejo zaviranja. Analogom z dobro zaviralno aktivnostjo smo določili RA še pri nižjih koncentracijah. Trem spojinam, katerih RA je bila pri koncentraciji spojine 10 μM nižja od 0,500 (RA \leq 50%), smo določili tudi srednjo zaviralno koncentracijo (IC_{50}). IC_{50} predstavlja koncentracijo spojine, potrebno za zavrtje aktivnosti encima za polovico.

Preglednica VII: Prikaz zaviralne aktivnosti nitroksolinskih analogov proti encimoma huBChE in mAChE

Spojina	huBChE		mAChE	
	RA [30 μM]	IC_{50} [μM]	RA [30 μM]	IC_{50} [μM]
<u>2</u>	0,914 \pm 0,078	n.d.	n.z.	n.d.
<u>3</u>	n.i.	n.d.	n.z.	n.d.
<u>4</u>	0,444 \pm 0,009	n.d.	n.z.	n.d.
<u>5</u>	0,129 \pm 0,005	2,14	n.z.	n.d.
<u>6</u>	0,805 \pm 0,039	n.d.	n.z.	n.d.
<u>7</u>	0,014 \pm 0,024	0,215	n.z.	n.d.
<u>8</u>	0,747 \pm 0,001	n.d.	0,641 \pm 0,042	n.d.
<u>9</u>	n.z.	n.d.	0,856 \pm 0,047	n.d.
<u>10</u>	0,389 \pm 0,010	n.d.	0,514 \pm 0,055	n.d.
<u>11</u>	n.z.	n.d.	(n.z.)	n.d.
<u>12</u>	0,577 \pm 0,041	n.d.	0,214 \pm 0,065	7,87

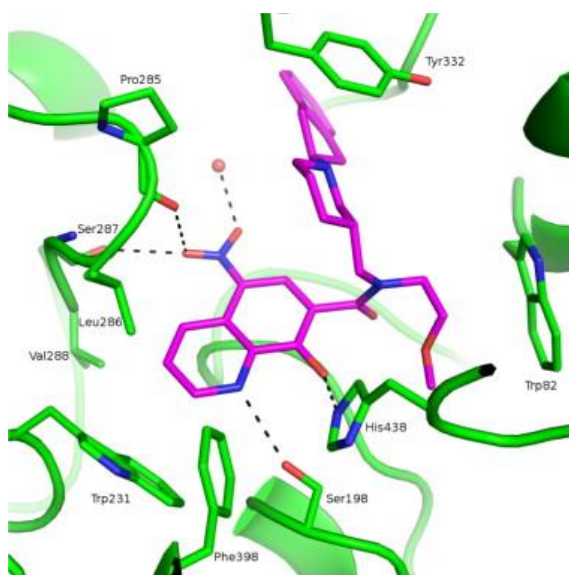
n.d. – nismo določili; n.i. – nismo izmerili; n.z. – ni zaviranja (RA \geq 0,950)

5.4.1. Zaviralna aktivnost huBChE

huBChE so najbolj zavirale spojine 4, 5, 7 in 10, ki so pokazale \geq 50% zaviranje. Med njimi sta se najbolj izkazali spojin 5 in 7, katerih IC_{50} vrednosti smo določili v koncentracijah 2,14 μM (5) in 0,215 μM (7). Strukturno najbolj podoben analog 7 selektivnemu huBChE zaviralcu 1 je izkazal zaviralno aktivnost proti huBChE v nanomolarnem območju. Predpostavljamo lahko, da k dobri zaviralni aktivnosti pripomore metoksietilenska skupina,

saj njena odstranitev kaže na izgubo aktivnosti, kar se je izkazalo pri primerjavi spojin **7** in **8**. RA spojine **8** pri 30 μM ($0,747 \pm 0,001 \mu\text{M}$) je več kot za faktor 50 višja od RA spojine **7** pri 30 μM ($0,014 \pm 0,024 \mu\text{M}$), kot je prikazano v preglednici VII. Šibka zaviralna aktivnost se je ohranila tudi pri spojinah **10** in **12**, čeprav v svoji strukturi nimata metoksietilenske skupine in piperidinskega dušika, temveč cikloheksan karboksilat oziroma cikloheksan karboksamid. Zaviranje se ni ohranilo pri spojinah **9** in **11**, iz česar lahko sklepamo, da je za dobro vezavno afiniteto potrebna dovolj velika stranska entiteta, ki omogoča stabilizacijo molekule v aktivnem mestu.

V sklopu odkrivanja novih potencialnih zaviralcev butirilholin-esteraze je bila razrešena kristalna struktura kompleksa spojine **7** s človeško rekombinantno BChE, ki dokazuje vezavo nitroksolina v aktivno mesto encima (37). Kristalna struktura je razkrila tvorbo močnih kation π interakcij med pozitivno nabitim piperidinskim dušikom spojine in Tyr332 encima, nitroksolinski obroč pa pričakovano zaseda acilni žep huBChE. V acilni žep usidran fragment dodatno stabilizira vodikova vez med hidroksilno skupino nitroksolina in katalitskim ostankom His438 ter dušikom kinolina in aminokislinskim ostankom Ser198 (Slika 26). Kljub temu, da disubstituirani derivati piperidinov **2-8** vsebujejo potrebno strukturo za stabilno vezavo v aktivno mesto, analogi s fragmenti benzoksazola in benzotiazola (spojine **2-6**) niso izkazali zaviralne aktivnosti (preglednica VII). Neaktivnost je verjetno posledica znižane bazičnosti piperidinskega dušika in neposredne povezave heterocikličnega obroča (spojini **2** in **3**). Zaviralna aktivnost se je ohranila le pri derivatu **5**, s posredno povezavo aromatskega bicikličnega in piperidinskega sistema z vmesno metilensko skupino, pri katerem je bazičnost piperidina verjetno ostala enaka.



Slika 26: Kristalna struktura spojine **7** vijolične barve, vezane v kompleks s huBChE. Povzeto po (37).

5.4.2. Zaviralna aktivnost mAChE

Spojine **2-7** v testu proti mAChE pri 30 μM koncentraciji niso izkazale skoraj nobene zaviralne aktivnosti, saj je bila njihova $\text{RA} \geq 95\%$. Razlog za neaktivnost je verjetno prevelika velikost struktur in nezmožnost dobre vezave v manjše acil-vezavno mesto mAChE. Ob primerjavi spojin **7** in **8** vidimo, da že sama odstranitev metoksietilenske skupine vpliva na aktivnost in omogoča zaviranje ($0,641 \pm 0,042 \mu\text{M}$) pri 30 μM (spojina **8**). Kot najmočnejši zaviralec mAChE se je izkazala spojina **12**, ki je mAChE zavirala tudi pri koncentraciji spojine 1 μM . Spojina **12** je zavrla aktivnost mAChE za polovico pri koncentraciji 7,87 μM . Predvidevamo lahko, da cikloheksan karboksamid omogoča dobro vezavno afiniteto in prepoznavo liganda v aktivnem mestu mAChE. Zamenjava karboksamida s karboksilatom kaže na izgubo aktivnosti zoper mAChE, kar lahko vidimo pri spojini **10**. Zaviralna aktivnost spojine **10** je v primerjavi s spojino **12** za več kot faktor 2 nižja. Nitroksolinska analoga **9** z nitro skupino in **11** s ciano skupino kot substituentom sta pokazala slabo zaviralno aktivnost proti mAChE. Predvidevamo lahko, da je njuna struktura premajhna in ne zasede dovolj vezavnega mesta, da bi omogočila dobro zaviranje. Pozitivna kontrola v testu je bila spojina takrin ($\text{IC}_{50}(\text{huBChE}) = 0,012 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50}(\text{mAChE}) = 0,106 \mu\text{M}$).

5.5. Delovanje preiskovanih spojin v CZS

Zmožnost učinkovin za delovanje v CZS je pogojena z uspešnim prehajanjem krvno-možganske pregrade (KMP), specializiranega sistema endotelijskih celic, ki večini zdravil iz krvnega obtoka preprečuje vstop v možgane. Endotelij možganskih kapilar za razliko od kapilar na periferiji vsebuje tesne stike, ki preprečujejo paracelularni prehod snovi. Minimalno število mešičkov, ki omogočajo pinocitozo, omejuje nespecifično transcelularno difuzijo in postavlja visoko selektivnost za prehod KMP. Majhne molekule lahko v možganske celice prehajajo na tri načine: z receptorsko uravnavanim prenosom, prenosom preko prenašalcev in lipidno uravnavanim prenosom (pasivna difuzija), ki predstavlja najpogostejši način prehoda zdravilnih učinkovin.

Pasivna difuzija omogoča ciljano dostavo učinkovin v CZS, ki ustrezajo naslednjim fizikalno-kemijskim merilom: visoka selektivnost, aktivnost v nanomolarnih koncentracijah, molska masa nižja od 450 Da, minimalna hidrofobnost oziroma cLogP pod 5, polarna površina molekule (tPSA) manjša od 60-70 \AA^2 , pKa med 7.5 in 10.5, število donorjev vodikove vezi manj kot 3, število akceptorjev vodikove vezi manj kot 7 in število vrtljivih

vezi manjše od 8. Iz meril je razvidno, da preko KMP lažje prehajajo molekule, ki so majhne, bolj rigidne in pri fiziološkem pH pozitivno nabite. Znan fragment učinkovitih šibko bazičnih zdravil v CZS je terciarni dušik (49,50).

Preglednica VIII: Prikaz fizikalno-kemijskih lastnosti multiplih ligandov nitroksolina

Spojina	cLogP	tPSA [Å ²]	pKa	Molska masa [Da]	Št.donorjev/ akceptorjev H-vezi	Št. vrtljivih vezi
<u>2</u>	3.97	137.31	5.7	447.45	2/10	5
<u>3</u>	4.62	124.17	5.7	463.45	2/9	5
<u>4</u>	3.93	124.17	7.3	477.55	2/9	6
<u>5</u>	3.68	124.62	7.5	535.63	1/10	9
<u>6</u>	3.55	137.76	7.0	519.56	1/11	9
<u>7</u>	3.90	111.72	5.5	504.59	1/9	8
<u>8</u>	4.14	111.28	5.6	446.51	2/8	5
<u>9</u>	1.78	124.77	3.6	235.16	1/8	2
<u>10</u>	3.38	117.28	4.6	373.41	2/8	7
<u>11</u>	1.16	114.76	7.1	258.24	2/7	2
<u>12</u>	2.63	120.07	4.7	372.43	3/8	6

Iz preglednice VIII je razvidno, da bi se glede na hidrofobnost vse preiskovane spojine (2-12) pretežno dobro absorbirale. Vrednosti tPSA močno presegajo predvidene zahteve in ne dosegajo niti maksimalne sprejemljive zahteve 90 Å². K visoki vsoti površin polarnih atomov prispeva predvsem nitro skupina na obroču nitroksolina in njena odstranitev bi pri večini spojin znižala tPSA pod 70 Å². Z odstranitvijo nitro skupine bi nasprotno zvišali pKa vrednosti, ki variirajo od 3.6 do 7.5. Vrednosti molskih mas spojin 3, 4, 5, 6 in 7 presegajo minimalne zahteve do 450 Da, spojine 2, 8, 9, 10, 11 in 12 pa imajo molsko maso dovolj nizko. Število donorjev vodikove vezi ustreza pri vseh derivatih nitroksolina (2-12), med tem ko ima ustrezno število akceptorjev vodikove vezi le spojina 11. Za najmanj ugodni sta se izkazali spojini 5 in 6, ki imata zaradi najdaljših stranskih verig preveliko število vrtljivih vezi. Najbolj ugodne fizikalno-kemijske lastnosti za prehod KMP izkazuje spojina 11, ki ustreza največ predpisanim zahtevam. Po pregledu izračunanih lastnosti smo ugotovili, da bi sama odstranitev nitro skupine pozitivno vplivala na večino nezadostnih parametrov (tPSA, pKa, molska masa, število akceptorjev vodikove vezi) in zadoščala za ugodno napoved prehoda KMP.

5.6. Pregled rezultatov biokemijskega vrednotenja nitroksolinskih derivatov

Zbrani rezultati v preglednici IX kažejo, da smo z združitvijo znanega fragmenta za kelacijo kovinskih ionov s fragmentom spojine zadetka pridobili lastnosti, ki derivate nitroksolina uvrščajo med potencialne multiple ligande za zdravljenje AB. V ciljanju na različne tarče je najboljše lastnosti prikazala spojina **7**, edina izmed preiskovanih spojin s srednjo zaviralno koncentracijo proti huBChE v nanomolarnem območju. Selektivnost vezave, pri kateri smo predpostavili, da je IC₅₀ (mAChE) večja od 10 μM, je na huBChE dosežena za faktor več kot 47. Najbolj obetaven mutlipli ligand je na podlagi testov točkovnega nanosa pokazal 20,1% zaviranje spontane agregacije amiloida beta, omeniti pa velja tudi šibko antioksidativno aktivnost. S selektivno kelacijo kovinskih ionov bakra spojina **7** izkazuje potencial za terapevtsko učinkovitost na kar štirih različnih tarčah za zdravljenje AB.

Preglednica IX: Prikaz vseh rezultatov za ovrednotenje multiplih ligandov

Spojina	Zaviranje spontane agregacije Aβ pri 10 μM [%] ¹	Selektivna kelacija Cu ²⁺	Redukcija DPPH· EC ₅₀ [μM]	RA huBChE pri 30 μM / IC ₅₀ [μM]	RA mAChE pri 30 μM / IC ₅₀ [μM]	Selektivnost mAChE / huBChE
2	35,5 ± 12,8	ne	880,96 ± 8,4	0,914 ± 0,078	n.z.	n.d.
3	33,3 ± 8,6	ne	3829,65 ± 4,5	n.i.	n.z.	n.d.
4	53,4 ± 15,5	ne	1325,45 ± 1,7	0,444 ± 0,009	n.z.	n.d.
5	44,2 ± 19,6	ne	4142,40 ± 2,3	0,129 ± 0,005 / IC ₅₀ = 2,14 μM	n.z.	> 5
6	34,9 ± 9,7	ne	770,25 ± 1,9	0,805 ± 0,039	n.z.	n.d.
7	20,1 ± 2,0	da	3448,83 ± 3,7	0,014 ± 0,024 / IC₅₀ = 0,215 μM	n.z.	> 47
8	28,7 ± 4,3	ne	523,53 ± 0,9	0,747 ± 0,001	0,641 ± 0,042	n.d.
9	n.i.	da	4052,87 ± 4,3	n.z.	0,856 ± 0,047	n.d.
10	n.i.	da	353,89 ± 15,0	0,389 ± 0,010	0,514 ± 0,055	n.d.
11	n.i.	ne	302,83 ± 7,1	n.z.	0,976 ± 0,009	n.d.
12	n.i.	da	621,35 ± 3,0	0,577 ± 0,041	0,214 ± 0,065 / IC ₅₀ = 7,87 μM	< 3

n.d. – nismo določili; n.i. – nismo izmerili; n.z. – ni zaviranja (RA ≥ 0,950)

¹ Rezultati pridobljeni na Inštitutu za strukturno biologijo v Grenoblu (37).

6. ZAKLJUČEK

V iskanju novih potencialnih multiplih ligandov za zdravljenje AB smo uspešno prilagodili postopke iz literature in izvedli teste za biokemijsko ovrednotenje derivatov nitroksolina. Z rezultati spektrofotometričnih meritev smo dobili vpogled na vpliv delovanja nitroksolinskih analogov na različne tarče, udeležene v razvoju nevrodegenerativne bolezni. Zadostna topnost preiskovanih spojin v testu puferskih raztopin je bila potrjena z uporabo meritev razpršenosti svetlobe. Z uspešno postavljenim testom za kelacijo dvovalentnih kovinskih ionov smo pri vseh spojinah potrdili nastanek kompleksa kovinski ion-ligand. Dokazali smo, da nitroksolinski skelet omogoča selektivno kompleksacijo kovinskih ionov bakra, hkrati pa ne tvori kompleksov z biološko pomembnimi ioni kalcija in magnezija. Kelirajoči fragment je pokazal tudi šibko antioksidativno aktivnost, ki bi z nasprotovanjem povečanemu oksidativnemu stresu lahko dodatno koristila v terapiji AB.

Poleg pridobljenih antioksidativnih in kelirajočih lastnosti, nitroksolinski fargment omogoča tudi zaviranje samo inducirane agregacije amiloida beta, kar v primerjavi s spojino **1** odtehta šibkejšo zaviralno aktivnost proti humani BChE. Izmed preiskovanih spojin najbolj izstopa spojina **7**, ki je proti huBChE izkazala zaviralno aktivnost v nanomolarnem območju ($IC_{50} = 215 \text{ nM}$), hkrati pa je neaktivna na mAChE in omogoča selektivno zaviranje nespecifične holin-esteraze. Z razrešeno kristalno strukturo spojine **7** v kompleksu s humano BChE smo dokazali, da je nitroksolinski fragment sposoben vezave v aktivno mesto encima in tvorbe polarnih interakcij s pomembnimi aminokislinskimi preostanki. Nitroksolinski analog piperidina prav tako selektivno kompleksira baker in skoraj povsem ustreza merilom za prehod KMP.

Simultano delovanje na različne patološke procese AB uvršča spojino **7** med obetavne multiple ligande in predstavlja odlično izhodišče za nadaljnjo optimizacijo več-funkcijskih potencialnih novih zdravilnih učinkovin. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno raziskati citotoksičen profil in preveriti nevroprotektiven učinek spojine na celičnih linijah pred škodljivimi učinki toksičnih fibril amiloida beta. Smiselno bi bilo preveriti pozitivne učinke napram bolezni na mišjih modelih *in vivo* ter razmisliti o optimizaciji skeleta z namenom izboljšanja biološke uporabnosti.

7. LITERATURA

1. Lu C, Guo Y, Yan J, Luo Z, Luo H, Yan M. Design, Synthesis, and Evaluation of Resveratrol Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Med Chem.* 2013;1–18.
2. Ribarič S. Temelji patološke fiziologije, 2.izdaja. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo; 2011. 293-297 p.
3. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Gemma-Claire A, Wu Y-T, Prina M. The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Dis Int.* 2015;84.
4. Association A. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* Elsevier Ltd; 2015;11(3):332–84.
5. Wieckowska A, Wieckowski K, Bajda M, Brus B, Salat K, Czerwinska P, in drugi. Synthesis of new N-benzylpiperidine derivatives as cholinesterase inhibitors with beta amyloid anti-aggregation properties and beneficial effects on memory in vivo. *Bioorganic Med Chem.* 2015;23:2445–57.
6. Canevelli M, Piscopo P, Talarico G, Vanacore N, Blasimme A, Crestini A, in drugi. Familial Alzheimer's disease sustained by presenilin 2 mutations: Systematic review of literature and genotype-phenotype correlation. *Neurosci Biobehav Rev.* Elsevier Ltd; 2014;42:170–9.
7. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(3):137–52.
8. Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, Jessen F, Luckhaus C, Frolich L, in drugi. The future of Alzheimer's disease: The next 10 years. *Prog Neurobiol.* 2011;95(4):718–28.
9. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, in drugi. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 1993;43(8):1467–72.
10. Price JL, Berg L, Morris J, Mckeel D, Storandt M. Diagnostic Criteria for Alzheimer ' s Disease. Elsevier Ltd. 1997;18(97):0–3.
11. Mckhann G, Drachman D, Folstein M. Clinical diagnosis of Alzheimer ' s disease. *Neurology.* 1984;34(7):939–44.
12. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, in drugi. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* Elsevier Ltd; 2011;7(3):280–92.
13. Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* Elsevier Ltd; 2011;35(6):1397–409.
14. Brus B, Kos U, Turk S, Pis A, Coquelle N, Kos J, in drugi. Discovery, Biological Evaluation, and Crystal Structure of a Novel Nanomolar Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor. *J Med Chem.* 2014;57:8167–79.
15. Barage SH, Sonawane KD. Neuropeptides Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer ' s disease. *YNPEP.* Elsevier Ltd; 2015;52:1–18.
16. Reid GA, Chilukuri N, Darvesh S. Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. *Neuroscience.* 2013;234:53–68.
17. Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem Biol Interact.* Elsevier Ltd; 2010;187(1-3):10–22.
18. Darvesh S, Grantham DL, Hopkins DA. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 1998;393(3):374–90.
19. Darvesh S, Hopkins D a, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Neuroscience.* 2003;4(2):131–8.
20. Perry E, Tomlinson B, Blessed G, Bergmann K, Gibson P, Perry R. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Int J Geriatr Psychiatry.* 1996;11(9):765–71.
21. Pinto T, Lanctot KL, Herrmann N. Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. *Ageing Res Rev.* Elsevier B.V.; 2011;10(4):404–12.

22. Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, in drugi. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(47):17213–8.
23. Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* Nature Publishing Group; 2011;10(9):698–712.
24. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002;297:353–6.
25. Kindy MS, Yu J, Zhu H, El-Amouri SS, Hook V, Hook GR. Deletion of the cathepsin B gene improves memory deficits in a transgenic alzheimer's disease mouse model expressing A β PP containing the wild-type β -secretase site sequence. *J Alzheimer's Dis.* 2012;29(4):827–40.
26. Cummings J, Morstorf T, Lee G. Alzheimer's drug-development pipeline: 2016. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv.* Elsevier Inc.; 2016;(August):1–11.
27. Ferrero J, Williams L, Stella H, Leitermann K, Mikulskis A, O'Gorman J, in drugi. First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (BIIB037) in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv.* Elsevier Inc.; 2016;2(3):169–76.
28. Hegde ML, Bharathi P, Suram A, Venugopal C, Jagannathan R, Poddar P, in drugi. Challenges associated with metal chelation therapy in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009;17(3):457–68.
29. Hureau C. Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid beta peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview. *Coord Chem Rev.* Elsevier B.V.; 2012;256(19-20):2164–74.
30. Sensi SL, Paoletti P, Koh J-Y, Aizenman E, Bush AI, Hershfinkel M. The Neurophysiology and Pathology of Brain Zinc. *J Neurosci.* 2011;31(45):16076–85.
31. Choi J-S, Braymer JJ, Nanga RPR, Ramamoorthy A, Lim MH. Design of small molecules that target metal-A β species and regulate metal-induced A β aggregation and neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(51):21990–5.
32. Geng J, Li M, Wu L, Ren J, Qu X. Liberation of Copper from Amyloid Plaques: Making a Risk Factor Useful for Alzheimer's Disease Treatment. *J Med Chem.* 2012;55:9146–55.
33. Cavalli A. Multi-Target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases. *J Med Chem.* 2008;51(3):347–72.
34. Padurariu M, Ciobica A, Lefter R, Serban IL. The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub.* 2013;25(4):401–9.
35. Bajda M, Guzior N, Ignasik M, Malawska B. Multi-Target-Directed Ligands in Alzheimer's Disease Treatment. *Curr Med Chem.* 2011;18(32):4949–75.
36. Rizzo S, Bisi A, Bartolini M, Mancini F, Belluti F, Gobbi S, in drugi. Multi-target strategy to address Alzheimer's disease: Design, synthesis and biological evaluation of new tacrine-based dimers. *Eur J Med Chem.* Elsevier Masson SAS; 2011;46(9):4336–43.
37. Knez D, Brus B, Coquelle N, Sosič I, Šink R, Brazzolotto X, in drugi. Structure-based development of nitroxoline derivatives as potential multifunctional anti-Alzheimer agents. *Bioorg Med Chem.* Elsevier Ltd; 2015;23(15):4442.
38. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7(2):88–95.
39. Yao Y, Hyde E, Trojanowski JQ, Lee VM, Smith AB. Discovery of Brain-Penetrant, Orally Bioavailable Aminothienopyridazine Inhibitors of Tau Aggregation. *NIH PA.* 2011;53(9):3739–47.
40. Levine H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 1993;2(3):404–10.
41. Rajić Z, Končić MZ, Miloloža K, Perković I, Butula I, Bucar F, in drugi. Primaquine-NSAID twin drugs: Synthesis, radical scavenging, antioxidant and Fe²⁺ chelating activity. *Acta Pharm.* 2010;60(3):325–37.
42. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* Elsevier Ltd;

- 2009;113(4):1202–5.
43. Umamaheswari M, Chatterjee TK. In vitro antioxidant activities of the fractions of *Coccinia grandis* L. leaf extract. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2007;5(1):61–73.
 44. Dingova D, Leroy J, Check A, Garaj V, Krejci E, Hrabovska A. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. *Anal Biochem*. Elsevier Inc.; 2014;462:67–75.
 45. Geneen H, Bowers B. The synergy™ HT: A unique multi-detection microplate reader for HTS and drug discovery. Bio-Tek Instruments. Inc. 1997. p. 1–6.
 46. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>; datum dostopa: 25.07.2016
 47. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm*. 2012;2012(100 mL):195727.
 48. Bosque-Sendra JM, Almansa-López E, García-Campaña AM, Cuadros-Rodríguez L. Data analysis in the determination of stoichiometries and stability constants of complexes. *Anal Sci*. 2003;19(10):1431–9.
 49. Pajouhesh H, Lenz GR. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. 2005;2(October):541–53.
 50. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. Nature Publishing Group; 2012;32(11):1959–72.