

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA PIRNAT

**VREDNOTENJE 1,3-SUBSTITUIRANIH PIPERIDINOV KOT POTENCIALNIH
UČINKOVIN Z MULTIPLIM DELOVANJEM NA ZDRAVLJENJE
ALZHEIMERJEVE BOLEZNI**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA PIRNAT

**VREDNOTENJE 1,3-SUBSTITUIRANIH PIPERIDINOV KOT POTENCIALNIH
UČINKOVIN Z MULTIPLIM DELOVANJEM NA ZDRAVLJENJE
ALZHEIMERJEVE BOLEZNI**

**EVALUATION OF 1,3-SUBSTITUTED PIPERIDINS AS POTENTIAL
MULTIFUNCTIONAL DRUGS IN TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca.

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem Damijanu Knezu za usmerjanje pri opravljanju eksperimentalnega dela in pisanju magistrske naloge. Hvala tudi za vso drugo pomoč, razlage in dobro voljo. Zahvaljujem se prof. dr. Janezu Mravljaku za sodelovanje pri DPPH testu in nasvete pri delu v laboratoriju. Zahvala gre tudi prof. dr. Stanislavu Gobcu, ker mi je omogočil opravljati magistrsko delo na področju Alzheimerjeve bolezni. Hvala tudi prof. dr. Odonu Planinšku in asist. dr. Meti Kokalj Ladan za pregled naloge in komentarje. Posebej se zahvaljujem svoji družini in sestrični Petri za vso podporo, spodbudo in potrpljenje v času študija. Hvala tudi Tjaši, Petri, Kaji in Lidiji za kavice pred predevanjem in »skupinsko jamranje« zaradi česar je bilo opravljanje študijskih obveznosti lažje.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca.

Andreja Pirnat

Vsebina

1. UVOD.....	1
1.1. Mehanizmi nastanka Alzheimerjeve bolezni	1
1.2. Trenutna terapija AB.....	7
1.3. Potencialne tarče in potencialne zdravilne učinkovine v zdravljenju AB.....	7
1.3.1. Aktivna in pasivna imunizacija	8
1.3.2. Modulatorji sekretaz	8
1.3.3. Zaviralci agregacije A β	9
1.3.4. Kelatorji kovinskih ionov	9
1.3.5. Agonisti M1 muskarinskih receptorjev	9
1.3.6. Zaviralci kinaze in zaviralci agregacije proteina tau	9
1.3.7. Inhibitorji AChE in agonisti holinergičnih receptorjev.....	10
1.4. Učinkovine z multiplim delovanjem	10
1.4.1. Zaviralci BChE kot učinkovine z multiplim delovanjem.....	11
2. NAČRT ZA DELO	16
3. MATERIALI IN METODE.....	19
3.1. Vrednotenje BChE zaviralnega delovanja z Ellmanovo metodo	19
3.1.1. Materiali in aparature.....	21
3.1.2. Priprava izhodnih raztopin vzorcev in reagentov	21
3.1.3. Postopek izvedbe testa.....	21
3.1.4. Analiza rezultatov.....	22
3.2. Vrednotenje antioksidativnega delovanja z DPPH testom.....	22
3.2.1. DPPH test s testnimi spojinami in standardi	24
3.2.2. Test kinetike redukcije DPPH $^{\cdot}$	26
3.3. Vrednotenje kelacijskih lastnosti s kelacijskim testom in askorbatnim testom	28
3.3.1. Test kelacije	30
3.3.1.1. Test kelacije kovinskih ionov in selektivnosti za vezavo Cu $^{2+}$ ionov.....	30
3.3.1.2. Določanje stehiometrije vezave Cu $^{2+}$ ionov	32
3.3.2. Askorbatni test.....	33
3.3.2.1. Materiali in aparature	33
3.3.2.2. Priprava izhodnih raztopin vzorcev in reagentov	34
3.3.2.3. Postopek izvedbe testa	35
3.3.2.4. Analiza rezultatov	35

3.4.	Vrednotenje inhibicije agregacije A β s tioflavin T fluorimetričnim testom.....	36
3.4.1.	Materiali in aparature.....	37
3.4.2.	Priprava izhodnih raztopin vzorcev in reagentov	37
3.4.3.	Postopek izvedbe testa.....	38
3.4.4.	Analiza rezultatov.....	38
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	39
4.1.	Zaviranje huBChE.....	39
4.1.1.	Rezultati.....	39
4.1.2.	Razprava	41
4.2.	DPPH test	42
4.2.1.	DPPH test s testnimi spojinami	42
4.2.2.	DPPH test s standardi	44
4.2.3.	Test kinetike redukcije DPPH'	46
4.3.	Kelacijski test in askorbatni test.....	48
4.3.1.	Kelacijski test	48
4.3.1.1.	Test kelacije kovinskih ionov in selektivnosti za vezavo Cu ²⁺ ionov.....	48
4.3.1.2.	Določanje stehiometrije vezave Cu ²⁺ ionov	50
4.3.2.	Askorbatni test.....	54
4.3.2.1.	Rezultati presejalnih testov	54
4.3.2.2.	Končni rezultati.....	54
4.3.2.3.	Razprava	58
4.4.	Tioflavin T fluorimetrični test.....	59
4.4.1.	Rezultati.....	59
4.4.2.	Razprava	59
5.	SKLEP	60
6.	LITERATURA	61
7.	DODATEK	66

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura acetilholina.....	2
Slika 2: Shematski prikaz cepitve APP z α -, β - in γ -sekretazo.....	3
Slika 3: Shema nastajanja ROS z $A\beta\text{-Cu}^{2+}$	6
Slika 4: Aktivno mesto huBChE.....	13
Slika 5: Izbrani zaviralec huBChE 1 in nitroksolin	14
Slika 6: Nastajanje rumeno-obarvanega 5-tio-2-nitrobenzoatnega aniona po Ellmanovi metodi na primeru AChE.....	20
Slika 7: DPPH $^{\cdot}$ sprejme H $^{\cdot}$ od spojine (AH) in se spremeni v bledo rumeni 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazin	23
Slika 8: Standardi: kvercetin, resveratrol in troloks.....	24
Slika 9: Pozitivna kontrola α -tokoferol	24
Slika 10: Cu-askorbatni redoks sistem.....	29
Slika 11: Kumarin-3-karboksilna kislina (CCA) in 7-hidroksi-kumarin-3-karboksilna kislina (7-hidroksi-CCA).....	29
Slika 12: Struktura tioflavina T.....	36
Slika 13: Grafi odvisnosti RA od koncentracije inhibitorja huBChE za A) 9 , B) 8 in C) takrin ter graf odvisnosti RA od inhibitorja mAChE za D) takrin, s pripadajočimi vrednostmi IC ₅₀	40
Slika 14: Grafi odvisnosti odstotka nereduciranega DPPH $^{\cdot}$ od koncentracije testne spojine za A) 9 , B) 2 in C) 11 in pripadajoče vrednosti EC ₅₀	43
Slika 15: Grafi odvisnosti odstotka nereduciranega DPPH $^{\cdot}$ od koncentracije spojine standarda za A) kvercetin, B) resveratrol in C) troloks in pripadajoče vrednosti EC ₅₀	45
Slika 16: Kinetika redukcije DPPH $^{\cdot}$ ob prisotnosti A) 9 , 8 in 2 ter B) 35 μ M standarda α -tokoferola.....	46
Slika 17: Odvisnost absorbance od valovne dolžine spojin 2 (spekter A), 3 (spekter B) in 6 (spekter C) samih in ob prisotnosti posameznih kovinskih ionov ter selektivnost za vezavo Cu ²⁺ ionov.....	49
Slika 18: A) Graf odvisnosti absorbance spojine 2 in kompleksa Cu ²⁺ -spojina od valovne dolžine, B) Graf odvisnosti absorbance pri $\lambda = 266,5$ nm od molarnega razmerja Cu ²⁺ ioni/ 2 , C) Graf odvisnosti absorbance 3 in kompleksa od valovne dolžine in D) Graf odvisnosti absorbance 6 in kompleksa od valovne dolžine.	52

Slika 19: Spreminjanje fluorescence s časom ob prisotnosti testne spojine in Cu ²⁺ ionov v razmerju 2:1 A) in spreminjanje fluorescence pripadajočih pozitivnih kontrol B). Spreminjanje fluorescence s časom ob prisotnosti testne spojine in Cu ²⁺ ionov v razmerju 1:1 C) in spreminjanje fluorescence pripadajočih pozitivnih kontrol D). Spreminjanje fluorescence s časom ob prisotnosti testnih spojin 10 in 11 in Cu ²⁺ ionov v razmerju 1:1 E) in pripadajoče pozitivne kontrole F).....	57
Slika 20: Odvisnost absorbance od valovne dolžine za spojino 10 samo in ob prisotnosti posameznih kovinskih ionov ter selektivnost spojine za vezavo Cu ²⁺ ionov (spekter A). Slika B prikazuje povečan spekter istih meritev. ..	67
Slika 21: Odvisnost absorbance od valovne dolžine za spojino 11 samo in ob prisotnosti posameznih kovinskih ionov ter selektivnost spojine za vezavo Cu ²⁺ ionov (spekter A). Slika B prikazuje povečan spekter istih meritev. ..	68
Slika 22: Graf odvisnosti absorbance spojine 10 in kompleksa Cu ²⁺ -spojina od valovne dolžine.	69
Slika 23: Graf odvisnosti absorbance spojine 11 in kompleksa Cu ²⁺ -spojina od valovne dolžine.	70

Povzetek

Alzheimerjeva bolezen je kronična napredujoča nevrodegenerativna bolezen in je najpogostejši vzrok za demenco. Za bolezen je značilno slabšanje spoznavnih funkcij, od začetne pozabljivosti, neurejenosti, nemirnosti in motenj v presoji, do značilne izgube spomina za nedavne dogodke, dezorientiranosti v času in prostoru ter popolne nesposobnosti skrbeti zase.

Patogenezo bolezni razlagajo številne hipoteze, med njimi je najbolj izpostavljena holinergična hipoteza, ki simptome bolezni pripisuje pomanjkanju živčnega prenašalca acetilholina v sinapsah nevronov. Med bolj znane hipoteze spadajo tudi amiloidna hipoteza, hipoteza kovinskih ionov ter hipoteza oksidativnega stresa.

Trenutna terapija temelji na simptomatskem zdravljenju in le začasno izboljša simptome bolezni, nima pa vpliva na napredovanje bolezni. Raziskovalci so zato ubrali nov pristop v iskanju učinkovin – iskanje učinkovin z multiplim delovanjem. Nove potencialne učinkovine bi združevale simptomatsko in vzročno zdravljenje, saj bi v idealnem primeru vplivale na večje število mehanizmov bolezni.

V okviru magistrske naloge smo preučevali 1,3-substituirane piperidinske zaviralce butirilholin esteraze, katere aktivnost se poveča v poznejši fazи bolezni in nadomesti acetilholin esterazo pri zniževanju ravni acetilholina v možganih. Modifikacije strukture so bile načrtovane z namenom doseganja multiplega delovanja, ki smo ga nato vrednotili z različnimi metodami.

Ellmanovo metodo smo uporabili za vrednotenje zaviranja butirilholin esteraze. Antioksidativne lastnosti smo ugotavljali z DPPH testom, z askorbatnim testom in testom kelacije pa smo dokazali nastanek kompleksov med spojinami in kovinskimi ioni ter redoks aktivnosti takšnih kompleksov.

Rezultati testov so pokazali, da je z vidika hkratnega zaviranja aktivnosti butirilholin esteraze, antioksidativnega in kelacijskega delovanja najbolj učinkovita spojina **2**. Za bolj natančno okarakterizacijo spojin, bi morali ponoviti Tioflavin T test, s katerim bi bolj natančno opredelili še sposobnost spojin za zaviranje spontane agregacije β -amiloida.

Ključne besede: Alzheimerjeva bolezen, butirilholin esteraza, zaviralci butirilholin esteraze z multiplim delovanjem, 1,3-substituirani piperidini

Abstract

The Alzheimer's disease is a chronic progressive neurodegenerative disorder and it is the most common cause of dementia. The disease is characterised by decreased cognitive functions, starting with forgetfulness, untidiness, restlessness and a deficient judgment, exacerbating to the typical loss of memory for recent events, temporal and spatial disorientation, and finally, in the late stages, to complete inability to take care for yourself.

The pathogenesis of the disease is described in several hypotheses. Common cholinergic hypothesis claims that the symptoms of the disease appear due to the deficiency in levels of acetylcholine, the neurotransmitter in cholinergic synapses. Other well known hypotheses are amyloid hypothesis, metal ion hypothesis and oxidative stress hypothesis.

The current therapy is based on a symptomatic treatment. It only temporarily improves the disease symptoms and does not have any impact on the disease progression. A new approach has therefore been adopted in the quest for new disease-modifying molecules – searching for multifunctional ligands. Such molecules would ideally combine both symptomatic and causal treatment and would be active against several processes in the disease development and progression.

The subject of this master thesis are 1,3-substituted piperidines, butyrylcholinesterase inhibitors. The activity of the enzyme rises in later stages of the disease and replaces acetylcholinesterase in lowering acetylcholin levels in brains. Modifications of the parent structures have been planned to obtain potential multifunctional entities, which we have evaluated with several methods.

Ellman's method was used to determine the inhibitory activity of the compounds against butyrylcholinesterase. We assessed the antioxidative features with the DPPH test, and defined the formation and features of the complexes between the compounds and metal ions with chelation test. Redox activity of the formed complexes was also investigated using ascorbate assay.

Compound **2** is the most effective in terms of simultaneous butyrylcholinesterase inhibitor, antioxidative and chelating activity. For further evaluation of multifunctional properties, we would have to repeat the thioflavin T fluorometric assay, in order to define the activity of compounds against β -amyloid self-aggregation.

Keywords: Alzheimer's disease, butyrylcholinesterase, multifunctional inhibitors of butyrylcholinesterase, 1,3-substituted piperidines

Seznam okrajšav

ATC	acetiltioholin
ATP	adenozin-5'-trifosfat
Ala	alanin
AB	Alzheimerjeva bolezen
Aβ	amiloid- β
APP	amiloid prekurzorski protein
AMPAr	receptor za α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionsko kislino
Asp	asparaginska kislina
BChE	butirilholin esteraza
BTC	butiriltioholin
CCA	kumarin-3-karboksilna kislina
ChE	holin esteraza
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojska kislina) oz. Ellmanov reagent
GSK3β	glikogen sintaza kinaza 3 β
Glu	glutamin
HNE	4-hidroksi nonenal
His	histidin
huBChE	humana butirilholin esteraza
Leu	levcin
Lys	lizin
MeOH	metanol
mAChE	mišja acetilholin esteraza
MAO	monoamin oksidaza
MTDL	angl. multi-target-directed ligand (multifunkcionalne učinkovine)
nAChr	nikotinski acetilholinski receptorji
NMDAr	receptor za <i>N</i> -metil-D-aspartat
PPARγ	peroksisom proliferator aktivirani receptor γ
Phe	fenilalanin
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RA	rezidualna aktivnost encima
Ser	serin
ThT	tioflavin T

Trp	tryptofan
Tyr	tirozin
Val	valin
v₀	začetna hitrost encimske reakcije ob odsotnosti zaviralca
v_i	začetna hitrost encimske reakcije ob prisotnosti zaviralca
ZnT	cinkovi prenašalci v živčevju

1. Uvod

Alzheimerjeva bolezen (AB) je kronična napredujoča nevrodegenerativna bolezen in predstavlja najpogosteji vzrok za demenco (pri 60–70 % pacientov z demenco) (1). Klinično se običajno pokaže v poznejšem življenjskem obdobju (po 65. letu starosti), nevropatološke spremembe pa se začnejo že desetletja pred pojavom kognitivnih in drugih kliničnih znakov (2). Po podatkih organizacije Alzheimer's Association ima v Združenih državah Amerike v letu 2016 v starostni skupini nad 65 let Alzheimerjevo bolezen eden od devetih ljudi (3). Zaradi staranja prebivalstva in zato večje pojavnosti bolezni ter trenutno neučinkovite terapije postaja AB velik zdravstveni problem.

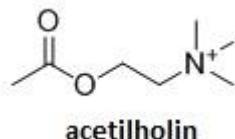
V predklinični fazi se v možganski skorji začnejo nalagati amiloidni plaki sestavljeni iz β -amiloida, ki vodijo v propad nevronov. Slednje je povezano tudi z nastankom nevrfibrilarnih pentelj iz hiperfosforiliranega tau proteina v nevronih pomembnih nevrotransmiterskih sistemov (holinergični, noradrenergični in serotoninergični sistem). Zaradi propadanja nevronov in sinaps v možganski skorji in hipokampusu pride do zmanjšanja prenosa živčnih signalov v nevrotransmiterskih sistemih. Posledično pride do pojava kognitivnih znakov, torej do klinične faze bolezni. Nevrodegenerativne spremembe najprej prizadenejo asociacijske predele možganske skorje, ki igrajo vlogo pri pomnjenju in spoznavnih funkcijah. Zmanjšanje holinergičnega prenosa v hipokampusu pa povzroči motnje prehajanja kratkotrajnega v dolgotrajni spomin. Prvi simptomi bolezni so pozabljivost, neurejenost, nemirnost in motnje v presoji; za napredovalo bolezen pa je značilna izguba spomina za sveže dogodke, dezorientiranost v času in prostoru, nesposobnost skrbeti zase in na koncu celoten upad spoznavnih funkcij (4–6).

1.1. Mehanizmi nastanka Alzheimerjeve bolezni

Patofiziologija AB še ni povsem razjasnjena. Na podlagi različnih diagnostičnih tehnik in opažanj pri preskušanju novih zdravilnih učinkovin, pa je nastalo več teorij o nastanku bolezni. V nastanek AB vodi več različnih vendar med sabo tudi povezanih mehanizmov. Vzroki teh toksičnih procesov in njihovo sosledje pa še niso povsem določeni, zato jih opisujejo različne hipoteze.

Holinergična hipoteza predpostavlja, da je vzrok kognitivnih, funkcionalnih in vedenjskih nepravilnosti pri AB nezmožnost prenosa živčnih impulzov preko holinergičnih sinaps. Do upada holinergičnega prenosa, ki vpliva na učenje, spomin in pozornost, pride zaradi

propadanja celic v neokorteksu, amigdali in hipokampusu ter posledično zmanjšane ravni živčnega prenašalca acetilholina (ACh) (Slika 1).



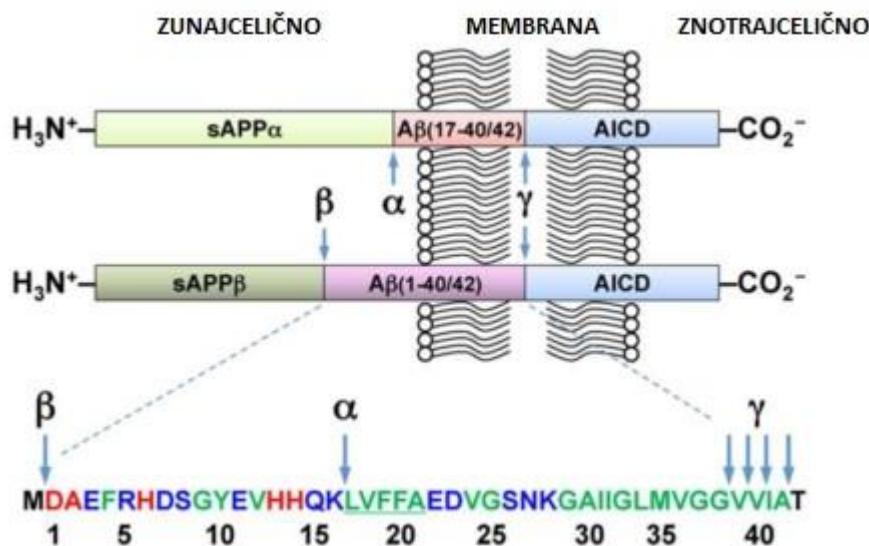
Slika 1: Struktura acetilholina

Pomembno vlogo v holinergičnem sistemu igrata encima acetilholin esteraza (AChE) in butirilholin esteraza (BChE), ki hidrolizirata ACh (ta se sprošča iz presinaptičnega nevrona) in s tem zaključita z ACh-posredovani živčni signal (4, 5, 7, 8). V fizioloških pogojih ima pri razgradnji ACh primarno vlogo AChE, BChE pa podporno (9). Pri AB je število nevronov zmanjšano, s tem je zmanjšano število sinaps, posledica pa je zmanjšan živčni prenos (med drugim tudi živčni prenos z ACh). Encimska hidroliza ACh torej, kljub temu da ni patološka, dodatno znižuje prevajanje po živčnih vlaknih.

Z napredovanjem AB aktivnost AChE v hipokampusu in možganski skorji upada, aktivnost BChE pa narašča. Encima sta udeležena tudi pri fosforilaciji tau proteina in amiloidni kaskadi, kjer njuna prisotnost ob A β signifikatno poveča nevrotoksičnost. AChE s hidrofobnim delom v bližini perifernega anionskega vezavnega mesta interagira z A β in tvori stabilen kompleks ter tako pospeši nastajanje β -sekundarnih struktur amiloidnih fibrilov (4, 5, 7, 8).

Amiloidna hipoteza predpostavlja, da je porušeno ravnovesje med nastajanjem in očistkom A β glavni vzrok, amiloidi pa glavne nevrotoksične substance pri AB (5). A β nastane iz amiloid prekurzorskega proteina (APP), membranskega proteina nevronov in celic glije (v zunanji celični membrani in v membranah celičnih organelov, npr. mitohondrijev), ki se metabolizira po dveh poteh:

1. amiloidogena pot: s cepitvijo na N-terminalnem delu sekvence A β z β -sekretazo (BACE-1), pri čemer nastane β -C-terminalni fragment, ki ga γ -sekretaza (presenilina PS-1 in PS-2) pretvori v A β ;
2. ne-amiloidogena pot: s cepitvijo znotraj sekvence A β z α -sekretazo, kjer nastane topen APP α , ki ga celice izločijo (4, 5, 7, 8) (Slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz cepitve APP z α -, β - in γ -sekretazo. S cepitvijo APP z α -sekretazo nastane topni fragment (sAPP α), z nadaljnjo cepitvijo z γ -sekretazo nastane A β (17–40) ali A β (17–42) in AICD (APP intracellular domain oz. APP znotrajcelični fragment). V primeru cepitve APP z β - in γ -sekretazo, nastane topni sAPP β , A β (predvsem A β (1–40/42)) in AICD. Spodaj je prikazano aminokislinsko zaporedje A β (1–42) (10).

Številni dejavniki spodbujajo delovanje β -sekretaze in γ -sekretaze ter zavirajo α -sekretazo, ter tako povečajo nastajanje A β in zmanjšajo količino topnega APP α . Nizek pH je optimalen za delovanje β -sekretaze, oksidativni stres in hipoksija pa povečata njen ekspresijo. Hiperholesterolemija spodbuja β -sekretazo in γ -sekretazo, ki ju nasprotno, torej znižana raven holesterola, inhibira. Celični mehanizem nastajanja A β v odvisnosti od lipidov še ni pojasnjen (5, 11).

Za nalaganje A β v možganih je lahko kriv tudi nezadosten očistek proteina. Normalno koncentracijo A β vzdržujejo številne metaloproteaze (Zn^{2+} v aktivnem mestu) kot sta npr. neprilizin (razgrajuje monomere in oligomere A β) in inzulin-razgrajevalni encim (5).

A β peptide sestavlja od 36 do 43 aminokislin. Monomeri se združijo v topne oligomere, ki se naprej povezujejo v vmesne skupke oz. *protofibrile* (5), ti pa v amiloidne fibrile. Slednji se organizirajo v β -ploskve, ki se nalagajo v obliki netopnih vlaken amiloidnih plakov. Topni oligomeri in vmesni skupki so najbolj toksične oblike A β . A β ₄₂ je najbolj toksična oblika A β , ki ima poleg tega tudi največjo tendenco za agregacijo (4, 7, 8).

Topni oligomeri A β lahko delujejo nevrotoksično na več načinov:

- 1) Metioninski ostanek v A β reagira znotraj peptida, z drugimi celičnimi komponentami ali s kovinskimi ioni, in tvori radikale (12–14). Oksidativen stres vodi v poškodbe nevronov, fagocitozo in celično smrt.
- 2) A β poruši elektrokemijsko signaliziranje npr. s tvorbo membranskih kanalčkov, ki porušijo gradiente ionov preko celičnih membran (predvsem gradient Ca $^{2+}$ ionov), ali pa z oviranjem modulacije vzdražljivosti NMDAr (5).
- 3) Oslabijo prenos živčnih signalov in dolgotrajno potenciacijo (ang. long-term potentiation), procesa pomembna za tvorbo spomina. Dolgotrajna potenciacija je dolgotrajno povečanje prenosa signala med dvema nevronoma, ki okrepi sinaptično povezavo med njima (sinaptična plastičnost) in ustvari spomin. Proses je značilen predvsem za glutamatne NMDA receptorje, ki pa so zaradi vpliva A β podvrženi endocitozi. A β oslabi tudi prenos živčnega signala preko nikotinskih acetilholinskih receptorjev (nAChr) in sproščanje ACh iz presinaptičnega nevrona (4, 8).
- 4) A β se nalaga v mitohondriih in moti dihalno verigo, kar posredno povzroči oksidativen stres (5).
- 5) Povečajo aktivnost kinaze proteina tau in s tem nastanek hiperfosforilirane in agregirane oblike proteina tau. V zdravih nevronih je monomeren tau protein topen in povezuje protein tubulin v mikrotubule (del citoskeleta), ki so pomemben del aksoplazemskega transporta snovi. Hiperfosforilirani tau pa je netopen, nima afinitete do tubulina in se agregira v parne vijačne filamente (najbolj citotoksična oblika proteina tau), ti pa naprej v nevrotoksične pentlje. Posledica je okvara citoskeleta (destabilizacija mikrotubulov) in aksonskega transporta, kar vodi v odmiranje nevronov (4, 8).
- 6) A β pospeši prepisovanje genov, ki vodijo v apoptozo (4).

Hipoteza kovinskih ionov trdi, da je vzrok AB okvarjena homeostaza kovinskih ionov, predvsem Zn $^{2+}$, Cu $^{2+}$ in Fe $^{2+}$, posledica pa neravnovesje nastajanja in odstranjevanja A β ter njegovo kopičenje. Koncentracije kovinskih ionov niso nujno zvišane, lahko gre le za njihovo prerazporeditev in posledično povečano prisotnost v določenih delih možganov. Amiloidoza po tej hipotezi ni spontana, sprožijo jo kovinski ioni.

Kovinski ioni regulirajo in interagirajo z APP. Primer je Zn $^{2+}$, ki se veže na predel APP, ki ga cepi α -sekretaza. Tako se več APP cepi z β -sekretazo in nastane več nevrotoksičnega A β . Cu $^{2+}$, Zn $^{2+}$ in drugi kovinski ioni (npr. Fe $^{2+/3+}$, Al $^{3+}$) lahko interagirajo, stabilizirajo ali

sprožijo agregacijo oz. nastajanje toksičnih oligomerov A β . A β_{42} , ki je bolj nagnjen k agregaciji, kaže večjo afiniteto do kovinskih ionov kot A β_{40} in ob prisotnosti Cu $^{2+}$ in Zn $^{2+}$ tvori oligomere. Kompleksi A β -kovinski ion spremenijo naboј A β , s tem pa povečajo njegovo hidrofobnost, permeabilnost in agregacijske lastnosti, kar je pomembno za interakcijo A β z membrano.

Nenormalna razporeditev Zn $^{2+}$ pri AB je povezana s povečanim izražanjem cinkovih prenašalcev ZnT v živčevju, ki so nujni za nastajanje plakov. Zn $^{2+}$ zavira tudi nekatere encime, ki razgrajujejo A β (npr. neprilizin in inzulin-razgrajevalni encim).

Poleg vsega so kovinski ioni vpleteni tudi v nastanek oksidativnega stresa. Kompleks Cu $^{2+}$ -A β ter povečane koncentracije prostega Cu $^{2+}$ in Fe $^{2+/3+}$ inducirajo nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS-ov) (5).

V pozni stopnji AB pride do kronične aktivacije NMDA receptorjev z glutamatom, kar poveča koncentracijo Ca $^{2+}$ v nevronih, to pa sproži oksidativen stres in propad nevronov (ekscitotoksičnost). Glutamat posredno aktivira tudi napetostno odvisne kalcijeve kanalčke. A β v membranah oblikuje napetostno-neodvisne kationske kanalčke, skozi katere prav tako poteka privzem Ca $^{2+}$. Dolgotrajno povečana citosolna koncentracija Ca $^{2+}$ ionov preko ekscitotoksičnosti in povečane permeabilnosti mitohondrijske membrane sproži kaskado signalov, ki vodijo v apoptozo nevronov (5, 7, 8).

Hipoteza oksidativnega stresa predpostavlja, da radikali, ki se izognejo antioksidativnim mehanizmom, oksidirajo proteine in lipide, s tem zmanjšajo njihovo stabilnost in okrnijo njihovo funkcijo, ter nukleinske kisline, kar povzroči nastanek mutacij. Omenjene okvare vodijo v nevrodegeneracijo in apoptizo.

Oksidativen stres je posledica prekomernega nastajanja ali nezadostnega odstranjevanja ROS in reaktivnih dušikovih zvrsti (RNS). Pomembne ROS so superoksidni radikal O $_2^{\bullet-}$, vodikov peroksid H $_2$ O $_2$ in hidroksilni radikal OH $^{\bullet}$, ki nastajajo predvsem v mitohondrijih kot stranski produkt oksidativnega metabolizma. Pri AB je njihovo prekomerno nastajanje posledica okvare funkcije mitohondrijev.

Kovinski ioni, ki so bistveni za funkcijo številnih encimov in transport kisika, imajo katalitično vlogo pri nastajanju prostih radikalov, saj lahko opravijo prenos enega elektrona (e $^-$):



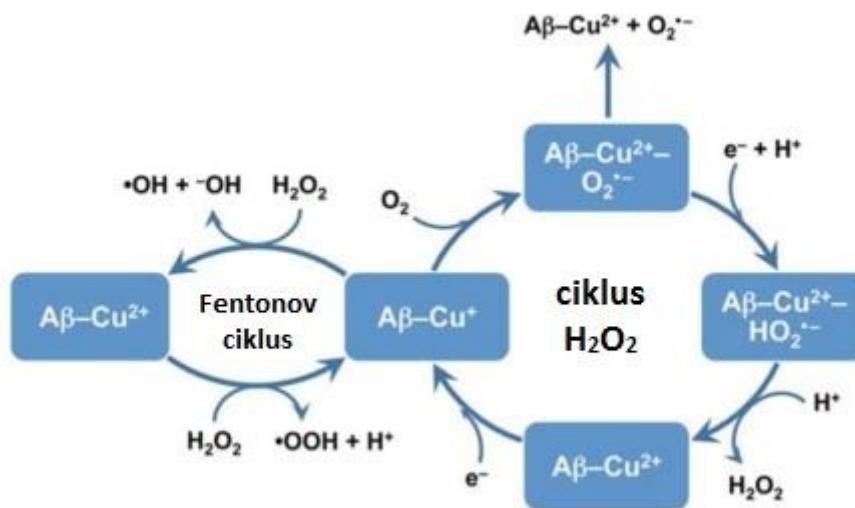
Povečana znotrajcelična koncentracija prostih kovinskih ionov zato lahko vodi v prekomerno nastajanje ROS. Cu^{2+} in $\text{Fe}^{2+/3+}$ proizvajata $\cdot\text{OH}$ po Fentonovi reakciji, pri čemer H_2O_2 nastaja iz O_2^- in H^+ ob katalizi superoksid dismutaze (5, 7, 8).



Pri AB se v mitohondrijih nalaga A β , ki inhibira ključne mitohondrijske encime (npr. citokrom c-oksidazo) in s tem moti prenos elektronov in protonov ter porabo O_2 v dihalni verigi. Posledica je zmanjšan nastanek ATP in povečano nastajanje O_2^- in $\cdot\text{OH}$.

A β_{40} in A β_{42} lahko ob prisotnosti Cu^{2+} in Fe^{2+} proizvajata H_2O_2 ter ostale ROS (Slika 3). Nevroni izpostavljeni A β so zato podvrženi lipidni peroksidaciji pri kateri, poleg zmanjšanja membranskega potenciala in povečane prepustnosti le-te za ione, nastane tudi 4-hidroksinonenal (HNE). HNE pospeši agregacijo A β , oslabi funkcije membranskih ATPaz, ki sodelujejo pri prenašanju ionov ter glutamatnih in glukoznih transporterjev. Nevroni so tako podvrženi ekscitotoksičnosti in apoptozi.

Oksidativni stres poveča tudi aktivnost β - in γ -sekretaze in nastajanje A β . Povezan je tudi z nevrofibrilarnimi pentljami. Oksidacija hiperfosforiliranega proteina tau namreč inducira dimerizacijo in polimerizacijo proteina v filamente (5, 7, 8).



Slika 3: Shema nastajanja ROS z A β -Cu $^{2+}$. A β -Cu $^{2+}$ katalizira nastanek H_2O_2 (ciklus H_2O_2) in sodeluje pri nastajanju $\cdot\text{OH}$ v Fentonovi reakciji (Fentonov ciklus) (10).

1.2. Trenutna terapija AB

Trenutno so v terapiji AB v uporabi zaviralci AChE (donepezil, galantamin in rivastigmin) in antagonist NMDA receptorjev (memantin). Zdravljenje z omenjenimi zdravilnimi učinkovinami le začasno izboljša simptome bolezni, in praktično nima večjega vpliva na potek bolezni in njeno zdravljenje.

Donepezil je selektivni nekompetitivni zaviralec AChE, ki kot ostali inhibitorji AChE do določene mere upočasni napredovanje bolezni. Izboljša simptome, ki so posledica nevrotoksičnosti A β in zmanjša nastajanje le-tega v korteksu, kjer tudi poveča izražanje nikotinskih receptorjev. Donepezil tudi zmanjša koncentracijo glutamata in njegove nevrotoksične učinke v korteksu. Poleg tega z nevtraliziranjem ROS deluje antioksidativno.

Galantamin je selektivni kompetitivni zaviralec AChE. Deluje tudi kot alosterični modulator nikotinskih holinergičnih receptorjev tako, da se veže na receptor in spremeni njegovo konformacijo, rezultat pa je okrepljen postsinaptični odziv. Alosterično deluje tudi na presinaptične nikotinske holinergične receptorje, ki imajo pomembno vlogo pri sproščanju ACh in uravnavajo koncentracijo drugih transmiterjev (npr. γ -aminomaslene kisline (GABA), glutaminske kisline, serotonina in noradrenalina), pomembnih za spomin, razpoloženje in čustva.

Rivastigmin je kompetitivni inhibitor AChE in BChE, in je selektiven za AChE in BChE v možganih. V strukturi vsebuje karbamatni fragment, s katerim acetilira katalitični serin encima. Govorimo lahko o *pseudo-ireverzibilni inhibiciji*, saj zaviranje encima zaradi acetiliranja traja dlje kot je rivastigmin prisoten v plazmi.

Memantin je nekompetitivni antagonist, ki blokira za AB značilno patološko stimulacijo NMDA receptorjev z glutamatom in zmanjša ekscitotoksičnost (9, 15, 16).

1.3. Potencialne tarče in potencialne zdravilne učinkovine v zdravljenju AB

Zaradi trenutne neučinkovite terapije in zaradi naraščanja števila bolnikov z AB, je iskanje novih tarč in novih zdravilnih učinkovin, ki bi delovale nanje, v polnem teku. Kljub izjemnemu obetu v predklinični fazi razvoja, pa so se mnoge potencialne učinkovine v kliničnih fazah izkazale kot neučinkovite ali kot premalo varne z vidika pojava neželenih učinkov (17).

1.3.1. Aktivna in pasivna imunizacija

Imunizacija transgene miši s humanim APP (vsebuje sekvenco A β), je zmanjšala nastajanje amiloidnih plakov v možganih. Po tej analogiji so pacientom z AB aplicirali sintetični A β , ki pa je pri 6 % pacientov povzročil meningoencefalitis. Zaplet pripisujejo citotoksičnim T-celicam oz. avtoimunskemu odzivu. Kljub vsemu so ugotovili, da imunizacija z A β sproži nastajanje protiteles proti A β in pomembno izboljša kognitivne funkcije. Magnetna resonanca pa je vseeno pokazala zmanjšanje volumna možganov – napredovanje bolezni (15).

V izogib toksičnosti in vnetnim procesom, bi morali namesto celotne sekvence A β uporabiti samo njegove fragmente ali pa druge celične epitope. Na tem temelji nova generacija cepiv, ki so trenutno v različnih fazah preskušanj.

Glede na omenjene zaplete pri aktivni imunizaciji so sklepali, da je pasivna imunizacija varnejša in bolj učinkovita. Trenutno je v različnih fazah razvoja več cepiv s selektivnimi monoklonskimi protitelesi proti A β (15, 17, 18). Protitelesa lahko vežejo in izločijo določeno obliko A β , kar je pomembno zaradi vzpostavljenega ravnotežja med oligomeri in plaki (18).

1.3.2. Modulatorji sekretaz

A β nastane s cepitvijo APP s pomočjo β -sekretaze in γ -sekretaze. Inhibicija teh dveh encimov in spodbujanje cepitve po α -sekretazni poti sta torej cilja razvoja β -sekretaznih (BACE1) inhibitorjev, γ -sekretaznih inhibitorjev oz. modulatorjev ter α -sekretaznih aktivatorjev.

Potencialni zaviralci β -sekretaze so derivati učinkovin za zdravljenje diabeta tipa 2 z agonističnim delovanjem na jedrni peroksisom proliferator aktivirani receptor γ (PPAR γ). Agonisti med drugim povečajo periferno odzivnost na inzulin, neodzivnost namreč povezujejo s poslabšanjem AB, in inhibirajo β -sekretazo. Modulatorji γ -sekretaze preusmerijo nastajanje iz daljšega A β_{42} proti krajsim manj toksičnim peptidom, ki imajo manjšo tendenco za agregacijo.

Glavna ovira pri razvoju modulatorjev sekretaz je dejstvo, da imajo omenjeni encimi poleg APP tudi druge substrate, katerih cepitev je pomembna za pravilno delovanje celice.

Potencialni spodbujevalci α -sekretaze, ki so v klinični fazi preskušanj so agonisti muskarinskih, glutamatnih in serotonininskih receptorjev, statini, estrogeni, testosteroni in aktivatorji protein kinaze C (9, 11, 12).

1.3.3. Zaviralci agregacije A β

Namen zaviralcov agregacije A β je preprečiti agregacijo A β v vmesne oligomere, amiloidne fibrile in plake oz. destabilizirati njegove oligomere in aggregate. Fibrili A β so oblika z zelo nizko energijo, zato je aggregate A β težko razgraditi. Preiskovane spojine delujejo tako, da se npr. vežejo na topni A β , s tem pa preprečijo združevanje peptida v toksične fibrile in plake (15, 17, 18).

1.3.4. Kelatorji kovinskih ionov

A β interagira z biogenimi elementi kot so Zn²⁺, Cu²⁺ in Fe²⁺ in skupaj z njimi tvori citotoksične fibrile. Spojine, ki bi kompleksirale kovinske ione in preprečile njihovo interakcijo z A β so zato predmet intenzivnih raziskav (15, 17, 18).

1.3.5. Agonisti M1 muskarinskih receptorjev

Raziskave so pokazale, da bistveno vlogo v patogenezi AB igrajo muskarinski receptorji podtipa 1 (M1). V kliničnih preskušanjih so ugotovili, da M1 muskarinski agonisti posredujejo cepitev APP z α -sekretazo po ne-amiloidogeni poti, preprečijo hiperfosforilacijo proteina tau, zmanjšajo pojav vnetja in s povečanjem učinka zaviralcov AChE zmanjšajo kognitivne motnje (15, 17, 18).

1.3.6. Zaviralci kinaze in zaviralci agregacije proteina tau

Hiperfosforilirani protein tau se agregira v nevrofibrilarne pentlje in na enak način kot A β katalizira reakcije oksidacije ter tako povzroča oksidativen stres, okvaro nevronov, celično smrt, zaradi destabilizacije mikrotubulov pa med drugim tudi pomanjkanje transmitterjev (15, 17–19). Tarče za zdravljenje AB so tako proteinske kinaze udeležene pri fosforilaciji, kot tudi sam proces agregacije proteina tau.

V hiperfosforilaciji proteina tau naj bi bila udeležena prekomerno izražena glikogen sintaza kinaza 3 β (GSK3 β). Fiziološka vloga encima je fosforilacija proteina tau, s čimer regulira afiniteto vezave proteina na mikrotubule. Hiperfosforilacija tako povzroči disociacijo tau z mikrotubulov in njegovo agregacijo.

GSK3 β je eden od dveh izoencimov glikogen sintaze kinaze 3, ki sodeluje tako pri nastajanju amiloidnih plakov, kot pri nastajanju nevrofibrilarnih pentelj. Povečano nastajanje A β okrepi aktivnost GSK3. Ugotovljeno je bilo tudi, da sta APP in PS-1 (katalitična podenota γ -sekretaze) substrata encima GSK3 α , ki tako med procesom cepitve

APP uravnava nastajanje A β . Inhibitorji GSK3 se delijo na neposredne, ki interagirajo z encimom, in posredne, ki povečajo N-terminalno fosforilacijo encima in ga s tem deaktivirajo.

Še eden od pristopov je zaviranje agregacije proteina tau oz. sprožanje disociacije agregatov. Agregacijo lahko zavirajo stabilizatorji mikrotubulov, ki zavirajo sproščanje tau iz mikrotubulov in s tem ohranjajo aksonski transport ter preprečujejo nalaganje proteina (15, 17, 18).

1.3.7. Inhibitorji AChE in agonisti holinergičnih receptorjev

Čeprav učinkovine, ki uravnavajo nastajanje, sproščanje in recikliranje nevrotransmiterjev, ne morejo ustaviti napredovanja AB, se iskanje in preskušanje novih agonistov in antagonistov receptorjev nadaljuje. Zaviralci AChE izboljšajo spomin in učenje, zato so v kliničnih preskušanjih nove učinkovine, ki potencirajo učinke ACh ali pa zavirajo ChE.

ACh se veže na nikotinske receptorje in sproži ekscitacijo na postsinaptičnih nevronih, kar je osnova dolgotrajne potenciacije in nastajanja spomina. V kliničnih testiranjih je zato več agonistov nikotinskih receptorjev, ki bi tako neposredno povečali holinergični prenos in izboljšali simptome AB (15, 17, 18).

1.4. Učinkovine z multiplim delovanjem

Perspektivnost potencialnih učinkovin specifičnih za eno tarčo v predkliničnih in njihov neuspeh v kliničnih študijah ter številnost mehanizmov, ki povzročajo AB, so raziskovalce vodili k novemu pristopu v razvoju učinkovin – iskanje multifunkcionalnih učinkovin. Multifunkcionalne učinkovine oz. učinkovine z multiplim delovanjem, so molekule, ki hkrati delujejo na več patoloških procesov in/ali tarč (20). Znanstvena literatura običajno obravnava t.i. mnogo-tarčne učinkovine (angl. multi-target-directed ligands oz. MTDLs), spojine, ki največkrat združujejo dva farmakofora, vsakega z delovanjem na svojo tarčo (A β , tau protein, receptorji, encimi). Delovanje takšnih učinkovin je lahko razširjeno še na druge patološke mehanizme in tarče (oksidativni stres, porušena homeostaza kovinskih ionov, ekscitotoksičnost, vnetje, okvara mitohondrijev). V tem primeru govorimo o multifunkcionalnih učinkovinah (v ožjem pomenu zvezne).

Velik delež potencialnih multifunkcionalnih učinkovin in MTDL-jev, ki so trenutno v razvoju, predstavljajo inhibitorji ChE z dodatnimi farmakološkimi lastnostmi, ki k

simptomatskemu dodajo potencialno vzročno zdravljenje (9). Dodatna farmakološka lastnost je največkrat zaviranje agregacije A β , zaviranje β -sekretaze ali monoaminske oksidaze (MAO), antioksidativno delovanje ter kelacija kovinskih ionov. MAO oksidira amine v imine, pri čemer nastaja H₂O₂. Na ta način MAO povečuje oksidativni stres. Za AB je značilna povečana aktivnost izoencima MAO B (7, 8).

Tarče za simptomatsko zdravljenje so večinoma receptorji, tarče z vplivom na potek AB pa so tesno povezane z A β , nastanjem tau proteina in zaščito nevronov – nevroprotективnostjo (9). Dodatna prednost multifunkcionalnih učinkovin je, da z uporabo ene same spojine zmanjšamo verjetnost resnih neželenih učinkov, ki so sicer povezani s polifarmakoterapijo (21).

1.4.1. Zaviralci BChE kot učinkovine z multiplim delovanjem

Aktivnost BChE z napredovanjem AB narašča in vzdržuje holin-esterazno aktivnost, medtem ko aktivnost AChE pada. Poleg tega BChE povezujejo z nevropatološkimi markerji AB, amiloidnimi plaki in nevrofibrilarnimi pentljami, kjer njena vloga še ni povsem jasna. Rezultat selektivnega zaviranja tega encima je zvišana raven ACh v možganih, znižana raven A β in APP v humanih živčnih celičnih linijah, izboljšanje kognitivnih sposobnosti pri starejših podganah ter izboljšanje z A β_{40} -povzročenega poslabšanja spomina pri miših (20). Dodatna prednost selektivnega zaviranja BChE je, da v primerjavi z zaviranjem AChE, ne povzroča perifernih (parasimpatomimetičnih) neželenih stranskih učinkov (22). Omenjeni razlogi tako spodbujajo iskanje novih zaviralcev BChE, ki bi izboljšali simptome AB, princip multifunkcionalnih učinkovin pa vodi v razširitev delovanja zaviralcev na potencialno vzročno zdravljenje.

Aggregacija A β vpliva na več molekularnih procesov pri AB, kar se kaže tudi kot oksidativni stres, okvara homeostaze kovinskih ionov in prerazporeditev le-teh. Različne strukture A β kompleksirajo predvsem Fe²⁺, Zn²⁺ in Cu²⁺ ione, ki so bistveni za mnoge metabolične procese. Posledica kompleksacije je spremembra koncentracije teh ionov v pre-sinaptičnih in post-sinaptičnih nevronih, ki povzroči motnje v prenosu živčnih signalov, zmanjša aktivnost od kovinskih ionov odvisnih encimov in spodbuja nastajanje A β .

Cij je torej oblikovati multifunkcionalno učinkovino, ki selektivno kelira kovinske ione, zmanjša agregacijo A β in zavira BChE. Pri ciljanju na kovinske ione udeležene v

patogenezi AB je potrebno paziti, da pri tem ne vplivamo na homeostazo ostalih fiziološko pomembnih ionov kot sta Ca^{2+} in Mg^{2+} (20).

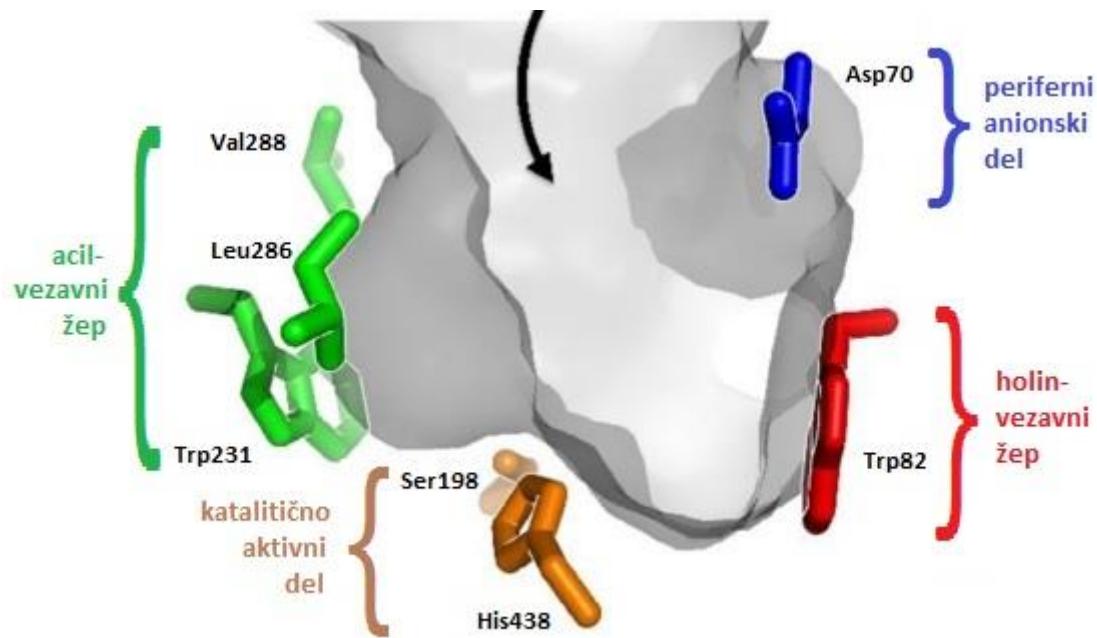
1.4.1.1. Strukturne lastnosti in razlike med AChE in BChE, pomembne za načrtovanje selektivnih zaviralcev BChE

Humana AChE in BChE se ujemata v 65 % aminokislinskega zaporedja. Aktivno mesto obeh encimov se nahaja v približno 20 nm globokem in ozkem žepku. Sestavljen je iz katalitično aktivnega dela, ki ga sestavljajo esterazni katalitični aminokislinski ostanki, acil-vezavni ter holin-vezavni žep, in perifernega anionskega dela. Hidroliza estrske vezi ACh poteka na dnu vezavnega mesta, ki je sestavljeno iz katalitične triade: aminokisline Ser203, Glu202 in His447 v humani AChE, in Ser198, Glu325 ter His438 v humani BChE (Slika 4). Vhod v aktivno mesto je obdan s številnimi aromatskimi ostanki.

Holin-vezavni žep v hAChE sestavljata Trp86 in Phe338, ki ustvarita šibke interakcije med svojim aromatskim delom in pozitivno nabitim kvaternim dušikom ACh. Na ta način se ACh pravilno orientira. Tyr133 v hAChE s svojo interakcijo s Trp86 stabilizira nastalo kation- π konformacijo. V huBChE konformacijo stabilizira interakcija Trp82 z Ala328, medtem ko ta encim nima Phe, kar vpliva na afiniteto do določenih inhibitorjev. Ta vezavni žep lahko interagira tudi z ligandi brez pozitivnega naboja.

Periferno anionsko mesto, ki se nahaja na vhodu v aktivno mesto, je pri huAChE sestavljen iz Tyr72, Tyr124 in Trp286, pri huBChE pa teh aromatskih ostankov ni, zato ima manjšo afiniteto do substratov specifičnih za AChE. Anionsko mesto BChE vsebuje Asp70, Tyr332 in Phe329.

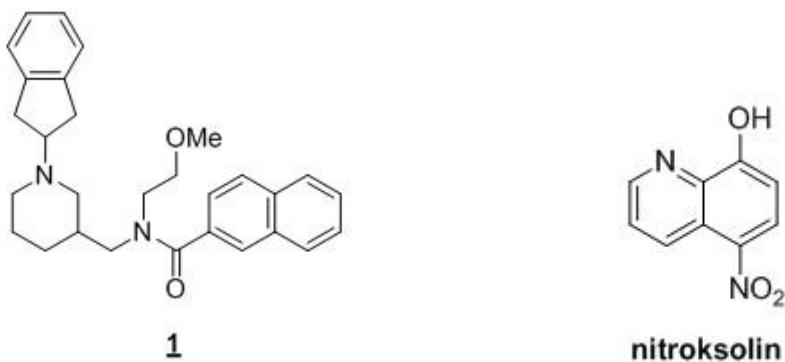
AChE ima večjo afiniteto do ACh kot BChE, ne more pa hidrolizirati estrov z večjo molekulsko maso, ki jih lahko BChE. Razlike v afiniteti do substratov so posledica zaporedij aminokislin encimov, ki določata tri-dimenzionalno velikost in obliko žepkov. AChE ima v acil-vezavnem žepku zmanjšan prostor za vezavo substrata zaradi prisotnosti večjih aminokislin Phe295 in Phe297, katerih aromatski ostanki tvorijo ta žep. V BChE sta omenjeni aminokislini zamenjani z manjšima Val288 in Leu286, kar omogoča več prostora in vezavo različnih večjih substratov (15, 16, 23, 24).



Slika 4: Aktivno mesto huBChE (22)

1.4.1.2. 1,3-substituirani piperidini

Z namenom vplivati na različne dejavnike in procese povezane z AB (npr. aktivnost huBChE, agregacija A β , neravnovesje kovinskih ionov, oksidativni stres), so raziskovalci (Knez in sod.) združili dve znani strukturi, ki imata terapevtski potencial pri AB. Na podlagi predhodnih študij inhibitorjev BChE, so izbrali selektivni zaviralec huBChE z dobim zaviranjem agregacije A β **1** (Brus in sod.) (Slika 5) (20, 22). Strukturne lastnosti omenjenega inhibitorja so združili z nitroksolinom (Slika 5), katerega struktura temelji na 8-hidroksikinolinu. Spojine na osnovi 8-hidroksikinolina so se namreč v raziskavah izkazale kot obetavni kelatorji kovinskih ionov z nevroprotективnim učinkom. Poleg tega nitroksolin vsebuje fenolno OH-skupino, fenoli pa so znani po svojem antioksidativnem delovanju kot donorji vodikovega radikala (H^{\cdot}).



Slika 5: Izbrani zaviralec huBChE **1** (22) in nitroksolin (25)

Spojina **1** s pozitivno nabitim dušikom v piperidinu tvori močne kation- π interakcije s Tyr332 v perifernem anionskem mestu huBChE (20, 26). Te interakcije so pomembne za prepoznavanje liganda in dobro afiniteto, zato so pri načrtovanju multifunkcionalnih nitroksolinov ohranili 1,3-disubstituirano piperidinsko jedro.

Naftalenski del se umesti v velik acil-vezavni žep huBChE, ki je obdan s hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki (Trp231, Leu286, Val288), s katerimi naftalen tvori hidrofobne in van der Waalsove interakcije. Nespecifična narava teh interakcij in bližina katalitičnih aminokislinskih ostankov (Ser198, His438) omogočata spremjanje strukture liganda z namenom, da bi dosegli dodatne interakcije s katalitičnimi ostanki in s peptidnim ogrodjem. Možnost za takšne modifikacije odpira tudi pot za doseg dodatnih lastnosti, ki bi lahko nasprotovale patologiji AB. Naftalenski obroč so tako zamenjali z nitroksolinom, da bi dosegli keliranje ionov in antioksidativno delovanje spojine. Kristalna struktura kompleksa derivata nitroksolina s huBChE je potrdila, da nitrokinolin-8-olski del, tako kot naftalen, zapolni acil-vezalni žep in je prevelik, da bi se prilegal v manjši acil-vezavni žep AChE, kar je verjetno razlog za selektivno zaviranje huBChE.

Hidroksilna skupina na nitroksolinskem skeletu tvori H-vez z dušikom imidazola katalitičnega His438, kinolinski dušik pa z OH-skupino Ser198. Nitro skupina interagira s karbonilnimi skupinami glavnih verig aminokislinskih ostankov Phe285 in Ser287.

2,3-Dihidro-1*H*-inden so v nekaterih molekulah zamenjali z benzoksazolom ali benzotiazolom, ki se, podobno kot derivati indena, vežeta na A β aggregate in zavirata agregacijo A β .

Hidrofobni C-terminalni del in centralni hidrofobni ostanki Leu17–Ala21 A β peptida so bistveni za vzpostavitev konformacije β -ploskve, ki jo stabilizira še solni mostiček med

Glu22/Asp23 in Lys28. Monomeri A β peptida urejeni v β -ploskev potem ustvarjajo dodatne intermolekularne interakcije (večinoma hidrofobne in H-vezi) z drugimi monomeri in tako nastajajo nevrotoksične vrste višjega reda.

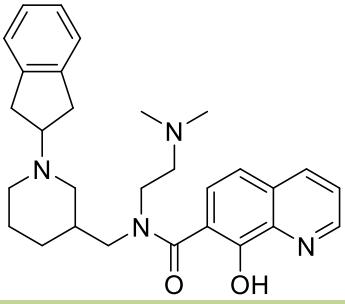
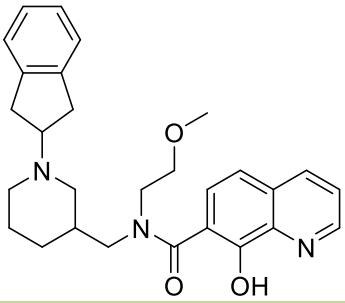
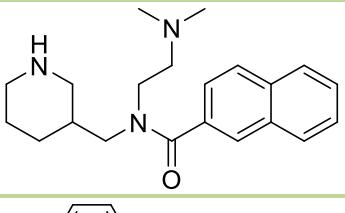
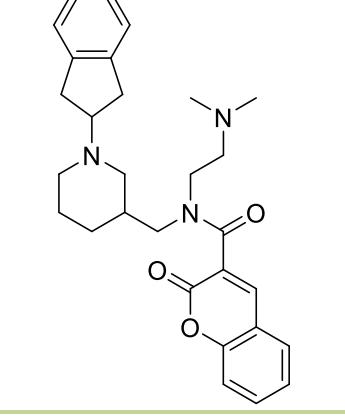
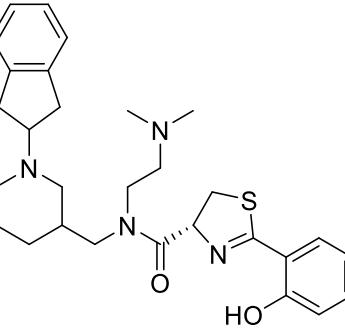
Molekule z aromatskimi strukturami kot so kumarin, benzoksazol in benzotiazol, lahko preprečijo spontano agregacijo A β peptida tako, da motijo π -nalaganje aromatskih ostankov v procesu nastajanja A β agregatov (20). Za inhibicijo agregacije A β pri multifunkcionalnih analogih nitroksolina, je odgovoren aromatski center vezan na dušik pipridina. Analogi nitroksolina torej, poleg hidroksikinolina, vsebujejo še en aromatski center, ki je eden od že omenjenih: benzoksazol, benzotiazol ali pa 2,3-dihidro-1*H*-inden (20).

2. Načrt za delo

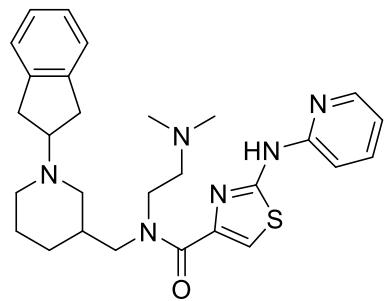
Spojine (Tabela I), ki so predmet te magistrske naloge, so strukturno 1,3-substituirani piperidini in izhajajo iz zgoraj obravnavanih multifunkcionalnih analogov nitroksolina. Načrtovane in sintetizirane so bile v sklopu nadaljevanja projekta razvoja selektivnih zaviralcev butirilholin esteraze na Katedri za farmacevtsko kemijo, kjer so žeeli pripraviti spojine, ki bi hkrati delovale na več tarč oz. procesov povezanih z Alzheimerjevo boleznijo. Nitroksolin je v teh spojinah zamenjan z 8-hidroksikinolinom, naftalenom, kumarinom, 2-feniltiazolinom, 2-[(pirid-2-il)amino]tiazolom ali z imidazo[1,2-*a*]piridinom. Ohranjena sta amidna vez z metilenskim mostom in piperidin. Na dušik piperidina je lahko vezan 2,3-dihidro-1*H*-inden, 2-[(pirid-2-il)amino]tiazol ali pa samo vodik. Dušik amidne vezi ima vezano metoksietilno ali pa *N,N*-dimetiletilaminsko verigo. Zamenjave so bile izvedene z namenom izboljšanja oz. pridobitve dodatnih interakcij s huBChE ter izboljšanja oz. dodajanja kelacijskega, antioksidativnega in A β antiagregacijskega delovanja v primerjavi z izhodnimi derivati nitroksolina.

V okviru magistrskega dela bomo z *in vitro* biokemijskimi testi ovrednotili delovanje testnih 1,3-substituiranih piperidinov kot zaviralcev huBChE, antioksidantov, kelatorjev kovinskih ionov in zaviralcev agregacije A β . Vse metode bodo temeljile na merjenju sprememb absorbance (UV-VIS spektrofotometrija) oz. fluorescence (fluorimetrija).

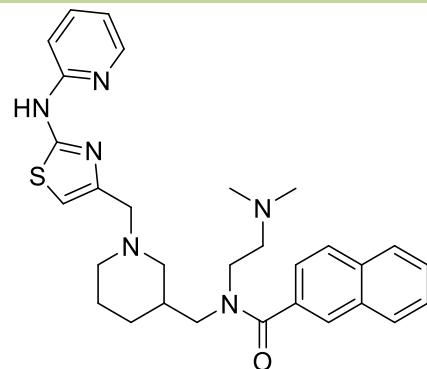
Tabela I: Oznake testnih spojin in njihove kemijske strukture

Spojina	Struktura
2	
3	
4	
5	
6	

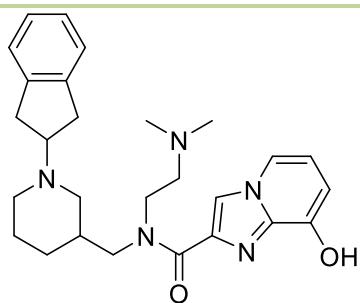
7



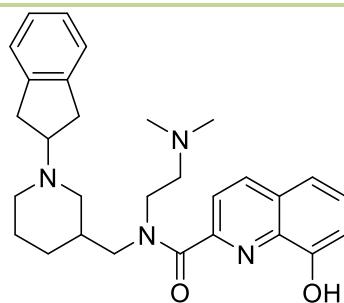
8



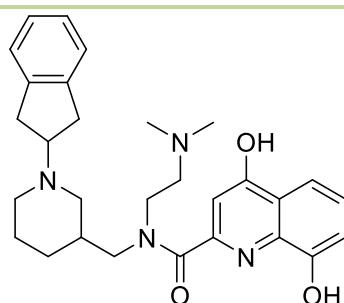
9



10



11



3. Materiali in metode

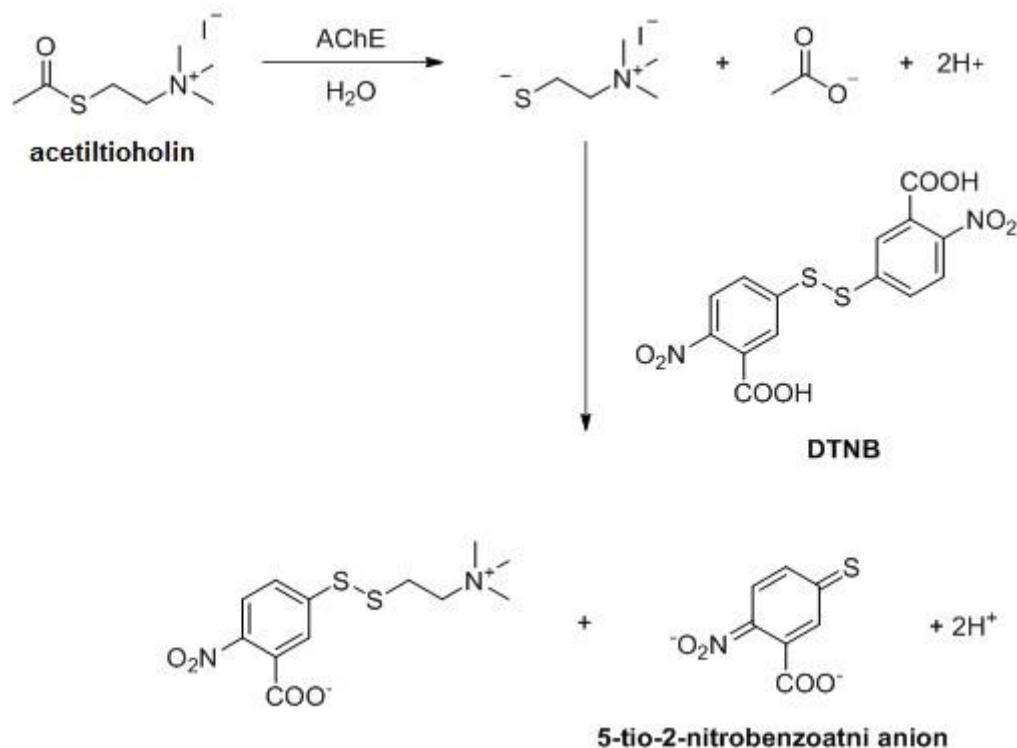
Za izvedbo testov smo uporabili kemikalije proizvajalcev Sigma Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Carlo Erba in TCI Europe. Encima, ki smo ju uporabili v Ellmanovem testu, sta priskrbela Florian Nachon in Xavier Brazzolotto (Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 91223 Brétigny sur Orge, France).

Meritve smo izvajali z UV-Vis spektrofotometrom (Cary 100 Bio, Varian) v programu Cary Winuv in z mikrotitrskim čitalcem (Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, BioTek) v programu Gen5. Ustreznost raztopine DPPH[•] v DPPH testu smo preverjali z UV-Vis spektrofotometrom DU® 730, proizvajalca Beckman Coulter. Vse rezultate meritev smo pretvorili v obliko za Microsoftov program Excel, s pomočjo katerega smo potem analizirali podatke.

3.1. Vrednotenje BChE zaviralnega delovanja z Ellmanovo metodo

Inhibitorno aktivnost spojin na huBChE smo opredelili z vrednostjo IC₅₀, to je koncentracija spojine pri kateri dosežemo 50 % zmanjšanje aktivnosti encima. Po Ellmanovi metodi smo določali tudi IC₅₀ spojin za AChE in s tem preverili selektivnost spojin za huBChE.

Test smo izvedli z uporabo rekombinantne humane BChE in mišje AChE. Pri Ellmanovem testu smo kot substrat za BChE namesto butirilholina, uporabili butiriltioholin, za AChE pa namesto naravnega substrata acetilholina, acetiltioholin. Tioholini se namreč na omenjena encima vežejo močneje kot naravna substrata. BChE oz. AChE tako cepi tioester in nastane tioholin, ki reagira z dodanim Ellmanovim reagentom (5,5'-ditriobis (2-nitrobenzojska kislina)) oz. DTNB. Nastane rumeno obarvani produkt 5-tio-2-nitrobenzoatni anion, ki ima absorpcijski maksimum pri $\lambda = 412$ nm (Slika 6). Z dodatkom spojin, ki delujejo kot zavirci, zmanjšamo nastajanje tioholina in s tem tudi nastajanje rumeno obarvanega 5-tio-2-nitrobenzoatnega aniona, kar zaznamo kot padec absorbance pri $\lambda = 412$ nm.



Slika 6: Nastajanje rumeno-obarvanega 5-thio-2-nitrobenzoatnega aniona po Ellmanovi metodi na primeru AChE (27)

Test smo izvedli z različnimi koncentracijami posameznih testnih spojin na mikrotitrski ploščici in z merjenjem spreminjaanja absorbance pri $\lambda = 412$ nm v določenem časovnem intervalu. Iz izmerjenih absorbanc smo s pomočjo linearne regresije, izračunali vrednost povprečnega naklona oz. začetno hitrost encimske reakcije za posamezno vdolbinico. Iz začetnih hitrosti smo potem izračunali rezidualno aktivnost (RA) encima (razmerje med povprečno začetno hitrostjo pri določeni koncentraciji spojine v_i in povprečno začetno hitrostjo brez spojine v_0) in narisali krivulje odvisnosti RA od koncentracij posamezne spojine. Iz izračunanih RA in pripadajočih koncentracij spojin smo s pomočjo računalniškega programa Gnuplot software (in-house python skripta), izračunali IC_{50} za posamezne spojine (20).

3.1.1. Materiali in aparature

Pri testu smo uporabili naslednje testne spojine in reagente:

- Ellmanov reagent (DTNB) oz. 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojsko kislino) (ReagentPlus®, 99 %, Sigma Aldrich, D218200)
- S-butirilthiolin jodid (BTC) (puriss., ≥99,0 % (AT), Sigma Aldrich, 20820) oz. aciltioholin jodid (ATC) (≥99,0 % (AT), Sigma Aldrich, 01480) kot substrat
- rekombinantno humano butirilholin esterazo (huBChE) oz. mišjo acetilholin esterazo (mAChE) kot encim (4,6 mg/mL v 10 mM MES pufru s pH = 6,5)
- spojine **2–11** kot inhibitorji
- 0,1 M fosfatni pufer (pH = 8,0) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Merck Millipore, 106346 oz. 119753)
- topilo DMSO (for analysis EMSURE® ACS, Merck)

Vzorce in reagente smo pripravljali s pomočjo precizne in analitske tehnice, stresalnika Vortex in ultrazvočne kadičke. Raztopine smo nanesli na mikrotitrskie ploščice s 96-timi vdolbinicami in izvedli meritve z mikrotitrskim čitalcem v programu Gen5.

3.1.2. Priprava izhodnih raztopin vzorcev in reagentov

- DTNB je v testu v prebitku, zato smo pripravili osnovno raztopino s koncentracijo $6,34 \times 10^{-4}$ M z razapljanjem DTNB v 0,1 M fosfatnem pufru (pH = 8)
- osnovni raztopini 1,5 mM BTC in 1,5 mM ATC smo prav tako pripravili z razapljanjem v 0,1 M fosfatnem pufru (pH = 8)
- huBChE in mAChE s koncentracijo 4,6 mg/mL v 10 mM MES pufru (pH = 6,5) smo redčili z 0,1 M fosfatnim pufrom (pH = 8) tako, da smo dosegli začetno hitrost encimske reakcije oz. aktivnost encima približno 500 mAU/min
- iz 10 mM raztopin spojin v DMSO, smo z redčenjem z DMSO pripravili naslednje koncentracije: 1mM, 300µM, 100µM, 30µM, 10µM, 3µM, 1µM, 300 nM, 100 nM; volumski odstotek topila DMSO v testni mešanici je bil vedno 1 %

3.1.3. Postopek izvedbe testa

Na mikrotitrsko ploščico smo v triplikatih nanesli najprej osnovno raztopino DTNB, potem izhodno raztopino testne spojine in na koncu izhodno raztopino encima ter inkubirali 5 minut, da se je lahko popolnoma vzpostavilo ravnotežje kompleksov encim –

inhibitor. Z dodatkom osnovne raztopine substrata BTC oz. ATC pri sobni temperaturi, smo sprožili potek reakcije in nastajanje rumenega 5-tio-2-nitrobenzoatnega aniona (20). Nastajanje 5-tio-2-nitrobenzoatnega aniona smo takoj po dodatku substrata, spremljali 1 minuto z mikrotitrskim čitalcem kot spremembo absorbance pri 412 nm.

V 300 µL končnega volumna mešanice reagentov in spojine, je bila ob začetku reakcije koncentracija DTNB 370 µM, koncentracija spojine 10 µM, 3 µM, 1 µM, 300 nM, 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM oz. 1 nM in koncentracija BTC oz. ATC 500 µM. Merili smo tudi nastajanje 5-tio-2-nitrobenzoatnega aniona ob odsotnosti spojine kot inhibitorja tako, da smo namesto spojine dodali DMSO.

3.1.4. Analiza rezultatov

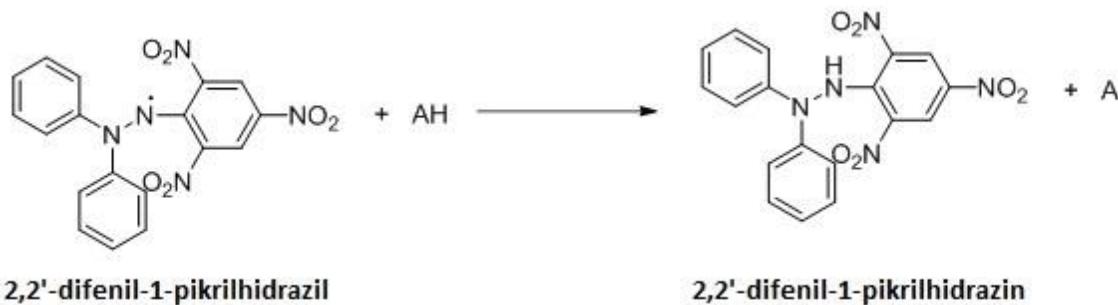
Rezultati merjenja absorbance so bili podani kot povprečni naklon, izračunan iz linearnega trenda naraščanja absorbanc v prvi minuti encimske reakcije, za posamezno vdolbinico. Ker smo meritve izvedli v triplikatih, smo izračunali povprečni naklon, ki predstavlja začetno hitrost v_i , in standardno deviacijo. Tako smo izračunali začetne hitrosti encimske reakcije ob prisotnosti določene koncentracije posamezne spojine v_i in začetno hitrost ob odsotnosti zaviralca v_0 . Inhibitorno aktivnost spojin smo izrazili kot rezidualno aktivnost encima RA ($RA = v_i / v_0$) in narisali graf odvisnosti RA od koncentracije testne spojine. Razpon koncentracij spojin je bil takšen, da smo z njimi dosegli RA med 5 % in 90 %. Vrednosti IC_{50} smo pridobili s pomočjo programske opreme Gnuplot in in-house python skripte po enačbi 1, kjer X predstavlja logaritem koncentracije zaviralca in Y predstavlja RA (20).

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log IC_{50} - X) \times \text{HillSlope})}) \quad (\text{enačba 1})$$

3.2. Vrednotenje antioksidativnega delovanja z DPPH testom

Antioksidativno delovanje spojin smo ovrednotili z DPPH testom. Test z DPPH[•] radikalom je pogosto uporabljena metoda za določanje antioksidativne aktivnosti spojин. DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilen prosti radikal temno vijolične barve, ki močno absorbira svetlobo valovnih dolžin 515–520 nm. DPPH[•] lahko od spojine antioksidanta sprejme elektron oz. vodikov atom. V reducirani obliki je DPPH bolj stabilen in postane bledo rumene barve (Slika 7). To spremembo barve ob prisotnosti antioksidanta

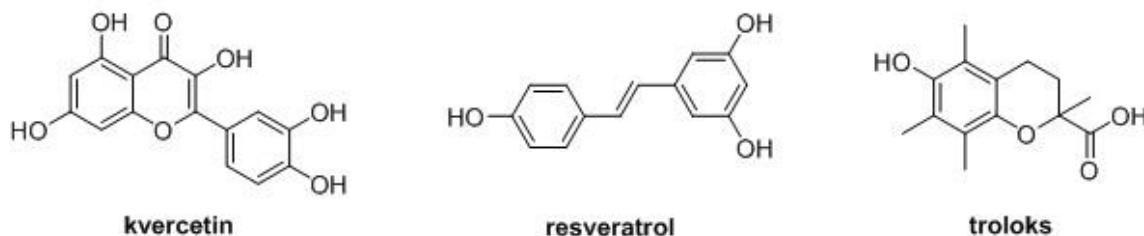
oz. lovilca radikalov lahko opazujemo spektrofotometrično in iz izmerjenih podatkov izračunamo antioksidativno aktivnost spojin. Večja kot je antioksidativna aktivnost spojine, večji je padec absorbance DPPH[•] v primerjavi z absorbenco DPPH[•] brez antioksidanta. Rezultat smo izrazili kot EC₅₀ oz. efektivno koncentracijo antioksidativne spojine, to je koncentracija spojine, ki reducira 50 % prisotnega radikala DPPH[•] (28).



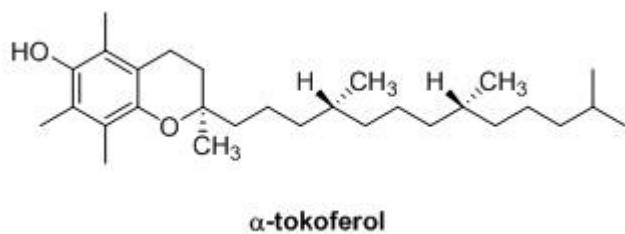
Slika 7: DPPH[•] sprejme H[•] od spojine (AH) in se spremeni v bledo rumeni 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazin (29)

Pripravili smo eno koncentracijo DPPH[•] in različne koncentracije posameznih testnih spojin. Kot topilo za pripravo raztopin smo uporabili metanol. Izhodne raztopine spojin smo v štirih paralelah nanesli na mikrotitrsko ploščico in jim dodali izhodno raztopino DPPH[•]. Posebej smo nanesli tudi metanol in mu dodali DPPH[•], da smo lahko določili absorbanco DPPH[•] brez antioksidanta. Po inkubaciji smo na mikrotitrskem čitalcu v programu Gen5 izmerili absorbanco pri $\lambda = 517$ nm. Iz izmerjenih podatkov smo narisali graf odvisnosti odstotka DPPH radikala (razmerje med absorbanco DPPH[•] ob prisotnosti spojine in absorbanco DPPH[•] brez spojine) od različnih koncentracij posameznih spojin. S pomočjo linearne regresije smo nato izračunali EC₅₀, ki je enaka x v enačbi linearne funkcije $y = k \times x + n$, ko je $y = 50$.

Po enakem postopku smo test izvedli še s standardi s podobno strukturo kot testne spojine. Reakcije DPPH[•] s standardi so služile kot pozitivna kontrola, medtem ko je bil DPPH[•] v topilu (metanolu) negativna kontrola. Uporabili smo tipične antioksidante kvercetin, resveratrol in troloks (Slika 8).

**Slika 8:** Standardi: kvercetin, resveratrol in troloks

Z najbolj aktivnimi spojinami smo izvedli še DPPH[•] test kinetike, pri katerem smo merili kinetiko antioksidativnega procesa. Na ta način smo ugotovili ali je testirana spojina hiter ali počasen antioksidant, torej kako hitro doseže plato in če plato doseže v času merjenja. Čas merjenja je bil enak času inkubacije pri predhodnih testih z DPPH[•], s čimer smo preverili, če smo inkubirali dovolj dolgo, da je reakcija dosegla ravnovesje med redukcijo in oksidacijo DPPH[•] oz. plato. Za pozitivno kontrolo smo uporabili α -tokoferol, ki je znan primer antioksidanta s hitro kinetiko redukcije in EC₅₀ med 10 in 20 μM (Slika 9).

**Slika 9:** Pozitivna kontrola α -tokoferol

3.2.1. DPPH test s testnimi spojinami in standardi

3.2.1.1. Materiali in aparature

Pri izvedbi testa smo uporabili naslednje testne spojine in reagente:

- DPPH prosti radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (95 %, Alfa Aesar, 44150 oz. Sigma Aldrich, D9132)
- spojine **2–11** kot antioksidante
- standarde: kvercetin (Quercetin hydrate, >95,0 % (HPLC)(E), TCI Europe, P0042), resveratrol (≥ 99 % (HPLC), Sigma Aldrich, R5010) in troloks ($\geq 98,0$ % (GC)(T), TCI Europe, H0726) kot antioksidante

- topilo metanol (MeOH) (Metanol RPE - for analysis, ACS Reag. Ph.Eur., Reag USP 2.5, Carlo Erba, 414816)

Vzorce in reagente smo pripravljali s pomočjo analitske tehnice, UV–Vis spektrofotometra, stresalnika Vortex in ultrazvočne kadičke. Raztopine smo nanesli na mikrotitrsko ploščico s 96-timi vdolbinicami in izvedli meritve z mikrotitrskim čitalcem v programu Gen5.

3.2.1.2. Priprava izhodnih raztopin vzorcev in reagentov

- 700 µM osnovno raztopino DPPH smo pripravili z raztopljanjem v MeOH s pomočjo ultrazvočne kadičke. Iz osnovne raztopine smo z redčenjem z MeOH pripravili 140 µM izhodno raztopino DPPH, ki smo ji izmerili absorbanco pri $\lambda = 517$ nm (pred merjenjem smo raztopino redčili z MeOH v razmerju 1:1). Vrednost absorbance med 0,9 in 0,5 je potrdila ustreznost raztopine DPPH za uporabo, kar je pomenilo da v raztopini ni neraztopljenih kristalov DPPH in da radikal še ni razpadel v preveliki meri (v primeru hranjenja raztopine zaščitene pred svetlobo, v hladilniku).
- 10 mM osnovne raztopine spojin smo pripravili z raztopljanjem v MeOH s pomočjo stresalnika Vortex in ultrazvočne kadičke. Iz osnovne raztopine posamezne spojine smo z redčenjem z MeOH za presejalni test, pripravili naslednje koncentracije izhodnih raztopin spojin: 700 µM, 280 µM, 140 µM, 70 µM, 35 µM in 17,5 µM.
- 10 mM osnovne raztopine kvercetina, resveratrola in troloksa smo pripravili v MeOH. Za presejalni test smo iz osnovnih raztopin, z redčenjem z MeOH, pripravili naslednje izhodne raztopine standardov: 32 µM, 16 µM, 8 µM, 4 µM, 2 µM, 1 µM in 0,5 µM za kvercetin, 1120 µM, 560 µM, 280 µM, 140 µM, 70 µM, 35 µM in 17,5 µM za resveratrol, 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM in 1,25 µM za troloks.

3.2.1.3. Postopek izvedbe testa

Na mikrotitrsko ploščico smo v štirih paralelah nanesli osnovne raztopine spojin in standardov, v eno od paralel dodali MeOH, v ostale tri pa osnovno raztopino DPPH[•]. Ploščico smo nato pokrili, da bi preprečili izhlapevanje MeOH, zaščitili pred svetlobo, da

bi preprečili razpadanje DPPH[•], in inkubirali 90 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo izmerili absorbanco nezreduciranega DPPH pri $\lambda = 517$ nm. Izmerili smo tudi absorbanco DPPH[•] ob odsotnosti antioksidanta (namesto antioksidanta smo dodali MeOH).

Končni volumen reakcijske mešanice v posamezni vdolbinici je bil 300 μL , končna koncentracija DPPH[•] ob začetku reakcije 70 μM , končne koncentracije posameznih testnih spojin za presejalni test pa 350 μM , 140 μM , 70 μM , 35 μM , 17,5 μM in 8,75 μM . Končne koncentracije kvercetina ob začetku reakcije so bile 16 μM , 8 μM , 4 μM , 2 μM , 1 μM , 0,5 μM in 0,25 μM , končne koncentracije resveratrola 560 μM , 280 μM , 140 μM , 70 μM , 35 μM , 17,5 μM in 8,75 μM ter koncentracije troloksa 40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM in 0,625 μM .

3.2.1.4. Analiza rezultatov

Rezultate meritev, absorbance v vsaki vdolbinici, smo prenesli v program Excel, kjer smo izvedli nadaljnjo analizo rezultatov. Za vsako koncentracijo posamezne spojine smo iz paralel z DPPH[•] izračunali povprečno absorbanco in odsteli absorbanco paralele z MeOH oz. absorbano ozadja. Na enak način smo izračunali tudi absorbanco DPPH[•] brez antioksidanta.

Iz tako dobljenih podatkov smo izračunali odstotek DPPH radikala iz razmerja absorbance DPPH[•] pri določeni koncentraciji posamezne spojine A_i in absorbance DPPH[•] ob odsotnosti spojine A_0 (% DPPH radikala = $A_i / A_0 \times 100$). Nato smo narisali graf odvisnosti odstotka DPPH prostega radikala od koncentracije posamezne spojine. Z linearno regresijo smo dobili enačbo premice, iz katere smo izračunali EC₅₀, s funkcijo STYX pa smo izračunali standardno napako predvidenih vrednosti y za vsak x v regresiji. Končni rezultat smo podali s standardno deviacijo.

3.2.2. Test kinetike redukcije DPPH[•]

3.2.2.1. Materiali in aparature

Pri izvedbi testa smo uporabili naslednje testne spojine in reagente:

- DPPH prosti radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (95 %, Alfa Aesar, 44150 oz. Sigma Aldrich, D9132)

- antioksidativno najbolj aktivne testne spojine: **9, 8 in 2**
- standard α -tokoferol (DL- α -tokoferol, >96,0 % (GC), TCI Europe, T0251)
- topilo MeOH (Metanol RPE - for analysis, ACS Reag. Ph.Eur., Reag USP 2.5, Carlo Erba, 414816)

Vzorce in reagente smo pripravljali s pomočjo analitske tehnice, UV–Vis spektrofotometra, stresalnika Vortex in ultrazvočne kadičke. Meritve smo izvedli v manjših ($l = 0,5$ cm) kivetah iz kvarčnega stekla na UV-Vis spektrofotometru.

3.2.2.2. Priprava izhodnih raztopin vzorcev in reagentov

- $140\ \mu\text{M}$ raztopino DPPH $^{\bullet}$ smo pripravili na enak način kot za DPPH test s testnimi spojinami
- $70\ \mu\text{M}$ **9**, $700\ \mu\text{M}$ **8** in $70\ \mu\text{M}$ in $35\ \mu\text{M}$ **2** raztopina v MeOH so bile pripravljene kot v DPPH testu. Navedene koncentracije smo izbrali glede na vrednosti EC₅₀, določene v omenjenem testu.
- $70\ \mu\text{M}$ raztopino α -tokoferola smo pripravili v MeOH

3.2.2.3. Postopek izvedbe testa

Pri $\lambda = 517\ \text{nm}$ smo 90 minut merili absorbanco DPPH $^{\bullet}$ ob prisotnosti posamezne testne spojine oz. standarda α -tokoferola. V kiveto smo odpipetirali izhodno raztopino DPPH $^{\bullet}$, dodali izhodno raztopino spojine oz. izhodno raztopino standarda, premešali in takoj začeli z merjenjem absorbance.

Preden smo začeli z merjenjem vzorcev, smo pomerili tudi kinetiko samega DPPH $^{\bullet}$. V kiveto smo raztopini DPPH $^{\bullet}$, namesto spojine oz. standarda, dodali MeOH. Z merjenjem kinetike samega DPPH $^{\bullet}$ smo preverili, ali absorbanca s časom pada oz. ali DPPH $^{\bullet}$ razpada. Končni volumen testne mešanice v kiveti je bil $1400\ \mu\text{L}$. Koncentracija DPPH $^{\bullet}$ ob začetku reakcije je bila $70\ \mu\text{M}$, **9** $35\ \mu\text{M}$, **8** $350\ \mu\text{M}$, **2** $35\ \mu\text{M}$ in α -tokoferola $35\ \mu\text{M}$.

3.2.2.4. Analiza rezultatov

Izmerjene absorbance in pripadajoče čase smo iz programa Cary Winuve pretvorili v obliko za program Excel, v katerem smo narisali krivuljo odvisnosti absorbance od časa za posamezen vzorec.

3.3. Vrednotenje kelacijskih lastnosti s kelacijskim testom in askorbatnim testom

Z delovanjem naših učinkovin želimo doseči kelacijo kovinskih ionov udeleženih v AB, pri čemer ne smemo vplivati na homeostazo ostalih pomembnih ionov. S testom kelacije smo ugotavliali ali naše spojine kompleksirajo oz. katere kovinske ione kompleksirajo. Poleg tega smo določali selektivnost spojin za vezavo Cu^{2+} ionov in stehiometrijo vezave spojine s Cu^{2+} . Izvedli smo še askorbatni test, s katerim smo ugotavliali ali je Cu^{2+} v kompleksu s posameznimi spojinami še vedno redoks aktiven in katalizira nastajanje HO^\bullet .

Keliranje kovinskih ionov smo testirali tako, da smo z UV-Vis spektrofotometrom pomerili absorpcijski spekter raztopine posamezne spojine pri $\lambda = 200\text{--}500 \text{ nm}$ (ker je absorpcijski maksimum spojin med 250 in 270 nm). Raztopni smo nato dodali raztopino kovinskega iona in ponovno pomerili absorpcijski spekter. Če je prišlo do kompleksacije, smo pri drugem spektru v primerjavi s prvim, opazili premik absorpcijskega maksimuma. Test smo izvedli z naslednjimi kovinskimi ioni: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} in Al^{3+} . Selektivnost spojine za vezavo Cu^{2+} smo določili tako, da smo k spojini in ekvimolarni količini posameznega kovinskega iona dodali ekvimolarno količino Cu^{2+} ionov in posneli še tretji spekter, v katerem smo v primeru selektivnosti za Cu^{2+} zaznali premik absorpcijskega maksimuma oz. spekter enak spektru spojine s Cu^{2+} .

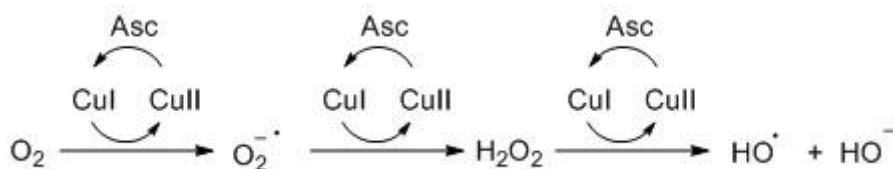
Za določitev stehiometrije vezave spojine s Cu^{2+} smo pomerili spektre spojine z različnimi koncentracijami bakrovih ionov. Absorpcijski maksimum se ob dodatku Cu^{2+} spojini premakne na določeno valovno dolžino, ki predstavlja absorpcijski maksimum nastalega kompleksa. Iz pomerjenih spektrov pri tej valovni dolžini smo odčitali absorbance in narisali graf odvisnosti razlike v absorbanci med samo spojino in spojino s Cu^{2+} (ΔA) od molarnega razmerja bakrovi ioni/spojina.

V grafu pričakujemo naraščanje oz. padanje ΔA do točke preloma, po kateri se absorbanca ne spreminja več. Naraščanje oz. padanje ΔA pomeni, da nastaja vedno več kompleksa, od

točke preloma naprej pa se je vezal že ves Cu²⁺ in je vzpostavljen ravnotežje med nastajanjem in razpadanjem kompleksa. Točka preloma je torej točka pri kateri smo odčitali razmerje, ki predstavlja stehiometrijo vezave Cu²⁺/spojina (30).

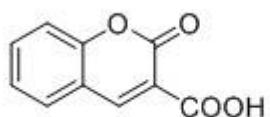
V nastajanje ROS pri AB so vpletene tudi kovinski ioni. Pomembno vlogo igra Cu²⁺, med drugim tudi kot vir oksidativnega stresa zaradi vpleteneosti v nastanek toksičnega hidroksilnega radikala HO[•]. Cu²⁺ katalizira nastanek HO[•] tako v obliki kompleksa Cu²⁺-Aβ kot tudi v prosti obliki.

S pomočjo Cu-askorbat redoks sistema (slika 10) oz. **askorbatnega testa**, smo ugotavljali ali lahko naše spojine zaustavijo redoks aktivnost vezanega bakra pod aerobnimi pogoji (31). Metoda temelji na reakciji kumarin-3-karboksilne kisline (CCA) (Slika 11) s hidroksilnim radikalom HO[•], ki nastaja posredno z redukcijo kisika O₂ ob prisotnosti redoks aktivnega Cu²⁺ in askorbata. Produkt 7-hidroksi-CCA (Slika 11) fluorescira ($\lambda_{\text{ekscitacija}} = 395 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisija}} = 450 \text{ nm}$), zato lahko njegovo nastajanje spremljamo kot spremembo intenzitete fluorescence.

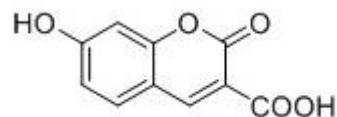


Slika 10: Cu-askorbatni redoks sistem (32)

Prednost metode je, da poleg pH omogoča posnemanje še drugih fizioloških pogojev v možganih. V testu tako uporabimo fiziološko koncentracijo askorbata in aerobne pogoje, saj so za možgane značilne visoke koncentracije askorbata in kisika (31–33).



kumarin-3-karboksilna kislina



7-hidroksi-kumarin-3-karboksilna kislina

Slika 11: Kumarin-3-karboksilna kislina (CCA) in 7-hidroksi-kumarin-3-karboksilna kislina (7-hidroksi-CCA) (34)

Cu^{2+} in CCA smo inkubirali v prisotnosti testnih spojin. Po dodatku askorbata smo merili spremembo intenzitete fluorescence (mikrotitrski čitalec Bioteč), ki smo jo potem primerjali s spremembo intenzitete fluorescence sistema brez naših spojin. Na ta način smo ugotavljali ali spojine kelirajo bakrove ione in s tem preprečijo njihovo redoks aktivnost ter nastajanje HO^{\cdot} . Ob dodatku spojin smo torej pričakovali padec intenzitete fluorescence. Iz podatkov smo narisali grafe odvisnosti intenzitete signala fluorescence (R.F.U., $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 395 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisija}} = 450\text{nm}$) od časa (min) in rezultate podali kvalitativno.

3.3.1. Test kelacije

3.3.1.1. Test kelacije kovinskih ionov in selektivnosti za vezavo Cu^{2+} ionov

3.3.1.1.1. Materiali in aparature

Za izvedbo testa smo uporabili naslednje testne spojine in reagente:

- testne spojine **2–11**
- kovinske ione v obliki $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 , CaCl_2 , $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, ACS reagent, $\geq 99,0 \%$, Sigma Aldrich, 307483; ZnCl_2 , ACS reagent, $\geq 97 \%$, Sigma Aldrich, 211273; $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, puriss. p.a., $\geq 99,0 \%$ (RT), Sigma Aldrich, 44939; MgCl_2 anhydrous, $\geq 98 \%$, Sigma Aldrich, M8266; CaCl_2 , anhydrous, BioReagent, $\geq 96,0 \%$, Sigma Aldrich, C5670; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, puriss. p.a., Sigma Aldrich, 31462; FeCl_3 , anhydrous, $\geq 98 \%$, Sigma Aldrich, 12321; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, BioReagent, Sigma Aldrich, M5005; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, ACS reagent, $\geq 98 \%$, Sigma Aldrich, 255599; $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, ReagentPlus, 99 %, Sigma Aldrich, 237078)
- askorbinsko kislino (L-askorbinska kislina, $\geq 99 \%$ by assay, Merck Millipore, 1831), ki smo jo kot antioksidant dodali raztopini Fe^{2+} ionov
- 20 mM HEPES pufer s 146 mM NaCl (pH = 7,5) (HEPES, $\geq 99,5 \%$ (titration), Sigma Aldrich, H7006; NaCl, BioXtra, $\geq 99,5 \%$ (AT), Sigma Aldrich, S7653)
- DMSO kot topilo (for analysis EMSURE® ACS, Merck)
- 2 M NaOH in 1 M NaOH (ACS Reagent, Ph Eur, 99–100 % Merck Millipore, 106469)

Vzorce in reagente smo pripravljali s pomočjo analitske in precizne tehnic ter stresalnika Vortex. Meritve smo izvajali v manjših ($l = 0,5 \text{ cm}$) kivetah iz kvarčnega stekla z UV–Vis spektrofotometrom.

3.3.1.1.2. Priprava izhodnih raztopin vzorcev in reagentov

- 3 mM izhodne raztopine testnih spojin smo pripravili z raztplavljanjem v DMSO
- 6 mM osnovne raztopine kovinskih ionov smo pripravili v prečiščeni vodi. Iz osnovnih raztopin smo, z redčenjem z zgoraj navedenim HEPES pufrom, pripravili 1200 µM osnovne raztopine Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Co²⁺ in Al³⁺ ionov.
- 6 mM osnovno raztopino Fe²⁺ ionov smo pripravili v vodi z 1 mM askorbatom z namenom, da bi preprečili oksidacijo Fe²⁺ v Fe³⁺. Iz osnovne raztopine smo nato, z redčenjem s HEPES pufrom, pripravili 1200 µM osnovno raztopino Fe²⁺ ionov.
- 20 mM HEPES pufer s 146 mM NaCl (pH = 7,5) smo pripravili z raztplavljanjem HEPES proste kisline (Sigma) in NaCl (BioXtra, ≥99,5 % (AT), Sigma Aldrich, S7653) v prečiščeni vodi in z uravnavanjem pH z 2 M in 1 M NaOH

3.3.1.1.3. Postopek izvedbe testa

Za test kelacije smo raztopinam testnih spojin najprej posneli absorpcijski spekter pri valovnih dolžinah med 200 in 500 nm. Potem smo dodali izhodno raztopino kovinskega iona, dobro premešali in, po petih minutah inkubacije pri sobni temperaturi, ponovno posneli absorpcijski spekter med 200 in 500 nm. Za test selektivnosti spojine za vezavo Cu²⁺ ionov, smo testni mešanici dodali izhodno raztopino Cu²⁺ ionov, dobro premešali, 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi in posneli absorpcijski spekter med 200 in 500 nm. Absorpcijski spekter posamezne testne spojine oz. slepi vzorec smo posneli tako, da smo v kiveto odpipetirali 579 µL HEPES pufra, 6 µL izhodne raztopine spojine in še 15 µL HEPES pufra namesto izhodne raztopine kovinskih ionov. Mešanici smo po meritvi dodali 15 µL izhodne raztopine kovinskega iona, posneli spekter in dodali še 15 µL osnovne raztopine Cu²⁺ ionov za test selektivnosti. Na ta način smo vse meritve izvedli v isti mešanici in s tem zmanjšali napako koncentracij. Pri računanju koncentracij posameznih komponent v mešanici smo končni volumen poenostavili na 600 µL (tudi zaradi kontrakcije volumna zaradi DMSO). Napaka zaradi poenostavitev je bila konstantna in zaradi kvalitativne analize rezultatov, ni imela signifikantnega vpliva na končni rezultat. V testni mešanici je bilo tako prisotne 30 µM testne spojine, 30 µM kovinskega iona in 30 µM Cu²⁺ iona.

3.3.1.1.4. Analiza rezultatov

Rezultate meritev, absorbance pri valovnih dolžinah od 200 do 500 nm, za posamezne spojine, same oz. ob prisotnosti posameznih kovinskih ionov in Cu²⁺ ionov, smo pretvorili v obliko za Excel. V Excelu smo nato narisali grafe odvisnosti absorbance od valovne dolžine. Krivulje za spojino samo, spojino ob prisotnosti kovinskega iona in spojino s kovinskim ionom ob dodatku Cu²⁺ ionov, smo združili v enem grafu in kvalitativno oz. s primerjanjem ovrednotili kelacijske lastnosti in selektivnost testnih spojin za vezavo Cu²⁺ ionov.

3.3.1.2. Določanje stehiometrije vezave Cu²⁺ ionov

3.3.1.2.1. Materiali in aparature

Za izvedbo testa smo uporabili naslednje testne spojine in reagente:

- testne spojine ki, glede na rezultate testa kelacije, kelirajo Cu²⁺ ione: **2, 3, 6, 10** in **11**
- 6 mM vodna raztopina Cu²⁺ ionov (raztopina pripravljena za predhodni test)
- 20 mM HEPES pufer s 146 mM NaCl (pH = 7,5) (pufer pripravljen za predhodni test)

Meritve smo izvajali v manjših ($l = 0,5$ cm) kivetah iz kvarčnega stekla z UV–Vis spektrofotometrom.

3.3.1.2.2. Priprava izhodnih raztopin vzorcev in reagentov

- 3 mM izhodne raztopine zgoraj navedenih testnih spojin v DMSO so bile že pripravljene za izvedbo predhodnega testa
- iz 6 mM vodne raztopine Cu²⁺ ionov smo z redčenjem s HEPES puferom pripravili 5,4 mM, 4,8 mM, 4,2 mM, 3,6 mM, 3,0 mM, 2,4 mM, 1,8 mM, 800 µM, 600 µM, 400 µM, 200 µM, 120 µM in 40 µM izhodno raztopino Cu²⁺ ionov
- 20 mM HEPES pufer s 146 mM NaCl (pH = 7,5) je bil že pripravljen za izvedbo predhodnega testa

3.3.1.2.3. Postopek izvedbe testa

Najprej smo posneli absorpcijski spekter testne spojine med 200 in 500 nm. Nato smo spojini dodali izhodno raztopino prve koncentracije Cu²⁺ ionov, dobro premešali in, po 5-

minutni inkubaciji pri sobni temperaturi, ponovno posneli spekter. Za tem smo v kiveti na novo pripravili mešanico spojine in izhodne raztopine druge koncentracije Cu^{2+} ionov, 5 min inkubirali pri sobni temperaturi in posneli spekter. Na enak način smo potem postopali z izhodnimi raztopinami preostalih koncentracij Cu^{2+} ionov.

V kiveto smo v vseh primerih odpipetirali 594 μL HEPES pufra, 6 μL izhodne raztopine spojine in 15 μL izhodne raztopine posamezne koncentracije Cu^{2+} ionov. Pri računanju koncentracij posameznih komponent v testni mešanici smo, tako kot pri testu kelacije, končni volumen poenostavili na 600 μL . Meritve so torej potekale ob prisotnosti 30 μM testne spojine in 150 μM , 135 μM , 120 μM , 105 μM , 90 μM , 75 μM , 60 μM , 45 μM , 20 μM , 15 μM , 10 μM , 5 μM , 3 μM oz. 1 μM Cu^{2+} ionih.

3.3.1.2.4. Analiza rezultatov

Izmerjene absorbance in pripadajoče valovne dolžine smo pretvorili v obliko za Excel. V Excelu smo za tem narisali grafe odvisnosti absorbance od valovne dolžine za posamezne testne spojine, same in ob prisotnosti različnih koncentracij Cu^{2+} ionov. Krivulje za posamezno spojino smo združili v en graf in mu dodali še krivuljo spojine ob prisotnosti 30 μM Cu^{2+} , ki smo jo narisali v predhodnem testu.

Iz posnetih spektrov smo določili valovno dolžino pri kateri ima absorpcijski maksimum kompleks spojina– Cu^{2+} . Pri tej valovni dolžini smo odčitali absorbance posamezne testne spojine in absorbance posamezne testne spojine ob prisotnosti posameznih koncentracij Cu^{2+} ionov oz. absorbance kompleksov spojina– Cu^{2+} .

Iz odčitanih absorbanc smo izračunali razliko v absorbanci (ΔA) med absorbanco kompleksa pri posamezni koncentraciji Cu^{2+} ionov in absorbanco spojine. Izračunali smo tudi koncentracijsko razmerje med Cu^{2+} ioni in spojino ter narisali graf odvisnosti ΔA od molarnega razmerja Cu^{2+} /spojina. Točkam na grafu bi v idealnem primeru dodali trendno črto in narisali tangenti v linernih začetnih delih. V našem primeru smo skozi točke, ki so nakazovale linearni trend, narisali dve premici. V točki presečišča premic smo odčitali molarno razmerje na x – osi in tako določili stehiometrijo vezave spojine s Cu^{2+} ioni.

3.3.2. Askorbatni test

3.3.2.1. Materiali in aparature

Pri izvedbi testa smo uporabili naslednje testne spojine in reagente:

- kumarin-3-karboksilno kislino (CCA) (GDK-336)

- 6 mM vodno raztopino Cu^{2+} , pripravljeno z raztopljanjem $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (ACS reagent, ≥99,0 %, Sigma Aldrich, 307483)
- askorbinsko kislino (L-askorbinska kislina, ≥99 % by assay, Merck Millipore, 1831)
- testne spojine **2**, **3**, **5–11** (spojine **4** nismo testirali)
- 8-hidroksikinolin (for synthesis, ≥99,0 % (GC, area %), Merck Millipore, 820261)
- EDTA (reagent grade, 99 %, Sigma Aldrich, ED2SS)
- MeOH (Metanol RPE - for analysis, ACS Reag. Ph.Eur., Reag USP 2.5, Carlo Erba, 414816)
- 20 mM fosfatni pufer s 100 mM NaCl in 2,21 μM desferilom (kelator železa) (pH = 7,4) ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, ACS Reagent, Ph Eur, 99,0–102,0 %, Merck Millipore, 106346; NaCl, BioXtra, ≥99,5 % (AT), Sigma Aldrich, S7653; deferoxamine mesylate salt, powder, ≥92,5 % (TLC), Sigma Aldrich, D9533)

Vzorce in reagente smo pripravljali s pomočjo precizne tehtnice, analitske tehtnice, stresalnika Vortex in ultrazvočne kadičke. Raztopine smo nanesli na mikrotitrsko ploščico s 96-timi vdolbinicami in izvedli meritve z mikrotitrskim čitalcem.

3.3.2.2. Priprava izhodnih raztopin vzorcev in reagentov

- 310 μM osnovno raztopino CCA smo pripravili z raztopljanjem CCA v 20 mM fosfatnem pufru s 100 mM NaCl in 2,21 μM desferilom (pH = 7,4)
- 2400 μM in 1200 μM izhodno raztopino Cu^{2+} ionov smo pripravili z redčenjem 6 mM vodne raztopine Cu^{2+} ionov s prečiščeno vodo
- 461,54 μM izhodno raztopino askorbinske kisline smo pripravili z raztopljanjem askorbinske kisline v zgoraj omenjenem fosfatnem pufru
- 40 mM osnovne raztopine testnih spojin **2**, **3**, **5–11** smo pripravili z raztopljanjem spojin v MeOH. Iz osnovnih raztopin smo, z redčenjem s fosfatnim pufrom, pripravili 4 mM izhodne raztopine testnih spojin. Na ta način smo zagotovili, da je bila vsebnost MeOH na mikrotitrski ploščici 0,1 % (V/V), višja vsebnost bi namreč lahko motila meritev. DMSO-ja pa iz previdnosti nismo uporabili namesto MeOH, ker deluje kot antioksidant (35).
- 4 mM izhodni raztopini 8-hidroksikinolina in EDTA, ki sta služili kot pozitivni kontroli, smo pripravili na enak način kot testne spojine

- 20 mM fosfatni pufer s 100 mM NaCl in 2,21 μM desferilom (pH = 7,4) smo pripravili z raztopljanjem $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, NaCl in desferila v prečičeni vodi in z uravnovanjem pH. Koncentracija desferila na mikrotitrski ploščici je bila približno 2 μM .

3.3.2.3. Postopek izvedbe testa

Z mikrotitrskim čitalcem smo 20 minut merili intenziteto fluorescence 7-hidroksi-CCA, ki je nastajal v reakciji CCA s hidroksilnim radikalom HO^\bullet . Meritve smo spremljali s programom Gen5 pri $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 395 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{emisija}} = 450 \text{ nm}$.

Na mikrotitrsko ploščico smo v štirih paralelah najprej nanesli izhodno raztopino CCA, vzorec (izhodno raztopino testne spojine oz. pozitivne kontrole) oz. pufer in izhodno raztopino Cu^{2+} ionov ter inkubirali 5 minut zaščiteno pred izhlapevanjem pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali izhodno raztopino askorbinske kisline in takoj začeli z merjenjem fluorescence.

Nanosi na mikrotitrski ploščici in končne koncentracije v posamezni paraleli s končnim volumenom 300 μL , so bili naslednji:

1. vrstica: 100 μM CCA, fosfatni pufer z 0,1 % MeOH, 20 μM oz. 40 μM Cu^{2+} in 300 μM askorbat
2. vrstica: 100 μM CCA, 40 μM testna spojina, 20 μM oz. 40 μM Cu^{2+} in 300 μM askorbat
3. vrstica: fosfatni pufer in 300 μM askorbat kot negativna kontrola
4. vrstica: 100 μM CCA, 40 μM 8-hidroksikinolin, 20 μM oz. 40 μM Cu^{2+} in 300 μM askorbat kot pozitivna kontrola
5. vrstica: 100 μM CCA, 40 μM EDTA, 20 μM oz. 40 μM Cu^{2+} in 300 μM askorbat kot pozitivna kontrola.

3.3.2.4. Analiza rezultatov

Izmerjene vrednosti intenzitete fluorescence za vsako vdolbinico s testno mešanico in pripadajoči čas, smo iz Gena5 prenesli v Excel. V Excelu smo nato iz vrednosti paralel izračunali povprečno fluorescenco, odšteli vrednost negativne kontrole ter narisali grafe odvisnosti intenzitete fluorescence (R.F.U.) od časa. Izrisane krivulje smo združili v enem grafu in jih kvalitativno ovrednotili. Primerjali smo intenziteto fluorescence 7-hidroksi-

CCA v Cu²⁺ - askorbatnem sistemu ob prisotnosti posameznih testnih spojin z intenziteto v sistemu samem, in sklepali na redoks aktivnost Cu²⁺ v kompleksu z našimi spojinami.

3.4. Vrednotenje inhibicije agregacije Aβ s tioflavin T fluorimetričnim testom

Testne piperidine smo ovrednotili tudi z vidika zaviranja agregacije Aβ. Spojine vsebujejo aromatske centre, zato nas zanima, če lahko zmotijo π-nalaganje aromatskih ostankov (nekovalentna elektrostatska privlačna interakcija med aromatskimi sistemi s π-elektroni) v procesu agregacije Aβ peptidov.

Za dokazovanje anti-agregacijske aktivnosti spojin smo izvedli Tioflavin T fluorimetrični test. Tioflavin T (ThT) (Slika 12) je spojina, ki fluoresceira ($\lambda_{\text{ekscitacija}} = 385 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisija}} = 445 \text{ nm}$) in se veže na agregirani Aβ. ThT se v nekaj sekundah veže na β-ploskve Aβ, v nastalem kompleksu pa ima ekscitacijski (absorpcijski) maksimum pri 450 nm, medtem ko emisija pri 482 nm naraste. Sprememba fluorescence je povezana s koncentracijo peptida, odvisna je tudi od koncentracije ThT (36). Dodatek spojine, ki lahko razgradi fibrile, k mešanici ThT in agregiranega Aβ povzroči disociacijo agregata, temu sledi padec fluorescence.



Slika 12: Struktura tioflavina T (37)

V testu smo uporabili Aβ₄₂, ker ga najpogosteje povezujemo z amiloidnimi plaki in ker je bolj toksičen in ima večjo težnjo za agregacijo kot drugi monomeri Aβ (20). Peptidu in testni spojini smo na mikrotitrski ploščici dodali ThT in z mikrotitrskim čitalcem pri $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 440 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{emisija}} = 490 \text{ nm}$ merili fluorescenco vsakih 90 v časovnem intervalu 48 ur. Začetek agregacije smo sprožili s stalnim stresanjem in inkubacijo pri 37 °C v čitalcu med meritvami.

Da smo lahko ovrednotili nastajanje amiloidnih plakov, smo fluorescenco merili tudi Aβ s ThT ob odsotnosti testnih spojin. Rezultat smo podali kot odstotek zaviranja agregacije. Iz meritev smo izračunali povprečno intenziteto fluorescence po doseženem platoju, za vzorce s testno spojino in za vzorce brez spojine ter odšeli povprečno intenziteto ob času 0. Inhibicijo agregacije Aβ₄₂ smo izračunali po enačbi $(1 - F_i/F_0) \times 100\%$ (F_i je povečanje

fluorescence v vzorcu s testno spojino, F_0 je povečanje fluorescence v vzorcu brez spojine) (22).

3.4.1. Materiali in aparature

Za izvedbo testa smo uporabili naslednje testne spojine in reagente:

- testne spojine, ki so se v Ellmanovem testu izkazale kot najboljši zaviralci huBChE: **2**, **5**, **8** in **9** (Testa na spojinah **10** in **11**, ki prav tako spadata med najboljše zaviralce huBChE med spojinami, ki jih obravnava ta magistrska naloga, nismo izvedli, ker sta spojini obarvani in tudi fluorescirata, zaradi česar interagirata s testnim sistemom. Alternativa bi bil dot-blot test s protitelesi (20).)
- rekombinantni humani z 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanolom predhodno obdelani A β ₄₂ peptid (>97,0 %, Merck Millipore, AG968-1MG)
- tioflavin T (ThT) (tioflavin T, used as stain for amyloid, dye content 65-75 %, Sigma Aldrich, T3516)
- DMSO topilo (for analysis EMSURE® ACS, Merck)
- 150 mM HEPES pufer s 150 mM NaCl (pH = 7,4) (HEPES, ≥99,5 % (titration), Sigma Aldrich, H7006; NaCl, BioXtra, ≥99.5 % (AT), Sigma Aldrich, S7653)

Vzorce in reagente smo pripravljali s pomočjo precizne tehnicte in stresalnika Vortex. Raztopine smo nanesli na mikrotitrsko ploščico s 96-timi črnimi vdolbinicami in izvedli meritve z mikrotitrskim čitalcem.

3.4.2. Priprava izhodnih raztopin vzorcev in reagentov

- iz 3 mM oz. 10 mM raztopin testnih spojin v DMSO (pripravljene za predhodne teste), smo z redčenjem z DMSO pripravili 1 mM osnovne raztopine testnih spojin. Iz osnovnih raztopin smo nato, z redčenjem s HEPES pufrom, pripravili 100 µM osnovne raztopine.
- A β ₄₂ peptid smo raztoplili v DMSO v 100 µM raztopino, ki smo jo potem razredčili s HEPES pufrom v 10 µM osnovno raztopino
- 14,3 µM osnovno raztopino ThT smo pripravili z raztopljanjem ThT v HEPES pufru

- 150 mM HEPES pufer s 150 mM NaCl (pH = 7,4) smo pripravili z raztopljanjem HEPES proste kisline ($\geq 99.5\%$ (titration), Sigma Aldrich, H7006) in NaCl v prečiščeni vodi in z uravnavanjem pH z 2 M in 1 M NaOH

3.4.3. Postopek izvedbe testa

Na mikrotitrsko ploščico smo v štirih paralelah nanesli izhodno raztopino A β_{42} in izhodno raztopino posamezne testne spojine ter takoj dodali osnovno raztopino ThT. Končni volumen testne mešanice v posamezni vdolbinici je bil 100 μL , koncentracija A β_{42} 2 μM , koncentracija testne spojine 10 μM in koncentracija ThT 10 μM . Vsebnost DMSO je bila v vsaki testni mešanici 3 %.

Pokrito ploščico smo po nanosu položili v mikrotitrski čitalec na 37 °C, s čimer smo sprožili agregacijo A β_{42} . Takoj za tem smo začeli z 48-urnim inkubiranjem in merjenjem fluorescence ThT pri $\lambda_{\text{ekscitacija}} = 440\text{ nm}$ in $\lambda_{\text{emisija}} = 490\text{ nm}$. Intenziteta fluorescence je bila pomerjena skozi dno vdolbinic vsakih 90 sekund, med posameznimi meritvami pa je potekalo stalno stresanje ploščice (22).

3.4.4. Analiza rezultatov

Rezultate meritev (intenzitete fluorescence v posamezni vdolbinici in pripadajoče čase) smo iz Gena5 prenesli v Excel, kjer smo narisali grafe odvisnosti intenzitete fluorescence (R.F.U.) od časa. Na ta način smo ugotovili kdaj je fluorescencija ThT dosegla plato.

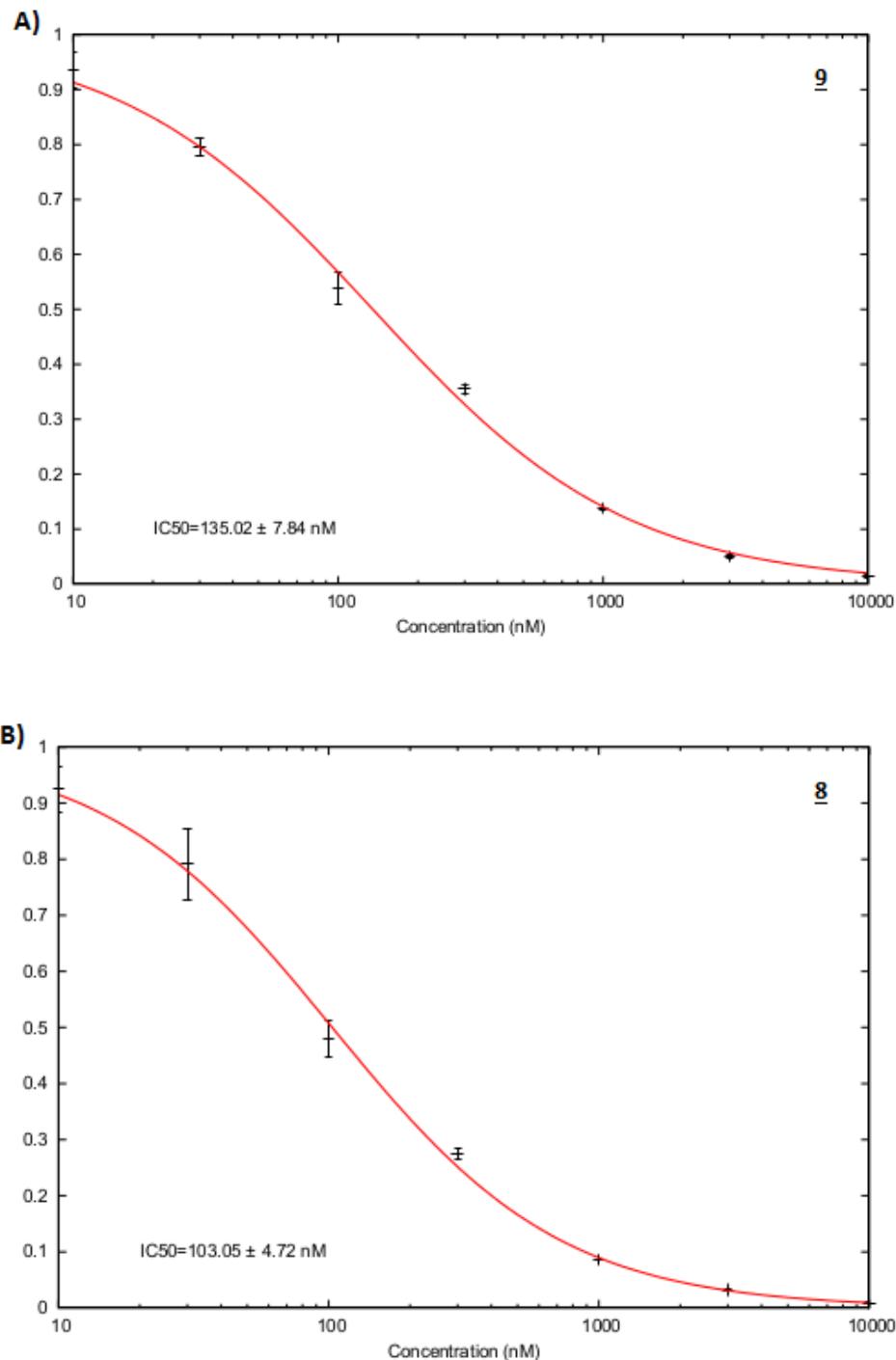
Iz vrednosti intenzitete fluorescence platoja posameznih paralel smo izračunali povprečje in odstotki povprečno fluorescenco pri času 0. Po enačbi $(1 - F_i/F_0) \times 100$ smo izračunali odstotek inhibicije spontane agregacije A β_{42} ob prisotnosti posamezne testne spojine. Pri tem F_i predstavlja povečanje fluorescence ob prisotnosti A β_{42} s testno spojino, in F_0 povečanje fluorescence ob prisotnosti A β_{42} samega (22).

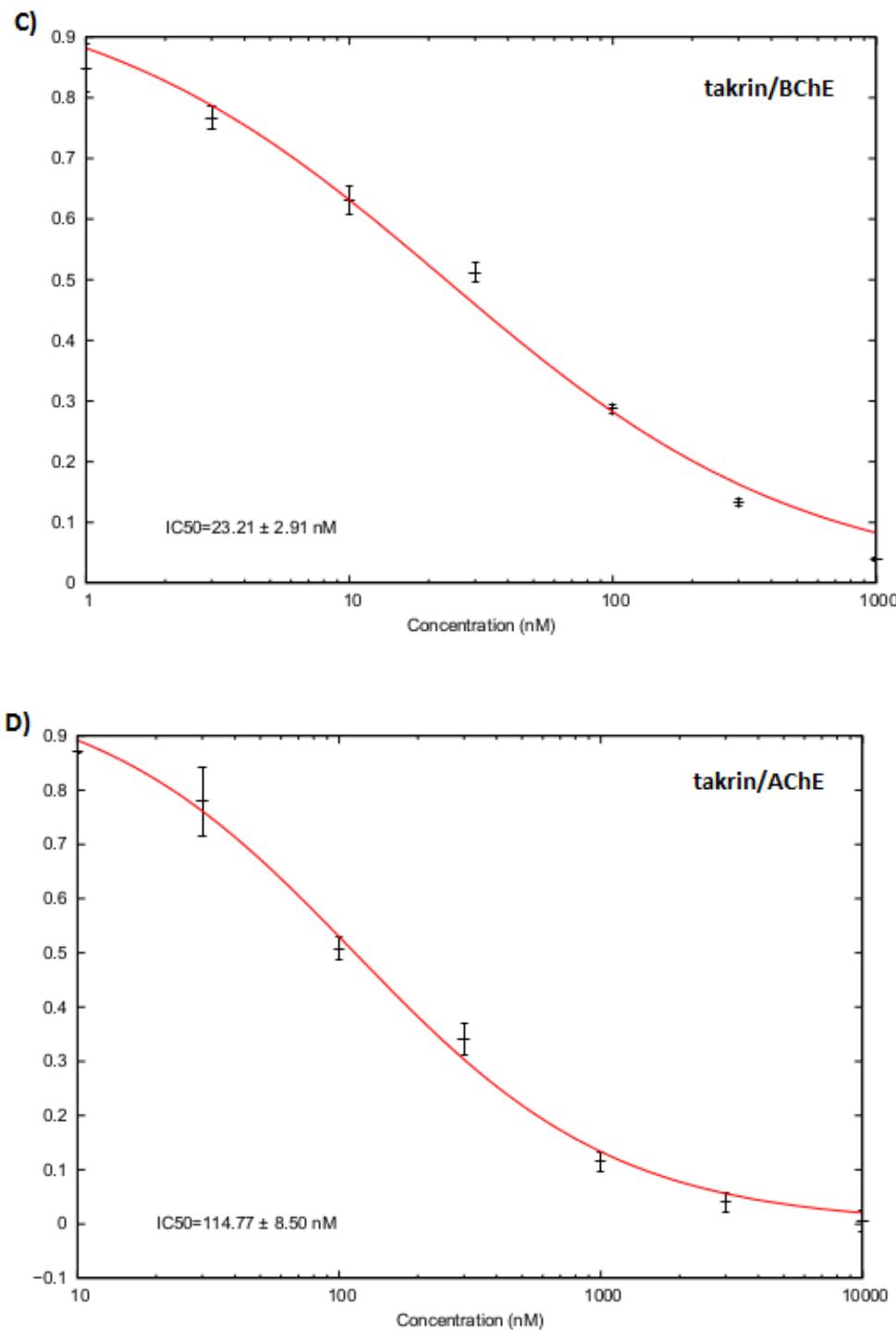
4. Rezultati in razprava

4.1. Zaviranje huBChE

4.1.1. Rezultati

S pomočjo Ellmanove metode smo ovrednotili delovanje spojin **2–11** kot zaviralcev huBChE (Slika 13, Tabela II). Test smo izvedli pri aktivnosti encima približno 500 mAU/min.





Slika 13: Grafi odvisnosti RA od koncentracije inhibitorja huBChE za A) 9, B) 8 in C) takrin ter graf odvisnosti RA od inhibitorja mAChE za D) takrin, s pripadajočimi vrednostmi IC_{50}

Ugotavljali smo tudi delovanje spojin kot zaviralcev mAChE. Rezultati testa podani kot rezidualne aktivnosti ob prisotnosti določene koncentracije testiranih spojin, so bili večji

od 75 %. Spojine torej niso zaviralci mAChE. Za pozitivno kontrolo smo test izvedli še s takrinom, ki je neselektiven zaviralec obeh holin esteraz.

Tabela II: IC₅₀ vrednosti testnih spojin proti huBChE

Spojina	IC ₅₀ [nM]
2	13,8 ± 0,6
3	265,8 ± 23,2
4	57 % RA pri 10 µM
5	9,5 ± 0,5
6	228,6 ± 25,0
7	634,5 ± 40,5
8	103,1 ± 4,7
9	135,0 ± 7,8
10	11,1 ± 0,6
11	19,0 ± 1,0
takrin	23,2 ± 2,9

4.1.2. Razprava

Spojine navedene v Tabeli I so bile v osnovi načrtovane kot zaviralci huBChE. Učinkovitost pri zaviranju huBChE je bila za večino testnih spojin dokazana z določitvijo IC₅₀ vrednosti, ki se pri vseh (z izjemo **4**) nahajajo v nanomolarnem območju.

Najboljši zaviralci huBChE so po padajoči aktivnosti **5**, **10**, **2** in **11**, sledita jim **8** in **9**. Iz primerjave strukture spojin lahko sklepamo, da kumarinski fragment vezan na amidno vez v dani konformaciji s svojimi interakcijami prispeva največ k zaviranju delovanja huBChE. Fragment na istem mestu, ki prav tako pomembno prispeva k učinkovitosti spojin kot inhibitorjev je 8-hidroksikinolin, sledita mu naftalen in 8-hidroksiimidazo[1,2-*a*]piridin. Omenjeni fragmenti v primerjavi s fragmenti ostalih testiranih spojin, po vsej verjetnosti tvorijo z acil-vezavnim žepom huBChE dodatne nespecifične interakcije (hidrofobne, van der Waalsove) oz. dodatne interakcije z aminokislinskimi ostanki ali peptidnim ogrodjem. Možno je tudi, da so fragmenti ostalih testiranih spojin preveliki za vezavo v žep huBChE. Z Ellmanovim testom smo ugotovili tudi, da preiskovane spojine ne zavirajo mAChE. S tem smo potrdili njihovo selektivno zaviranje huBChE. Razlog je verjetno prav tako v fragmentih, vezanih na amidno vez, ki so v tem primeru preveliki, da bi se prilegli v manjši acil-vezalni žepki mAChE.

4.2. DPPH test

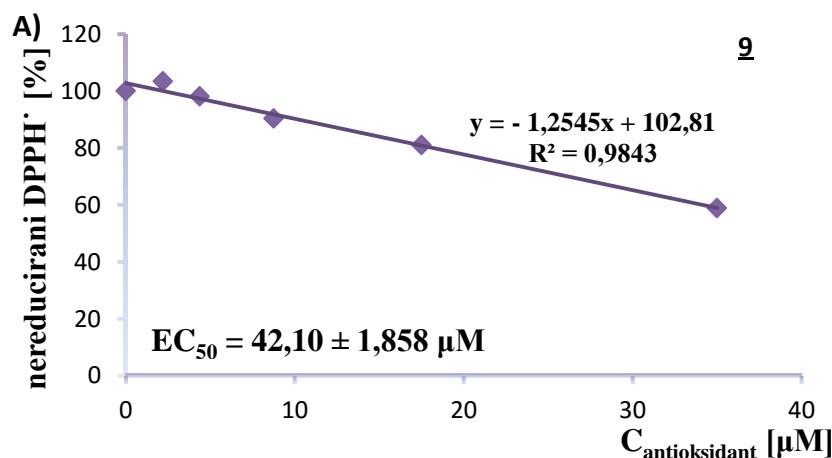
4.2.1. DPPH test s testnimi spojinami

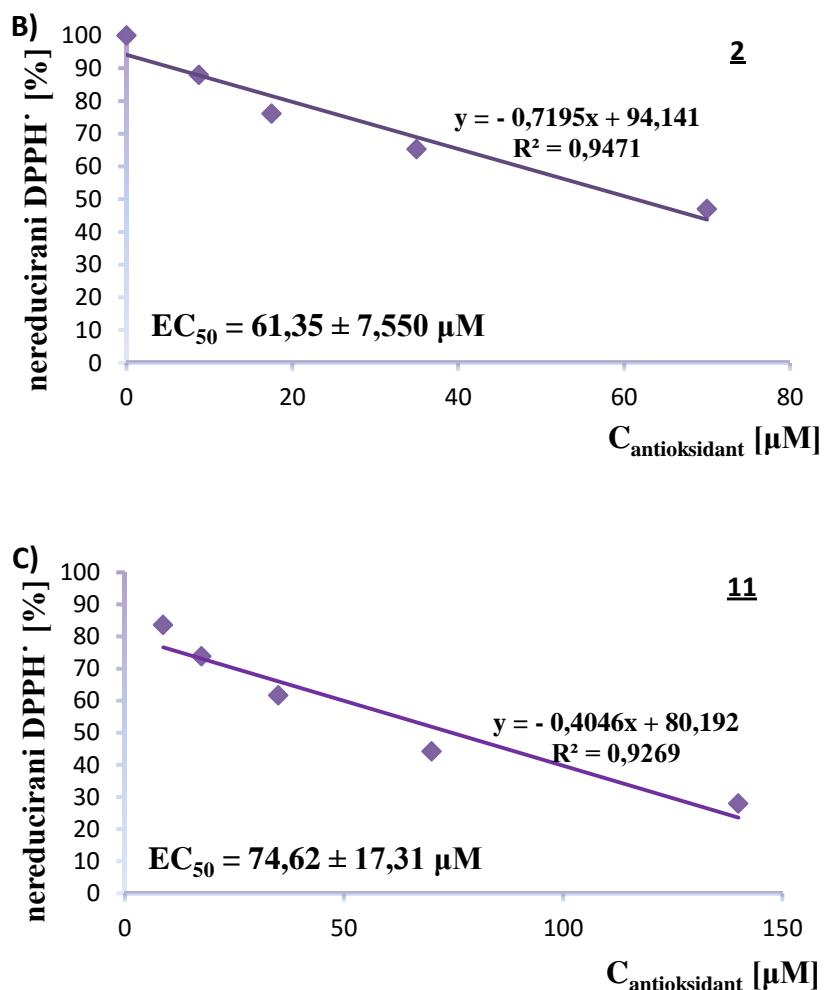
4.2.1.1. Rezultati presejalnih testov

Za določitev vrednosti EC_{50} testiranih spojin smo morali pokriti koncentracijsko območje v katerem pride vsaj do 50 % zmanjšanja absorbance $DPPH^{\bullet}$. Ker so se nekatere spojine v presejalnem testu izkazale kot močni oz. šibki antioksidanti, smo test ponovili pri nižjih oz. višjih koncentracijah. Test smo ponovili pri **9** z dvema nižjima koncentracijama ($4,375 \mu M$ in $2,188 \mu M$), pri **8** in **7** z dvema višjima koncentracijama ($700 \mu M$ in $1400 \mu M$) in pri **6**, **4** ter **3** s tremi višjimi koncentracijami ($700 \mu M$, $1400 \mu M$ in $2800 \mu M$).

4.2.1.2. Končni rezultati

Z DPPH testom smo ugotovili katere izmed spojin delujejo antioksidativno in izračunali njihove vrednosti EC_{50} . Sposobnost redukcije $DPPH^{\bullet}$ v odvisnosti od koncentracije smo za posamezno spojino prikazali z grafom. Z linearno regresijo smo izračunali enačbo premice, iz katere smo izrazili EC_{50} (Slika 14). Test je potekal ob $70 \mu M$ začetni koncentraciji $DPPH^{\bullet}$ radikala. Spodaj so prikazani grafi za tri testne spojine z najboljšimi antioksidativnimi lastnostmi, vrednosti EC_{50} vseh spojin pa so podane v Tabeli III.





Slika 14: Grafi odvisnosti odstotka nereduciranega DPPH radikala od koncentracije testne spojine za A) **9**, B) **2** in C) **11** in pripadajoče vrednosti EC₅₀.

Tabela III: Vrednosti EC₅₀ za antioksidativno delovanje testnih spojin

Spojina	EC ₅₀ [μM]
2	$61,4 \pm 7,6$
3	$3544,0 \pm 262,0$
4	$6494,0 \pm 25,7$
5	ne reducira DPPH·
6	$3475,0 \pm 208,6$
7	$3233,0 \pm 139,4$
8	$761,8 \pm 156,2$
9	$42,1 \pm 1,9$
10	$544,0 \pm 41,5$
11	$74,6 \pm 17,3$

4.2.1.3. Razprava

Iz Tabele III je razvidno, da so **9**, **2** in **11** spojine z najboljšim antioksidativnim delovanjem. Sledita jim spojini **10** in **8** z vrednostima EC₅₀ večjima za en red velikosti.

Iz strukture omenjenih spojin lahko sklepamo, da gre najboljše antioksidativno delovanje pripisati fenolni OH-skupini vezani na aromatski heterocikel. Elektronska gostota je zaradi dušika z dodatnim elektronskim parom v heterociklu povečana, zato fenolna OH-skupina lažje odda proton radikalu. Slednje ne velja v primeru spojine **3**, ki ima v primerjavi z **2** na amidnem dušiku, namesto terciarnega amina, vezano metoksi skupino, in ima EC₅₀ večji za dva velikostna reda.

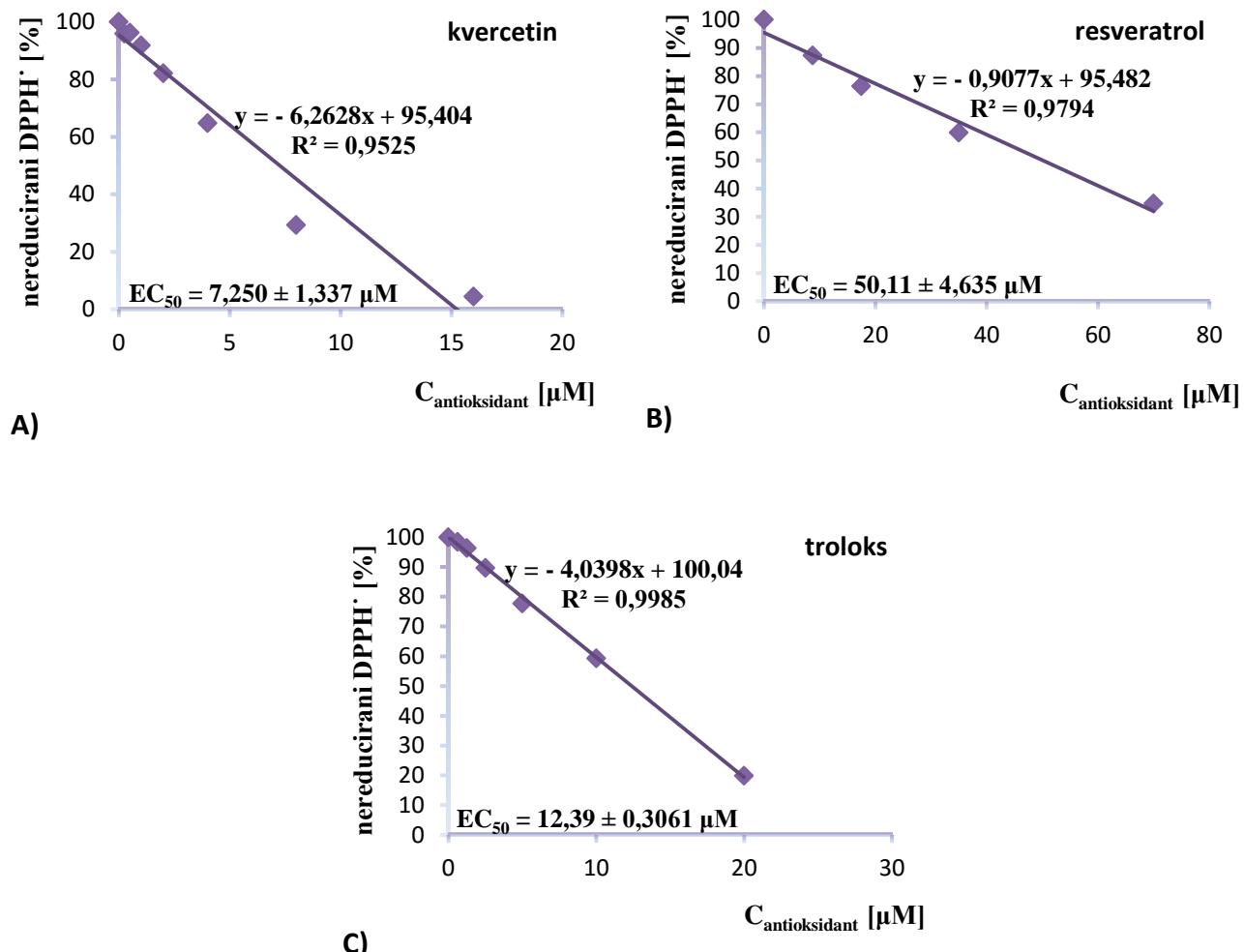
Izjema med najboljšimi antioksidanti je **8**, ki ne vsebuje heterocikla z OH-skupino, ampak ima na dušiku piperidina preko alkilne vezi (-CH₂-) vezan 2-[(pirid-2-il)amino]tiazol. Na drugi strani je spojina **7** z enakim fragmentom, vendar vezanim na amidno vez, med slabšimi antioksidanti. Glede na to, da je fragment v spojini **8** na spojino vezan preko alkilne vezi, ki je elektron donorska, amino skupina v fragmentu verjetno odda elektron. Nasprotno pa je v spojini **7** fragment vezan na δ⁺ karbonilni C-atom, ki privlači elektrone. Elektronska gostota na amino skupini se verjetno zato zmanjša in spojina preferenčno odda proton kot kislina in ne vodik.

Spojina **5** glede na DPPH test ne kaže antioksidativnih lastnosti. To je povsem razumljivo, saj tudi ne vsebuje elementa, ki bi lahko oddal vodikov atom, elektron ali ki bi vseboval dvojno vez, s katero bi lahko potekla radikalska reakcija.

4.2.2. DPPH test s standardi

4.2.2.1. Rezultati

DPPH test s standardi smo izvedli kot pozitivno kontrolo testu s testnimi spojinami. Rezultate smo prikazali na enak način kot pri DPPH testu s testnimi spojinami in na enak način izračunali vrednosti EC₅₀ (Slika 15). Test je potekal ob 70 μM začetni koncentraciji DPPH[•].



Slika 15: Grafi odvisnosti odstotka nereduciranega DPPH[•] od koncentracije spojine standarda za A) kvercetin, B) resveratrol in C) troloks in pripadajoče vrednosti EC₅₀.

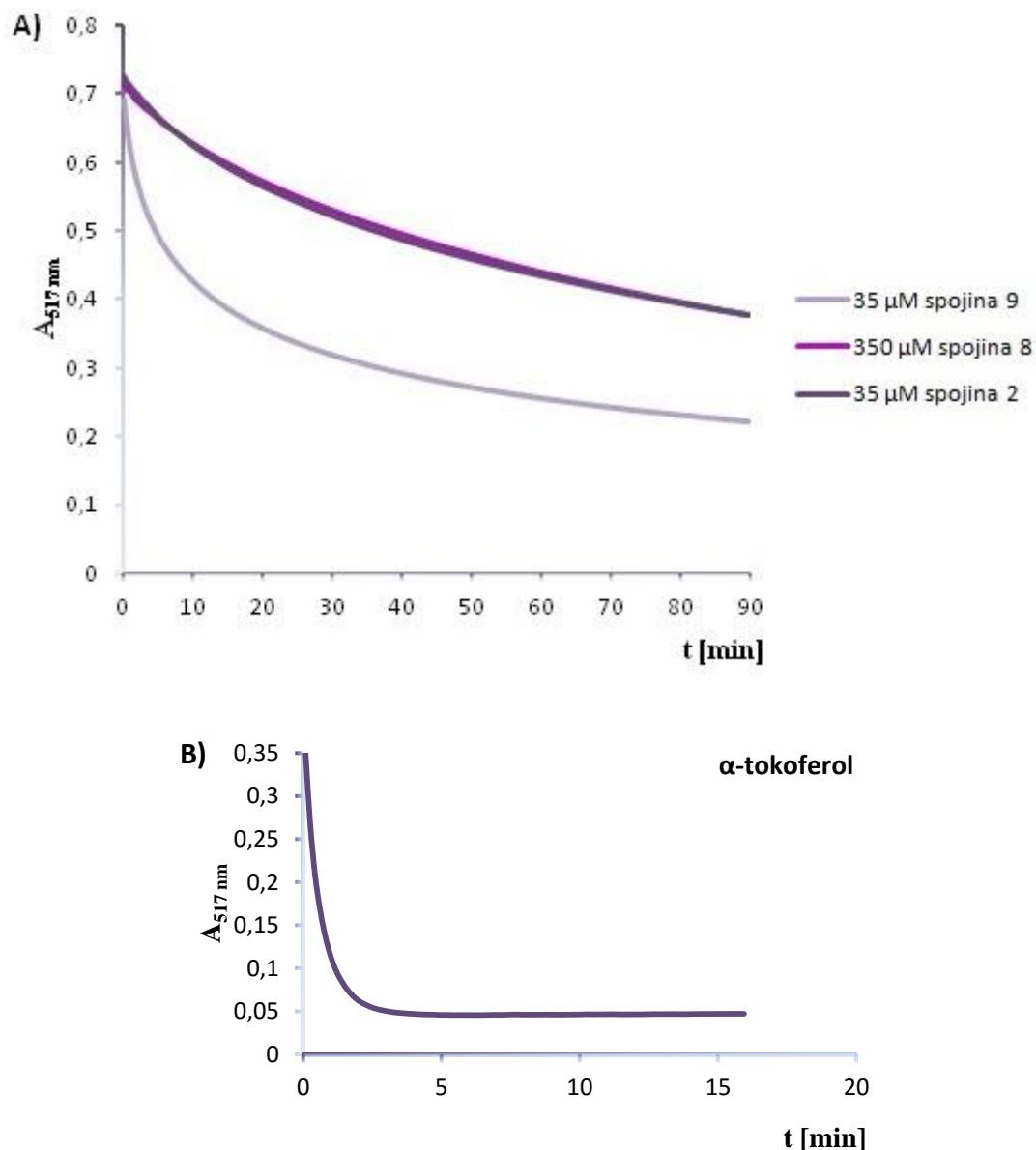
4.2.2.2. Razprava

Kvercetin, resveratrol in troloks so znani učinkoviti antioksidanti, zato smo z njimi izvedli DPPH test in potrdili primernost metode (reagentov, pogojev) za dokazovanje in vrednotenje antioksidativnih lastnosti testnih spojin. S primerjavo EC₅₀ vrednosti standardov in spojin, lahko naše spojine opredelimo kot dobre oz. slabe antioksidante. Naši najboljši reducenti DPPH[•] radikala imajo vrednosti enakega reda velikosti kot standarda resveratrol in troloks, zato jih lahko opredelimo kot dobre antioksidante.

4.2.3. Test kinetike redukcije DPPH[•]

4.2.3.1. Rezultati

Kinetiko redukcije DPPH[•] radikala, ob prisotnosti posameznega od treh najboljših antioksidantov iz Testa DPPH s testnimi spojinami, smo prikazali z grafi (Slika 16). Test je potekal pri 70 µM začetni koncentraciji DPPH[•]. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili test s 35 µM α-tokoferolom (Slika 16).



Slika 16: Kinetika redukcije DPPH[•] ob prisotnosti A) 9, 8 in 2 ter B) 35 µM standarda α-tokoferola.

4.2.3.2. Razprava

Krivulje spojin **2**, **8** in predvsem **9** kažejo sprva hitro, potem pa počasnejše padanje absorbance (Slika 16–A). Možni razlog za sprva večjo in v drugem delu manjšo hitrost redukcije DPPH[•], bi lahko bila reakcija DPPH[•] z dvema fragmentoma spojine. Reakcija s prvim fragmentom bi v tem primeru potekala hitreje kot reakcija z drugim oz. prvi fragment bi lažje oddal vodikov atom kot drugi. Glede na strukturo spojin, ki ne vsebuje drugega fragmenta s potencialnim antioksidativnim delovanjem (z izjemo vodikov v alkilnih vezeh ob skupinah z večjo elektronsko gostoto), je ta možnost malo verjetna. Druga možnost je, da se hitrost reakcije v drugem delu zmanjša zaradi zmanjšanja koncentracije neoksidirane oz. nezreagirane testne spojine. Poleg tega je v primeru **9** prisoten presežek DPPH[•], kar bi bil lahko razlog za bolj izrazito upočasnitev reakcije. Tudi pri spojni **2** je DPPH[•] v presežku, vendar je spojina nekoliko slabši antioksidant in že od začetka počasneje reagira, zato je upočasnitev manj izrazita. Standard α-tokoferol je učinkovit antioksidant in hitro reagira z DPPH[•], kar je razvidno iz hitrega padca absorbance, kratke upočasnitve reakcije zaradi pomanjkanja antioksidanta in platoja ob koncu reakcije oz. vzpostavitev ravnotežja med oksidiranim in reduciranim DPPH (Slika 16–B).

Glavni namen testiranja kinetike je bil potrditi ustreznost inkubacijskega časa oz. časa merjenja v DPPH testu s testnimi spojinami. Trajanje inkubacije je ustrezno, če v tem času reakcija doseže ravnovesje oz. plato (absorbanca je konstantna). V vseh primerih testiranih spojin je iz grafa A (Slika 16) razvidno, da v 90-tih minutah nismo dosegli platoja. Glede na naklon drugega dela krivulj, bi morali čas merjenja bistveno podaljšati. Če bi čas podaljšali npr. na 24 ur, bi v tem času izhlapela večja količina MeOH, zato bi se spremenila koncentracija DPPH[•] in izmerjene absorbance bi bile napačne. Poleg tega smo za določitev EC₅₀ potrebovali le nekaj več kot 50 % padec absorbance DPPH[•], ki pa smo ga v 90-tih minutah dosegli. Nasprotno smo čas merjenja absorbance pri α-tokoferolu skrajšali na 20 minut, saj se je absorbanca ustalila že po 5-tih minutah.

4.3. Kelacijski test in askorbatni test

4.3.1. Kelacijski test

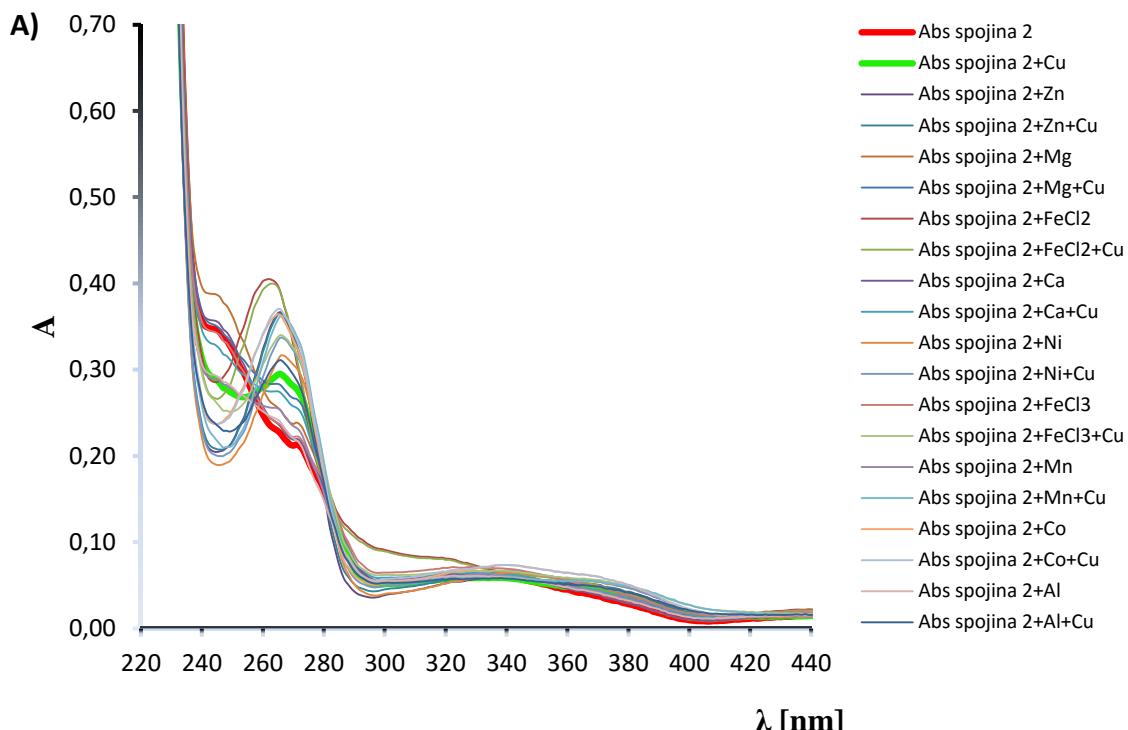
4.3.1.1. Test kelacije kovinskih ionov in selektivnosti za vezavo Cu²⁺ ionov

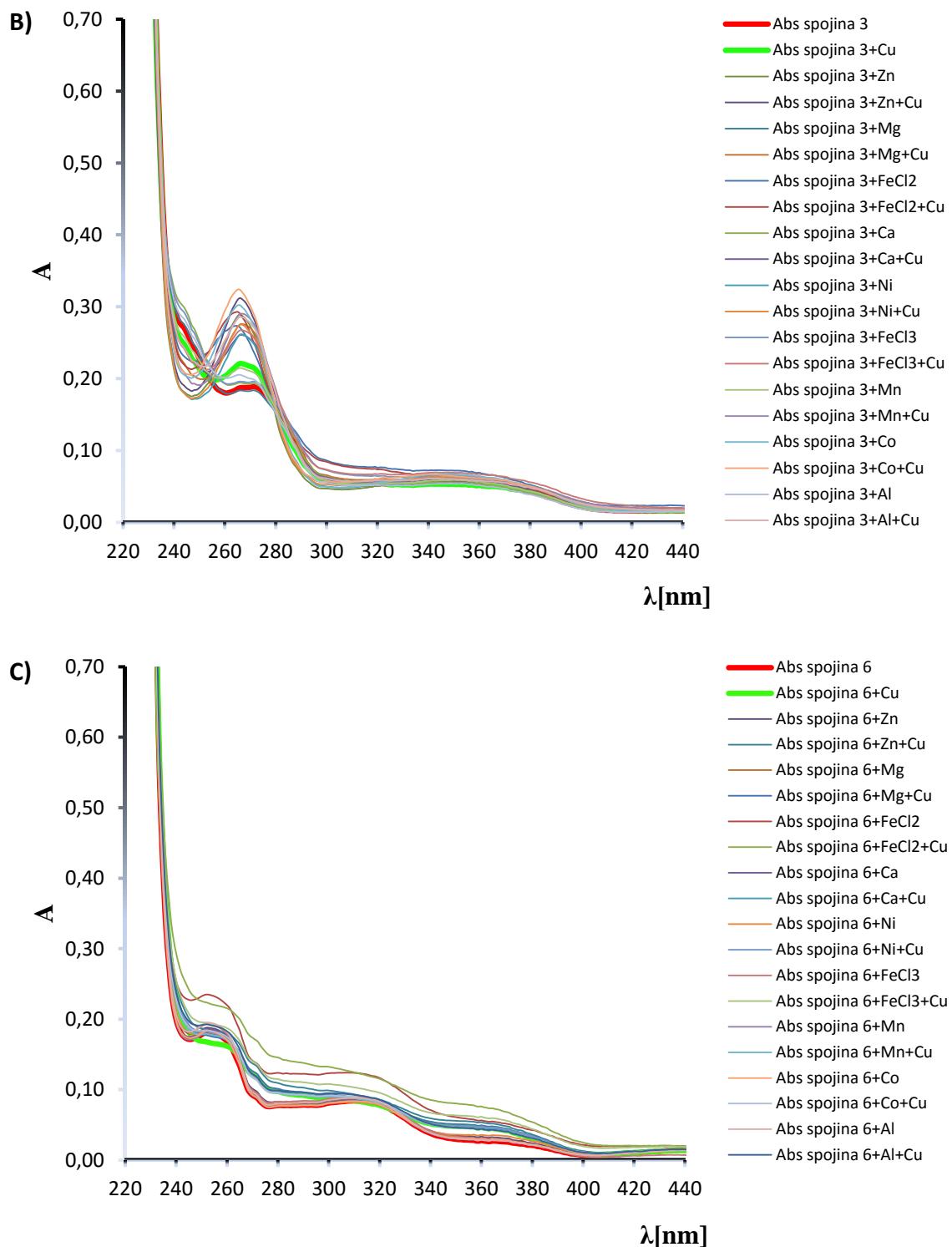
4.3.1.1.1. Rezultati

Test je potekal ob koncentracijskem razmerju testna spojina/Cu²⁺ ioni oz. kovinski ioni 1:1. Iz primerjave spektrov spojin samih, spojin ob dodatku posameznih kovinskih ionov in spojin s kovinskimi ioni in dodatkom Cu²⁺ ionov, smo določili najboljše kelatorje kovinskih ionov in njihovo selektivnost za vezavo Cu²⁺ ionov.

Najboljša kelatorja kovinskih ionov sta **2** in **3**, medtem ko **6** kompleksira izključno Cu²⁺ ione (Slika 18). Spojine **4**, **5**, **7**, **8** in **9** ne izkazujejo nikakršne sposobnosti kelacije. Spektra spojin **10** in **11** (glej Dodatek, Slika 20 in Slika 21) nakazujeta ramo ob dodatku Cu²⁺ ionov, vendar gre za izjemno majhne razlike v absorbanci, ki močno otežujejo določitev selektivnosti za vezavo Cu²⁺ ionov.

Najbolj selektivna za vezavo Cu²⁺ ionov je spojina **6**, ki tvori kompleks izključno z bakrovimi ioni. Kljub temu gre za manjše razlike v absorbanci. Spojina **2** kelira Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ in Al³⁺ ione, ob prisotnosti katerih je selektivna za vezavo Cu²⁺ samo napram Mn²⁺ in Al³⁺. **3** veže Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ in Co²⁺ ione. Od teh selektivnost za baker izkazuje samo ob prisotnosti Mn²⁺ ionov.





Slika 17: Odvisnost absorbance od valovne dolžine spojin **2** (spekter A), **3** (spekter B) in **6** (spekter C) samih in ob prisotnosti posameznih kovinskih ionov ter selektivnost za vezavo Cu²⁺ ionov.

4.3.1.1.2. Razprava

Kelacijo Cu²⁺ smo posredno ugotavljali tudi v askorbatnem testu, kjer smo kot najboljša kelatorja opredelili **2**, **3**, med boljše pa smo uvrstili tudi **6**. S testom selektivnosti vezave Cu²⁺ smo prišli do podobnega rezultata. V askorbatnem testu smo kelacijske lastnosti pripisali tudi spojinam, ki v testu kelacije niso pokazale sposobnosti vezave Cu²⁺ ionov. Te spojine so v askorbatnem testu verjetno na drugačen način preprečevale nastanek HO• radikala, npr. kot antioksidanti (tako bi lahko delovale vse razen spojine **7**).

Spojini **2** in **3**, poleg bakrovih ionov, vežeta tudi Fe²⁺ in Zn²⁺ ione, ki so prav tako udeleženi pri AB. V patofiziologijo AB so domnevno vpletene tudi Al³⁺ ioni, ki jih kelira spojina **2**. Kompleks s spojinama nastaja tudi z Ni²⁺, Mn²⁺ in Co²⁺ ioni, ki jim ne pripisujemo neposredne vloge v AB, ob njihovi prisotnosti pa spojine tudi niso selektivne za vezavo Cu²⁺ (razen v primeru Mn²⁺).

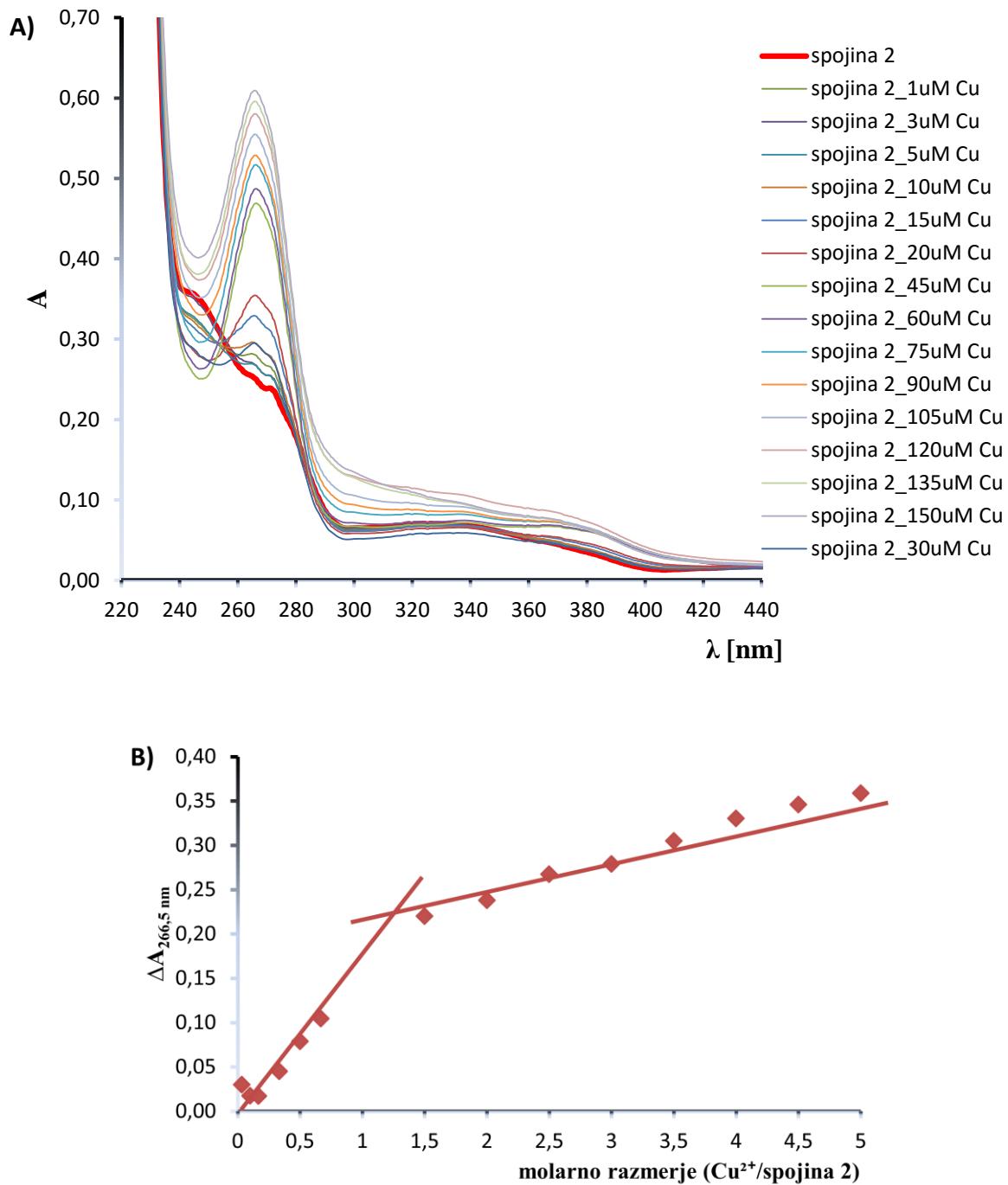
V primeru kompleksa z Mn²⁺ ioni, ob dodatku Cu²⁺ ionov spekter absorbance ne sledi spektru kompleksa s Cu²⁺ ioni. Absorbanca je pri maksimumu spojine nižja, pri maksimumu kompleksa pa višja, kar morda nakazuje na dodatno nastajanje kompleksa ob dodatku Cu²⁺ in ne na selektivnost.

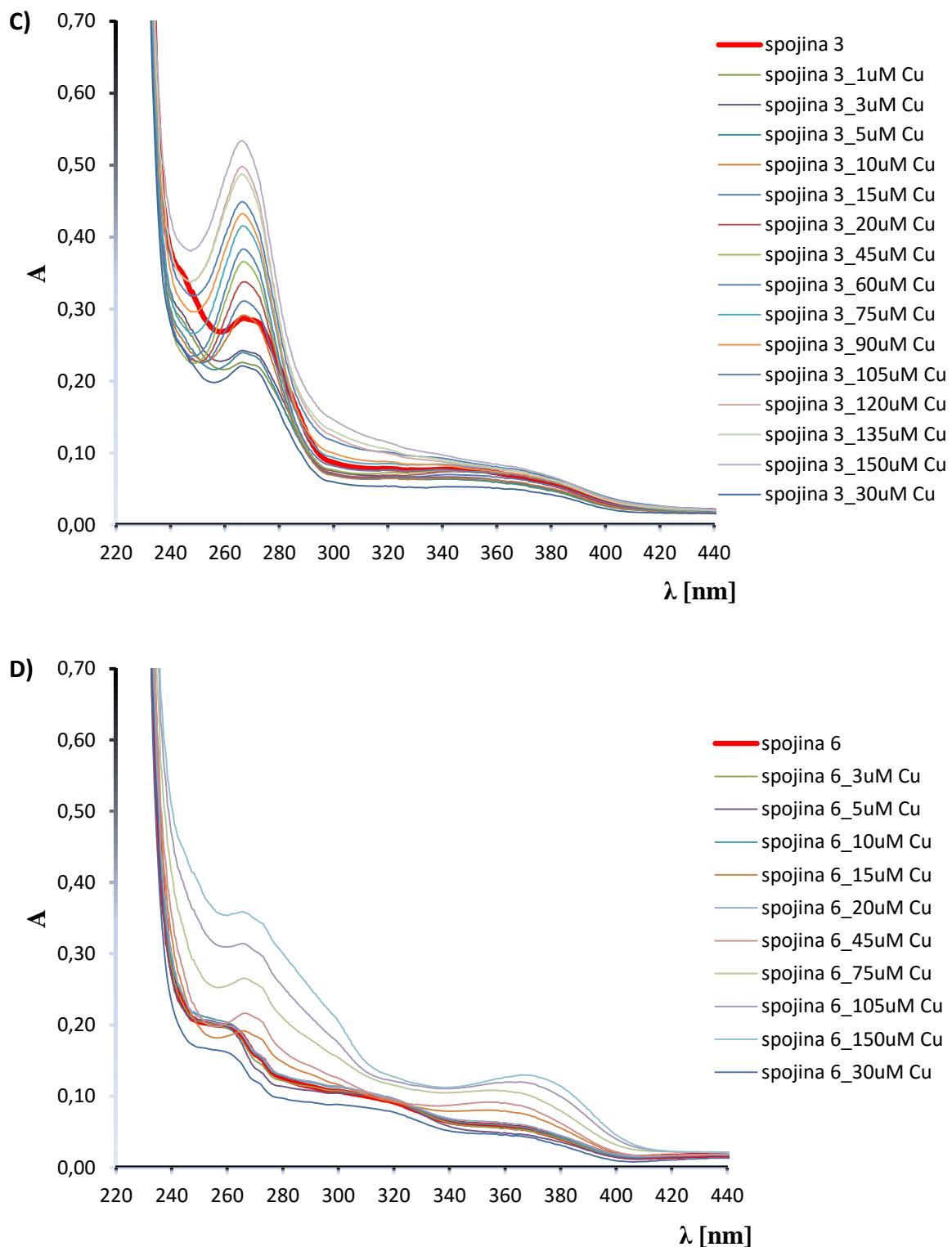
Nizka absorpcija kompleksa pri spojinah **10** in **11** je lahko posledica slabe absorpcije kompleksa pri dani valovni dolžini ali pa prenizke koncentracije le-tega. Vzrok premajhne koncentracije je lahko nestabilnost kompleksa ali pa prekratek predinkubacijski čas, v katerem ni prišlo do vzpostavitve ravnotežja.

4.3.1.2. Določanje stehiometrije vezave Cu²⁺ ionov

4.3.1.2.1. Rezultati

Stehiometrijo vezave spojine in Cu²⁺ ionov smo določevali spojinam **2**, **3**, **6**, **10** in **11**. Posneli smo absorpcijske spektre spojin ob prisotnosti različnih koncentracij Cu²⁺ ionov in narisali graf odvisnosti absorbance pri valovni dolžini maksimuma kompleksa od molarnega razmerja med Cu²⁺ ioni in posamezno spojino (Slika 19 in Dodatek, Slika 22 in Slika 23).





Slika 18: A) Graf odvisnosti absorbance spojine **2** in kompleksa Cu^{2+} -spojina od valovne dolžine, B) Graf odvisnosti absorbance pri $\lambda = 266,5 \text{ nm}$ od molarnega razmerja Cu^{2+} ioni/**2**, C) Graf odvisnosti absorbance **3** in kompleksa od valovne dolžine in D) Graf odvisnosti absorbance **6** in kompleksa od valovne dolžine.

Iz grafa B) (Slika 19) je razvidno, da se spojina **2** s Cu^{2+} ioni veže v razmerju 1:1. Razmerje smo odčitali na x-osi v točki preloma, ki jo določata začetni linearni del in linearni del po vzpostavitev ravnotežja med nastajanjem in razpadanjem kompleksa.

Spojini **3** se ob prisotnosti 1 μM , 3 μM , 5 μM in 30 μM Cu^{2+} absorbanca v celotnem območju meritve zmanjša. Spekter spojine ima ramo pri 245 nm in vrh pri 267,9 nm. Ob prisotnosti koncentracij Cu^{2+} enakih in višjih od 60 μM , absorbanca pri 267,9 nm narašča, vendar se razlika v absorbanci pri valovni dolžini rame zmanjšuje. Pričakovani padec absorbance pri rami in naraščanje le-te pri 267,9 nm lahko opazimo samo ob prisotnosti 10 μM , 15 μM , 20 μM in 45 μM Cu^{2+} ionov, kar pa je premalo za zanesljivo določitev stehiometrije vezave za kompleks, ki nastaja pri teh koncentracijah (graf C, Slika 19).

6 daje podobne rezultate (graf D, Slika 19). Ob 30 μM Cu^{2+} se spojini absorbanca zmanjša na celotnem območju merjenja. Pri koncentracijah Cu^{2+} 15 μM , 45 μM in višjih, absorbanca narašča ob valovni dolžini rame spojine in pri 370 nm. Tudi v tem primeru stehiometrije vezave ni bilo mogoče določiti.

Spojini **10** absorbanca pri koncentracijah Cu^{2+} od 1 μM do 45 μM pri valovni dolžini maksimuma spojine pada in pri drugi valovni dolžini narašča. Pri koncentracijah višjih od 60 μM pa se absorbanca pri maksimumu sicer zmanjša, in pri drugi valovni dolžini narašča, vendar se z večanjem koncentracije Cu^{2+} razlika pri maksimumu zmanjšuje. Podobno se obnaša tudi spojina **11**. Spojini se od 45 μM Cu^{2+} spremeni spekter, levo in desno od valovne dolžine maksimuma absorbanca z večanjem koncentracije iona narašča. Pri obeh spojinah imamo tako na voljo premalo izrazite spremembe absorbančnega spektra za določitev stehiometrije.

4.3.1.2.2. Razprava

Stehiometrija vezave Cu^{2+} in **2** je bila, glede na trodimenzionalno kemijsko strukturo pričakovana. Cu^{2+} verjetno tvori koordinacijski vezi s karbonilnim kisikom (dva nevezna elektronska para) in fenolno OH-skupino (disociira in ostane negativni naboj na kisiku). V testu pa nam ni uspelo doseči platoja, kar smo kasneje poskušali pri spojini **10** z dodatnima višjima koncentracijama. Dejstvo, da nismo dosegli platoja nakazuje na šibkost oz. nestabilnost kompleksa (38).

Pri spojinah **3** in **6** ob manjših koncentracijah bakrovih ionov pade absorbanca v celotnem območju posnetega spektra. Spojina verjetno kompleksira Cu^{2+} , kompleksa pa ne moremo zaznati v območju merjenja.

Spojini mogoče tvorita različne komplekse, odvisno od koncentracije Cu^{2+} ionov, ki imajo lahko dva absorpcijska maksimuma, ki se lahko pojavita pri isti valovni dolžini kot absorpcijska vrhova spojine. To bi pojasnilo tudi spektre spojin ob prisotnosti višjih koncentracij Cu^{2+} ionov.

Pri spojinah **3**, **6**, **10** in **11**, v odvisnosti od koncentracije prisotnih Cu^{2+} ionov, nastajajo različni kompleksi, kar oteže enoznačno določanje stehiometrije vezave. Stehiometrijo bi lahko določili za posamezen kompleks, vendar bi za to potrebovali večje število koncentracij bakra v območjih kompleksov, ki nastanejo pri nizkih in srednjih koncentracijah Cu^{2+} .

4.3.2. Askorbatni test

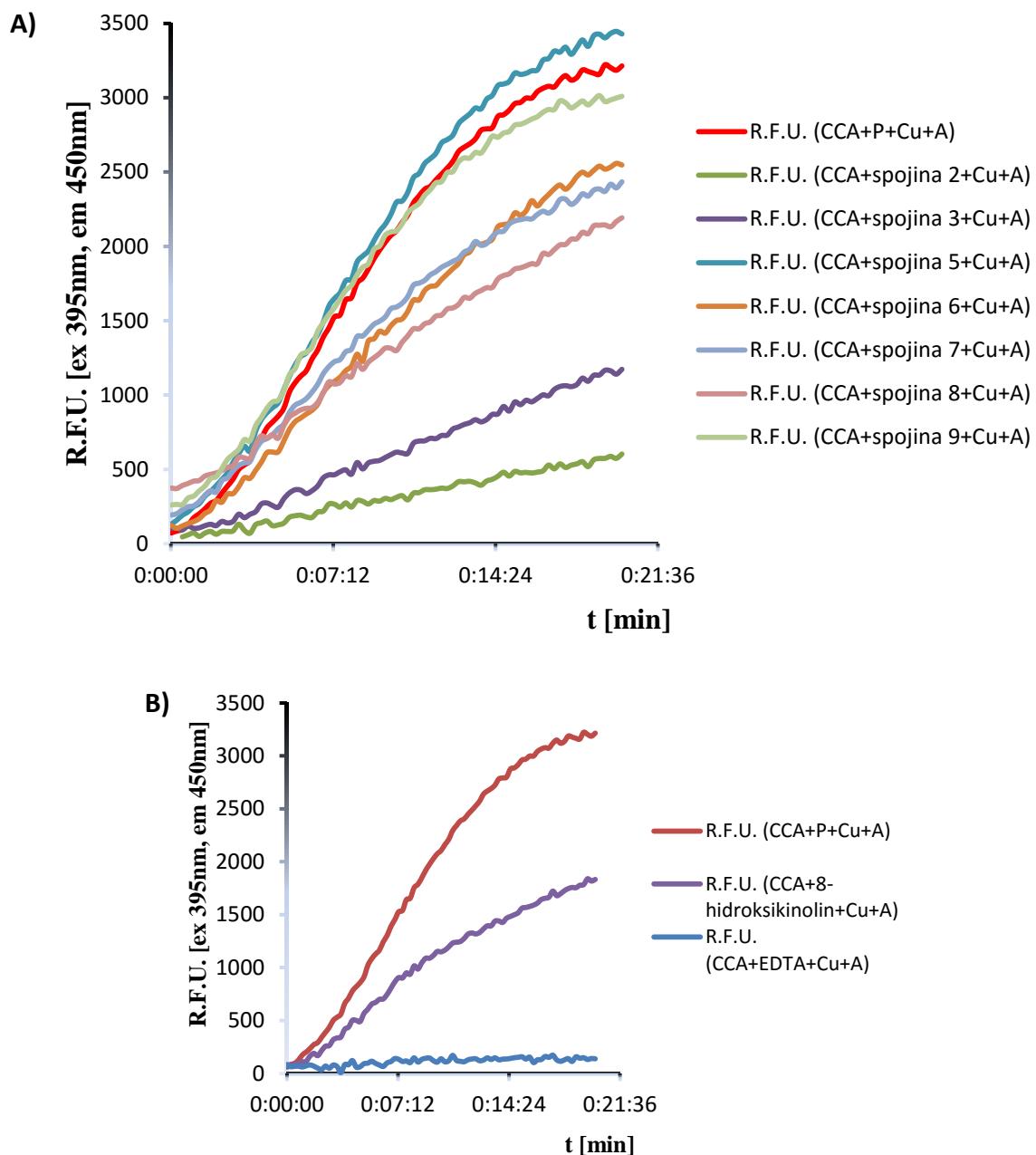
4.3.2.1. Rezultati presejalnih testov

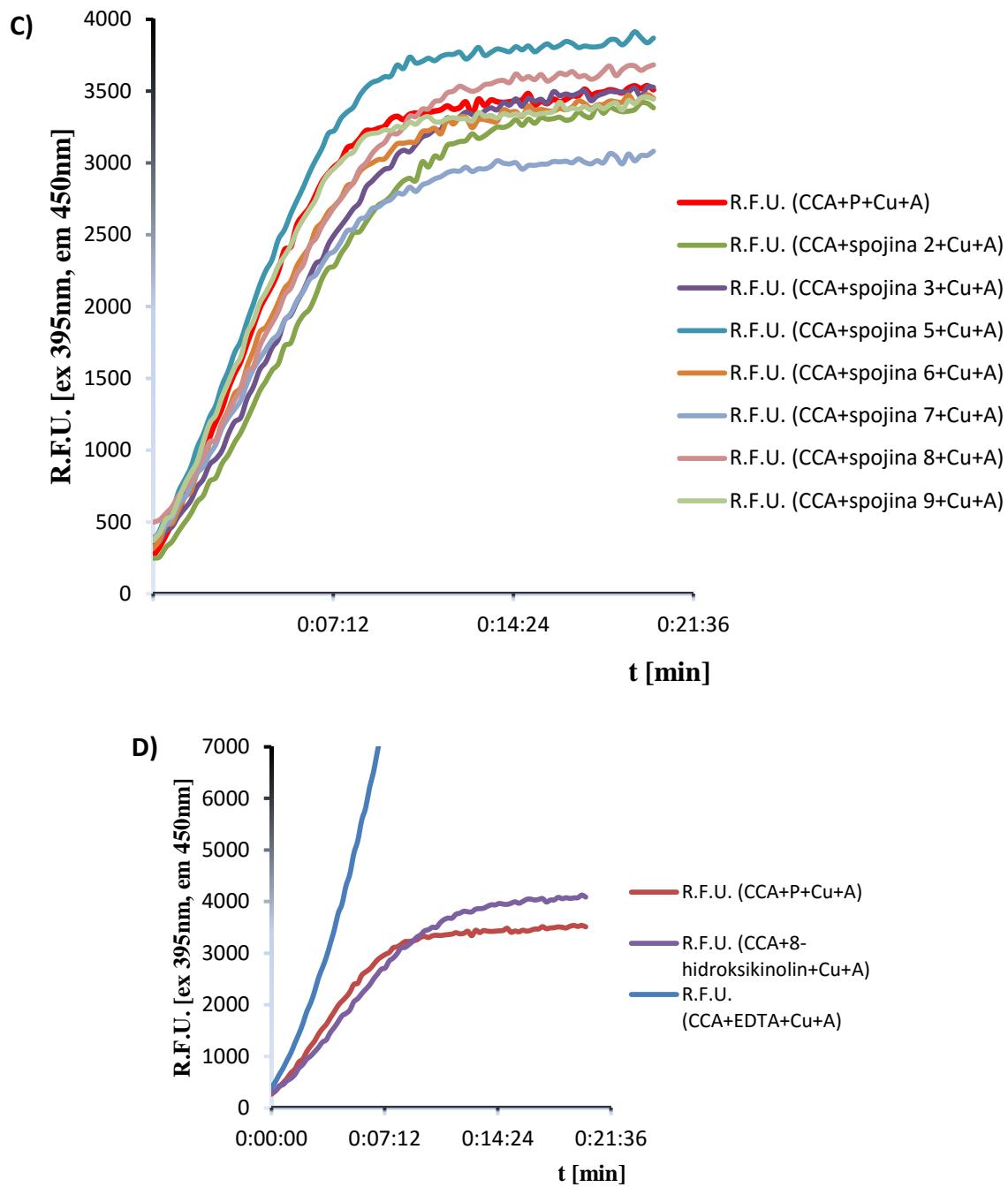
Pri pripravljanju 40 mM raztopin testnih spojin v MeOH in redčenju le-teh v fosfatnem pufru smo opazili, da se nekatere spojine ne raztapljajo oz. se ob dodatku pufra izoborijo (**3**, **6**, **7**, **8**, **10** in **11**, pri kateri smo oborino opazili šele po mesecu hranjenja v hladilniku). Zato smo pripravili še 10 mM osnovne raztopine vseh spojin v MeOH in jih s pufrom redčili do 1 mM osnovnih raztopin. Zmanjšali smo tudi koncentracijo Cu^{2+} ionov tako, da smo ohranili razmerje med testno spojino in Cu^{2+} ioni v presejalnem testu (2:1 in 1:1).

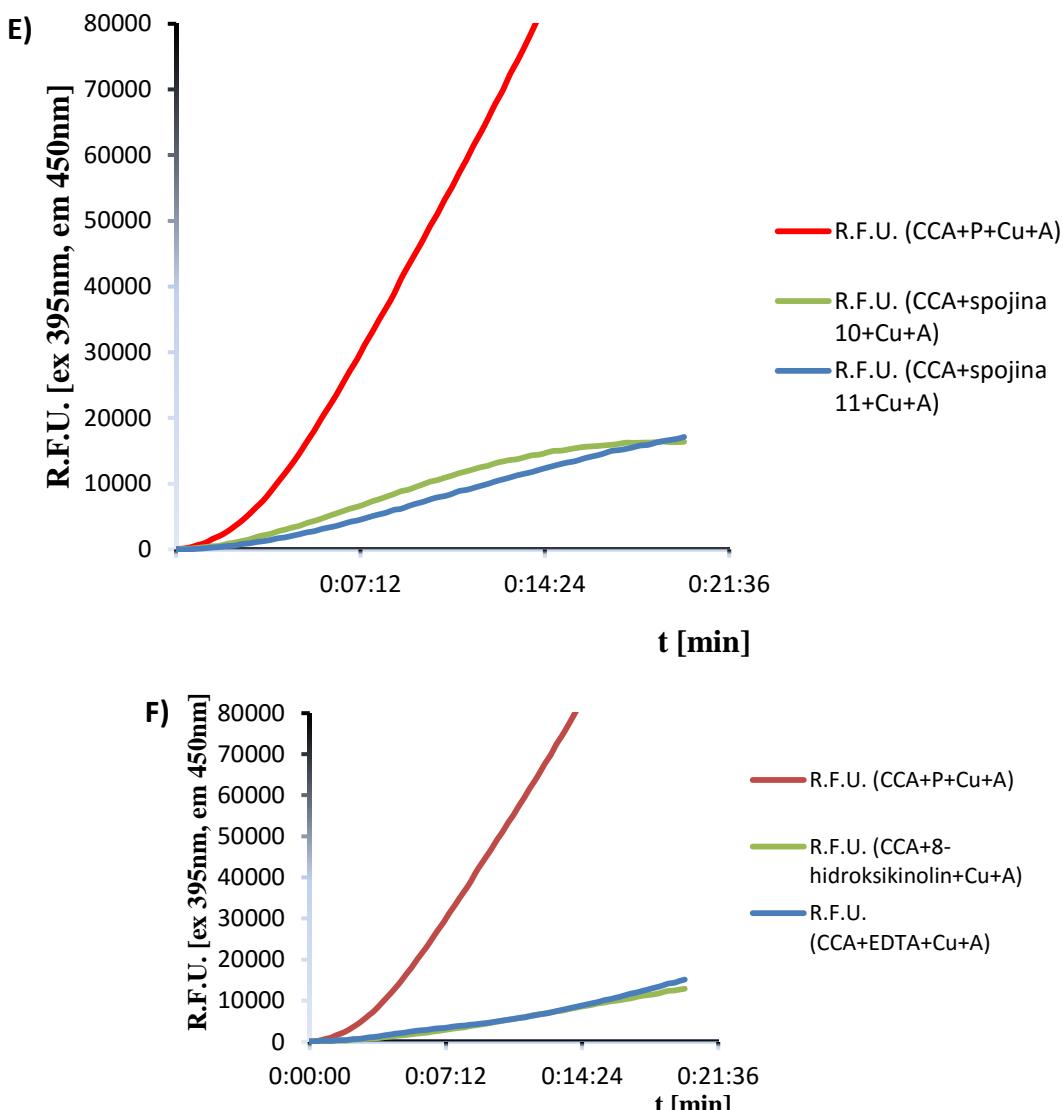
4.3.2.2. Končni rezultati

Iz izmerjenih intenzitet fluorescence smo izračunali povprečje paralel, odšteli vrednost negativne kontrole in narisali graf spreminjaanja intenzitete fluorescence 7-hidroksi-CCA v odvisnosti od časa (Slika 17). Rezultate smo ovrednotili kvalitativno s primerjavo krivulje fluorescence Cu^{2+} - askorbatnega sistema ob prisotnosti posamezne testne spojine s krivuljo Cu^{2+} - askorbatnega sistema samega.

Koncentracijsko razmerje med spojino in Cu^{2+} ioni v reakcijski mešanici je bilo 2:1 in 1:1. Slika 5 prikazuje rezultate testa z 1 mM izhodnimi testnimi spojinami, ker je bila topnost spojin pri nižji koncentraciji boljša kot pri 4 mM (**6** se je še vednoobarjala, ostale spojine so se raztopile). Za vse spojine smo izvedli test ob prisotnosti 600 μM Cu^{2+} ionov. Testa ob prisotnosti 300 μM Cu^{2+} ionov nismo izvedli s spojinama **10** in **11**.







Slika 19: Spreminjanje fluorescence s časom ob prisotnosti testne spojine in Cu^{2+} ionov v razmerju 2:1 A) in sprememjanje fluorescence pripadajočih pozitivnih kontrol B). Spremenjanje fluorescence s časom ob prisotnosti testne spojine in Cu^{2+} ionov v razmerju 1:1 C) in sprememjanje fluorescence pripadajočih pozitivnih kontrol D). Spremenjanje fluorescence s časom ob prisotnosti testnih spojin **10** in **11** in Cu^{2+} ionov v razmerju 1:1 E) in pripadajoče pozitivne kontrole F).

P = pufer, A = askorbat

Rezultati **10** in **11** so zaradi večje preglednosti prikazani ločeno, ker smo test s spojinama izvajali posebej in so bili odzivi meritev fluorescence Cu^{2+} - askorbatnega sistema samega in negativne kontrole pomembno višji kot v predhodnih testih. Pri merjenju fluorescence

čitalec omogoča ojačanje signala, kar je najverjetnejši razlog povišanih odzivov pri naših spojinah.

4.3.2.3. Razprava

Askorbatni test smo izvedli ob koncentracijskem razmerju med spojino in Cu²⁺ ioni 1:1 in 2:1, ker smo glede na kemijsko strukturo predvidevali stehiometrijo vezave 2:1. Koncentracija askorbata v poskusih je bila 300 µM, s čimer je ustrezala fiziološkim pogojem zunajcelične tekočine v možganih (33). Z znižanjem koncentracije Cu²⁺ ionov (zaradi ohranitve razmerja) s 40 µM oz. 20 µM na 10 µM oz. 5 µM, nismo bistveno vplivali na relevantnost rezultatov za AB. Plaki Aβ namreč vsebujejo približno 400 µM koncentracijo Cu²⁺ ionov (39).

S primerjavo intenzitete fluorescence Cu²⁺ - askorbatnega sistema samega in ob prisotnosti posamezne spojine, smo ugotavljali katere spojine v kompleksu z bakrom preprečijo njegovo redoks aktivnost. Za ostale spojine obstaja možnost, da ne tvorijo kompleksa z bakrom ali pa kljub kelaciji iona ne preprečijo njegove redoks aktivnosti.

Fluorescenco pri 5 µM Cu²⁺ (razmerje med spojino in Cu²⁺ je 2:1) najbolj znižata **2** in **3**, sledijo jima **8**, **7** in **6**. Ob prisotnosti 10 µM Cu²⁺ (razmerje med spojino in Cu²⁺ je 1:1) so rezultati drugačni. Fluorescenco najbolj zniža **7**, ostale spojine signala ne znižajo bistveno ali pa ga celo zvišajo. Ker smo pri tem testu dobili nepričakovane rezultate za pozitivni kontroli (obe intenziteti sta bili mnogo višji kot intenziteta signala Cu²⁺ - askorbatnega sistema samega), smo test ponovili. Ponovitev je dala podobne rezultate za pozitivni kontroli in drugačne za spojine. Signal je najbolj znižala spojina **3**, sledila je spojina **2**.

Večjo intenziteto signala ob prisotnosti 10 µM Cu²⁺ ionov, v primerjavi s 5 µM, smo izmerili zaradi presežka ionov glede na njihovo stehiometrijo vezave s spojinami. To pa ne pojasni drugačnega vrstnega reda najboljših kelatorjev in višje intenzitete pozitivne kontrole EDTA. EDTA se namreč z vsemi kovinskimi ioni veže v razmerju 1:1, 8-hidroksikinolin pa, tako kot smo predvidevali za nekatere naše spojine, 2:1. Presežek Cu²⁺ ionov, zaradi nestabilnosti kompleksov, morda moti ponovljivost testa.

Krivilji spojin **10** in **11** sta prikazani ločeno, ker so vsi odzivi, tudi za negativno kontollo in Cu²⁺-askorbatni sistem sam, desetkrat višji kot pri ostalih spojinah. Spojini pa sta se izkazali kot učinkovita kelatorja bakra.

Glede na strukturo testiranih spojin, bi lahko sklepali, da je nosilec kelacije 8-hidroksikinolinski fragment, kar smo potrdili s testom s 5 µM Cu²⁺ ioni in s testom z **10** in

11. in na kar, kljub slabi ponovljivosti, nakazuje test z $10 \mu\text{M}$ Cu^{2+} ioni s preostalimi spojinami s tem fragmentom. Za opredelitev kelacijskih lastnosti ostalih fragmentov (npr. 2-[(pirid-2-il)amino]tiazola) bi bilo potrebno test ponoviti. Ker nekatere spojine izkazujejo antioksidativne lastnosti, bi lahko padec fluorescence pripisali tudi reakciji s hidroksilnim radikalom (npr. pri **8**).

4.4. Tioflavin T fluorimetrični test

4.4.1. Rezultati

Iz grafov odvisnosti intenzitete fluorescence od časa je bilo razvidno, da se intenziteta pozitivne kontrole (spojine, katere antiagregacijska sposobnost je že bila potrjena), v primerjavi z intenzitetom $\text{A}\beta$ in ThT brez zaviralca agregacije, ne spremeni. Pogoji v metodi so bili torej neprimerni za določanje antiagregacijskih lastnosti spojin.

4.4.2. Razprava

Neustrezen dejavnik v testu je bil verjetno nabavljen $\text{A}\beta$ peptid, ki ni agregiral in vezal ThT. Fluoresanca barvila ni narasla, ob prisotnosti spojine z antiagregacijskimi lastnostmi pa tudi ni padla. Test bi bilo zato potrebno ponoviti na sveže dobavljenem in pripravljenem $\text{A}\beta$.

5. Sklep

V okviru magistrske naloge smo ovrednotili deset 1,3-substituiranih piperidinov. Najbolj uravnoteženo delovanje proti AB je pokazala spojina **2**, ki je z IC₅₀ vrednostjo 13,81 nM med najboljšimi zavirci huBChE. Z EC₅₀ 61,35 μM v DPPH testu jo uvrščamo tudi med najboljše antioksidante in je primerljiva z znanimi antioksidanti. Askorbatni test je pokazal, da zavira tudi nastajanje HO[•]. Slednje lahko pripišemo kelacijskim lastnostim in sklepamo, da Cu²⁺ v kompleksu s spojino ni redoks aktivен. Spojina **2** s Cu²⁺ ioni tvori samo točno definiran kompleks, kjer je razmerje med Cu²⁺ in spojino 1:1. Spojina ni selektivna za vezavo Cu²⁺ ionov, vendar med drugimi veže tudi Fe²⁺, Zn²⁺ in Al³⁺ ione, ki pa so prav tako udeleženi v AB.

Tudi nekaj drugih spojin nakazuje učinkovito multiplo delovanje, vendar bi morali za njihovo natančnejšo in boljšo okarakterizacijo ponoviti askorbatni test z optimiziranimi eksperimentalnimi pogoji. Dodatne informacije o multifunkcionalnosti teh spojin bi podal tudi optimiziran Tioflavin T fluorimetrični test.

Za opredelitev lastnosti zavircov huBuChE z multiplim delovanjem proti AB smo v primerjavi s predhodnimi raziskavami podobnih spojin (20, 22), vpeljali dodatno metodo – askorbatni test. S tem testom smo ugotavljali ali spojina kelira Cu²⁺ ione in ali v kompleksu preprečuje njegovo redoks aktivnost ter nastajanje HO[•] radikala.

Metoda z askorbatom torej pomembno dopolnjuje test kelacije, v katerem izvemo zgolj katere kovinske ione spojina veže. To je sicer pomembno zaradi patoloških koncentracij kovinskih ionov pri AB, vendar ne izvemo ničesar o delovanju kompleksa npr. ali smo s kelacijo preprečili redoks aktivnost vezanih kovin.

6. Literatura

- (1) Dementia: Fact sheet [online]. **2016**. World Health Organization. [Dostopano: 14. apr. 2016]. Dostopno na spletnem naslovu: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>>
- (2) Alzheimer's Disease [online]. **2015**. Alzheimer Europe. [Dostopano: 16. apr. 2016]. Dostopno na spletnem naslovu: <[http://www.alzheimer-europe.org/Dementia/Alzheimer-s-disease/\(language\)/eng-GB](http://www.alzheimer-europe.org/Dementia/Alzheimer-s-disease/(language)/eng-GB)>
- (3) 2016 Alzheimer's disease facts and figures: Prevalence [online]. **2016**. Alzheimer's association. [Dostopano: 16. apr. 2016]. Dostopno na spletnem naslovu: <http://www.alz.org/facts/overview.asp>
- (4) Temelji patološke fiziologije, 2., Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, **2011**; 294–297.
- (5) Kasper P. Kepp: Bioinorganic Chemistry of Alzheimer's Disease. *Chemical Reviews* **2012**; 112 (10): 5193–5239.
- (6) Eliezer Masliah and David P. Salmon: When Cognitive Decline Becomes Pathology: From Normal Aging to Alzheimer's Disease. *Genes, Environment and Alzheimer's Disease* **2016**; 29–50.
- (7) M. Carmo Carreiras, Eduarda Mendes, M. Jesus Perry, Ana Paula Francisco and J. Marco-Contelles: The Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease for Developing Potential Therapeutics. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2013**; 13: 1745–1770.
- (8) Henry W. Querfurth, M. D., Ph. D., and Frank M. LaFerla, Ph. D.: Mechanisms of Disease: Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine* **2010**; 362: 329–344.
- (9) Natalia Guzior, Anna Więckowska, Dawid Panek and Barbara Malawska: Recent Developement of Multifunctional Agents as Potential Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Medicinal Chemistry* **2015**; 22: 373–404.
- (10) Masha G. Savelieff, Sanghyun Lee, Yuzhong Liu and Mi Hee Lim: Untangling Amyloid- β , Tau, and Metals in Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Biology* **2013**; 8: 856–865.
- (11) Marcus O. W. Grimm, Heike S. Grimm, Inge Tomic, Konrad Beyreuter, Tobias Hartmann and Christine Bergmann: Independent Inhibition of Alzheimer

- Disease β - and γ -Secretase Cleavage by Lowered Cholesterol Levels. *The Journal of Biological Chemistry* **2008**; *283*: 11302–11311.
- (12) D. Allan Butterfield: Amyloid Beta-peptide (1–42)-induced Oxidative Stress and Neurotoxicity: Implications for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Brain. A review. *Free Radical Research* **2002**; *36* (12): 1307–1313.
- (13) Christian Schöneich, Dariusz Pogocki, Gordon L. Hug and Krzysztof Bobrowski: Free Radical Reactions of Methionine in Peptides: Mechanisms Relevant to Beta-amyloid Oxidation and Alzheimer's disease. *Journal of the American Chemical Society* **2003**; *125* (45): 13700–13713.
- (14) Sridhar Varadarajan, Servet Yatin, Marina Aksanova, D. Allan Butterfield: Review: Alzheimer's Amyloid Beta-peptide-associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Journal of Structural Biology* **2000**; *130* (2-3): 184–208.
- (15) Jan Korabecny, Filip Zemek, Ondrej Soukup, Katarina Spilovska, Kamil Musilek, Daniel Jun, Eugenie Nepovimova and Kamil Kuca: Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease: Current State and Future Perspectives. *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease* **2014**; 3–39.
- (16) Vageesh Revadigar, Raza Murad Ghalib, Vikneswaran Murugaiyah, Mohamed A. Embaby, Ali Jawad, Sayed Hasan Mehdi, Rokiah Hashim and Othman Sulaiman: Enzyme Inhibitors Involved in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease* **2014**; 142–198.
- (17) Werner J Galdenhuys & Altaf S Darvesh: Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current and future trends. *Expert Review of Neurotherapeutics* **2015**; *1*: 3–5.
- (18) Qiutian Jia, Yulin Deng and Hong Qing: Potential Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease targeting od Beyond β -Amyloid: Insights from Clinical Trials. *BioMed Research International* **2014**; *2014*: 22 pages.
- (19) Lawrence m. Sayre, George Perry, Peggy L. R. Harris, Yahua Liu, Kathryn A. Schubert and Mark A. Smith: In Situ Oxidative Catalysis by Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in Alzheimer's Disease: A Central Role for Bound Transition Metals. *Journal of Neurochemistry* **2000**; *74*: 270–279.
- (20) Damijan Knez, Boris Brus, Nicolas Coquelle, Izidor Sosič, Roman Šink, Xavier Brazzoloto, Janez Mravljak, Jacques-Philippe Colletier, Stanislav Gobec: Structure-based Development of Nitroxoline Derivatives as Potential

- Multifunctional anti-Alzheimer Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**; *23*: 4442–4452.
- (21) W. J. Geldenhuys and C. J. Van der Schyf: Rationally Designed Multi-Targeted Agents Against Neurodegenerative Diseases. *Current Medicinal Chemistry* **2013**; *20*: 1662–1672.
- (22) Boris Brus, Urban Košak, Samo Turk, Anja Pišlar, Nicolas Coquelle, Janko Kos, Jure Stojan, Jacques-Philippe Colletier and Stanislav Gobec: Discovery, Biological Evaluation, and Crystal Structure od a Novel Nanomolar Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**; *57*: 8167–8179.
- (23) Nigel H. Greig, Debomoy K. Lahiri and Kumar Sambamurti: Butyrylcholinesterase: An Important New Target in Alzheimer's Disease Therapy. *International Psychogeriatrics* **2002**; *14*: 77–91.
- (24) Ian R. Macdonald, Earl Martin, Terrone L. Rosenberry and Sultan Darvesh: Probing the Peripheral Site of Human Butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **2012**; *51*: 7046–7053.
- (25) Izidor Sosič, Bojana Mirković, Katharina Arenz, Bogdan Štefane, Janko Kos and Stanislav Gobec: Development of New Cathepsin B Inhibitors: Combining Bioisosteric Replacements and Structure-Based Design To Explore the Structure–Activity Relationships of Nitroxoline Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**; *56* (2): 521–533.
- (26) Florian Nachon, Laurence Ehret-Sabatier, Damarys Loew, Christophe Colas, Alain van Dorsselaer, and Maurice Goeldner: Trp82 and Tyr332 Are Involved in Two Quaternary Ammonium Binding Domains of Human Butyrylcholinesterase as Revealed by Photoaffinity Labeling with [³H]DDF. *Biochemistry* **1998**; *37*: 10507–10513.
- (27) Franz Worek, Peter Eyer and Horst Thiermann: Determination of Acetylcholinesterase Activity by the Ellman Assay: A Versatile Tool for *in vitro* Research on Medical Countermeasures Against Organophosphate Poisoning. *Drug Testing and Analysis* **2012**; *4*: 282–291.
- (28) Yolanda Carmona-Jiménez, M. Valme García-Moreno, Jose M. Igartuburu, Carmelo Garcia Barroso: Analytical Methods: Simplification of the DPPH Assay

- for Estimating the Antioxidant Activity of Wine and Wine By-products. *Food Chemistry* **2014**; *165*: 198–204.
- (29) Krystyna Pyrzynska and Anna Pękal: Application of Free Radical Diphenylicrylyhydrazyl (DPPH) to Estimate the Antioxidant Capacity of Food Samples. *Analytical Methods* **2013**; *5*: 4288–4295.
- (30) Jie Geng, Meng Li, Li Wu, Jinsong Ren and Xiaogang Qu: Liberation of Copper from Amyloid Plaques: Making a Risk Factor Useful for Alzheimer's Disease Treatment. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**; *55*: 9146–9155.
- (31) Fei Mao, Jun Yan, Jianheng Li, Xian Jia, Hui Miao, Yang Sun, Ling Huang and Xingshu Li: New Multi-target-directed Small Molecules Against Alzheimer's Disease: a Combination of Resveratrol and Clioquinol. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**; *12*: 5936–5944.
- (32) Kimberly M. Lincoln, Timothy E. Richardson, Lauren Rutter, Paulina Gonzalez, James W. Simpkins and Kayla N. Green: An N-Heterocyclic Amine Chelate Capable of Antioxidant Capacity and Amyloid Disaggregation. *ACS Chemical Neuroscience* **2012**; *3*: 919–927.
- (33) Luc Guilloréau, Sarah Combalbert, Alix Sournia-Saquet, Honoré Mazarguil and Peter Faller: Redox Chemistry of Copper-Amyloid- β : The Generation of Hydroxyl Radical in the Presence of Ascorbate is Linked to Redox-Potentials and Aggregation State. *ChemBioChem* **2007**; *8*: 1317–1325.
- (34) Bahador Karami, Mahnaz Farahi and Saeed Khodabakhshi: Rapid Synthesis of Novel and Known Coumarin-3-carboxylic Acids Using Stannous Chloride Dihydrate under Solvent-Free Conditions. *Helvetica Chimica Acta* **2012**; *95*: 455–460.
- (35) Carolina Sanmartín-Suárez, Ramón Soto-Otero, Inés Sánchez-Sellero and Estefanía Méndez-Álvarez: Antioxidant Properties of Dimethyl Sulfoxide and its Viability as a Solvent in the Evaluation of Neuroprotective Antioxidant. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2011**; *63*: 209–215.
- (36) Harry LeVine: Thioflavine T Interaction With Synthetic Alzheimer's Disease β -amyloid Peptides: Detection of Amyloid Aggregation in Solution. *Protein Science* **1993**; *2*: 404–410.
- (37) Chester A. Mathis, Brian J. Bacska, Stephen T. Kajdasz, Megan E. McLellan, Matthew P. Frosch, Bradley T. Hyman, Daniel P. Holt, Yanming Wang,

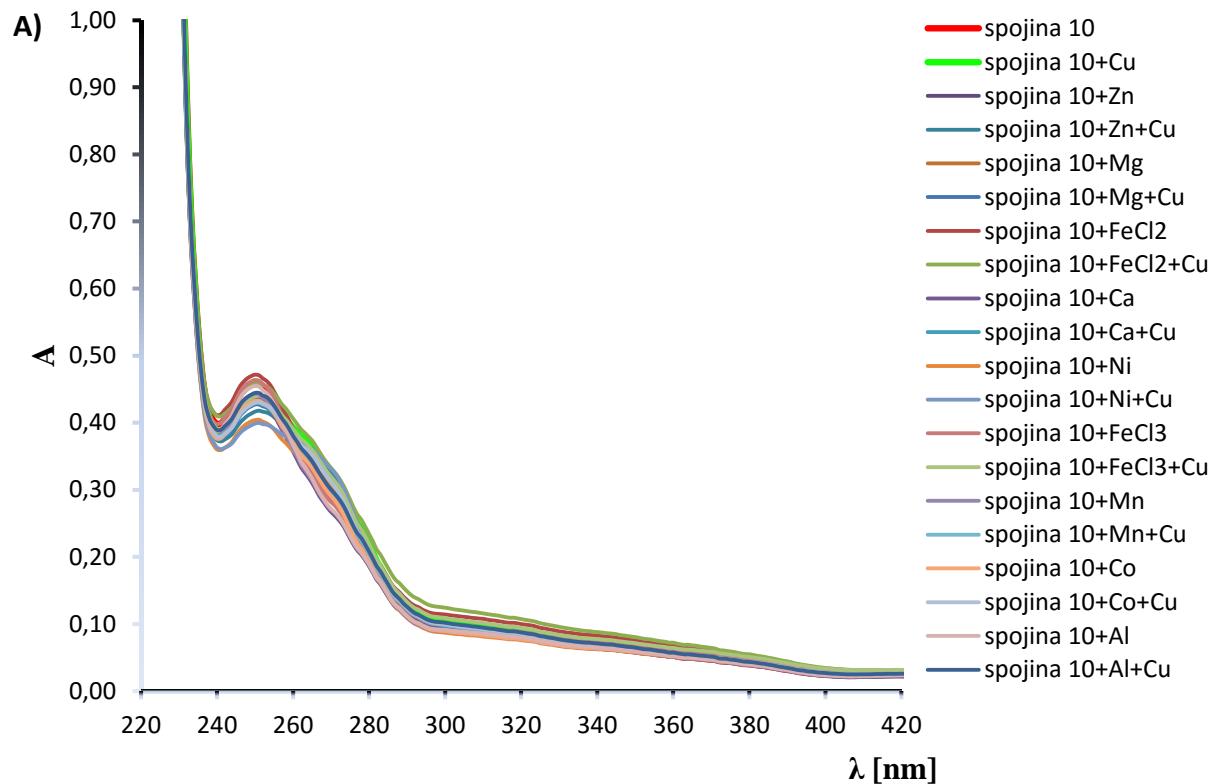
- Guo-Feng Huang, Manik L. Debnath and William E. Klunk: A Lipophilic Thioflavin-T Derivative for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Amyloid in Brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**; *12*: 295–298.
- (38) Aqeel Mahdi Jreo: Spectrophotometric Determination of the Stability Constant of $[Cu^{2+}\text{-}2\text{-}(6\text{-Methyl-2-Benzothiazolylazo)\text{-}4\text{-Chloro phenol}]$, $[Cu^{2+}$ and $Ni^{2+}\text{-}2\text{-}(6\text{-Bromo-2-Benzothiazolylazo)\text{-}4\text{-Chloro phenol}]$ Complexes Depending on the Stoichiometric Curves. *Journal of Al-Qadisiyah for Pure Science* **2008**; *13*: 1–6.
- (39) Christa J. Maynard, Roberto Cappai, Irene Volitakis, Robert A. Cherney, Anthony R. White, Konrad Beyreuther, Colin L. Masters, Ashley I. Bush and Qiao-Xin Li: Overexpression of Alzheimer's Disease Amyloid- β Opposes the Age-dependent Elevations of Brain Copper and Iron. *The Journal of Biological Chemistry* **2002**; *277*: 44670–44676.

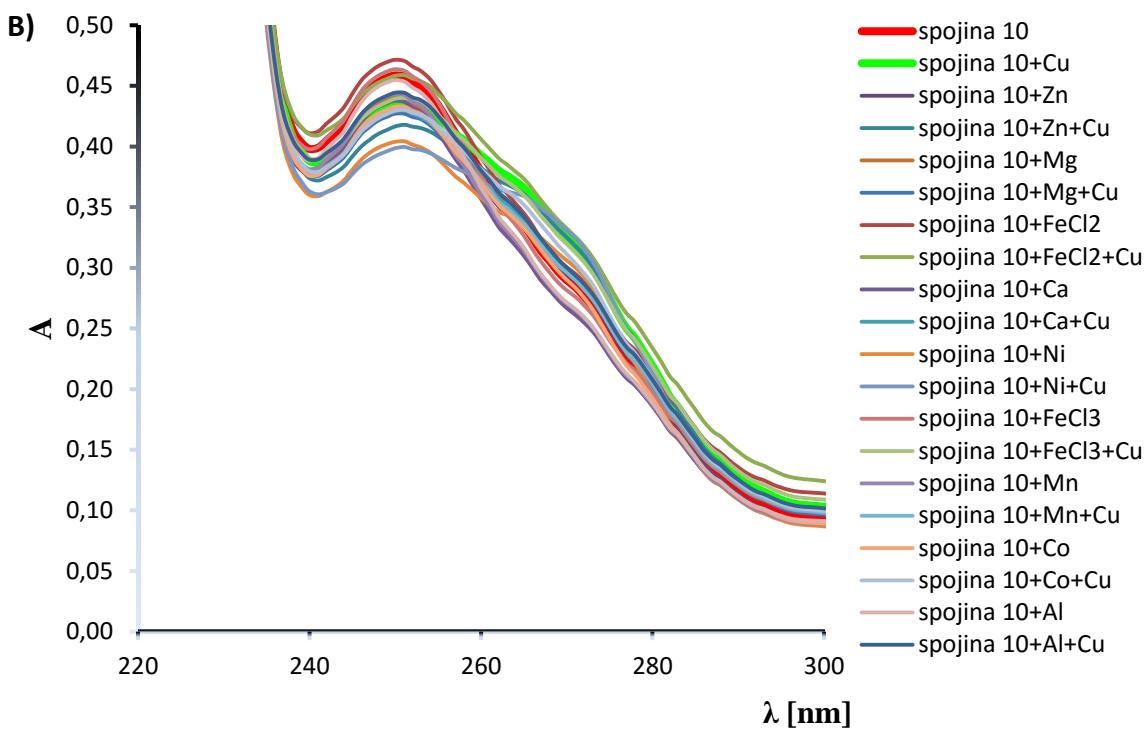
7. DODATEK

Rezultati in razprava

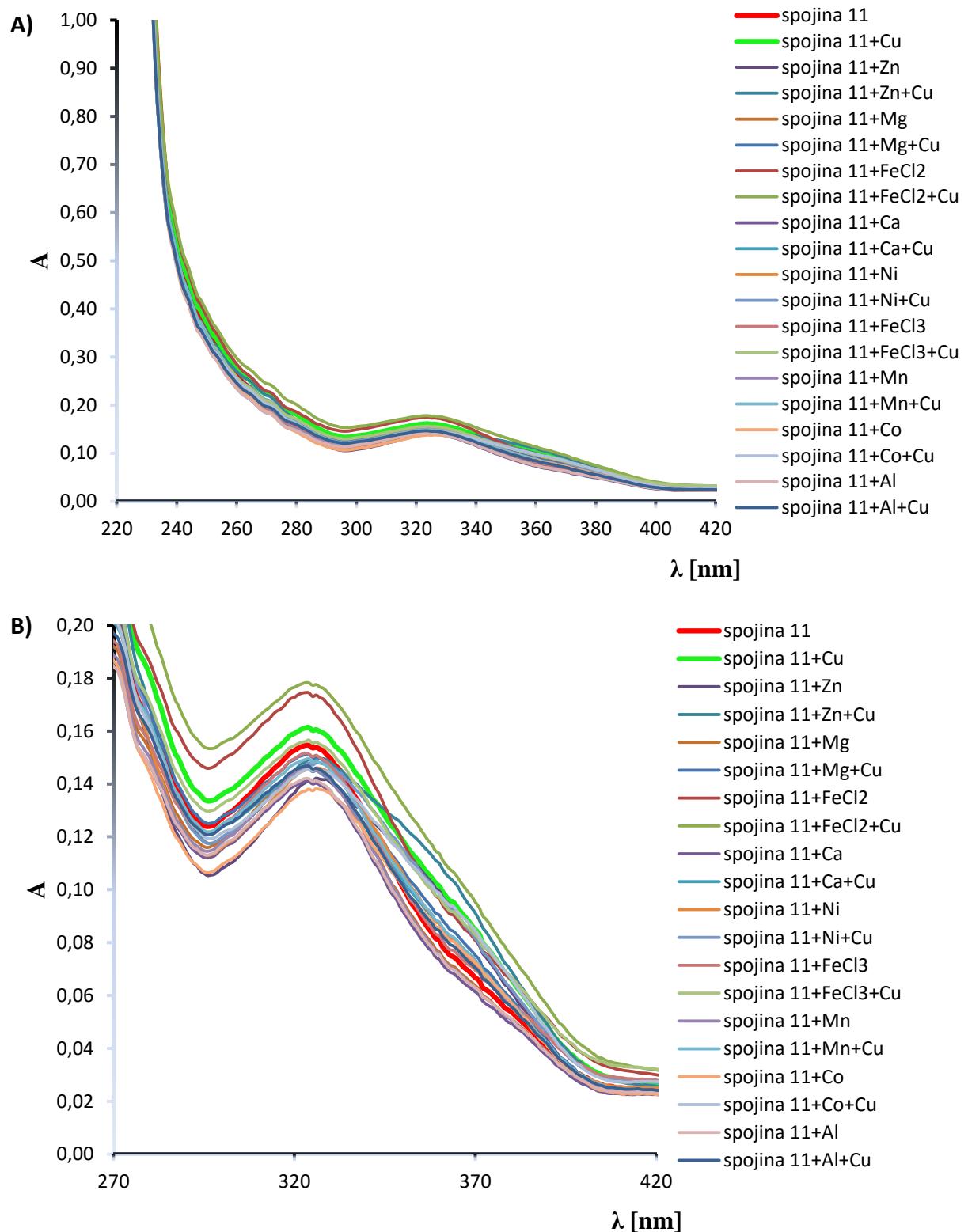
1. Kelacijski test

1.1. TEST KELACIJE KOVINSKIH IONOV IN SELEKTIVNOSTI ZA VEZAVO Cu^{2+} IONOV

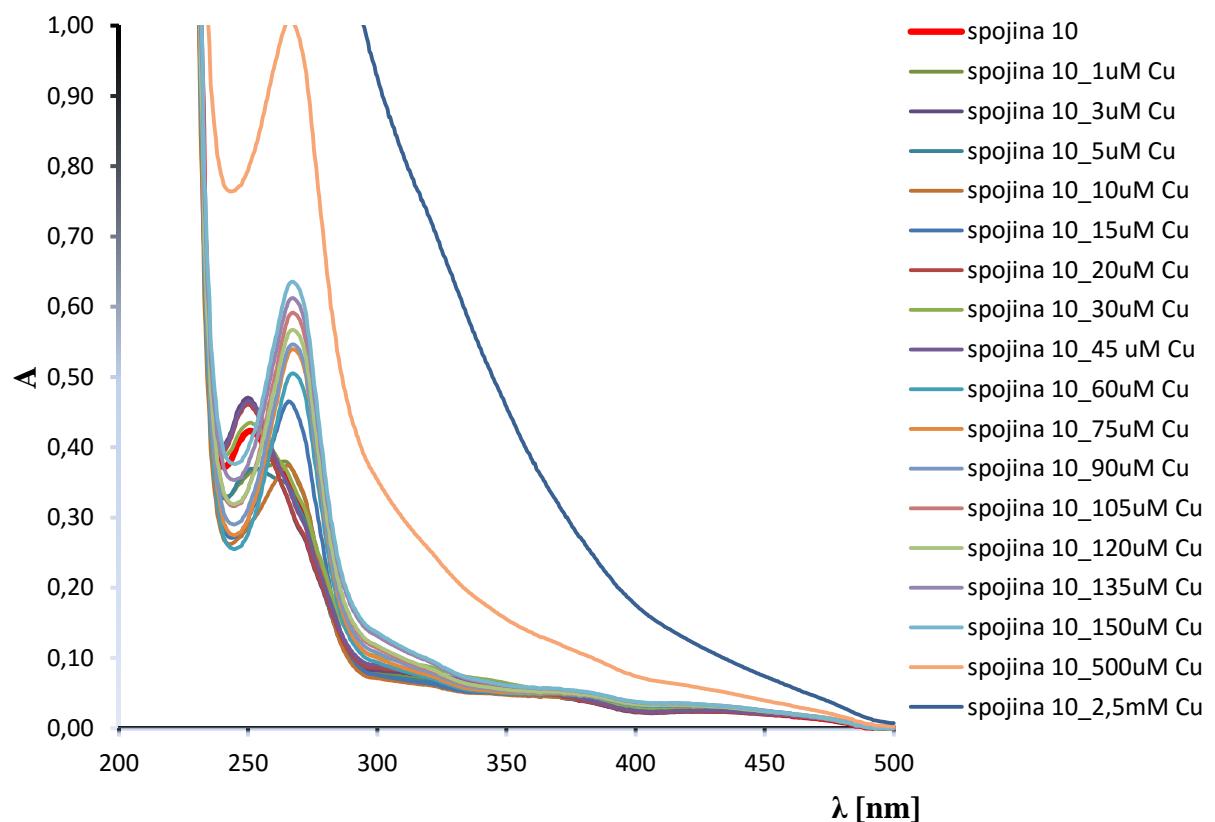




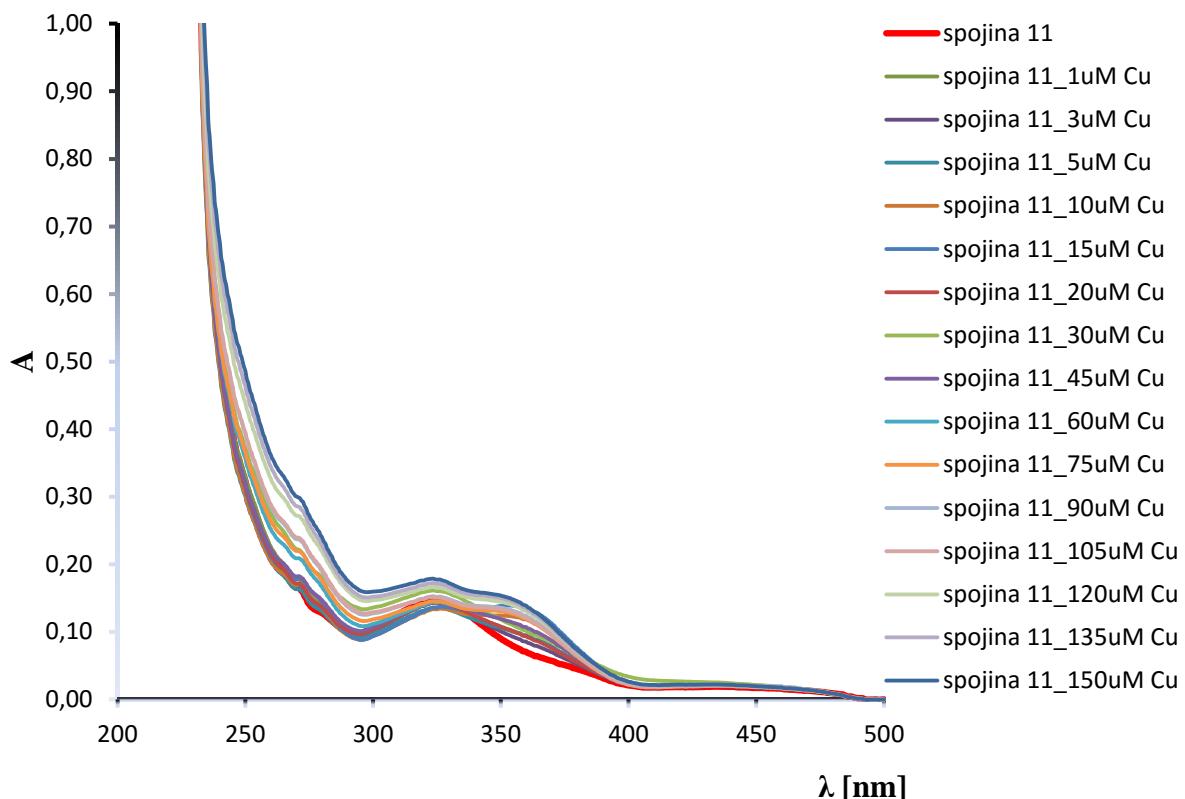
Slika 20: Odvisnost absorbance od valovne dolžine za spojino **10** samo in ob prisotnosti posameznih kovinskih ionov ter selektivnost spojine za vezavo Cu^{2+} ionov (spekter A). Slika B prikazuje povečan spekter istih meritev.



Slika 21: Odvisnost absorbance od valovne dolžine za spojino **11** samo in ob prisotnosti posameznih kovinskih ionov ter selektivnost spojine za vezavo Cu²⁺ ionov (spekter A). Slika B prikazuje povečan spekter istih meritev.

1.2. DOLOČANJE STEHIOMETRIJE VEZAVE Cu^{2+} IONOV

Slika 22: Graf odvisnosti absorbance spojine **10** in kompleksa Cu^{2+} -spojina od valovne dolžine.



Slika 23: Graf odvisnosti absorbance spojine **11** in kompleksa Cu^{2+} -spojina od valovne dolžine.

