



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Marija Bartolić

**INHIBITORI KOLINESTERAZA S MOGUĆIM
VIŠESTRUKIM UČINKOM NA BIOLOŠKE METE U
TRETMANU ALZHEIMEROVE BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Anita Bosak

Zagreb, 2026.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Marija Bartolić

CHOLINESTERASE INHIBITORS WITH POTENTIAL MULTIPLE EFFECTS ON BIOLOGICAL TARGETS IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Anita Bosak

Zagreb, 2026

Ova doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za Toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod mentorstvom dr. sc. Anite Bosak.

Disertacija je izrađena u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Razvoj bioaktivnih molekula za tretman neurodegenerativnih bolesti (BioMol4ND)“ (HRZZ-IP-2020-02-9343) voditeljice dr. sc. Anite Bosak.

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Aniti Bosak, na ukazanom povjerenju i prilici da radim na temi koju smatram vrlo zanimljivom, a i izazovnom. Hvala na volji i pomoći, iscrpnom iščitavanju mojih kilometraskih rečenica s ponekad upitno pozicioniranim interpunkcijama, te strpljenju kada se nakon mnogobrojnih iteracija postavi pitanje: je li „bilo je“ ili „je bilo“?

Zahvaljujem svojim kolegama i suradnicima sa Zavoda za Toksikologiju, poglavito pripadnicima neformalne grupe „Biokemija“, koji su mi pomogli u svladavanju korištenih tehnika (eksperimentalnih i računalnih), rada u staničnom laboratoriju te prenijeli znanje i davali savjete kojima su olakšali moju borbu s doktoratom.

Zahvaljujem cimericama, bivšima i sadašnjima, iz „sobe 202“ na ugodnoj atmosferi u uredu, zbog kojih su i momenti koji su se činili najcrnijima uvijek dobili makar tračak zabave, te na najvažnijem nepisanom pravilu: „Ne postoje glupa pitanja“.

Zahvaljujem svojoj „Trici Špade“, u svim njenim izdanjima, na umijeću kombiniranja međusobne podrške i jadanja neovisno o prigodi, te spremnosti za čašicu razgovora u razna doba dana (čak i nakon 10).

Zahvaljujem Vladi što je preživio moje putovanje kroz doktorski studij, a u koje je htio-ne htio upao, uz veliku dozu strpljenja.

Za kraj, zahvaljujem svojim roditeljima i bratu, koji me podržavaju u svakom mom odabiru, unatoč tome što sam ponekad spremna testirati tu bezrezervnost. Uz moto „Po redu se jež ježi“ sve je moguće!

Sadržaj

SAŽETAK	XIV
ABSTRACT	XVI
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Alzheimerova bolest	3
2.2. Patofiziologija Alzheimerove bolesti	4
2.2.1. Uloga kolinesteraza (kolinergička hipoteza)	5
2.2.2. Uloga BACE1 i hipoteza amiloidne kaskade	10
2.2.3. Uloga oksidacijskog stres i biometala kod nastanka i razvoja AB	15
2.2.4. Uloga monoamin-oksida A i B	18
2.3. Liječenje Alzheimerove bolesti	21
2.3.1. Višeciljni lijekovi	23
2.4. Pregled poznatih bioloških aktivnosti odabranih strukturnih skupina	27
2.4.1. Aminokinolini	28
2.4.2. Benzokinoni	28
2.4.3. Hidrazoni	29
2.4.4. Oksimi	30
2.4.5. Karbamati	31
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	32
3.1. Popis ispitivanih spojeva	32
3.1.1. 4-aminokinolini	33
3.1.2. Derivati amodiakina	35
3.1.3. Benzokinoni	35
3.1.4. Hidrazoni i N-acilhidrazoni	36
3.1.5. O-alkiloksimi	36
3.1.6. Karbamati	38
3.2. Inhibicija ljudskih kolinesteraza	40
3.2.1. Enzimi	40
3.2.2. Kemikalije i otopine	40
3.2.3. Mjerenje aktivnosti i reverzibilne inhibicije kolinesteraza Ellmanovom metodom	41

3.2.4. Konstante disocijacije	42
3.3. Inhibicija aktivnosti ljudske β-sekretaze.....	44
3.3.1. Komercijalni kompleti, enzim i kemikalije.....	44
3.3.2. Mjerenje aktivnosti BACE1 u prisutnosti ispitivanih spojeva	44
3.4. Inhibicija samoagregacije amiloidnih-β-peptida.....	46
3.4.1. Puferi, reagensi	46
3.4.2. Amiloidni- β peptid.....	47
3.4.3. Optimizacija metode mjerenja inhibicije β -amiloidne samoagregacije.....	47
3.4.4. Optimizacija metode mjerenja inhibicije β -amiloidne samoagregacije.....	49
3.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih spojeva	50
3.5.1. FRAP metoda (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power).....	50
3.5.2.1. Puferi, kemikalije, reagensi.....	50
3.5.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih spojeva FRAP metodom	50
3.5.2. ORAC metoda (engl. Oxygen Radical Antioxidant Capacity)	52
3.5.2.1. Puferi, kemikalije, reagensi.....	52
3.5.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih spojeva ORAC metodom ...	52
3.6. Inhibicija aktivnosti monoamin-oksidaaza (MAO)	54
3.6.1. Puferi, kemikalije, reagensi	54
3.6.2. Mjerenje aktivnosti enzima MAO-A i MAO-B u prisustvu ispitivanih spojeva	55
3.7. Kelacija biometala	57
3.7.1. Kemikalije, reagensi i ispitivani spojevi.....	57
3.7.2. Procjena kelacijske sposobnosti odabranih spojeva.....	57
3.8. Citotoksičnost spojeva.....	58
3.8.1. Stanice, puferi, kemikalije i ispitivanih spojevi.....	58
3.8.2. Uzgoj staničnih kultura	59
3.8.3. Određivanje broja živih stanica u uzorku.....	59
3.8.4. Određivanje citotoksičnosti spojeva.....	60
3.9. In silico analiza ispitivanih spojeva	61
3.9.1. Molekulsko uklapanje.....	61
3.9.2. Procjena biodostupnosti spojeva u središnjem živčanom sustavu nakon oralne primjene	63
3.9.3. Procjena prolaznosti spojeva kroz krvno-moždanu barijeru.....	63
3.9.4. Procjena apsorpcije spojeva u ljudskom probavnom sustavu	64
§ 4. REZULTATI	65
4.1. Inhibicija kolinesteraza.....	65

4.1.1. Inhibicija kolinesteraza 4-aminokinolinima	66
4.1.2. Inhibicija kolinesteraza derivatima amodiakina.....	76
4.1.3. Inhibicija kolinesteraza benzokinonima	81
4.1.4. Inhibicija kolinesteraza hidrazonima	85
4.1.5. Inhibicija kolinesteraza O-alkiloksimima.....	90
4.1.6. Inhibicija kolinesteraza karbamatima	97
4.2. Inhibicija BACE1.....	97
4.2.1. Aktivnost BACE1 u puferima različitog sastava	98
4.2.2. Inhibicija BACE1 4-aminokinolinima	100
4.2.3. Inhibicija BACE1 benzokinonima	102
4.2.4. Inhibicija BACE1 hidrazonima i N-acilhidrazonima.....	104
4.2.5. Inhibicija BACE1 O-alkiloksimima.....	105
4.2.6. Inhibicija BACE1 karbamatima	106
4.3. Inhibicija samoagregacije amiloidnih-β peptida.....	107
4.3.1. Uhodavanje i optimizacija metode mjerenja inhibicije samoagregacije peptida $A\beta$	108
4.3.2. Inhibicija samoagregacije peptida $A\beta$ u prisustvu 4-aminokinolina	111
4.3.3. Inhibicija samoagregacije peptida $A\beta$ u prisustvu hidrazona i N-acilhidrazona.....	112
4.3.4. Inhibicija samoagregacije peptida $A\beta$ u prisustvu O-alkiloksima.....	113
4.3.5. Inhibicija samoagregacije peptida $A\beta$ u prisustvu karbamata	114
4.4. Antioksidacijski kapacitet spojeva	117
4.4.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	118
4.4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom.....	118
4.5. Inhibicija monoamin-oksida MAO-A i MAO-B.....	119
4.5.1. Inhibicija monoamin-oksida MAO-A i MAO-B 4-aminokinolinima.....	120
4.5.2. Inhibicija monoamin-oksida MAO-A i MAO-B karbamatima.....	123
4.6. Procjena kelacijske sposobnosti spojeva	124
4.7. Citotoksičnost spojeva.....	127
4.7.1. Učinak 4-aminokinolina na preživljenje stanica.....	127
4.7.2. Učinak O-alkiloksima na preživljenje stanica	130
4.8. In silico analiza fizikalno-kemijskih svojstava spojeva.....	132
4.8.1. Procjena biodostupnosti spojeva nakon oralne primjene	133
4.8.2. Procjena prolaznosti spojeva kroz krvno-moždanu barijeru.....	137
4.8.3. Procjena apsorpcije spojeva u ljudskom probavnom sustavu	140
§ 5. RASPRAVA.....	143

§ 6. ZAKLJUČAK.....	155
§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICÂ I SIMBOLA.....	158
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	160
§ 9. DODATAK	XVIII
9.1. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza	XVIII
9.1.1. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza 4-aminokinolinima	XVIII
9.1.2. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza kinuklidinskim karbamatima	XIX
9.1.3. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza derivatima karbamata cinhonidina (CD) i cinhonina (CN).....	XIX
9.1.4. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza monokarbamatnim derivatima bambuterola	XX
9.1.5. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza biskarbamatnim derivatima bambuterola	XXI
9.2. Procjena prolaznosti spojeva kroz krvno-moždanu barijeru	XXII
§ 10. ŽIVOTOPIS	XXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

INHIBITORI KOLINESTERAZA S MOGUĆIM VIŠESTRUKIM UČINKOM NA BIOLOŠKE METE U TRETMANU ALZHEIMEROVE BOLESTI

Marija Bartolić

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, 10 000 Zagreb

Alzheimerova bolest (AB) je kronična neurodegenerativna bolest koja predstavlja vodeći uzrok demencije u svijetu. Karakterizira ju neurodegeneracija moždanih regija kao posljedica nakupljanja amiloidnih plakova, poremećaj neurotransmisije posredovane acetilkolinom, oksidacijski stres, poremećena homeostaza biometala u mozgu te povećana aktivnost monoamin-oksidaaza. S obzirom na multifaktorijalnu prirodu bolesti, primjena liganada koji djeluju na dvije ili više bioloških meta predstavljaju obećavajući koncept razvoja potencijalnih lijekova za tretman AB. Cilj ove doktorske disertacije bio je istražiti strukturne motive koji pokazuju inhibitornu aktivnost prema kolinesterazama i barem još jednoj dodatnoj biološkoj meti AB. Testirano je ukupno 189 spojeva podijeljenih u šest glavnih skupina (4-aminokinolini, derivati amodiakina, 1,4-benzokinoni, (*N*-acil)hidrazoni, *O*-alkiloksimi i karbamati) kojima je određena sposobnost inhibicije ljudskih kolinesteraza. Odabranim inhibitorima kolinesteraza ispitana je aktivnost prema dodatnim navedenim metama AB. Identificirano je 15 inhibitora kolinesteraza koji djeluju na barem još jednu dodatnu biološku metu AB.

(172 + XXVI stranica, 66 slika, 30 + D8 tablica, 219 literaturnih navoda, jezik izvornika:
hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest/ amiloid/ β -sekretaza/ kolinesteraze/ monoamin-oksidaaze/ oksidacijski stres/ višeciljni lijekovi

Mentor: dr. sc. Anita Bosak, zn. savj.

Rad prihvaćen: 5. studenog 2025.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski, PMF, Zagreb
2. doc. dr. sc. Morana Dulić, PMF, Zagreb
3. dr. sc. Silva Katušić, zn. savj. u trajnom izboru, IRB, Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

CHOLINESTERASE INHIBITORS WITH POTENTIAL MULTIPLE EFFECTS ON BIOLOGICAL TARGETS IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

Marija Bartolić

Institute for Medical research and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, 10 000 Zagreb

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disease and the leading cause of dementia in the world. AD is characterized by neurodegeneration of brain regions resulting from the accumulation of amyloid plaques, disturbed acetylcholine-mediated neurotransmission, oxidative stress, dyshomeostasis of biometals in the brain and increased activity of monoamine oxidases. Considering AD's multifactorial nature, multitarget-directed ligands represent a promising concept for the design of potential drugs for AD therapy. This doctoral thesis aimed to explore structural motifs which show inhibitory activity against cholinesterases and at least one more biological target of AD. The ability to inhibit human cholinesterases was tested for a total of 189 compounds divided into 6 main groups (4-aminoquinolines, amodiaquine derivatives, 1,4-benzoquinones, (*N*-acyl)hydrazones, *O*-alkyloximes and carbamates). Selected cholinesterase inhibitors were further tested on other mentioned biological targets involved in onset and progress of AD. 15 cholinesterase inhibitors acting on at least one additional biological target have been identified.

(172 + XXVI pages, 66 figures, 30 + D8 tables, 219 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: Alzheimer's disease/ amyloid/ β -secretase/ cholinesterases/ monoamine-oxidases/ multitarget-directed ligands/ oxidative stress

Supervisor: Dr. Anita Bosak, Scientific Adviser

Thesis accepted: November 5th 2025

Reviewers:

Dr. Aleksandra Mašavelski, Associate Professor, Faculty of Science, Zagreb
Dr. Morana Dulić, Assistant Professor, Faculty of Science, Zagreb
Dr. Silva Katušić, Scientific Adviser With Tenure, RBI, Zagreb

§ 1. UVOD

Alzheimerova bolest (AB) javlja se kao posljedica degeneracije moždanih regija, prvenstveno struktura odgovornih za održavanje procesa učenja i memorije poput hipokampusa, i uzrokuje 60 do 70 % svih slučajeva demencije u svijetu.¹ Radi se o progresivnoj bolesti čiji simptomi se javljaju postepeno. U početku je riječ o postepenom gubitku memorije i poteškoćama u govoru, dok se uznapredovanjem bolesti javljaju problemi sa snalaženjem u prostoru te promjene u ponašanju i raspoloženju.^{1,2} AB se najčešće javlja u osoba starijih od 65 godina, a nakon postavljanja dijagnoze kod osoba u ovoj dobnoj skupini, prema izvještaju *2022 Alzheimer's disease facts and figures*, očekivani životni vijek je u prosjeku još 4 do 8 godina.² Budući da je riječ o bolesti koja se razvija i napreduje starenjem, porast broja stanovnika i općenito starenje svjetske populacije glavni su faktori koji pridonose rastućem broju slučajeva Alzheimerove demencije, pri čemu trenutna predviđanja procjenjuju da će broj oboljelih u svijetu do 2050. godine doseći 150 milijuna.³ U krajnjem stadiju bolesti oboljele osobe više nisu sposobne samostalno voditi brigu o sebi^{1,2} i postaju ovisni o brizi medicinskog osoblja ili skrbnika, koji najčešće budu bliski članovi obitelji. Stoga, osim za oboljele, AB predstavlja veliki psihički i ekonomski teret i za cijele obitelji.² Zbog navedenih razloga, na globalnoj razini postoji velika potreba za lijekovima koji bi ublažili simptome bolesti učinkovitije od postojećih, i lijekovima koji bi mogli usporiti razvoj same bolesti.

Patofiziologija AB je složena, a karakterizira ju degeneracija neurona kao posljedica nakupljanja netopljivih nakupina amiloidnih- β peptida (plakova) u izvanstaničnom prostoru i neurofibrilarnih čvorova hiperfosforiliranih proteina tau (p-tau) u citoplazmi neurona.¹ Glavnim uzročnikom kognitivnog propadanja u AB smatra se degeneracija kolinergičkih neurona u moždanoj kori koja uzrokuje smanjenje koncentracije acetilkolina, jednog od glavnih prijenosnika živčanih impulsa u mozgu.^{4,5} Istraživanja su pokazala da degeneraciji neurona pridonose i brojni drugi procesi i stanja, poput poremećaja homeostaze biometalnih iona Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} , mitohondrijske disfunkcije i nastanka reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje uzrokuju oksidacijski stres, zatim pojačane aktivnosti monoamin-oksida A i B te povećane stimulacije N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora.⁶⁻¹⁰ Većina trenutno odobrenih lijekova za liječenje AB djeluje simptomatski s ciljem poboljšanja neurotransmisije te usporavanja razvoja kognitivnih poremećaja. Riječ je o inhibitorima acetilkolinesteraze (AChE) i

butirilkolinesteraze (BChE), enzima odgovornih za razgradnju acetilkolina, i antagonistima NMDA receptora koji reguliraju glutamatergičnu neurotransmisiju.^{11,12} U posljednjih pet godina razvijene su i prve anti-amiloidne terapije koje su usmjerene na sam razvoj bolesti, odnosno na sprječavanje samoagregacije amiloidnih peptida i uklanjanje amiloidnih struktura u mozgu.^{11–14} No, glavni nedostatak svih trenutnih lijekova je taj da djeluju samo na jednu metu AB čime je njihova djelotvornost ograničena. Stoga je danas velik broj istraživanja usmjeren na dizajn višeciljnih lijekova (engl. *Multitarget-directed ligands*, MTDL), spojeva čije strukture sadrže dva ili više farmakofora različitih bioloških aktivnosti koji istovremeno mogu djelovati na više različitih meta kod bolesti.^{15,16}

Cilj ove doktorske disertacije bio je istražiti biološku aktivnost spojeva različitih strukturnih karakteristika prema nekoliko mogućih meta AB. Tako su određene: sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE, inhibicije β -sekretaze (engl. *β -site APP cleaving enzyme 1*, BACE1), enzima odgovornog za nastajanje amiloidnih- β peptida ($A\beta$),^{17–21} inhibicije samoagregacije peptida $A\beta_{42}$ (42 označava duljinu peptida), monoamin-oksidaza A i B te antioksidacijska i kelirajuća svojstva samih spojeva. Ukupno je testirano 189 spojeva podijeljenih u šest glavnih skupina s obzirom na njihovu okosnicu/funkcionalnu grupu: 4-aminokinolini (63 spoja), derivati amodiakina (15 spojeva), 1,4-benzokinoni (15 spojeva), hidrazoni i *N*-acilhidrazoni (16 spojeva), *O*-alkiloksimi (45 spojeva) i karbamati (35 spojeva). Svim spojevima prvo je određen potencijal inhibicije ljudskih kolinesteraza (spojevima iz skupine karbamata inhibitorni potencijal prema AChE i BChE određen je u ranijim istraživanjima),^{22–25} nakon čega je odabranim inhibitorima kolinesteraza testirana mogućnost djelovanja i na neke od gore navedenih meta. Kako bi se procijenila sigurnost njihove primjene *in vivo*, odabranim spojevima testiran je učinak *in vitro* na stanične linije odabrane kao model ljudskog mozga, jetre i bubrega, nakon 24-satne izloženosti. Nadalje, primjenom *in silico* metoda analizirana su fizikalno-kemijska svojstva spojeva te je procijenjena njihova mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (KMB), kao osnovni preduvjet za lijekove s djelovanjem u središnjem živčanom sustavu, te mogućnost apsorpcije u ljudskom probavnom sustavu. Analizom utvrđenih bioloških aktivnosti spojeva, istaknuti su spojevi s višeciljnim djelovanjem, odnosno spojevi koji osim inhibicije kolinesteraza djeluju na barem još jednu metu kod AB. Također, predložene su smjernice za dizajn novih spojeva s višeciljnim djelovanjem sa strukturnim osnovicama i motivima za koja se u ovome radu pokazalo da su obećavajući farmakofori za ovdje istražene mete.

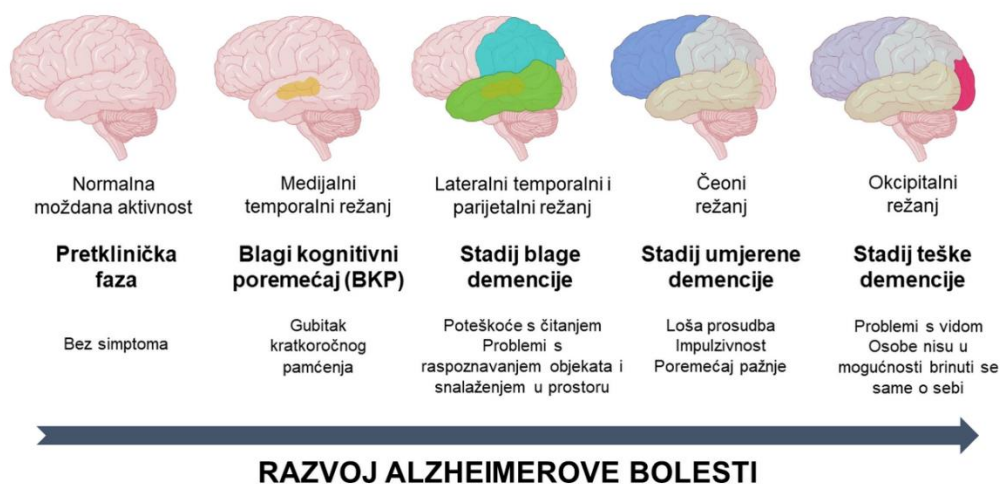
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) je kronična neurodegenerativna bolest koja se javlja kao posljedica degeneracije moždanih regija odgovornih za održavanje procesa učenja i memorije, prvenstveno hipokampusa koji se nalazi u medijalnom temporalnom režnju, i predstavlja najčešći oblik demencije u svijetu. Manifestira se postepenim gubitkom pamćenja i kognitivnih funkcija, a tijekom vremena i poteškoćama u govoru te smanjenjem vizualno-prostornih sposobnosti.¹ Glavni rizik pojave AB je starenje te se bolest obično javlja u osoba starijih od 65 godina. Nasljedni oblik bolesti (engl. *Familial Alzheimer's disease*), koja se javlja u osoba mlađih od 65 godina, čini manje od 5% svih slučajeva AB.^{26,27} Prema predviđanjima u sklopu *Global Burden of Disease* (GBD) studije, broj oboljelih od AB na svjetskoj razini mogao bi se utrostručiti do 2050. godine. Razlog tome je produljenje životnog vijeka u razvijenijim zemljama, kao posljedica poboljšanih životnih uvjeta te generalno starenje populacije.³ Navedeno čini AB velikim opterećenjem za zdravstveni sustav zemalja i predstavlja dodatni izazov u potrazi za lijekovima koji bi uspješnije tretirali bolest od postojećih, ali i suzbili ili usporili progresiju bolesti.

Glavne patofiziološke značajke AB su nakupljanje netopljivih amiloidnih plakova, nastalih agregacijom peptida A β , u izvanstaničnom prostoru neurona i neurofibrilarnih čvorova sačinjenih od proteina p-tau u citoplazmi neurona. Zbog načina razvoja, AB se smatra kontinuumom koji se odvija u tri glavna vremenska okvira: pretklinička faza AB, prodromalna faza koju karakterizira blagi kognitivni poremećaj (BKP) te faza demencije koju čine stadij blage, stadij umjerene i stadij teške demencije.² Faza pretkliničke AB je asimptomatska jer poremećaji vezani za kognitivne funkcije i pamćenje izostaju, ali su uočljive promjene u razini peptida A β i proteina p-tau u cerebrospinalnoj tekućini oboljelih osoba u odnosu na zdrave. Povećano nakupljanje peptida A β u mozgu moguće je detektirati korištenjem pozitronsko emisijske tomografije (PET) i specifičnih proba koje detektiraju nakupine peptida A β u mozgu.^{2,28} Do blagog kognitivnog poremećaja dolazi zbog pojave atrofije u području medijalnog temporalnog režnja mozga i povećanog nakupljanja peptida A β i proteina p-tau u navedenoj regiji. Navedene promjene predstavljaju najranije patološke znakove AB koji

uzrokuju simptome poput gubitka kratkoročnog pamćenja. 15 % osoba oboljelih od blagog kognitivnog poremećaja razvije Alzheimerovu demenciju nakon dvije godine, a jedna trećina nakon pet godina, dok se kod nekih pojedinaca kognitivne funkcije s vremenom ne pogoršavaju ili se čak vrate u stanje prije pojave BKP.^{2,29} U stadiju blage demencije AB zahvaća lateralni temporalni i parijetalni režanj mozga čije funkcije uključuju procesiranje audio-vizualnih te osjetilnih podražaja, zbog čega se oboljeli suočavaju s poteškoćama u čitanju te problemima sa raspoznavanjem objekata i snalaženjem u prostoru.^{30,31} Zahvaćanjem čeonog režnja (umjereni stadij demencije) kod oboljelih se javljaju simptomi povezani s promjenama u osobnosti i kontroli emocija pri čemu se počinju javljati epizode agresivnosti, impulzivnosti i loše prosudbe te poremećaji u ponašanju (lutanje, nesvrhovite aktivnosti).^{2,30-34} U stadiju teške demencije zahvaćeno je i područje okcipitalnog režnja zbog čega se kod oboljelih pojavljuju problemi s vidom, a moguće su i vizualne halucinacije.^{31,35-37} Napredovanjem bolesti od umjerenog prema teškom stadiju demencije komunikacijske i motoričke sposobnosti oboljelih se značajno pogoršavaju zbog čega više nisu u stanju brinuti se o sebi te zahtijevaju stalnu brigu skrbnika ili profesionalnog osoblja.² Razvojni stadiji AB prikazani su na slici 2.1.



Slika 2.1. Tijek razvoja AB u ljudskom mozgu te popratni simptomi (slika izrađena prema referenci 31).

2.2. Patofiziologija Alzheimerove bolesti

Patofiziologija AB je vrlo kompleksna, a neke od njenih glavnih karakteristika su nakupljanje netopljivih amiloidnih plakova u izvanstaničnom prostoru neurona, neurofibrilarni čvorovi u citoplazmi neurona, poremećaji neurotransmisije posredovane acetilkolinom (ACh), narušena

homeostaza biometala Fe^{2+} , Zn^{2+} i Cu^{2+} , mitohondrijska disfunkcija, pojačana aktivnost monoamin-oksidaza A i B te povećana stimulacija *N*-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora, što za posljedicu ima propadanje kolinergičkih neurona.^{1,4,6–10} Uz pojedine karakteristike vežu se i teorije o nastanku i uzroku AB. U nastavku je dan detaljniji opis uloga pojedinih karakteristika u nastanku i razvoju AB.

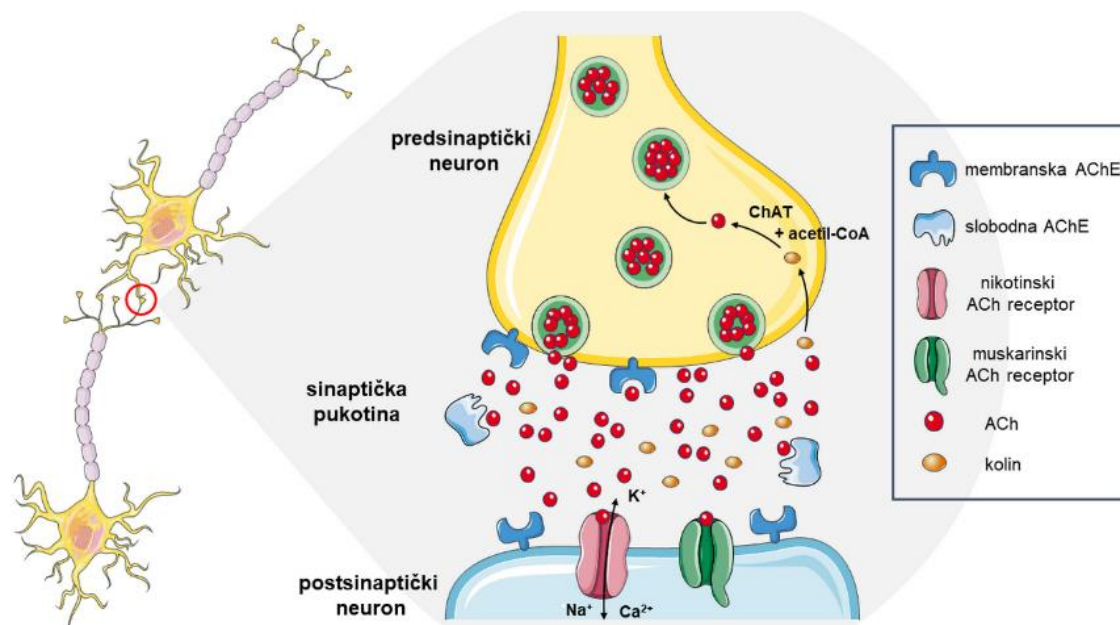
2.2.1. Uloga kolinesteraza (kolinergička hipoteza)

Kolinergička hipoteza, nastala 70-ih godina prošlog stoljeća, je najstarija teorija o nastanku AB koja se usredotočuje na progresivni gubitak limbičkih i neokortikalnih kolinergičkih inervacija kao glavni uzročnik bolesti.⁴ Ova teorija temeljena je na otkrićima da su aktivnosti enzima uključenih u sintezu i metabolizam acetilkolina (ACh), jednog od glavnih neurotransmitera u ljudskom mozgu, smanjene zbog degeneracije kolinergičkih neurona u moždanoj kori,⁵ te da su neuroni *nucleus basalis* koji su bogati acetilkolinesterazom (AChE), enzimom koji katalizira razgradnju ACh, i koji oživčuju neokorteks, podložni degeneraciji.^{38–40} Također, istraživanje učinka agonista i antagonista kolinergičkog sustava kod ljudi pokazala su da primjena antagonista kolinergičkog sustava kod mlađih ljudi rezultira kognitivnim poremećajima sličnima onima koji se javljaju starenjem.⁴¹

Kolinergička neurotransmisija, odnosno transmisija koja koristi ACh kao prijenosnik živčanih impulsa, ključna je za pravilno odvijanje životnih funkcija poput kontrakcije glatkih mišića te održavanja stanja svijesti, procesa pamćenja i učenja.^{4,42} Kolinergička hipoteza razvoja AB temelji se na ulozi kolinesteraza, enzima koji kataliziraju razgradnju ACh. U živčanom sustavu ljudi postoje dvije kolinesteraze: acetilkolinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (BChE, EC 3.1.1.8). AChE i BChE dijele oko 53% identičnosti u aminokiselinskom slijedu, a razlikuju se prema katalitičkoj aktivnosti, odnosno specifičnosti prema supstratima te afinitetu vezanja raznih liganada.^{43,44} AChE pokazuje visoku specifičnost za hidrolizu ACh, i za katalizu njegove razgradnje postiže obrtni broj od gotovo $15\,000\text{ s}^{-1}$, odnosno 900 000 molekula po minuti, što znači da je brzina te reakcije limitirana brzinom difuzije ACh u aktivno mjesto AChE.^{45,46} Za razliku od AChE, BChE pokazuje znatno manju supstratnu specifičnost pa osim ACh može hidrolizirati i druge estere kolina kao što su butirilkolin i sukcinilkolin, a posjeduje i aril acilamidaznu aktivnost.⁴⁷ U ljudskom organizmu AChE je u najvećim koncentracijama prisutna u skeletnim mišićima i mozgu, u oko 1000 puta manjoj koncentraciji u plućima, jetri i srcu,⁴⁸ dok je u krvi prisutna vezana na membrane

eritrocita.⁴⁹ U najvećim količinama BChE je prisuta u jetri, zatim u plućima, mozgu, srcu, skeletnim mišićima, gušterači i bubrezima, a također je prisutna i u krvnoj plazmi kao slobodno cirkulirajući enzim.^{48,50}

Fiziološka uloga AChE je hidroliza ACh u kolinergičnoj sinapsi čime dolazi do prekida prijenosa živčanih impulsa posredovanih ACh. Dolaskom akcijskog potencijala, ACh se otpušta iz predsiniptičkog neurona u sinaptičku pukotinu gdje se veže na acetilkolinske receptore (nikotinske ili muskarinske) vezane na membranu pred- ili postsiniptičkog neurona. Vezanje ACh na receptore predsiniptičkog neurona regulira otpuštanje ACh u sinaptičku pukotinu, dok vezanje na receptore postsiniptičkog neurona dovodi do depolarizacije membrane i daljnjeg prijenosa živčanog impulsa duž postsiniptičkog neurona. AChE je koncentrirana u sinaptičkoj pukotini vezana na membranu postsiniptičkog neurona te u mišićno-živčanom spoju, gdje katalizira razgradnju ACh što dovodi do ponovne polarizacije membrane i prestanka prijenosa živčanog impulsa. Razgradnjom ACh nastaju acetat i kolin. Kolin se unosi natrag u predsiniptički neuron gdje postaje supstratom kolin-acetiltransferaze (ChAT) za sintezu novih ACh (slika 2.2).^{46,51} Inhibicija enzimske aktivnosti AChE onemogućuje razgradnju ACh što dovodi do njegovog nakupljanja u sinapsama i neuromuskularnom spoju te prekomjerne stimulacije kolinergičkih receptora što rezultira poremećajem u prijenosu živčanih implusa i u konačnici kolinergičkom krizom. Kolinergička kriza manifestira se simptomima poput nekontroliranog trzanja mišića, pojačanog lučenja slina, znoja i suza, grčeva u gastrointestinalnom sustavu, dijareje, mokrenja i povraćanja, a u konačnici može doći i zatajenja respiratornog sustava te smrti.^{52,53} S druge strane, smanjenje koncentracije ACh kao posljedica poremećaja u njegovoj sintezi dovodi do razvoja neurodegenerativnih bolesti poput AB.⁴

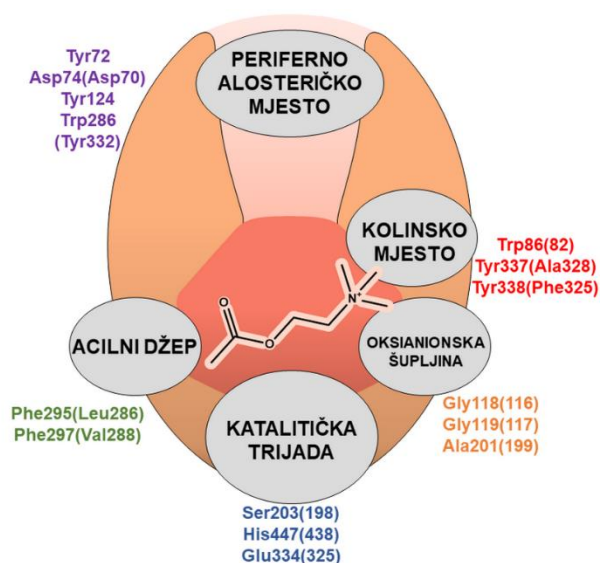


Slika 2.2. Prikaz neurotransmisije posredovane acetilkolinom (ACh). ACh se sintetizira u presinaptičkom neuronu iz kojeg se otpušta u sinaptičku pukotinu. Vezanjem na nikotinske ili muskarinske receptore postsinaptičkog neurona dolazi do depolarizacije membrane i prijenosa živčanog signala duž postsinaptičkog neurona. AChE u sinaptičkoj pukotini katalizira razgradnju ACh na kolin i acetat čime se prekida signalizacija te repolarizira membrana, dok se kolin unosi natrag u presinaptički neuron gdje postaje supstratom kolin-acetiltransferaze (ChAT) za sintezu novog ACh. (izrađeno prema referenci 51)

BChE, osim što hidrolizira ACh, može hidrolizirati i druge kolinske i nekolinske estere zbog čega se u literaturi prvotno nazivala pseudokolinesterazom ili nespecifičnom kolinesterazom. Zbog njene nespecifičnosti prema supstratu i činjenice da osobe s tihim inačicama BChE (inačice koje izrazito sporo hidroliziraju sukcinilkolin) nemaju nikakvih zdravstvenih teškoća, dugo se smatralo da BChE ne obnaša vitalnu ulogu u organizmu.⁴⁷ Međutim, upravo njena mogućnost da hidrolizira širok spektar supstrata, kao i činjenica da se primarno sintetizira u jetri, sugerira da se radi o enzimu koji ima ulogu biološkog čistila odnosno detoksikacije organizma.⁴⁸ Također, budući da inhibicija BChE ne dovodi do nuspojava karakterističnih za inhibiciju AChE, BChE je pripisana uloga zaštite AChE od djelovanja organofosfornih spojeva.⁵⁴ Aktivnost BChE važna je i za metabolizam nekolicine anestetika i narkotika. Primjer tome je sukcinilkolin, depolarizirajući mišićni relaksans koji se koristi za opuštanje mišića tijekom anestezije, a za čiju je hidrolizu u organizmu zadužena BChE. Primjena sukcinilkolina kod osobe s tihom inačicom BChE uzrokuje produljeno paralizirajuće djelovanje na mišiće. BChE također katalizira hidrolizu kokaina pri čemu nastaju netoksični metaboliti ekgonin-metil ester i benzojeva kiselina čime se smanjuje njegovo djelovanje.⁵⁵ S druge strane, serumska

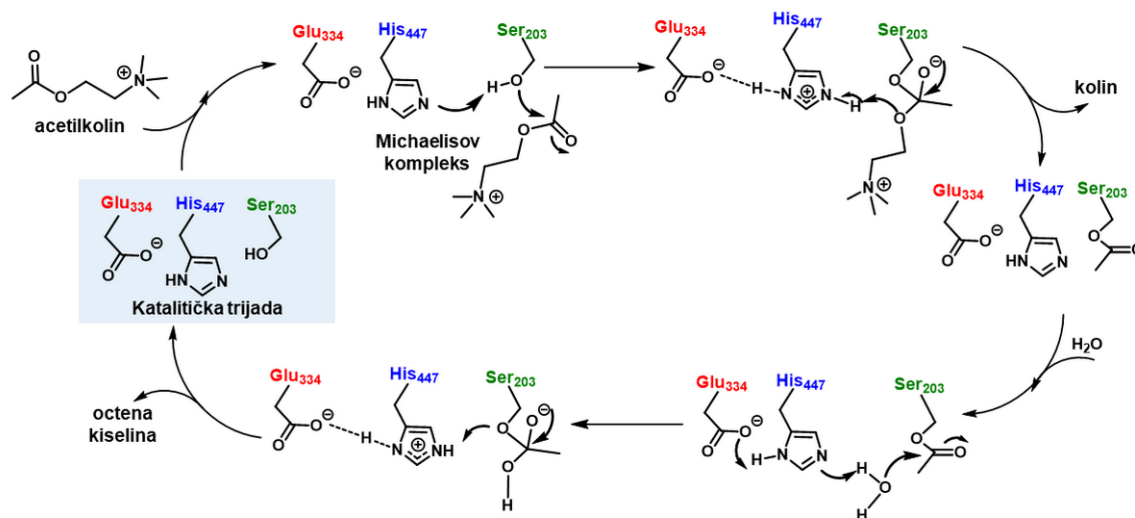
BChE aktivira heroin, jer njenim hidrolitičkim djelovanjem nastaje metabolit 6-monoacetilmorfin (6-MAM) koji je fiziološki aktivan u mozgu sisavaca.⁵⁶

Aktivno mjesto obiju kolinesteraza dugačko je 20 Å i široko oko 5 Å, a sačinjeno je od četiri domene: katalitičkog mjesta (čine ga katalitička trijada s oksianionskom šupljinom), kolinskog mjesta (kation- π mjesto) koje stabilizira pozitivno nabijeni kvaterni dio kolinskih supstrata, acilnog džepa u koji se smješta acilni dio supstrata, te perifernog alosteričkog mjesta koje se nalazi na rubu ždrijela (slika 2.3).⁵⁷ Katalitička trijada nalazi se na dnu ždrijela, a čine ju aminokiseline Ser203(198), His447(438) i Glu334(325) (broj izvan zagrade označava položaj aminokiseline u AChE, a broj u zagradi je položaj aminokiseline u BChE) koje direktno sudjeluju u katalizi. Kolinsko mjesto enzima čine aminokiselinski ogranci Trp86(82), Tyr337(Ala328) i Tyr338(Phe325) (u zagradi su navedene aminokiseline u kolinskom mjestu BChE, a izvan zagrade kod AChE). Uloga acilnog džepa je smještanje acilne grupe supstrata tijekom hidrolize ACh, određujući pritom njegovu orijentaciju prema katalitičkom serinu. U acilnom džepu AChE na položaju 295 i 297 nalaze se dva fenilalanina koji svojim obujmom ograničavaju vezanje supstrata većih od propionilkolina, dok se kod BChE u acilnom džepu nalaze manje alifatske aminokiseline Leu i Val (položaji 286 odnosno 288) zbog čega se smanjuje selektivnost BChE prema supstratima koje hidrolizira. Periferno mjesto AChE odgovorno je za alosterički mehanizam inhibicije AChE pri velikim koncentracijama acetilkolina, a čine ga Tyr72, Tyr124 i Trp286. Kod BChE se na odgovarajućim položajima nalaze alifatske aminokiseline Asn, Gln i Arg, zbog čega je otvor ždrijela kod BChE veći.⁵⁷



Slika 2.3. Shema aktivnog mjesta kolinesteraza s označenim domenama i pripadnim aminokiselinama te supstratom (ACh). Aminokiselinski sastav izvan zagrade odgovara onome u AChE, dok u zagradi odgovara BChE (izrađeno prema referenci 57).

Neovisno o razlikama u aminokiselinskom sastavu aktivnog mjesta, mehanizam hidrolize supstrata jednak je kod obiju kolinesteraza, a odvija se u tri koraka: nastajanje Michaelisova kompleksa, aciliranje enzima i njegovo deaciliranje vodom. Procesi aciliranja i deaciliranja odvijaju se preko tetraedarskoga prijelaznog stanja koje čine aktivni serin i supstrat. Tijekom procesa hidrolize nastaje intermedijer u kojemu se acilna grupa supstrata prenosi na serinski ostatak enzima, koji se regenerira deacilacijom (slika 2.4).⁵⁷



Slika 2.4. Mehanizam reakcije hidrolize supstrata katalizirane acetilkolinesterazom (izrađeno prema referenci 57).

Uz opisanu „klasičnu“ katalitičku aktivnost prema kolinskim supstratima, AChE i BChE imaju i druge uloge u organizmu. Istraživanja sugeriraju da oba enzima sudjeluju u regulaciji stanične diobe i rasta živčanog tkiva u procesu razvoja živčanog sustava. Pretpostavlja se da BChE sudjeluje i u metabolizmu lipida, čemu pridonosi otkriće da BChE može katalizirati lipolizu 4-metilumbeliferil (4-mu) palmitata pri fiziološkom pH (7,4).^{47,58} AChE pokazuje značajnu homologiju s proteinima stanične adhezije poput glutaktina, neurotaktina, gliotaktina iz *Drosophila melanogaster* te neurologina kod sisavaca što upućuje na mogućnost da AChE može djelovati i kao adhezijski protein. *In vitro* istraživanja pokazala su da AChE interagira s lamininom, proteinom izvanstaničnog matriksa koji regulira migraciju neuralnih prekursora u procesu razvoja mozga te usmjerenje i rast neurita.^{51,59} Aktivacija transkripcije *ACHE* gena u procesu aktivacije limfocita inducirane hemaglutininom sugerira da AChE ima ulogu u procesima hematopoeze.⁵¹

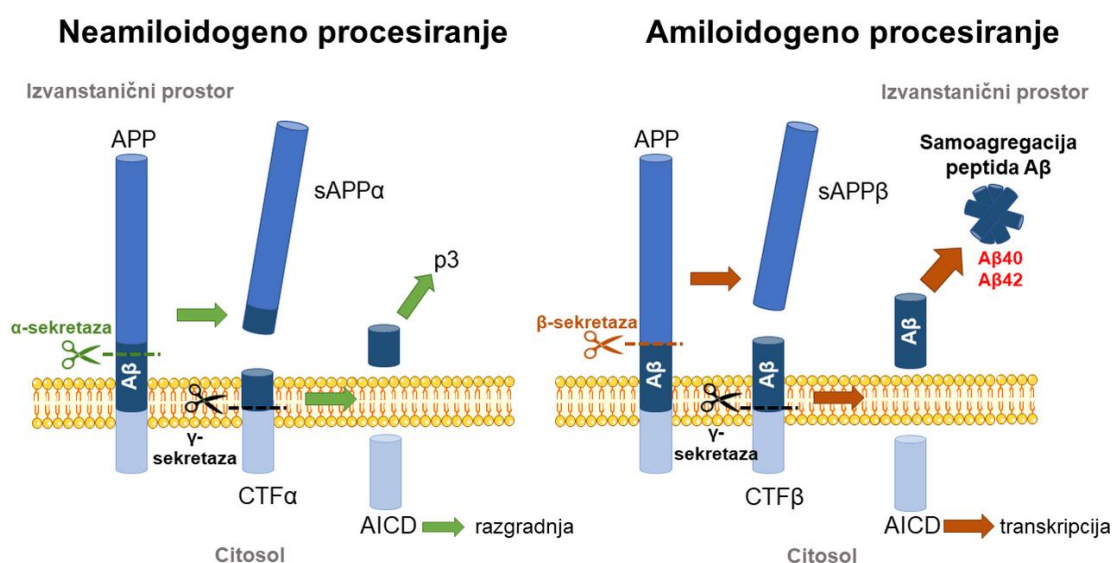
Kod osoba oboljelih od AB aktivnost AChE u mozgu progresivno opada s napretkom bolesti, te u pojedinim područjima mozga može doseći 10-15% normalne vrijednosti. S druge strane, aktivnost BChE se kod AB može povećati čak do 120% svoje normalne vrijednosti.⁶⁰ Međutim, unatoč smanjenju aktivnosti AChE, uočeno je da kod osoba oboljelih od AB dolazi do koncentriranja AChE unutar amiloidnih plakova i u njihovoj neposrednoj okolini. Također, u okolini amiloidnih plakova i neurofibrilarnih čvorova uočene su i povećane koncentracije BChE.^{47,60} AChE interagira s peptidima A β preko aminokiselinskog bočnog ogranka Trp279, koji se nalazi u perifernom mjestu AChE, što ubrzava agregaciju peptida. Pritom nastaju stabilni AChE-A β kompleksi što dovodi do promjene u enzimskim svojstvima same AChE, poput povećane otpornosti na niski pH i djelovanje inhibitora, zbog čega nastali kompleksi pokazuju snažniji neurotoksični učinak od samih amiloidnih fibrila.⁶¹ Istraživanja na ADTg transgeničnim miševima koji razvijaju amiloidne plakove u ranom stadiju života pokazala su da u amiloidnim plakovima postoji aktivnost BChE, primarno onima kod kojih dominiraju nefibrilarne strukture, sugerirajući da bi njena aktivnost mogla biti povezana s procesom „sazrijevanja“ plakova odnosno prijelaza iz nefibrilarne u fibrilarnu formu.⁶²

2.2.2. Uloga BACE1 i hipoteza amiloidne kaskade

Prema teoriji amiloidne kaskade, narušena ravnoteža između produkcije i uklanjanja topljivih peptida A β unutar neurona rezultira nastajanjem oligomera A β podložnih samoagregaciji i taloženju u izvanstaničnom prostoru neurona u mozga u obliku netopljivih plakova.⁶³ Za nastajanje peptida A β sklonih samoagregaciji odgovorno je hidrolitičko procesiranje prekursora amiloidnog proteina (engl. *amyloid precursor protein*, APP) enzimima β - i γ -sekretazom. Amiloidni plakovi predstavljaju konačni produkt β -amiloidne agregacije, a riječ je o velikim izvanstaničnim naslagama čije progresivno nakupljanje dovodi do niza patoloških stanja poput oštećenja sinapsi i neurona, oksidativnog stresa, poremećene homeostaze biometala, aktivacije kinaza te hiperfosforilacije proteina tau.⁶⁴

Razgradnja proteina APP odvija se neamiloidogenim (posredovanjem α -sekretaze) ili amiloidogenim (posredovanjem β -sekretaze) putem. Proteoliza APP-a α -sekretazom je najučestalija (90%) te rezultira nastankom topljivog odsječka sAPP α i transmembranskog odsječka CTF α (engl. *carboxy-terminal fragment*). Djelovanjem β -sekretaze (10%) nastaju sAPP β i CTF β fragmenti. CTF α i CTF β dalje se cijepaju djelovanjem γ -sekretaze. Cijepanjem CTF α nastaju topljivi peptidi p3 koji se otpuštaju u izvanstanični prostor, te AICD (engl. APP

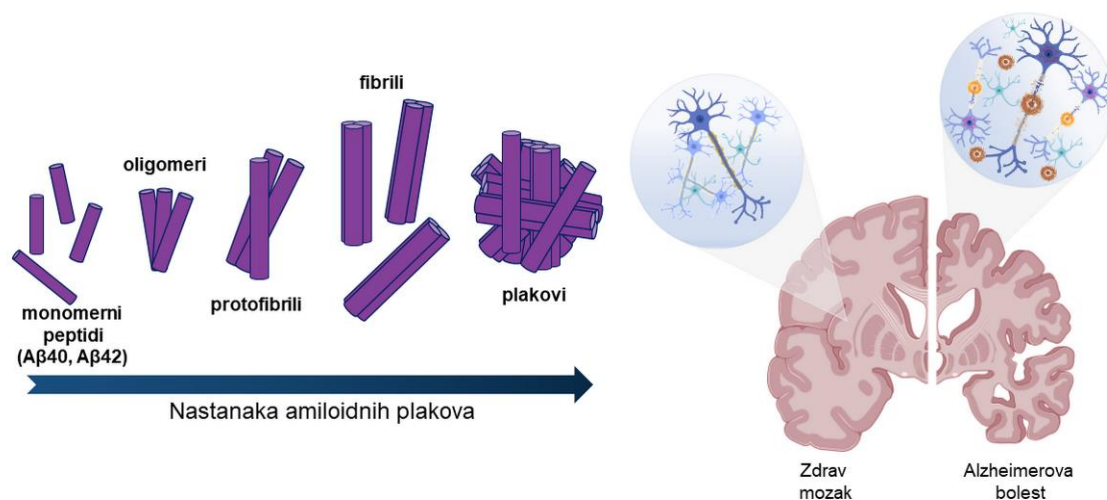
Intracellular Domain) koji se otpušta u unutarstanični prostor gdje je podložan razgradnji. S druge strane, cijepanjem CTF β nastaju peptidi A β različitih duljina, među kojima su najučestaliji oni od 40 aminokiselina (A β 40) te oni od 42 aminokiseline (A β 42), koji se nakon cijepanja otpuštaju u izvanstanični prostor, dok se fragment AICD otpušta u citoplazmu te se unosi u jezgru gdje vrši ulogu transkripcijskog faktora. Peptidi A β , za razliku od fragmenata nastalih neamiloidogenim putem, skloni su samoagregaciji.^{1,65–67} Proteolitička razgradnja proteina APP pomoću α -, β - i γ -sekretaza prikazana je na slici 2.5.



Slika 2.5. Neamiloidogeno i amiloidogeno procesiranje proteina APP. U slučaju neamiloidogenog procesiranja, prvi korak hidrolize katalizira α -sekretaza, pri čemu nastaju topljivi sAPP α te transmembranski CTF α odsječki. U sljedećem koraku γ -sekretaza razgrađuje CTF α fragment, pri čemu se u izvanstanični prostor otpušta fragment p3, dok se AICD otpušta u unutarstanični prostor. U slučaju amiloidogenog procesiranja, prvi korak razgradnje katalizira β -sekretaza (BACE1), prilikom čega nastaju topljivi sAPP β i transmembranski CTF β odsječki. Djelovanjem γ -sekretaze na CTF β u unutarstanični prostor se otpušta fragment AICD, dok se u izvanstanični prostor otpuštaju peptidi A β različitih duljina koji su podložni samoagregaciji (izrađeno prema referencama 65 – 67).

Peptidi A β nastaju u monomernom obliku, no njihovim nakupljanjem dolazi do međusobne agregacije u oligomerne forme (slika 2.6).^{1,65} Topljivi oligomeri A β izolirani iz ljudskog mozga su heterogenog sastava te uključuju vrste od dimera do dodekamera. Ovakvi mali oligomeri mogu utjecati na promjene u plastičnosti sinapsa te na morfologiju neurona, zbog čega pokazuju neurotoksično djelovanje. Protofibrili su intermedijeri u procesu agregacije monomernih A β peptida u netopljive fibrile i predstavljaju velike topljive agregate koji se akumuliraju u glija

stanicama i aktiviranim astrocitima u mozgu oboljelih od AB. Kao takvi utječu na razvoj upalnih procesa te poput oligomera narušavaju integritet i funkciju neurona. Fibrilne amiloidne strukture nastaju povezivanjem A β peptida u β -ploče putem vodikovih veza, a njihova topljivost ovisi o sastavu. U normalnim uvjetima amiloidogeni peptidi spontano agregiraju u amiloidne strukture, no u mikrookolini specifičnoj za AB, kao što je narušena homeostaza proteina te prisutnost slabo topljivih proteina, proces fibrilizacije je ubrzan. Prisutnost amiloidnih fibrila, kao i produkta njihovog udruživanja, netopljivih amiloidogenih plakova, uzrok je neurodegeneracije te razvoja neuroupalnih procesa.⁶⁵



Slika 2.6. Proces nastanka amiloidnih plakova. Peptidi A β u mozgu prisutni su u obliku monomera, oligomera, protofibrila, fibrila te u obliku netopljivih plakova.

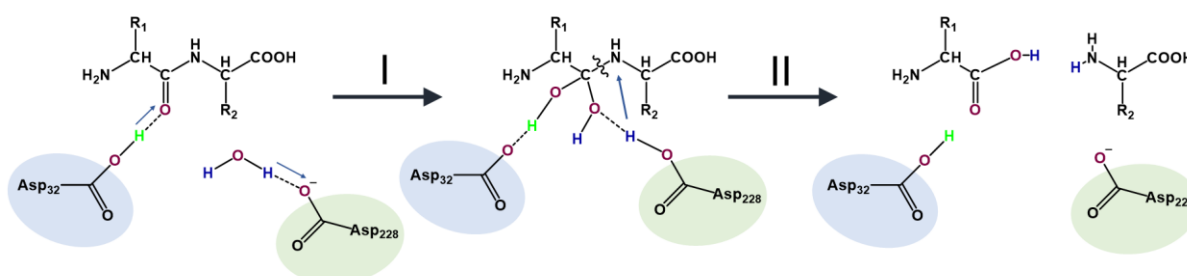
Također, postoje indicacije da nakupljanje peptida A β uzrokuje hiperfosforilaciju proteina tau i nastanak neurofibrilarnih čvorova. Proteini tau stabiliziraju stanične mikrotubule, no fosforilacijom se smanjuje njihova mogućnost vezanja na mikrotubule što može uzrokovati destabilizaciju neuronalnih citoskeleta.⁶⁸ Nekoliko je mogućih uzročnika hiperfosforilacije proteina tau koji se povezuju s nakupljanjem peptida A β . Peptidi A β aktiviraju nekoliko kinaza, među kojima su CDK5 (ciklin-ovisna kinaza 5) i GSK3 β (kinaza glikogen sintaze), dvije vodeće kinaze u fosforilaciji proteina tau. Također, akumulacija peptida A β uzrokuje aktivaciju stanica mikroglija i astrocita, što potiče otpuštanje proupalnih citokina, koji zatim stimuliraju kinaze i fosforilaciju proteina tau. Nadalje, peptidi A β mogu interagirati s proteasomom i na taj način inhibirati razgradnju proteina tau. Jedan mogući mehanizam pretpostavlja da peptidi A β aktivacijom kinaze GSK3 β prekidaju vezikularni prijenos tau mRNA i proteina, što rezultira pogrešnom lokalizacijom proteina tau.⁶⁸

Ideje o postojanju enzima odgovornog za pokretanje stvaranja peptida A β potekle su od otkrića iz sredine dvadesetog stoljeća da ljudi s Downovim sindromom (DS) razvijaju neuropatologiju sličnu onoj kod AB: nakupljanje amiloidnih plakova i neurofibrilarnih čvorova proteina p-tau u mozgu.⁶⁹ Prisutnost dodatne kopije kromosoma 21 kod osoba s DS-om uzrokuje genetsku neravnotežu i poremećenu ekspresiju proteina kodiranih iz gena na kromosomu 21.⁷⁰ Osamdesetih godina 20. stoljeća Glenner i Wong otkrili su da su proteini koji sačinjavaju cerebrovaskularne amiloidne fibrile kod ljudi s AB i DS strukturno gotovo identični, što je sugeriralo da bi amiloidni plakovi i kod AB i kod DS mogli biti rezultat istog genskog produkta.^{71,72} Hipoteza je potvrđena devedesetih godina kada je otkriveno da pacijenti s nasljednim cerebralnim krvarenjem s amiloidozom nizozemskog tipa (koju karakterizira taloženje amiloida u stijenkama moždanih žila) i pacijenti s nasljednom inačicom AB (familijalna AB, FAB) nose točkaste mutacije u *APP* genu koji se nalazi na kromosomu 21.^{73,74} Godine 1999. pet neovisnih skupina izvijestilo je o identifikaciji nove aspartične proteaze čijim djelovanjem na protein APP nastaju karakteristični amiloidni peptidi. Koristeći različite pristupe i/ili metode, sve skupine identificirale su enzim koji cijepa luminalnu domenu APP na β -mjestu i uzrokuje otpuštanje A β peptida i nazvale su ih β -sekretaza¹⁷, memapsin-2 (membranski usidrena aspartična proteaza)¹⁸, Asp2 (aspartična proteaza)^{19,20} ili BACE (enzim koji cijepa APP na β -mjestu).²¹

BACE1 je transmembranski protein tipa I koji se sastoji od *N*-terminalne domene usmjerene prema izvanstaničnom prostoru kada je enzim povezan sa staničnom membranom ili prema lumenu kada se nalazi u membrani endosoma, dok ostatak enzima čine transmembranska domena i kratka citosolna *C*-terminalna domena.^{75,76} BACE1 je u niskim koncentracijama eksprimirana u većini različitih tipova stanica, a najveće koncentracije ovog enzima nalaze se u neuronima, posebno u presinaptičkim završecima aksona.^{75,77} Kao član obitelji aspartičnih proteaza, BACE1 ima terciarnu strukturnu sličnu pepsinu.⁷⁸ Struktura BACE1 je bilobalna kao i kod pepsina, a koja se sastoji od dva režnja (nazvani *N*- i *C*-terminalni režnjevi) od kojih svaki daje po jedan katalitički aktivan aspartat (Asp32 i Asp228), oba smještena u pukotinu aktivnog mjesta između *N*- i *C*-terminalnih režnjeva.⁷⁹ Aktivno mjesto ljudske BACE1 sastoji se od jedanaest podjedinica: podjedinice S1 – S7 nazvane su *N*-terminalnim podjedinicama, a S1' – S4' *C*-terminalnim podjedinicama.⁸⁰ S obzirom na broj podjedinica koje ga čine, aktivno mjesto BACE1 je prostrano, a zbog činjenice da pojedine podjedinice ne pokazuju strogu specifičnost prema supstratu,⁸¹ BACE1 osim APP može prihvatiti veći broj supstrata. Tako BACE1 može

hidrolizirati i druge peptide kao što su β -podjedinica naponom kontroliranog natrijskog kanala (engl. *voltage-gated sodium channel β subunit*, VGSC β), β -galaktozid α -2,6-sijaliltransferaza 1 (ST6Gal-I), Sez6 (engl. *seizure protein 6*) i njegov homolog Sez6L (engl. *seizure 6-like protein*), PSLG-1 (engl. *P-selectin glycoprotein ligand-1*), proteini Notch signalnog puta JAG1 (engl. *Jagged 1*) i 2 (engl. *Jagged 2*), IL-1R2 (engl. *interleukin-1 receptor II*), glikoprotein 130 (gp130), protein stanične adhezije L1, CHL1 (engl. *close homolog of L1*) i neuregulin (NRG1).⁸²⁻⁹⁰

BACE1 cijepa svoje supstrate slijedeći opći dvostupanjski kiselinsko/bazni mehanizam hidrolize peptidne veze koji koriste druge aspartične proteaze. Prvi stupanj uključuje nukleofilni napad aktivirane molekule vode na karbonilnu grupu supstrata, što rezultira stvaranjem gem-diolnog intermedijera, dok u drugom stupnju dolazi do cijepanja peptidne veze.^{91,92} U prvom koraku Asp228 služi kao baza koja deprotonira vodu iz aktivnog mjesta i aktivira je za nukleofilni napad na karbonilni ugljikov atom, dok istovremeno Asp32 prenosi proton na karbonilnu grupu, služeći kao kiselina. U sljedećem koraku, Asp228 djeluje kao kiselina i protonira amidnu grupu, dok Asp32, djelujući kao baza, preuzima proton iz gem-diola što rezultira cijepanjem peptidne veze, stvaranjem produkata i regeneracijom enzima (slika 2.7).^{91,92}



Slika 2.7. Mehanizam hidrolize supstrata posredovan β -sekretazom (BACE1) (slika preuzeta iz reference 93).

Hipoteza amiloidne kaskade potaknula je potragu za mogućim inhibitorima nastanka peptida A β kao potencijalnim lijekovima za sprječavanje i usporavanje tijeka Alzheimerove bolesti. Godinama se tragalo za inhibitorom γ -sekretaze čije proteazno djelovanje na peptide CTF β rezultira nastankom amiloidnih peptida A β . No, zajednička osobina kandidata koji su ušli u klinička istraživanja kao inhibitori γ -sekretaze bila je njihova izrazita toksičnost kao posljedica brojnih fizioloških uloga γ -sekretaze, zbog čega njena inhibicija rezultira vrlo negativnim

posljedicama za organizam.⁹⁴ Naime, γ -sekretaza ima ulogu „housekeeping“ enzima koji uklanja brojne proteinske fragmente asocirane s membranama koji nastaju kao rezultat djelovanja membranskih proteaza poput α - i β - sekretaza, te sudjeluje u signalnom slijedu proteina Notch.⁹⁴ S druge strane, inhibicija BACE1 ne rezultira teškim posljedicama viđenima kod inhibicije γ -sekretaza. Delecija gena koji kodira β -sekretazu kod miševa rezultirala je značajnim smanjenjem razine $A\beta$, uz manje fenotipske abnormalnosti. Kod BACE1 *knockout* miševa nije uočen značajan negativan utjecaj na sposobnost učenja i pamćenja. Iako BACE1 ima ulogu u formaciji mijelinske ovojnice centralnih i perifernih živaca, ta aktivnost je uočena samo u prenatalnoj fazi te stoga inhibicija enzima ne bi trebala imati posljedice kod pacijenata starije životne dobi.⁹⁴ Zbog navedenih prednosti nad γ -sekretazom, i činjenicom da je upravo djelovanje BACE1 limitirajući korak za nastanak peptida $A\beta$,⁹⁵ sintetizirani su brojni inhibitori BACE1, od čega je nekolicina ušla u kliničke faze istraživanja za liječenje AB.⁹⁶ Međutim, nijedan inhibitor BACE1 nije odobren kao lijek za AB jer klinička istraživanja nisu rezultirala značajnim poboljšanjem kognitivnih sposobnosti, a u nekim slučajevima došlo je čak do pogoršanja te neželjenih učinaka poput anksioznosti i depresije kao moguće posljedice poremećene hidrolize drugih supstrata BACE1. Ipak, rješenje ovoga problema moglo bi biti u korištenju liganada koji djelomično inhibiraju BACE1 kako bi se izbjeglo potpuno zaustavljanje njenih funkcija. Podršku ovoj ideji daje činjenica da heterozigotni *BACE1*^{+/-} miševi, kod kojih je proizvodnja BACE1 enzima u organizmu smanjena na pola, imaju znatno manje amiloidnih nakupina od normalnih miševa, a proces mijelinizacije i struktura hipokampusu im nisu narušeni.⁹⁷ Nadalje, kod osoba s A673T mutacijom u *APP* genu („islandski“ tip), procesiranje APP od strane BACE1 smanjeno je za 30%, bez drugih posljedica na organizam.⁹⁸ Stoga bi inhibicija BACE1 do 50% njezine normalne vrijednosti mogla predstavljati obećavajući pristup liječenju AB u ranom stadiju demencije s ciljem usporavanja nakupljanja amiloida.⁹⁷

2.2.3. Uloga oksidacijskog stresa i biometala kod nastanka i razvoja AB

Oksidacijski stres je metaboličko stanje organizma koje nastaje kao posljedica prekomjerne proizvodnje i akumulacije reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), među kojima su najučestaliji superoksidni radikali ($O_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikali ($\cdot OH$), singletni kisik (1O_2) i radikali dušikovog oksida ($NO^{\cdot}$). ROS-ovi primarno nastaju u mitohondriju stanice kao nusprodukti procesa metabolizma kisika, a poremećajem

ravnoteže između njihove proizvodnje i razgradnje djelovanjem antioksidacijskih obrambenih mehanizama (superoksid-dismutaza (SOD), katalaza i glutathion-peroksidaza) dolazi do povećanja koncentracije ROS-ova u stanicama.⁹⁹ Superoksidni radikali nastaju kao posljedica rada nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat oksidaze (NADPH), ksantin oksidaze i peroksidaza, a uključeni su u procese u kojima nastaju vodikov peroksid, hidroksilni radikali, peroksinitrit (ONOO^-) i hipoklorna kiselina (HOCl). Vodikov peroksid je produkt djelovanja raznih oksidaza, a u reakciji sa superoksidnim radikalom, uz Fe^{2+} ili Cu^+ kao katalizator, kao produkt daje hidroksilne radikale (Fentonova reakcija), koji su ujedno najreaktivniji slobodni radikali *in vivo*. Radikali dušikovog oksida produkt su reakcije oksidacije arginina u citrulin uz sintazu dušikovog oksida (NOS). ROS-ovi nastaju kao posljedica endogenih procesa, poput aktivacije imunskih stanica, infekcija, pretjerane tjelovježbe ili starenja, ali mogu nastati i djelovanjem egzogenih uzročnika poput teških metala (Cd, Hg, Pb, Fe, As), lijekova, kemijskih otapala, dima cigareta i alkohola.⁹⁹ Treba napomenuti da je niska, odnosno normalna razina ROS-ova važna za održavanje normalnih bioloških funkcija kao što su sinteza staničnih struktura i obrana od invazivnih patogenih mikroba, pri čemu se ističe uloga NO kao signalne molekule koja regulira protok krvi, sprječava trombozu te posreduje u održavanju normalne neuralne aktivnosti. Prekomjerno nakupljanje ROS-ova uzrokuje oksidacijski stres koji rezultira oštećenjem stanične membrane i lipoproteina, konformacijskim i strukturnim promjenama u proteinima, poremećajem rada enzima te oštećenjima DNA koja mogu uzrokovati mutacije. Navedene promjene uzročnik su raznih bolesti poput raka i degenerativnih bolesti, a mogu ubrzati i proces starenja.⁹⁹

Kod osoba oboljelih od AB prisutna su značajna oštećenja u mozgu koja su posljedica oksidacijskog stresa. Naime, uočeno je da su kod osoba oboljelih od AB aktivnosti glutaminsintetaze i kreatin-kinaze značajno smanjene, što rezultira povećanjem koncentracije glutamata i prekomjernom ekscitacijom, odnosno smanjenim energetskeg metabolizmom. Također, oksidacijski stres kod AB povezuje se i s prekomjernim nakupljanjem amiloidnih naslaga i neurofibrilarnih čvorova.⁸ Tako je u uvjetima oksidacijskog stresa ekspresija BACE1 povećana, kao i aktivnost γ -sekretaze, što dovodi do pojačanog amiloidogenog procesiranja proteina APP i proizvodnje peptida A β koji potiču nastanak ROS-ova u mitohondriju te sprječavaju njihovo uklanjanje.¹⁰⁰ Također, u uvjetima oksidacijskog stresa uočena je pojačana fosforilacija proteina tau kao rezultat pojačane aktivnosti kinaza i smanjene aktivnosti fosfataza, čime se

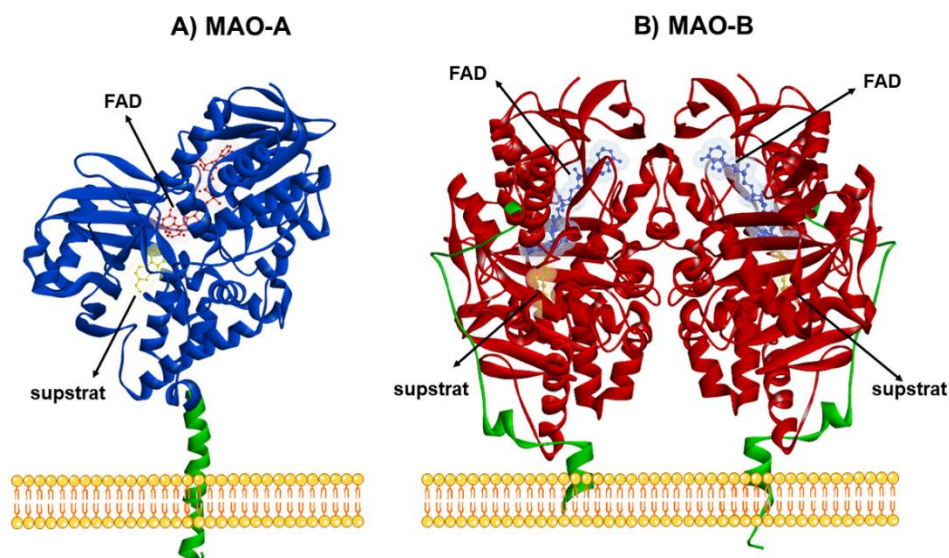
narušava regulacija fosforilacije proteina tau te naposljetku dovodi do nastanka neurofibrilarnih čvorova.¹⁰¹

Oksidacijski stres, taloženje amiloidnih plakova i nakupljanje neurofibrilarnih čvorova povezani su i s poremećajima homeostaze biometala u mozgu. Istraživanja pokazuju da se koncentracija željeza u mozgu s godinama povećava kao posljedica starenja, što dovodi do prekomjerne proizvodnje ROS-ova budući da željezo djeluje kao katalizator Fentonove reakcije.⁷ Željezo se može vezati na APP mRNA te na taj način poticati ekspresiju proteina APP.⁷ Nadalje, peptidi Aβ₄₂ akumuliraju Fe³⁺ unutar amiloidnih agregata što rezultira redukcijom Fe³⁺ i akumulacijom redoks-aktivnog Fe²⁺.¹⁰² Fe²⁺ pokazuje veliki afinitet za vezanje Aβ peptida *in vitro*, čime potiče njihovu oligomerizaciju, što objašnjava prisutnost povećanih koncentracija željeza u amiloidnim nakupinama kod oboljelih.⁷ Željezo sudjeluje i u nastanku neurofibrilarnih čvorova budući da aktivira kinaze CDK5 i GSK3β koje fosforiliraju protein tau.⁷ Poput željeza, povećane koncentracije bakra također ubrzavaju Fentonovu reakciju i nastanak ROS-ova. Bakar može interagirati s peptidima Aβ potičući njihovu oligomerizaciju, te aktivirati kinaze koje fosforiliraju protein tau. Unatoč oprečnim izvještajima da je ukupna koncentracija bakra u mozgu oboljelih od AB smanjena, a u cerebrospinalnoj tekućini jednaka kod oboljelih i zdravih osoba, u amiloidnim plakovima uočene su povećane koncentracije bakra što može značiti da se taloženjem bakra unutar plakova smanjuje njegovo prisustvo u regijama mozga u kojima plakovi nisu prisutni.⁷ Cink je esencijalni biometal koji, osim što služi kao kofaktor brojnih enzima i proteina, može služiti kao regulator stanične signalizacije i sinaptičke plastičnosti. Nedostatak cinka u sinapsama utječe na razvoj mozga, te može uzrokovati simptome depresije i poremećaje učenja i pamćenja. S druge strane, povećana koncentracija cinka utječe na proces oksidacijske fosforilacije u mitohondrijima, čime uzrokuje poremećaj rada mitohondrija te nastanak ROS-ova. Pokazano je da cink veže histidinske aminokiselinske ostatke C-terminalnog kraja peptida Aβ čime potiče njihovu agregaciju. U usporedbi sa željezom i bakrom, cink pokazuje najveći afinitet za vezanje peptida Aβ. Toksičnost peptida Aβ povećava se vezanjem cinka. Nastajanjem Zn-Aβ kompleksa smanjuje se koncentracija cinka u sinaptičkoj pukotini što remeti staničnu signalizaciju te pridonosi poremećaju kognitivnih funkcija kod oboljelih od AB. Uz navedeno, cink regulira aktivnost γ-sekretaze na način da pojačava njenu ekspresiju, ali djeluje inhibitorno na njenu aktivnost. Također, cink aktivira kinaze koje fosforiliraju protein tau.⁷ Značajnu ulogu u mozgu također imaju i mangan, kalcij i magnezij. Mangan služi kao kofaktor superoksid-dismutaze i glutamin-sintetaze, a

povećane koncentracije mangana povezane su s povećanjem koncentracija peptida Aβ. Magnezij je u mozgu i serumu oboljelih od AB prisutan u smanjenim koncentracijama u odnosu na zdrave osobe, dok su koncentracije kalcija povećane. Povećana koncentracija kalcija pojačava ekspresiju proteina APP i potiče fosforilaciju proteina tau. Suprotno tome, povećane koncentracije magnezija u mozgu uzrokuju smanjenje koncentracije BACE1 te inhibiciju fosforilacije proteina tau posredovane kinazom GSK3β, što sugerira da magnezij potencijalno vrši neuroprotektivnu ulogu prilikom razvoja AB.⁷

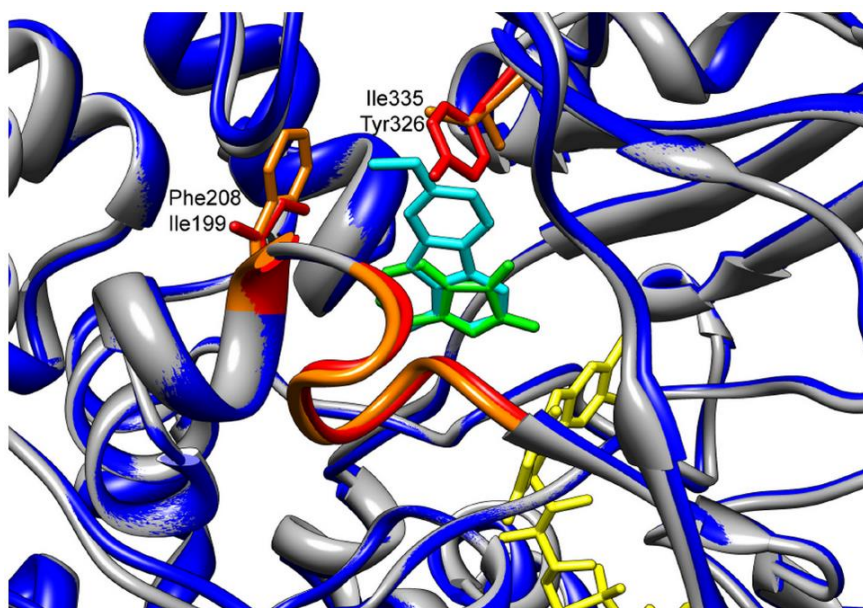
2.2.4. Uloga monoamin-oksidaza A i B

Monoamin-oksidaze A i B (MAO-A i MAO-B) su enzimi iz skupine oksidoreduktaza (EC 1.4.3.4) koji kataliziraju prvenstveno oksidaciju primarnih amina poput neurotransmitera dopamina, norepinefrina, epinefrina, serotonina i feniletilamina, te u manjoj mjeri nekih sekundarnih amina. U stanicama se nalaze vezani na vanjsku membranu mitohondrija.¹⁰³ Većina ljudskih tkiva i organa, uključujući i mozak, ekspirira oba enzima, ali u pojedinim tkivima ekspresija je specifična. Tako u placenti je ekspimirana prvenstveno MAO-A, dok trombociti i leukociti ekspimiraju samo MAO-B. Koncentracije MAO-B veće su u mozgu odraslih ljudi u odnosu na fetalni mozak. Kod odraslih, oba enzima ekspimirana su u istim regijama, prvenstveno u čeonom režnju.¹⁰⁴ Koncentracije MAO enzima u pojedinim tkivima povećavaju se starenjem, pa se tako ekspresija MAO-B u mozgu povećava 3 do 4 puta, dok se ekspresija MAO-A povećava oko 6 puta u srcu, što upućuje da je povećana ekspresija MAO enzima povezana s bolestima koje se razvijaju starenjem.¹⁰³ MAO enzimi su flavoenzimi koji kao kofaktor koriste flavin adenin dinukleotid (FAD). Iako dijele oko 70% sličnosti u primarnoj strukturi, MAO-A i MAO-B se razlikuju u specifičnosti prema supstratima i inhibitorima, pa tako MAO-A preferira veće amine poput epinefrina, norepinefrina i serotonina, a MAO-B preferira manje supstrate poput feniletilamin i benzilamina, dok oba enzima oksidiraju tiramin i dopamin.⁹ Generalna struktura oba enzima sastoji se od domene s veznim mjestom za FAD, domene s veznim mjestom za supstrat te domene koja veže membranu. Obje forme ljudskih MAO enzima u otopini su prisutne u obliku dimera, no MAO-A kristalizira u monomernom obliku (slika 2.8).¹⁰⁵



Slika 2.8. Struktura ljudskih enzima MAO-A (PDB kod: 2Z5X¹⁰⁶) i MAO-B (PDB kod: 1GOS¹⁰⁷). A) Struktura MAO-A enzima. Membranska domena enzima prikazana je zelenom bojom, dok je ostatak enzima prikazan plavom bojom. Kofaktor FAD prikazan je crveno, dok je supstrat/inhibitor prikazan žuto, svaki u odgovarajućoj veznoj domeni. B) Struktura MAO-B enzima. Membranska domena prikazana je zelenom bojom, a ostatak enzima crvenom bojom. Kofaktor FAD prikazan je plavom bojom, a supstrat/inhibitor žutom, svaki u odgovarajućoj veznoj domeni.

Vezno mjesto za supstrat kod oba enzima je pretežito hidrofobno te ga većinski čine aromatske i alifatske aminokiseline. Vezno mjesto za supstrat kod ljudske MAO-A ima volumen od oko 400 Å³, dok se kod MAO-B između površine proteina i veznog mjesta nalazi manja hidrofobna „ulazna šupljina“, koja se rotacijom izoleucina (Ile199) može stopiti s veznim mjestom u veću šupljinu od otprilike 700 Å³. Kod MAO-A, na mjestu spomenutog izoleucina nalazi se fenilalanin (Phe208). Različita selektivnost prema supstratima i inhibitorima je u velikoj mjeri posljedica razlike u aminokiselinama Ile335 kod MAO-A odnosno Tyr326 kod MAO-B (slika 2.9).¹⁰⁵



Slika 2.9. Superpozicija aktivnih mjesta humanih enzima MAO-A (PDB kod: 2Z5X¹⁰⁶) i MAO-B (PDB kod: 1OJA¹⁰⁸) u kompleksima s inhibitorima harminom i izatinom, redom. MAO-A prikazan je sivom bojom, a Phe208, aminokiseline na pozicijama 210 – 216 i Ile335 prikazani su narančastom bojom; inhibitor harmin prikazan je cijan plavom bojom. MAO-B prikazan je plavom bojom, a Ile199, aminokiseline na pozicijama 201 – 206 i Tyr326 prikazani su crvenom bojom; inhibitor izatin prikazan je zelenom bojom. Kofaktor FAD prikazan je žutom bojom. Prikazana superpozicija ističe razlike u aminokiselinskom sastavu aktivnog mjesta koje utječu na specifičnost prema supstratu te očuvanu strukturu petlje (crveno i narančasto) (preuzeto iz reference 105).

S obzirom na njihovu važnu ulogu u metabolizmu neurotransmitera, poremećaji rada MAO enzima povezani su s poremećajima ponašanja koji se povezuje s metabolizmom serotonina, hormona koji kontrolira ponašanje, a u koji je uključena MAO-A.^{109,110} Točkasta mutacija u genu *MAO-A* (zamjena kodona za glutamin u stop-kodon na poziciji 296) rezultira deficijencijom MAO-A enzima te se kod ljudi povezuje s agresivnim ponašanjem i blagim intelektualnim poteškoćama (Brunnerov sindrom). S druge strane, istraživanje Meyera i suradnika otkrilo je povećane koncentracije MAO-A enzima u mozgu osoba s neliječenom depresijom, sugerirajući da je upravo prekomjerna aktivnost MAO-A odgovorna za smanjene koncentracije monoaminskih neurotransmitera kod oboljelih od depresije.¹¹¹ Posebno se ističe uloga MAO enzima pri liječenju Parkinsonove bolesti (PB). PB je kronična neurodegenerativna bolest koju karakterizira nakupljanje „Lewyjeva tjelešca“ u neuronima (proteinskih agregata primarno sačinjenih od α -sinukleina) te propadanje dopaminergičnih neurona i, posljedično, smanjene koncentracije dopamina. Simptomi PB uključuju motoričke poremećaje poput usporenosti pokreta, tremora i ukočenosti mišića te nemotoričke poremećaje poput poremećaja

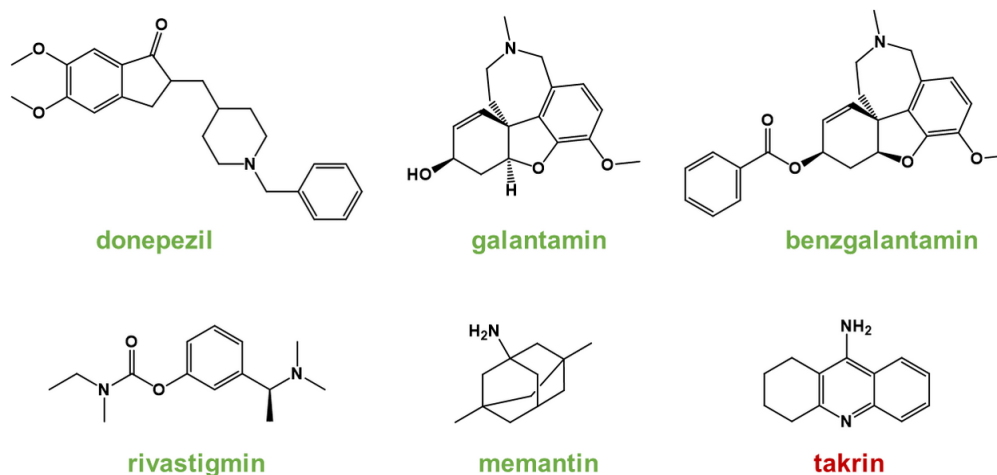
spavanja i depresije. MAO-A i MAO-B su oba zadužena za metabolizam dopamina: MAO-A metabolizira dopamin u presinaptičkim neuronima, dok MAO-B oksidira dopamin u sinaptičkoj pukotini i glija stanicama. Budući da se MAO-B pretežno nalazi u glija stanicama čiji broj starenjem raste, pa tako i aktivnost MAO-B, upravo je selektivna inhibicija MAO-B princip djelovanja nekoliko simptomatskih lijekova za PB (selegilin, rasagilin i safinamid).¹¹²

Kod AB, povećana aktivnost MAO enzima prvenstveno se povezuje s nastankom ROS-ova i oksidacijskim stresom te poremećajima u koncentraciji monoaminskih neurotransmitera što uzrokuje kognitivne disfunkcije kod oboljelih.⁹ Aktivnost MAO-A povećana je u kortikalnim uzorcima mozga oboljelih od AB gdje se povezuje s depresijom koja se učestalo pojavljuje uz AB,¹¹³ i u cingulatnom korteksu oboljelih gdje njena povećana aktivnost pozitivno korelira s prisutnošću amiloidnih plakova i neurofibrilarnih čvorova u navedenom području.¹¹⁴ Aktivnost MAO-B enzima povećana je i u kortikalnim i u hipokampalnim uzorcima mozga oboljelih od AB, i to u astrocitima i neuronima.^{113,115} Također, prisutnost MAO-B utječe na proizvodnju A β 42 peptida, odnosno prekomjerna ekspresija MAO-B aktivira γ -sekretazu i procesiranje njenog supstrata, C99, što rezultira povećanom proizvodnjom A β 42.¹¹⁵ Iz navedenih razloga, inhibicija MAO enzima smatra se potencijalnim terapijskim pristupom pri dizajnu lijekova za AB.

2.3. Liječenje Alzheimerove bolesti

Američka uprava za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) trenutno odobrava primjenu sedam lijekova za liječenje AB koji su podijeljeni u dvije kategorije: lijekove koji djeluju na simptome bolesti i lijekove koji djeluju na razvoj/tijek bolesti.¹¹ Lijekovi koji djeluju na simptome bolesti s ciljem ublažavanja i usporavanja posljedica kognitivnih poremećaja razvijenih kod oboljelih osoba uključuju reverzibilne inhibitore AChE donepezil, galantamin i njegov prolijeke benzgalantamin te neselektivni inhibitor AChE/BChE rivastigmin, čije djelovanje je posljedica karbamoilacije katalitičkog serina te spore disocijacije karbamoilnog derivata, radi čega se smatra pseudo-ireverzibilnim inhibitorom kolinesteraza.^{11,116} Prvi lijek za liječenje AB koji je FDA odobrila 1993. godine, takrin, također je pripadao skupini kolinesteraznih inhibitora, ali je zbog hepatotoksičnosti 2013. godine povučen s tržišta.¹² Među lijekove koji djeluju simptomatski spada još i memantin koji djeluje kao antagonist NMDA receptora odnosno regulator glutamatergične neurotransmisije.^{11,12} FDA

također odobrava kombiniranu terapiju u obliku lijeka pod trgovačkim nazivom *Namzaric* kojeg čine određene doze memantina i donepezila.¹¹ Strukture simptomatskih lijekova prikazane su na slici 2.10.



Slika 2.10. Strukture lijekova koji djeluju na simptome AB odobreni za uporabu od strane FDA. Lijekovi donepezil, galantamin, benzgalantamin i rivastigmin djeluju kao inhibitori kolinesteraza, dok memantin djeluje kao antagonist NMDA receptora. Takrin, kolinesterazni inhibitor i prvi lijek ove vrste povučen je s tržišta 2013. godine zbog toksičnog učinka na jetru.

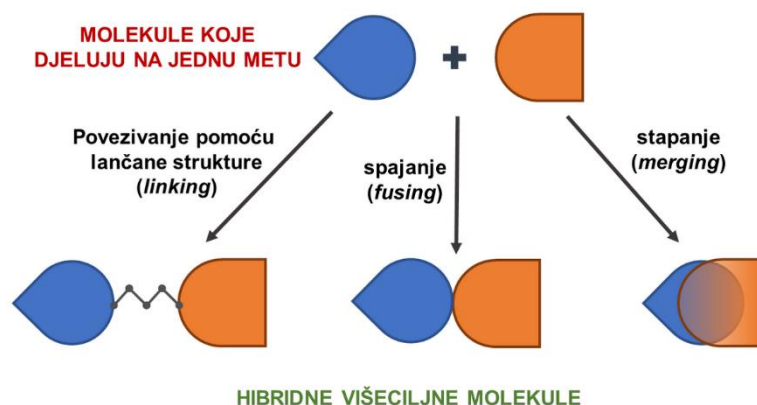
U lijekove koji djeluju na razvoj i tijek AB spadaju monoklonalna antitijela koja se koriste u anti-amiloidnoj terapiji, a usmjerena su na uklanjanje amiloidnih struktura te sprječavanje njihove agregacije i taloženja u mozgu.¹¹ Prvi lijek ove vrste, aducanumab, odobren je od strane FDA-a 2021. godine. Riječ je o rekombinantnom ljudskom antitijelu koje veže aminokiseline (3 – 7) peptida A β i koji se preferirano veže na fibrilne amiloidne strukture u odnosu na protofibrile i oligomere.¹³ Radi se o lijeku koji Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) nije odobrila za područje Europske Unije. Početkom 2024. aducanumab je povučen s tržišta od strane proizvođača uz obrazloženje da je razvoj drugih lijekova prioritet.¹¹⁷ Preostala dva antitijela s anti-amiloidnim učinkom koja su trenutno odobrena od strane FDA-a i EMA-e su lecanemab (trgovački naziv *Leqembi*), koji se preferirano veže na topljive oblike A β (oligomere i protofibrilne strukture) i na taj način smanjuje taloženje plakova u mozgu, i donanemab (trgovački naziv *Kisunla*), koji se ciljano veže na amiloidne peptide koji sadrže piroglutamat (učestala modifikacija kod peptida A β sadržanih u plakovima) potičući tako uklanjanje plakova iz mozga. Oba lijeka primjenjuju se u obliku intravenozne terapije.^{11–14} Budući da anti-amiloidna terapija može razviti nuspojave povezane s abnormalnostima nakupljanja amiloida (engl. *Amyloid Related Imaging*

Abnormalities, ARIA), poput glavobolje, mučnina i oticanja moždanih regija, njezina uporaba s tim u skladu je strože kontrolirana i ograničena na manji broj AB pacijenata.^{11,12}

Jedan od glavnih nedostataka svih navedenih lijekova je činjenica da svi djeluju na jednu specifičnu metu AB, ili na simptome ili na jedan od uzročnika bolesti, što ograničava djelotvornost terapije s obzirom na složenu patofiziologiju AB.

2.3.1. Višeciljni lijekovi

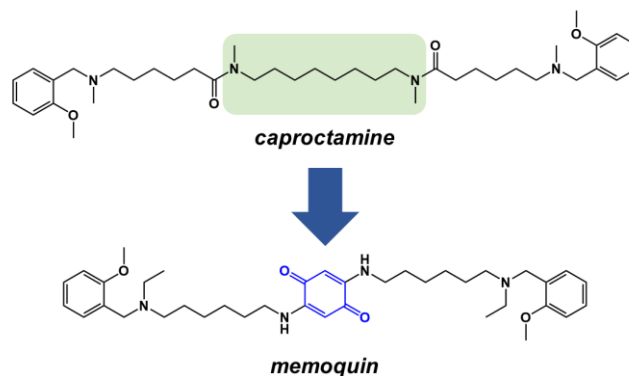
Kako bi se pokušao riješiti problem ograničenog djelovanja trenutno odobrenih lijekova za AB, osmišljen je koncept višeciljnih lijekova (engl. *Multitarget-directed ligands*, MTDL). Riječ je o molekulama koje u svojoj strukturi sadrže dva ili više farmakofora različitog biološkog djelovanja koje mogu istovremeno djelovati na više različitih meta bolesti.^{15,16} Dva su glavna pristupa dizajnu višeciljnih lijekova: prenamjena postojećih lijekova na način da se istraže učinci farmakofora poznatog djelovanja na druge još neistražene mete, te dizajn lijekova baziran na određenoj meti, pri čemu se razvijaju hibridne molekule kombinacijom farmakofora poznatih specifičnih aktivnosti, što rezultira molekulom višeciljnog djelovanja.¹⁶ Na ovaj način izbjegava se istovremena primjena više različitih lijekova, takozvanih „koktela lijekova“, koja je često ograničena problemima poput različitih farmakokinetičkih profila pojedinih lijekova, vremenskog i kvantitativnog reguliranja njihovih doza te mogućim nepovoljnim interakcijama između pojedinih lijekova.¹¹⁸ Pri dizajniranju hibridne višeciljne molekule koriste se tri glavne strategije: 1) povezivanje pojedinih farmakofora (engl. *linking*) pomoću lančane strukture, pri čemu konačna (konjugirana) molekula sadrži očuvane strukture pojedinih farmakofora; 2) spajanje farmakofora (engl. *fusing*), čime se dobiva molekula koja sadrži glavninu originalnih struktura polaznih farmakofora; te 3) stapanje farmakofora (engl. *merging*) koje rezultira molekulom čija struktura sadrži fragmente polaznih farmakofora (slika 2.11). Pritom je važno da su aktivnosti pojedinih farmakofora balansirane, odnosno da su njihovi kinetički parametri i aktivnosti te afiniteti prema njihovim ciljevima istog reda veličine, kako bi konačni lijek pokazao višestruke učinke pri dozi koja je sigurna za organizam.^{15,16,118}



Slika 2.11. Princip dizajna hibridnih višeciljnih molekula povezivanjem farmakofora koji djeluju na pojedinačnu metu pomoću lančane poveznice (engl. *linking*), njihovim spajanjem (engl. *fusing*) ili stapanjem (engl. *merging*).¹⁵

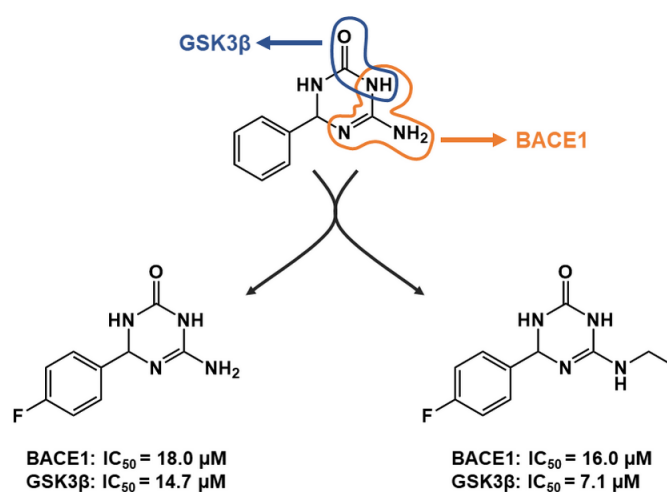
Povezivanje lijekova ili farmakofora može se ostvariti ili kovalentnom vezom koja je podložna metaboličkoj razgradnji, što je osnova dizajna kolijekova (engl. *codrugs*), ili povezivanjem farmakofora stabilnom vezom koja nije podložna biorazgradnji. Kod kolijekova, povezivanje polaznih postojećih lijekova kovalentnom poveznicom dovodi do njihove inaktivacije, a da bi došlo do njihove aktivacije potrebno je da se u organizmu odviju enzimske biotransformacije. Ovim načinom sintetizirani su konjugati ibuprofena i lipoične kiseline koji pokazuju neuroprotektivno i antioksidacijsko djelovanje kao i sposobnost inhibicije akumulacije peptida A β 40 u mozgu, konjugati takrina i silibinina koji, uz sposobnost inhibicije kolinesteraza, pokazuju hepatoprotektivno djelovanje te konjugati ibuprofena i glutathiona koji djeluju protuupalno i posjeduju antioksidacijska svojstva. Navedeni kolijekovi istraživani su u *in vivo* modelima kao potencijalni tretmani za AB.¹¹⁹ Povezivanjem farmakofora stabilnom vezom koja nije podložna enzimskoj razgradnji nastaju hibridne molekule koje u organizmu djeluju na više meta u svom cjelovitom obliku.^{118,119} Takav primjer je konjugat memagal, nastao povezivanjem memantina i galantamina, koji je pokazao *in vitro* inhibitornu aktivnost prema AChE u nanomolarnim koncentracijama i sposobnost vezanja na NMDA receptore u mikromolarnim koncentracijama.¹⁵ Nedostatak konjugiranih višeciljnih lijekova je da često imaju veliku molekulsku masu (> 500 Da), što može smanjiti njihovu bioraspoloživost u organizmu.^{15,120} S druge strane, spajanjem ili stapanjem farmakofora značajno se smanjuje molekulska masa konačne molekule u odnosu na one nastale povezivanjem. Jedan od prvih potencijalnih višeciljnih lijekova dizajniran i sintetiziran ovakvim pristupom je *memoquin*, kod kojeg je u strukturu poliaminamidnog *caproctamina* (AChE inhibitor i antagonist muskarinskih

M₂ receptora) inkorporiran 1,4-benzokinon, što je rezultiralo molekulom koja uz navedene aktivnosti posjeduje i antioksidacijska svojstva te sposobnost inhibicije BACE1 i samoagregacije peptida A β (slika 2.12.).¹²¹



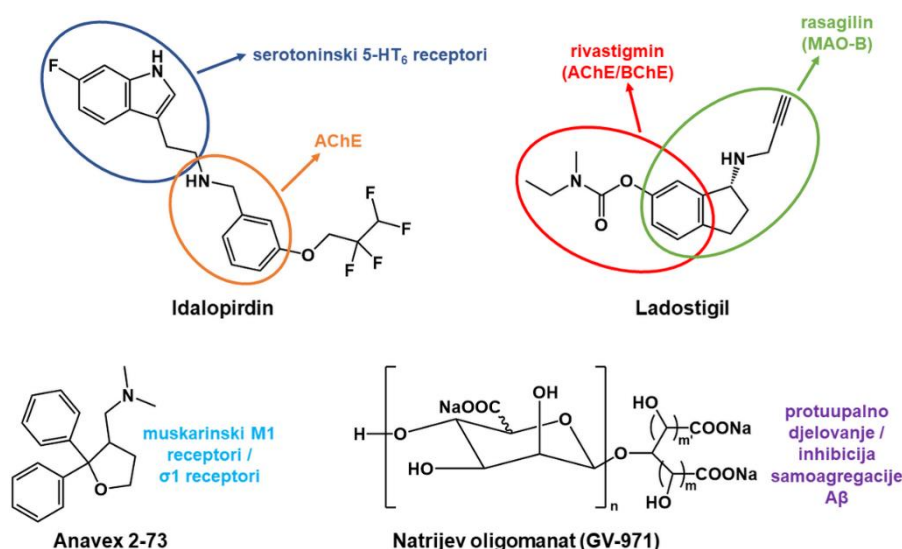
Slika 2.12. Dizajn višeciljnog lijeka *memoquina* spajanjem strukture inhibitora i antagonista muskarinskih M₂ receptora *caproctamina* i 1,4-benzokinona.¹²¹

Sličnim principom dizajnirani su hibridi kolinesteraznog inhibitora donepezila i derivata 8-hidroksikinolina koji djeluju kao kelatori biometala Cu²⁺ i Zn²⁺. Takve hibridne molekule uz navedena svojstva pokazale su i sposobnost inhibicije amiloidne samoagregacije.¹⁵ Strategija pretrage aktivnosti malih molekulskih fragmenata (engl. *fragment-based drug discovery*) također je atraktivan pristup dizajnu višeciljnih lijekova, jer mali fragmenti predstavljaju pogodnu polaznu točku u razvoju novih lijekova budući da često pokazuju višestruku biološku aktivnost. Ovakvim pristupom dizajnirani su triazinonski derivati koji objedinjuju gvanidinsku strukturu, koja djeluje inhibitorno prema BACE1, te ciklički amid, koji inhibira kinazu GSK3 β (slika 2.13).¹⁵



Slika 2.13. Dizajn dualnog inhibitora BACE1 i GSK3 β principom stapanja farmakofornih struktura gvanidina i cikličkog amida. (prilagođeno iz reference 15)

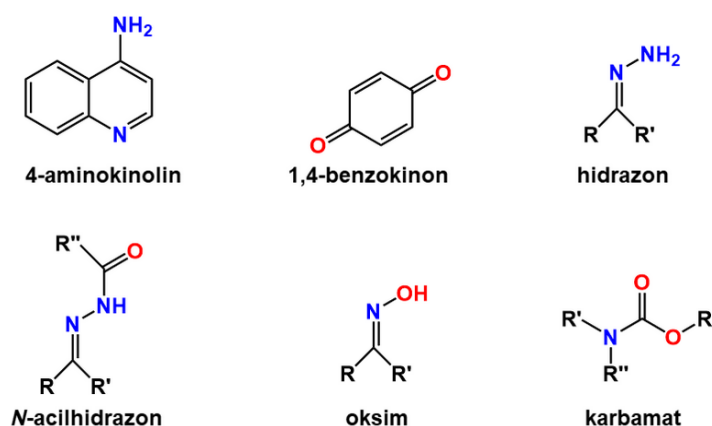
Nekoliko višeciljnih lijekova ušlo je u klinička ispitivanja za liječenje AB. Idalopirdin (slika 2.14.) dizajniran je kombinacijom triptamina (antagonist serotoninskih 5-HT₆ receptora) i benzilamina (inhibitor AChE), i u kliničkim istraživanjima je korišten kao dio kombinatorne terapije koja je uključivala i donepezil. Ladostigil (slika 2.14.) je hibridna molekula MAO inhibitora rasagilina i karbamatne strukture AChE inhibitora rivastigmina. U kliničkim ispitivanjima korišten je kao lijek za oboljele od AB koji pate od poremećaja kretnji i depresije. Iako oba lijeka nisu zadovoljila primarne ciljeve ispitivanja, predstavljaju uspješnu translaciju kemijskog i biološkog koncepta višeciljnih lijekova u klinička istraživanja. Anavex 2-73 (slika 2.14.) je mala molekula koja se veže na muskarinske i $\sigma 1$ receptore koji reguliraju signalizaciju posredovanu kalcijem te su uključeni u proces stvaranja dugoročnih sjećanja. *In vivo* istraživanja na miševima pokazala su da Anavex djeluje kao agonist muskarinskih M₁ receptora te da poništava amnestičko djelovanje antimuskarinskog lijeka skopolamina.^{16,119} Također se pretpostavlja da kao stimulator M₁ receptora može smanjiti aktivnost BACE1 i stvaranje peptida A β , budući da je pokazano da M₁ receptori mogu interagirati s BACE1 i posredovati u njenoj degradaciji.¹²² Rezultati istraživanja faze IIb/III kliničkih ispitivanja objavljeni 2025. godine govore u prilog blagotvornom djelovanju Anavex 2-73 na kognitivne sposobnosti oboljelih od AB.¹²³ Najneobičniji u ovoj skupini lijekova je natrijev oligomanat (GV-971) (slika 2.14.), dobiven ekstrakcijom iz morske alge *Ecklonia kurome*, koji je trenutno uvjetno odobren kao lijek za AB u Kini. Primarno djelovanje ovog lijeka je sprječavanje crijevne disbioze odnosno poremećaja u sastavu crijevnog mikrobioma, koji rezultiraju nakupljanjem aminokiselina fenilalanina i izoleucina. Takvo nakupljanje za posljedicu ima aktivaciju stanica imunološkog sustava i mikroglia u mozgu te rezultira neuroupalnim procesima i kognitivnim poremećajima. Osim protuupalnog djelovanja, natrijev oligomanat pokazuje inhibitorno djelovanje prema samoagregaciji peptida A β te potiče njihovo uklanjanje.^{119,124}



Slika 2.14. Strukture višeciljnih lijekova u kliničkim fazama istraživanja lijekova za AB.

2.4. Pregled poznatih bioloških aktivnosti odabranih strukturnih skupina

Istraživanje bioloških aktivnosti skupina s različitim strukturnim oksonicama i/ili strukturnim motivima važno je kako bi se mogao ustanoviti utjecaj pojedinih strukturnih dijelova na pojedine biološke mete. U nastavku teksta bit će dan kratki pregled nekoliko molekulskih skupina za koje je poznato da pokazuju određene biološke aktivnosti s naglaskom na aktivnost prema biološkim metama uključenima u patofiziologiju AB. Strukturni i funkcionalni motivi odabranih spojeva (4-aminokinolini, karbamati, oksimi, hidrazoni i benzokinoni) prikazani su na slici 2.15.



Slika 2.15. Strukturni i funkcionalni motivi odabranih grupa spojeva: aminokinolini, karbamati, oksimi, hidrazoni i benzokinoni.

2.4.1. Aminokinolini

Derivati 4-aminokinolina, klorokin i hidroksiklorokin, već su desetljećima prisutni u medicini zahvaljujući svojem antimalarijskom djelovanju. Osim toga, pokazuju i antivirusna, antibakterijska i antifungalna svojstva, sposobnost sprječavanja nastanka krvnih ugrušaka, kontrole lipidnog sastava u serumu (snižavanje koncentracije kolesterola i triglicerida) te antitumorsko djelovanje. Zahvaljujući brzom i potpunoj apsorpciji nakon oralne primjene, te akumulaciji u različitim tkivima nakon višekratnih unosa, navedeni lijekovi pokazali su dobar potencijal za prenamjenu i za druge terapije. Tako su našli svoju primjenu kod terapije autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa i Sjögrenovog sindroma te kod infekcija virusom humane imunodeficijencije (HIV). Budući da ovi spojevi također uspješno prolaze krvno-moždanu barijeru, spojevi s takvom strukturnom okosnicom posjeduju predispoziciju za razvoj lijekova za bolesti središnjeg živčanog sustava poput AB.¹²⁵ Tako je pokazano da derivati 4-aminokinolina s adamantanskim supstituentom reverzibilno inhibiraju kolinesteraze u niskim mikromolarnim koncentracijama, pri čemu je optimalna duljina alkilne poveznice između aminokinolinskog prstena i adamantanskog supstituenta iznosila 8 metilnih grupa.¹²⁶ Derivati 2-aminokinolina inhibiraju BACE1 u mikromolarnim i nanomolarnim koncentracijama, pri čemu je jedan od spojeva iz serije uspješno smanjio koncentracije peptida A β (40 i 42) u cerebrospinalnoj tekućini štakora, čime je dokazana sposobnost spojeva da uđu u središnji živčani sustav.¹²⁷ Jednostavni derivati kinolinskog prstena specifično interagiraju s oligomernim proteinima p-tau te sprječavaju njihovu agregaciju u filamente *in vitro*,¹²⁸ dok hibridi kinolina i kolesterola te 8-hidroksikinolina i indola pokazuju sposobnost inhibicije samoagregacije peptida A β 42 *in vitro* te disagregacije udruženih peptida u staničnoj liniji neuroblastoma, odnosno sprječavanja amiloidne agregacije u hipokampusu mišjeg modela AB.^{129,130} Hibrid 8-hidroksikinolina kliokvinola i rivastigmina pokazuje sposobnost višeciljnog djelovanja kao inhibitor AChE, mogućnost keliranja iona Zn²⁺, Cu²⁺ i Fe²⁺ te inhibicije samoagregacije peptida A β *in vitro*.¹³¹ Istraživanje derivata 8-aminokinolina pokazalo je da takvi spojevi posjeduju sposobnost inhibicije enzima MAO-A i MAO-B u mikromolarnim koncentracijama *in vitro*.¹³²

2.4.2. Benzokinoni

Benzokinoni su spojevi koji se u prirodi najčešće pojavljuju kao 1,4-benzokinoni. U biološkom smislu najviše se ističe njihova antioksidacijska sposobnost, budući da je struktura benzokinona

sadržana u koenzimu Q10 koji sudjeluje u mitohondrijskom procesu oksidativne fosforilacije i sintezi adenozin-trifosfata (ATP), staničnoj signalizaciji te zaštiti DNA, proteina i lipida od štetnih posljedica oksidacije. Sa stajališta kemije, budući da su podložni reakcijama nukleofilne adicije te mogu reagirati s različitim primarnim ili sekundarnim alifatskim i aromatskim aminima, benzokinoni su skupina spojeva vrlo pogodna za derivatizaciju.¹³³ Iz navedenih razloga, benzokinoni predstavljaju poželjnu gradivnu jedinicu za sintezu potencijalnih lijekova s neuroprotektivnim učinkom, kao u slučaju ranije opisanog *memoquina*.¹²¹ Embelin, derivat benzokinona izoliran iz biljke *Embelia ribes*, pokazao je obećavajuća neuroprotektivna svojstva *in vitro* radi sposobnosti inhibicije AChE, BChE i BACE1 u mikromolarnim koncentracijama.¹³⁴ Sjedinjavanjem benzokinonskog sustava s heterocikličkim prstenom priređena je serija derivata koji inhibiraju agregaciju samih peptida A β kao i njihovu samoagregaciju u prisustvu metalnih iona.¹³⁵ Inhibitorski učinak na amiloidnu agregaciju također je uočen kod hibrida naftokinona i triptofana koji sprječava i oligomerizaciju i fibrilizaciju peptida A β u nanomolarnim koncentracijama *in vitro*. Isto je ustanovljeno i *in vivo* u modelu transgenične mušice *Drosophila* koji predstavlja model AB.¹³⁶ Potencijal djelovanja na amiloidogenezu pokazuju i derivati arilkinona, koji djeluju dualno kao inhibitori BACE1 i samoagregacije peptida A β te djeluju destabilizirajuće prema amiloidnim fibrilima, čime se pokazuju djelotvornima u početnom te u krajnjem dijelu procesa nastanka amiloidnih nakupina.¹³⁷

2.4.3. Hidrazoni

Spojevi koji sadrže hidrazonsku vezu pokazuju brojna biološka svojstva poput antimikrobnih, antivirusnih, protuupalnih, antiepileptičkih, antikancerogenih i antituberkularnih aktivnosti, kao i sposobnost sprječavanja nastanka krvnih ugrušaka.¹³⁸ Zbog prirode hidrazonske veze, koju čine dva povezana nukleofilna dušika, od kojih je onaj aminskeg tipa reaktivniji, te ugljika koji dijeli i elektrofilni i nukleofilni karakter, hidrazoni su reaktivni spojevi pogodni za derivatizaciju.¹³⁹ Iz tog razloga takvi spojevi sintetizirani su i istraživani i kao mogući modulatori bioloških meta uključenih u razvoj AB. Serija benzilhidrazona sintetizirana po uzoru na strukturne motive postojećih inhibitora kolinesteraza koji se koriste u liječenju AB pokazala se selektivnim inhibitorima BChE u mikromolarnim koncentracijama.¹⁴⁰ Aminogvanidinski i benzensulfonilni analozi hidrazona također su se pokazali inhibitorima kolinesteraza.^{141,142} Triazolni hibridi *N*-acilhidrazona posjeduju inhibitorsku aktivnost prema

AChE i antioksidacijska svojstva, dok derivati semikarbazona i tiosemikarbazona te kinoksalinski hidrazoni pokazuju dualnu inhibitornu aktivnost prema AChE i MAO enzimima.^{143–145} Kvinazolinski spojevi kod kojih je sjedinjena gvanidinska i hidrazonska grupa pokazuju snažnu inhibitornu aktivnost prema BACE1.¹⁴⁶ Nadalje, spojevi koji sadrže hidrazonsku poveznicu također pokazuju i kelirajuća te antioksidacijska svojstva, kao i sposobnost inhibicije agregacije peptida A β , što ih čini obećavajućim strukturnim motivom za dizajn višeciljnih liganada za liječenje AB.^{147–150}

2.4.4. Oksimi

Oksimi su organski spojevi koji strukturno pripadaju skupini imina, a njihovi derivati pokazuju brojna biološka svojstva uključujući antibakterijsku, antifungalnu, antioksidacijsku, protuupalnu te antikancerogenu aktivnost. Ipak, njihova najpoznatija uloga u medicini je ona reaktivatora AChE inhibirane organofosfornim spojevima (bojni otrovi, pesticidi i insekticidi).^{151,152} Budući da su snažni nukleofili, oksimi mogu istisnuti fosfolirajući organofosforni spoj iz aktivnog mjesta AChE pri čemu nastaju fosfolirani oksim i regenerirani katalitički aktivan enzim.¹⁵³ Radi toga su razvijeni oksimi pralidoksim (2-PAM), diacetil monoksim (DAM), asoksim klorid (HI-6), obidoksim, metoksim i trimedoksim kao antidoti za slučajeve trovanja bojnim otrovima. Oksimi trenutno odobreni za upotrebu su 2-PAM (SAD, Francuska, UK), obidoksim (Njemačka, Norveška, Nizozemska), HI-6 (Kanada, Hrvatska, Češka, Švedska) i TMB-4 (Izrael).^{151,153} Osim što reaktiviraju fosfoliranu AChE, oksimi djeluju i kao reverzibilni inhibitori kolinesteraza, što ih čini pogodnim strukturnim motivom za razvoj lijekova za AB.¹⁵⁴ Derivati biljnog metabolita halkona koji sadrže oksimsku grupu pokazuju inhibitornu aktivnost prema AChE i MAO enzimima *in vitro*, pri čemu se ističe selektivnost prema MAO-B.¹⁵⁵ Nadalje, fenolni oligomeri s oksimskom poveznicom, posebice trioksimski, pokazuju sposobnost inhibicije fibrilizacije peptida A β 40, ali i disagregacijski potencijal već nastalih fibrilnih amiloida.¹⁵⁶ Azaciklički spojevi koji sadrže oksimsku grupu djeluju protektivno na očuvanje mitohondrijskih funkcija i stanične vijabilnosti kod patoloških stanja poput oksidacijskog stresa i nakupljanja amiloidnih peptida, pri čemu sprječavaju nekontrolirani prijenos molekula unutar i izvan mitohondrija.¹⁵⁷ Oksimski derivati imidazolil-acetofenona ističu se neuroprotektivnim i protuupalnim svojstvima koja proizlaze iz inhibicije ciklooksigenaze-2 (COX-2) i AChE, sposobnošću sprječavanja toksičnog djelovanja dušikovog monoksida na stanice te sposobnošću keliranja Cu²⁺.¹⁵⁸ Spojevi koji sadrže oksimsku grupu

također djeluju i kao inhibitori kinaza iz skupine CDK te kinaze GSK3 β , čime pokazuju potencijal za kontrolu ekspresije i fosforilacije proteina, posebice proteina tau u slučaju AB.¹⁵⁹

2.4.5. Karbamati

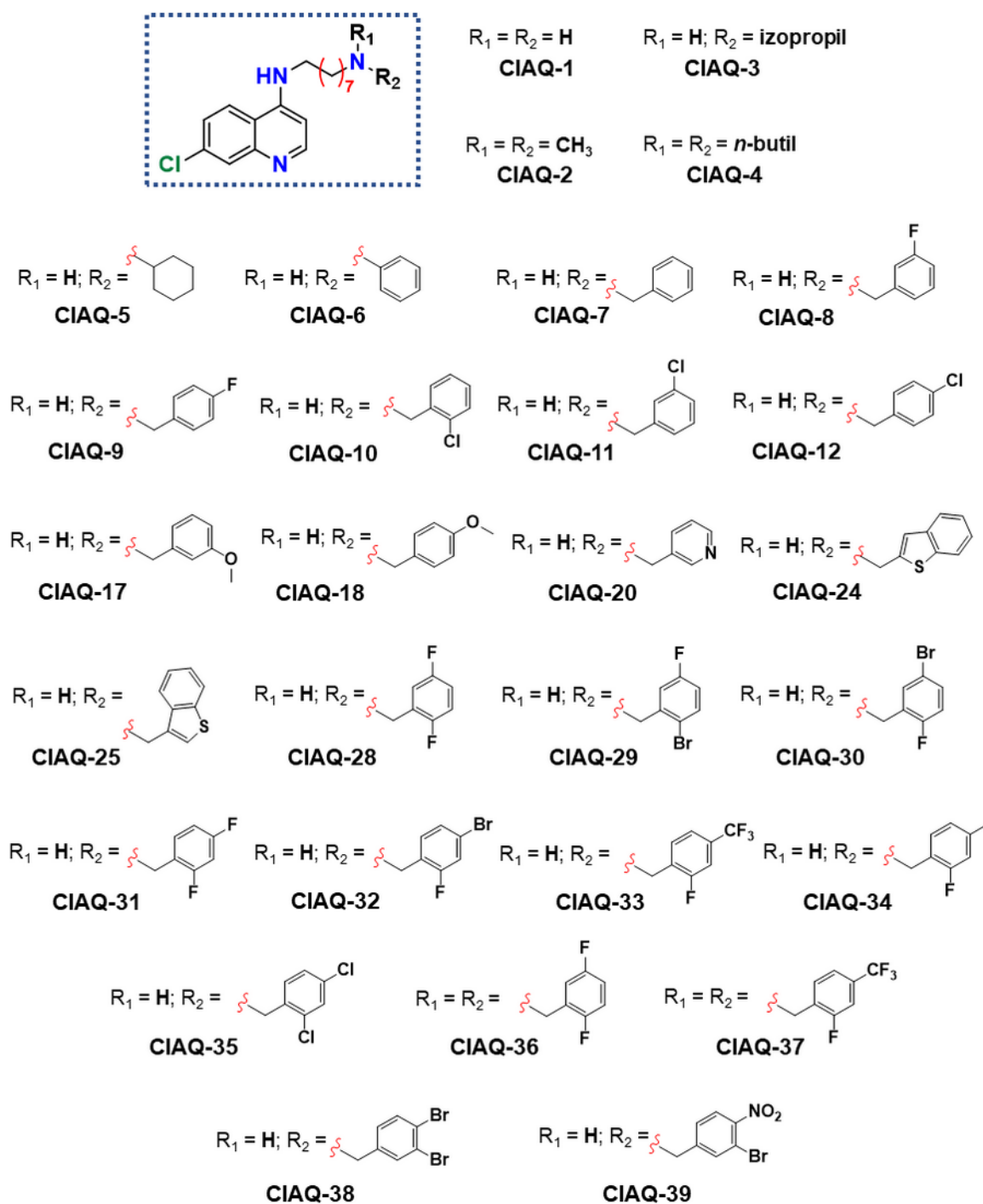
Karbamati su spojevi s karbamatnom grupom čiju okosnicu čini karbonilna grupa na čiji ugljik su vezane alkoksilna i amino grupa. Zbog sličnosti s amidnom grupom, karbamati se smatraju hibridima između amida i estera, što pridonosi stabilnosti spojeva te omogućava ostvarivanje unutar- i međumolekulskih interakcija. Iz tog razloga, karbamatna grupa je sastavni dio raznih lijekova koji se koriste u liječenju HIV-a, epilepsije, parazitarne infekcije te kao kemoterapeutici. Otkriće fizostigmina, alkaloidnog inhibitora kolinesteraza izoliranog iz mahunarke *Physostigma venenosum*, dovelo je do razvoja kolinesteraznih inhibitora koji se koriste u liječenju AB (rivastigmin) te mijastenije gravis, autoimunog poremećaja rada nikotinskih acetilkolinških receptora (neostigmin, piridostigmin).¹⁶⁰ Derivati biskarbamata bambuterola, bronhodilatatora koji se koristi u liječenju astme, ponašaju se kao vremenski ovisni selektivni inhibitori BChE, a uz to djeluju i kao kelatori biometalnih iona Fe²⁺, Cu²⁺ i Zn²⁺.²⁵ Nekolicina istraživanja provedena je u smjeru razvoja dualnih inhibitora kolinesteraza i MAO enzima, pri čemu su sintetizirani hibridi karbamata i strukturnih motiva odgovornih za inhibiciju MAO enzima. Tako su inhibitornu aktivnost prema MAO enzimima pokazali karbamatni derivati *N*-propargilaminoindana i *N*-propargilfenetilamina, 1-propargil-4-stirilpiperidina, *N*-alkilpiperidina te hibridi kumarina i karbamata.^{161–164} Također, spojevi koji sadrže karbamatnu grupu pokazali su i sposobnost sprječavanja agregacije A β 42 peptida *in vitro* te u stanicama ljudskih neuroblastoma.¹⁶⁵

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

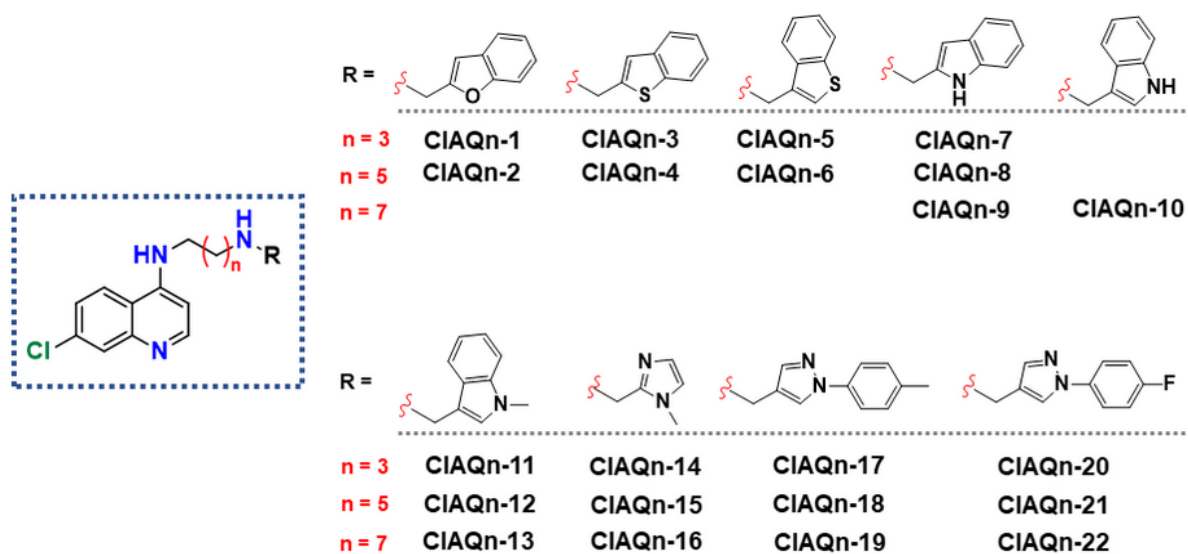
3.1. Popis ispitivanih spojeva

U okviru istraživanja ove doktorske disertacije testirani su spojevi koji su bili podijeljeni u 6 različitih skupina. Skupine 4-aminokinolini (slike 3.1, 3.2 i 3.3), derivati amodiakina (slika 3.4) i benzokinoni (slika 3.5) sintetizirani su na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Sveučilišta u Beogradu pod vodstvom dr. sc. Dejana Opsenice dok je skupina hidrazona i *N*-acilhidrazona (slika 3.6) sintetizirana na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku pod vodstvom prof. dr. sc. Dajane Gašo-Sokač. Skupina *O*-alkiloksima (slike 3.7, 3.8 i 3.9) i jedan dio skupine karbamata (kinuklidinski karbamati te derivati karbamata cinkonidina i cinkonina) (slike 3.10 i 3.11) sintetizirani su na Zavodu za organsku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ines Primožič, dok je drugi dio skupine karbamata (monokarbamati (slika 3.12) i biskarbamati (slika 3.13)) sintetiziran na Zavodu za Toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod vodstvom dr. sc. Anite Bosak. U sklopu disertacije ispitano je 189 spojeva. U slučaju da su iz pojedine skupine testirani samo odabrani spojevi, njihove strukture na slikama istaknute su sivom bojom. Sve strukture nacrtane su u programu ChemDraw 20.1.1. (*PerkinElmer Informatics*, Waltham, SAD).

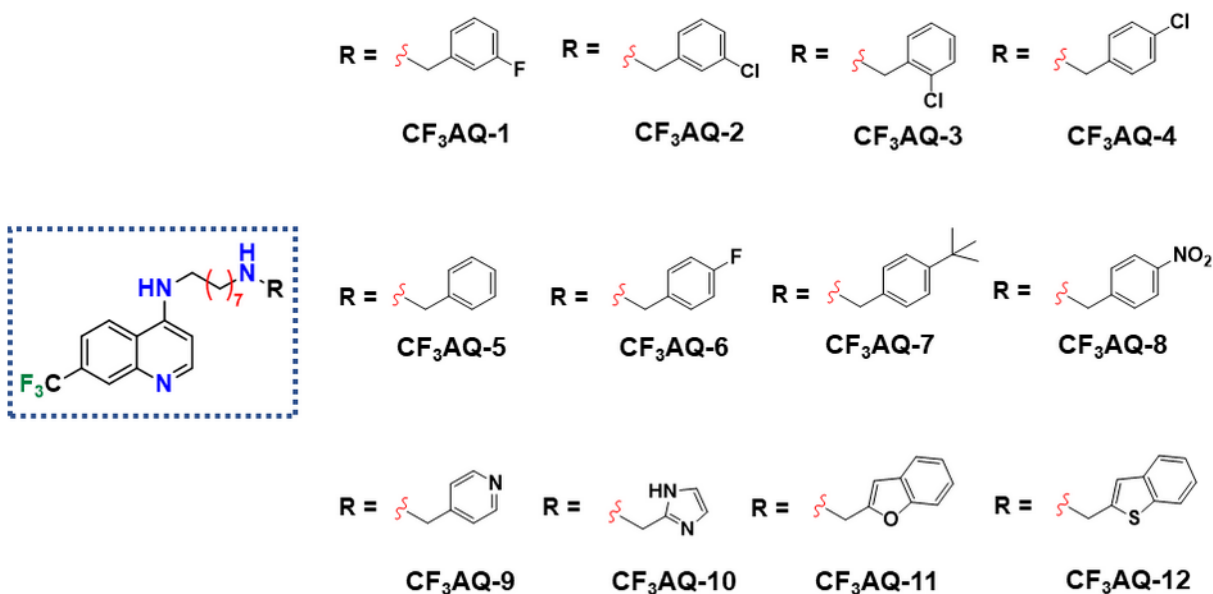
3.1.1. 4-aminokinolini



Slika 3.1. Strukture i oznake spojeva iz skupine 4-amino-7-klorkinolina s *n*-oktilnom poveznicom (29 spojeva).

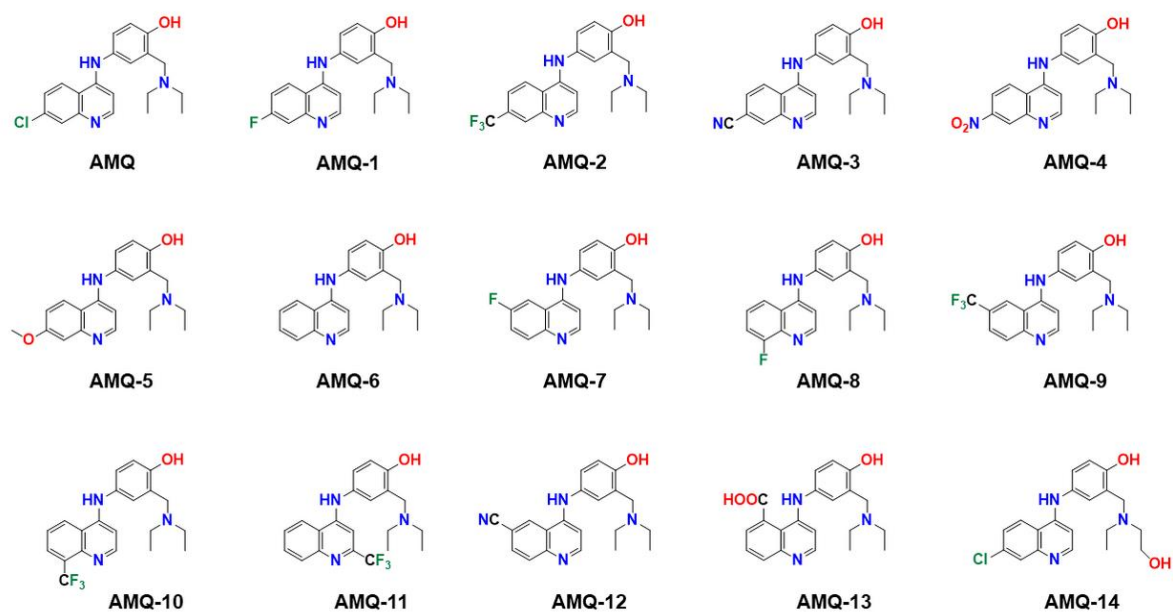


Slika 3.2. Strukture i oznake spojeva iz skupine 4-amino-7-klorkinolina različith duljina poveznice (22 spoja).



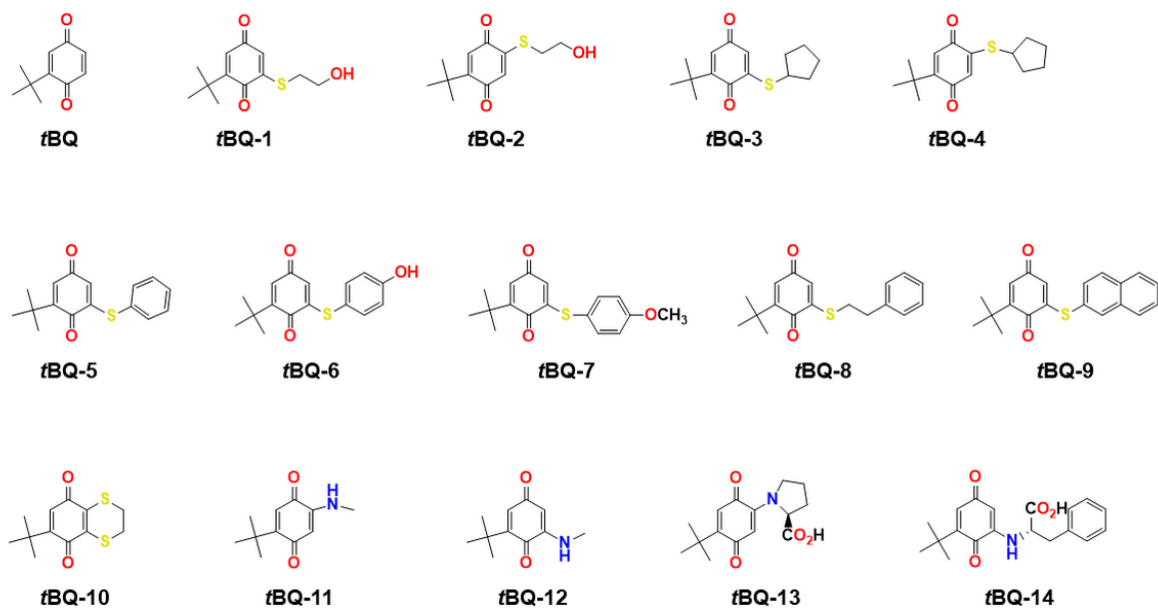
Slika 3.3. Strukture i oznake spojeva iz skupine 4-amino-7-trifluormetilkinolina s *n*-oktilnom poveznicom (12 spojeva).

3.1.2. Derivati amodiakina



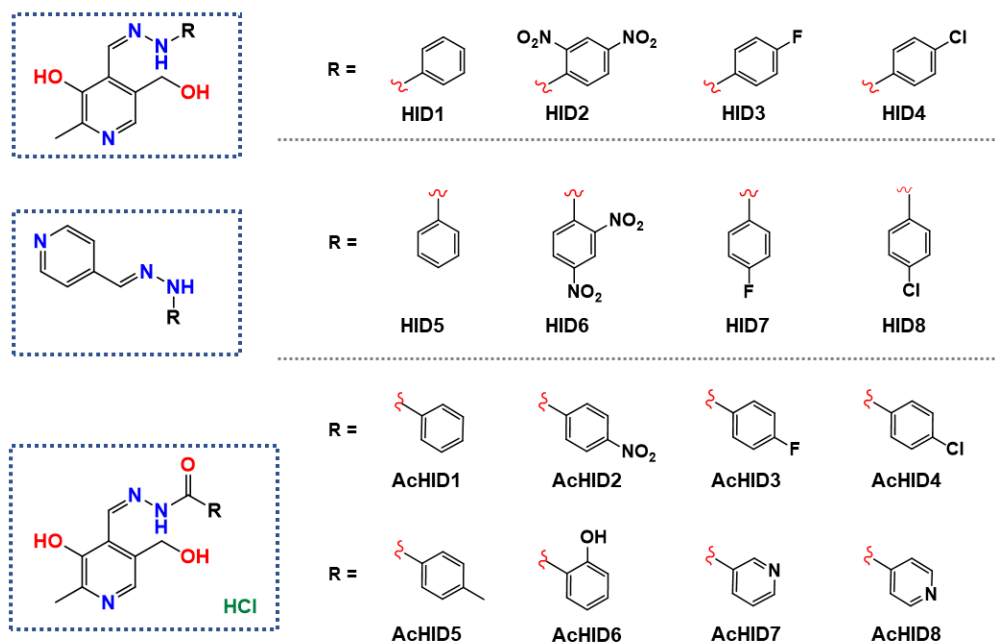
Slika 3.4. Strukture i oznake spojeva iz skupine derivata amodiakina (amodiakin je označen s AMQ) (15 spojeva).

3.1.3. Benzokinoni



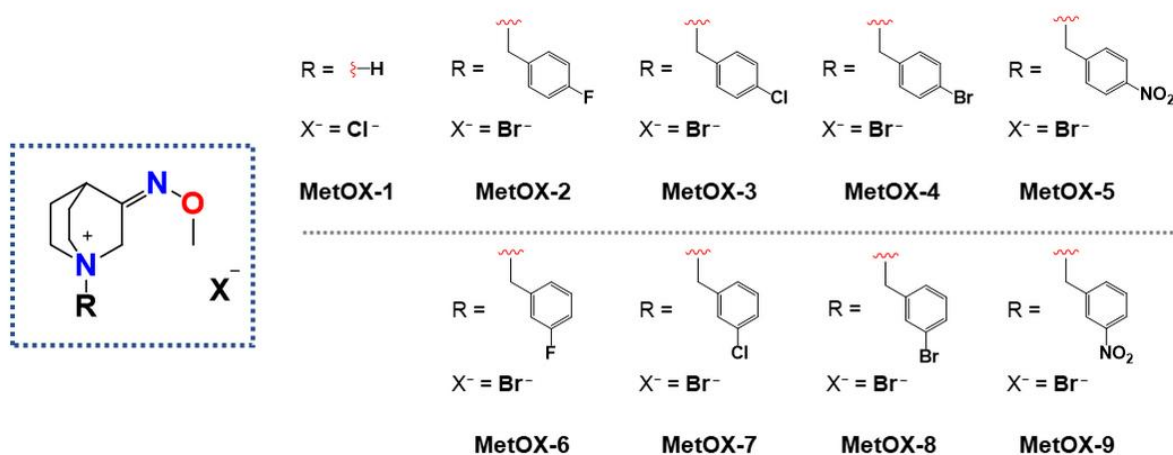
Slika 3.5. Strukture i oznake spojeva iz skupine benzokinona (15 spojeva).

3.1.4. Hidrazoni i N-acilhidrazoni

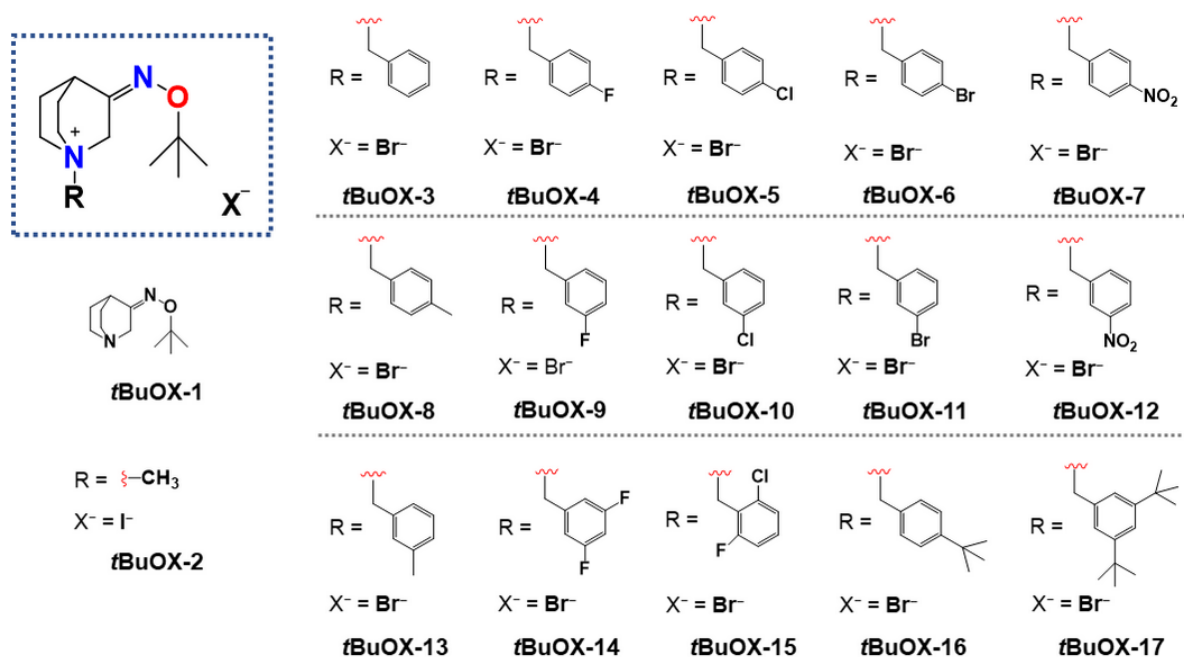
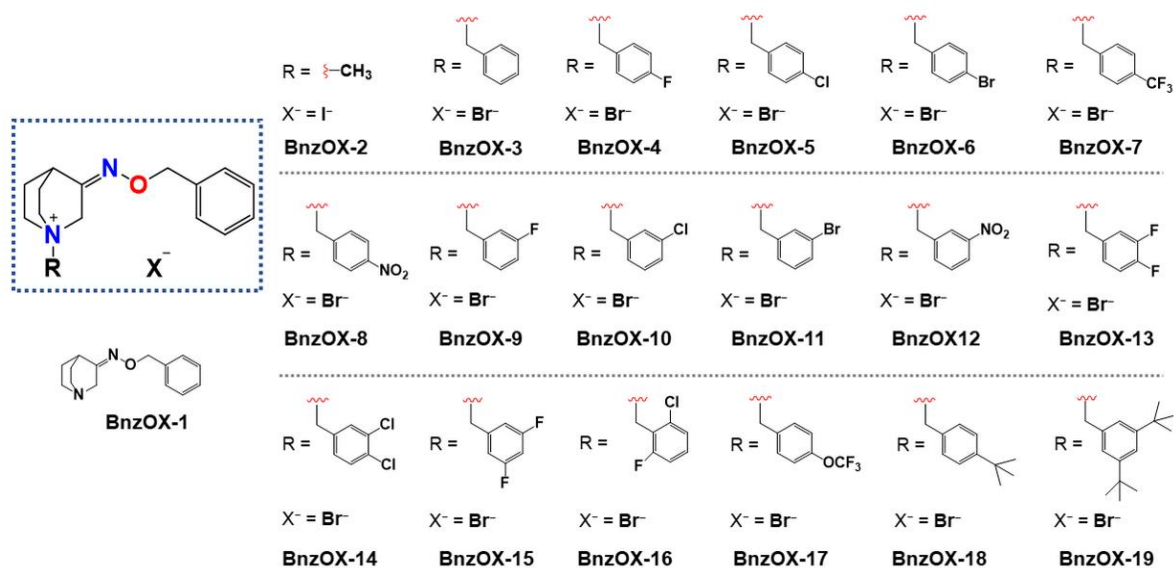


Slika 3.6. Strukture i oznake spojeva iz skupine hidrazona i N-acilhidrazona (16 spojeva).

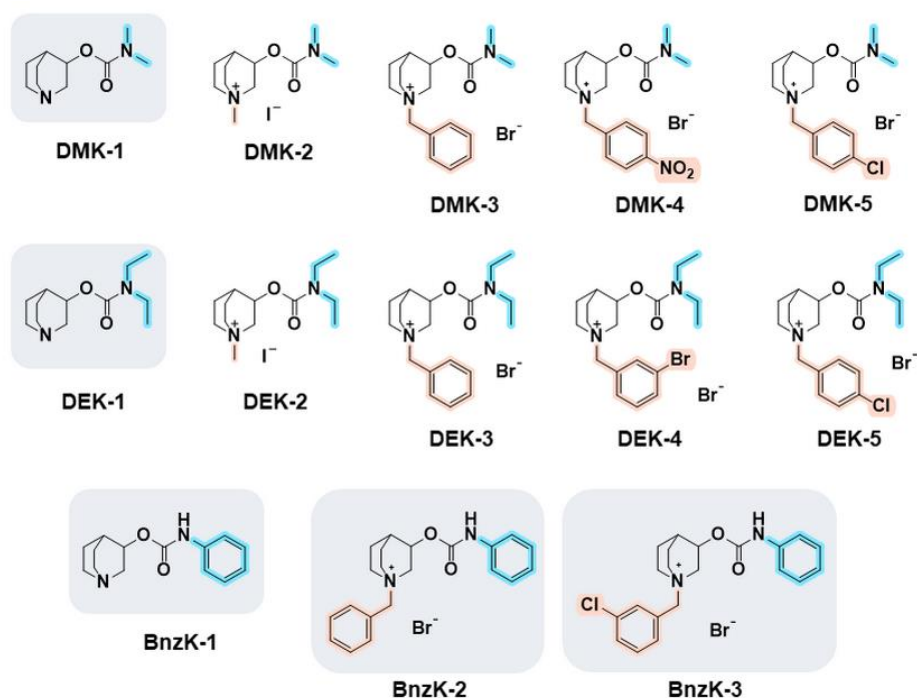
3.1.5. O-alkiloksimi



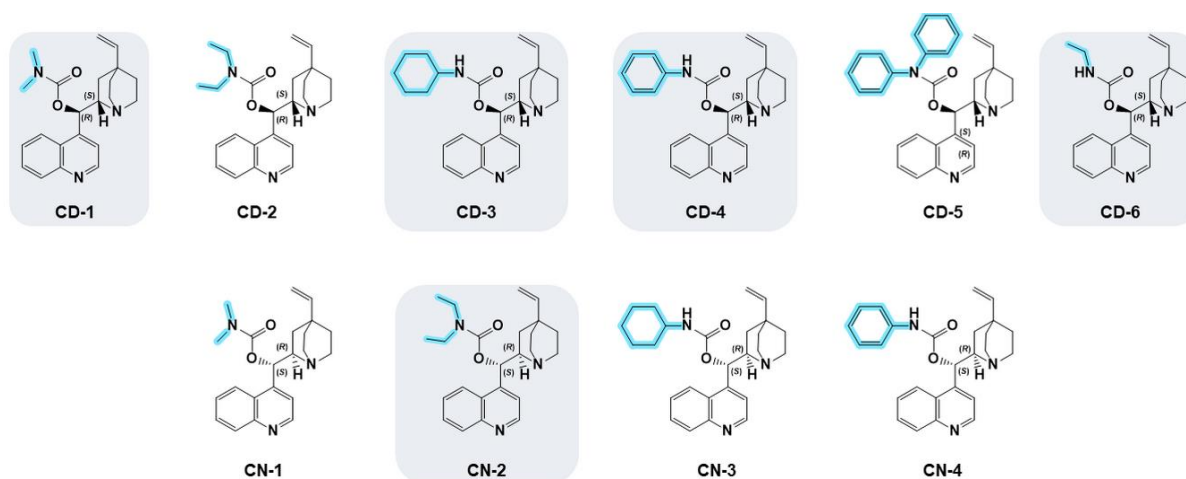
Slika 3.7. Strukture i oznake spojeva iz skupine O-metiloksima (9 spojeva).

Slika 3.8. Strukture i oznake spojeva iz skupine *O*-tert-butiloksima (17 spojeva).Slika 3.9. Strukture i oznake spojeva iz skupine *O*-benziloksima (19 spojeva).

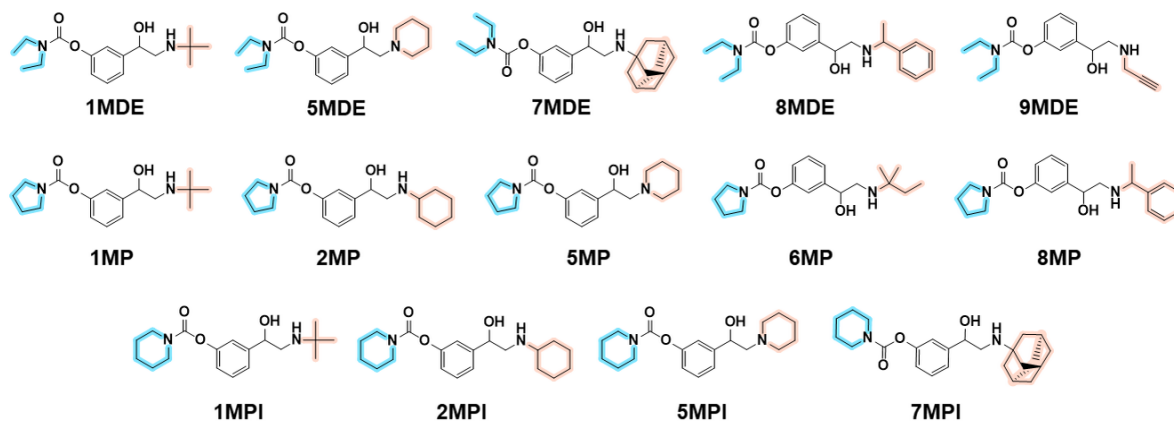
3.1.6. Karbamati



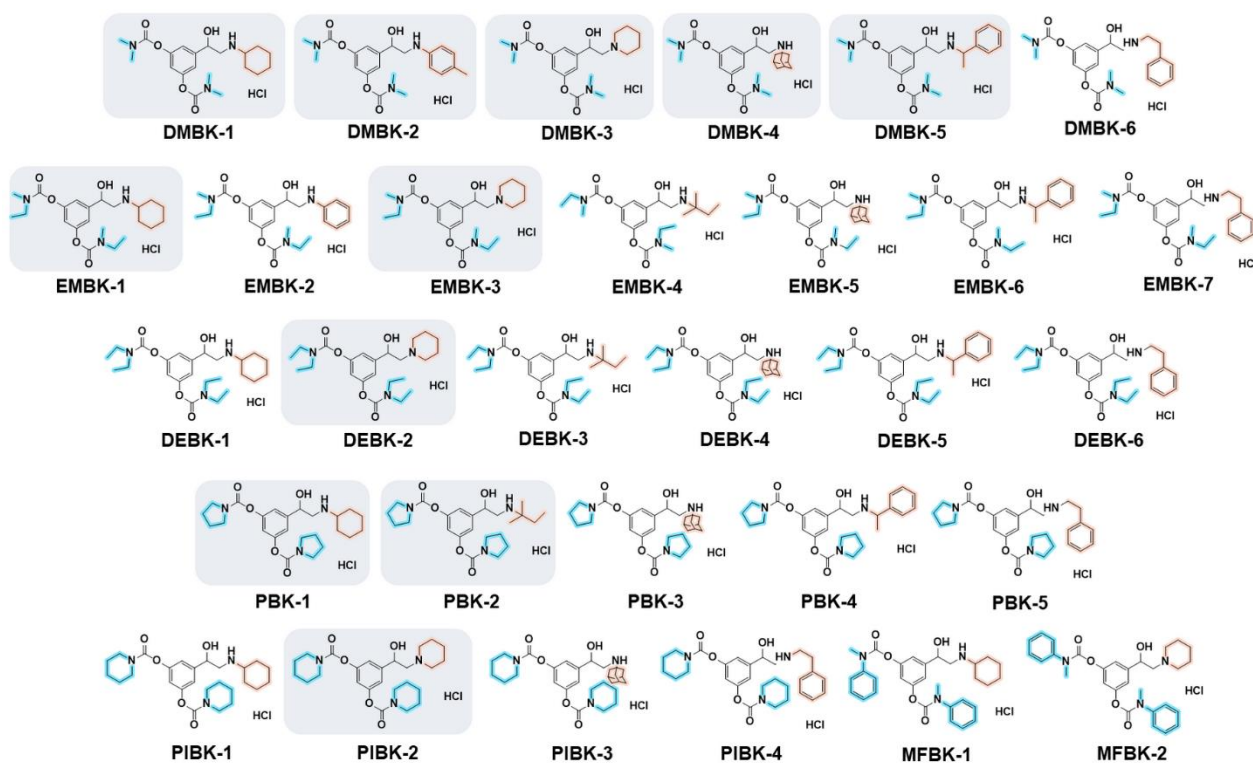
Slika 3.10. Strukture i oznake spojeva iz skupine kinulidinskih karbamata. U okviru ove doktorske disertacije testirano je ukupno 5 spojeva, naznačenih sivom bojom.



Slika 3.11. Strukture i oznake spojeva iz skupine derivata karbamata cinkonidina (CD) i cinkonina (CN). U okviru ove doktorske disertacije testirano je ukupno 5 spojeva, naznačenih sivom bojom.



Slika 3.12. Strukture i oznake spojeva iz skupine monokarbamatnih derivata bambuterola (14 spojeva).



Slika 3.13. Strukture i oznake spojeva iz skupine biskarbamatnih derivata bambuterola. U okviru ove doktorske disertacije testirano je ukupno 11 spojeva, naznačenih sivom bojom.

3.2. Inhibicija ljudskih kolinesteraza

3.2.1. Enzimi

Kao izvor enzima kolinesteraza korištene su rekombinantna ljudska AChE (hAChE_{rec}) i pročišćena nativna BChE (hBChE) dobivene od dr. sc. Floriana Nachona, *Département de Toxicologie et Risques Chimiques, Institut de Recherche Biomedicale des Armées*. Izvorne otopine enzima razrijeđene su 100 puta u 1 %-tnoj otopini albumina goveđeg seruma (BSA) pripremljenoj u 0,1 mol L⁻¹ natrijevu fosfatnom puferu (pH 7,4) i čuvane na 4 °C. Daljnja razrjeđenja enzima pripremana su neposredno prije pokusa u 0,01 % BSA pripremljenom u istom puferu.

3.2.2. Kemikalije i otopine

Sva mjerenja enzimske aktivnosti provedena su u 0,1 mol L⁻¹ natrijevom fosfatnom puferu (pH 7,4). Pufer je pripremljen titracijom 0,1 mol L⁻¹ otopina soli Na₂HPO₄ (*Kemika*, Zagreb, Hrvatska) i NaH₂PO₄ (*Kemika*, Zagreb, Hrvatska) do određenog pH.

Za praćenje enzimske aktivnosti kolinesteraza kao supstrat je korišten acetiltiokolinov jodid (ATCh; *Sigma-Aldrich*, SAD). Osnovna otopina ATCh (10 mmol L⁻¹) te sva daljnja razrjeđenja ATCh pripremljena su u destiliranoj vodi neposredno prije izvođenja pokusa.

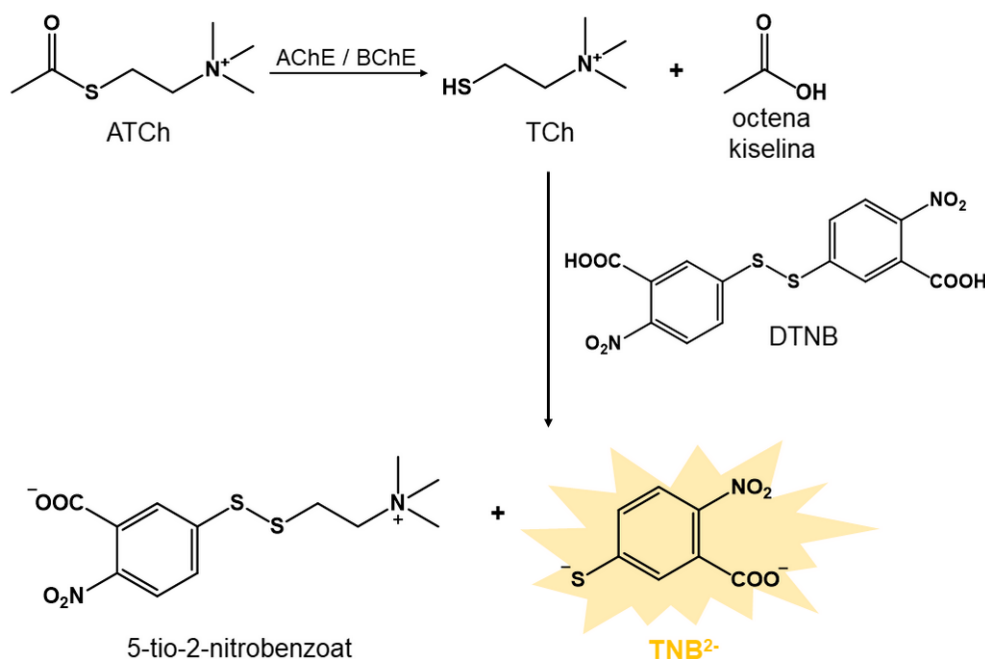
Enzimska aktivnost praćena je korištenjem Ellmanovog reagens, odnosno otopine 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB; *Sigma*, SAD). Osnovna otopina DTNB-a (6 mmol L⁻¹) priređena je u 0,1 mol L⁻¹ natrijevom fosfatnom puferu (pH 7,4), a dodatno razrjeđenje rađeno je u istom puferu neposredno prije izvođenja pokusa.

Kao reverzibilni inhibitori hAChE_{rec} i hBChE testirani su 4-aminokinolini (slike 3.1., 3.2. i 3.3.), amodiakini (slika 3.4.), benzokinoni (slika 3.5.), hidrazoni i *N*-acilhidrazoni (slika 3.6.) te *O*-alkiloksimi (slike 3.7., 3.8. i 3.9.).

Ishodne otopine inhibitora (5 – 100 mmol L⁻¹) pripremljene su u DMSO-u (dimetil-sulfoksid) i čuvane su na 4 °C. Daljnja razrjeđenja spojeva pripremana su u destiliranoj vodi neposredno prije pokusa.

3.2.3. Mjerenje aktivnosti i reverzibilne inhibicije kolinesteraza Ellmanovom metodom

Aktivnost kolinesteraza mjerena je spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu korištenjem DTNB-a kao tiolnog reagensa.¹⁶⁶ Metoda se temelji na hidrolitičkoj razgradnji supstrata ATCh kataliziranoj kolinesterazama pri čemu kao produkti nastaju octena kiselina i tiokolin (TCh). Nastali TCh potom reagira s DTNB-om dajući žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB^{2-}) (slika 3.14). Porast apsorbancije TNB^{2-} aniona proporcionalan je aktivnosti enzima, a praćen je na valnoj duljini od 412 nm.^{166,167}



Slika 3.14. Mehanizam na kojem se temelji princip određivanja aktivnosti kolinesteraza Ellmanovom metodom.¹⁶⁷

Reakcijske smjese priređivane su u prozirnim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. Ukupni volumen reakcijskih smjesa iznosio je 300 μL . Reakcijska smjesa koja je služila za mjerenje aktivnosti samog enzima (kontrolna reakcija) sadržavala je DTNB, destiliranu vodu (bez ili s dodatkom DMSO-a) i enzim, dok je reakcija u kojoj je praćena reverzibilna inhibicija enzima (reakcija inhibicije) umjesto destilirane vode sadržavala otopinu ispitivanog spoja. U zadnjem koraku objema reakcijskim smjesama dodan je supstrat čime je započeta enzimska reakcija. Koncentracija enzima odabrana je tako da promjena apsorbancije u vremenu ($\Delta A/\text{min}$) uz 0,5 mmol L^{-1} ATCh bude oko 0,1 kako bi se osigurali zadovoljavajući uvjeti mjerenja. Konačne koncentracije ATCh u pokusima bile su: 0,05, 0,1, 0,2, 0,35 i 0,5 mmol L^{-1} . Konačna

koncentracija DTNB-a iznosila je $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. Zbog utjecaja organskih otapala na aktivnost enzima, u slučajevima gdje je konačna koncentracija DMSO-a u inhibitornim reakcijama bila jednaka ili veća od 0,1 %, ista količina DMSO-a dodana je i u kontrolnu reakciju. Kod svih mjerenja promjena apsorbancije $\Delta A/\text{min}$ bila je linearna s vremenom. Mjerenje aktivnosti trajalo je 3 minute.

Tijekom mjerenja aktivnosti kolinesteraza Ellmanovom metodom može doći do tzv. neenzimske reakcije odnosno hidrolize supstrata ATCh pod utjecajem ispitivanog inhibitora, pri čemu nastaje TCh i, posljedično, TNB^{2-} anion koji uzrokuje porast apsorbancije u vremenu. Stoga je prije mjerenja inhibitorne sposobnosti spojeva prema kolinesterazama izmjerena i promjena apsorbancije u neenzimskoj reakciji kako bi se utvrdilo dolazi li do hidrolize ATCh u prisutnosti ispitivanih spojeva. Neenzimska reakcija (neenzimska kontrola) sadržavala je DTNB, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ natrijev fosfatni pufer (pH 7,4) uz dodatak 0,01 % BSA, ispitivani spoj i ATCh. Usporedno je praćena i kontrolna enzimska reakcija (DTNB, voda (bez ili s DMSO-om), enzim i $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ATCh). Ukoliko je došlo do neenzimske hidrolize supstrata (odnosno kada je promjena apsorbancije u minuti neenzimske hidrolize ATCh iznosila najmanje 10 % vrijednosti promjene apsorbancije u minuti za reakciju inhibicije enzimski hidroliziranog ATCh) napravljene su korekcije inhibiranih reakcija. Mjerenje aktivnosti trajalo je 5 minuta.

Sva mjerenja su provedena na čitačima mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (Tecan Group Ltd., Švicarska) i SpectraMax iD3 (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA) pri 25°C . Svako mjerenje provedeno je u duplikatu te ponovljeno u najmanje tri nezavisna eksperimenta.

3.2.4. Konstante disocijacije

Konstante disocijacije kompleksa enzima i inhibitora (K_i) određene su iz kompeticije između supstrata i inhibitora za vezanje u aktivno mjesto $\text{hAChE}_{\text{rec}}$, odnosno hBChE . Aktivnost enzima mjerena je pri različitim koncentracijama supstrata (s) u odsutnosti (v_0) i prisutnosti (v_i) inhibitora određene koncentracije. Budući da se interakcija između enzima i inhibitora odvija u prisutnosti supstrata, za svaku koncentraciju inhibitora $[I]$ je pri određenoj koncentraciji supstrata izračunata prividna konstanta disocijacije kompleksa enzim-inhibitor, $K_{i,\text{app}}$. $K_{i,\text{app}}$ određena je jednadžbom:

$$K_{i,\text{app}} = \frac{v_i}{v_0 - v_i} \cdot [I] \quad (1)$$

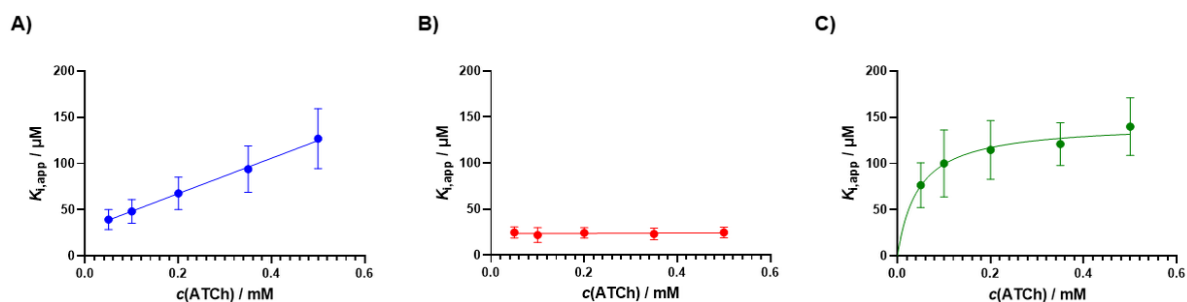
gdje v_0 predstavlja aktivnost enzima bez prisutnosti inhibitora (kontrolna reakcija), dok v_i predstavlja aktivnost enzima u prisutnosti inhibitora određene koncentracije $[I]$ (reakcija inhibicije) mjerene pri istoj koncentraciji supstrata. Utjecaj supstrata na vezanje inhibitora u aktivno mjesto enzima opisan je Hunter-Downsovom jednačbom:

$$K_{i,app} = K_{(I)} + \frac{K_{(I)}}{K_{(S)}} \cdot [S] \quad (2)$$

gdje je $[S]$ koncentracija supstrata pri kojoj je određena prividna konstanta disocijacije $K_{i,app}$. Budući da periferno mjesto AChE može ostvariti interakcije s amiloidnim peptidima i na taj način s njima tvoriti neurotoksične komplekse,⁶¹ analiziran je način vezanja inhibitora u aktivno mjesto AChE. Ukoliko je ovisnost $K_{i,app}$ vs $[S]$ linearna, inhibitor kompetira sa supstratom za vezanje u katalitičko mjesto enzima i odsječak na ordinati, $K_{(I)}$, predstavlja disocijacijsku konstantu reverzibilnog kompleksa enzim-inhibitor za katalitičko mjesto. U slučaju nelinearne ovisnosti u Hunter-Downsovom prikazu, inhibitor se veže i u katalitičko i u periferno mjesto enzima što ukazuje da se radi o mješovitom tipu kompetitivne inhibicije. Ukoliko se postotak inhibicije s inhibitorom određene koncentracije $[I]$ ne mijenja s promjenom koncentracije supstrata, govorimo o nekompetitivnoj reverzibilnoj inhibiciji. U tom slučaju vrijedi:

$$K_{i,app} = \frac{v_i}{v_0 - v_i} \cdot [I] = K_i \quad (3)$$

Reprezentativni primjeri grafičkih prikaza ovisnosti $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata za kompetitivni, nekompetitivni i mješoviti tip inhibicije hAChE_{rec} dani su na slici 3.15.



Slika 3.15. Hunter-Downsov prikaz ovisnosti eksperimentalno određenih konstanti $K_{i,app}$ (konstanta disocijacije kompleksa hAChE_{rec}-spoj) o koncentraciji supstrata ATCh. A) kompetitivni (spoj tBQ-4); B) nekompetitivni (spoj tBQ-8) i C) mješoviti tip inhibicije (spoj tBQ-1).

Za računanje svih kinetičkih parametara i izradu grafičkih prikaza upotrijebljen je statistički paket GraphPad Prism (*Graph Pad Inc*, San Diego, SAD).

3.3. Inhibicija aktivnosti ljudske β -sekretaze

3.3.1. Komercijalni kompleti, enzim i kemikalije

Za uhođavanje metode mjerenja aktivnosti BACE1 i ispitivanje inhibitorne sposobnosti spojeva (dio spojeva iz serije 4-aminokinolini (slika 3.1.) i hidrazoni (slika 3.6.)) korišten je komercijalni komplet *β -Secretase (BACE1) Activity Detection Kit (Fluorescent)* od *Sigme* (kat. br. CS0010, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD).¹⁶⁸

U ostalim eksperimentima korištene su pojedine komponente komercijalnog kompleta CS0010 i zasebno pribavljeni istovjetni komercijalno dostupni reagensi: fluorescentni peptidni supstrat 7-metoksikumarin-4-acetil-[Asn670, Leu671]-amiloid β /A4 prekursorski protein 770 fragment 667-676(2,4-dinitrofenil)Lys-Arg-Arg amid (kat. br. A1472, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD) te ljudski rekombinantni enzim BACE1 (kat. br. S4195, ($\sim 5\text{U}/\mu\text{L}$) ili kat. br. B9059 ($\sim 3\text{U}/\mu\text{L}$), *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD). Kao pufer korišten je natrijev acetatni pufer (50 mmol L^{-1} , pH 4,5) koji je sadržavao 0,005 % Triton X-100.¹⁶⁹ Pufer je priređen otapanjem 4,1 g anhidrida natrijevog acetata (*Supelco.*, Darmstadt, Njemačka) u 1 L destilirane vode nakon čega je titriran ledenom octenom kiselinom do pH 4,5. U tako pripremljenu otopinu dodan je detergent Triton X-100 do konačnog sadržaja 0,005%.

U svim eksperimentima, kao pozitivna kontrola korišten je komercijalno dostupni inhibitor BACE1 *β -Secretase Inhibitor III – Calbiochem* (kat. br. 565780, *EMD Millipore Corp.*, Billerica, MA, SAD).

Kao inhibitori aktivnosti BACE1 testirani su 4-aminokinolini (slike 3.1., 3.2. i 3.3.), benzokinoni (slika 3.5.), hidrazoni i *N*-acilhidrazoni (slika 3.6.), *O*-alkiloksimi (slike 3.7., 3.8. i 3.9.), kinuklidinski karbamati (slika 3.10.), karbamatni derivati cinkonidina i cinkonina (slika 3.11.) te monokarbatni (slika 3.12.) i biskarbatni derivati bambuterola (slika 3.13.). Konačne koncentracije testiranih spojeva odabrane su prema vrijednostima njihovih konstanti inhibicije ljudskih kolinesteraza (K_i).

3.3.2. Mjerenje aktivnosti BACE1 u prisutnosti ispitivanih spojeva

Aktivnost enzima β -sekretaze (BACE1) mjerena je prema modificiranom protokolu komercijalnog kompleta CS0010 koji koristi FRET (fluorescentno rezonantni energetski transfer) metodu temeljenu na pojačanju intenziteta fluorescencije uslijed proteolize fluorescentnog peptidnog supstrata potpomognute β -sekretazom.

Ishodna otopina supstrat pripremana je u DMSO-u u koncentraciji $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ koja je zatim alikvotirana, a alikvoti su bili pohranjeni na -20°C . Alikvoti su odmrzavani neposredno prije eksperimenta te razrijeđeni 10 puta u *Fluorescence assay buffer*-u (kod uhodavanja metode i za ispitivanje 4-aminokinolina (slika 3.1.) i hidrazona (slika 3.6.)) ili u natrijevom acetatnom puferu za sve ostale ispitivane spojeve. Ishodne otopine ispitivanih inhibitora i komercijalnog inhibitora *β -Secretase Inhibitor III* priređene su u DMSO-u te su dalje razrjeđivane u *Fluorescence assay buffer*-u ili destiliranoj vodi kod uhodavanja metode i spojeva iz skupine 4-aminokinolina (slika 3.1.) i hidrazona (slika 3.6.) ili, za ostale spojeve, u natrijevom acetatnom puferu. Ljudska rekombinantna BACE1 iz komercijalnog kompleta CS0010 razrjeđivana je 50 puta u *Fluorescence assay buffer*-u ili natrijevom acetatnom puferu (aktivnost enzima u konačnoj reakcijskoj smjesi iznosila je $\sim 0,6$ U (engl. *enzyme unit*)). Ljudska rekombinantna BACE1 (S4195) razrjeđivana je 100 puta u natrijevom acetatnom puferu (aktivnost enzima u konačnoj reakcijskoj smjesi iznosila je $\sim 0,5$ U).

Za sve eksperimente u kojima je određivan mogući inhibitorni učinak ispitivanih spojeva priređivane su 4 različite reakcijske smjese: negativna kontrola (supstrat + pufer), pozitivna kontrola (supstrat + BACE1 + pufer), slijepa proba (supstrat + inhibitor + pufer) i reakcija inhibicije (supstrat + BACE1 + inhibitor + pufer). Konačni volumeni svih navedenih smjesa iznosili su $100 \mu\text{L}$. Reakcijske smjese priređene su prema tablici 3.1 u crnoj mikrotitarskoj pločici s 96 jažica u duplikatima ili triplikatima, a reakcija je započeta dodatkom enzima BACE1.

Tablica 3.1. Sastav reakcijskih smjesa u pokusima inhibicije aktivnosti BACE1 (NK – negativna kontrola; PK – pozitivna kontrola; SP – slijepa proba).

REAGENSI	NK	PK	SP	Reakcija inhibicije
pufer	$80 \mu\text{L}$	$70 \mu\text{L}$	$60 \mu\text{L}$	$50 \mu\text{L}$
supstrat ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$)	$20 \mu\text{L}$	$20 \mu\text{L}$	$20 \mu\text{L}$	$20 \mu\text{L}$
inhibitor	/	/	$20 \mu\text{L}$	$20 \mu\text{L}$
BACE1	/	$10 \mu\text{L}$	/	$10 \mu\text{L}$

Reakcija je započinjala dodavanjem $10 \mu\text{L}$ razrjeđenog enzima u reakcijske smjese. Odmah po dodatku BACE1 u reakcijsku smjesu izmjeren je intenzitet fluorescencije (I_F) pri valnoj duljini pobude $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ i valnoj duljini emisije $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$ (nulto vrijeme) nakon čega je pločica s uzorcima inkubirana dva sata u termobloku pri 37°C . Nakon ta dva sata ponovno je očitana intenzitet fluorescencije pri istim valnim duljinama pobude i emisije. Izmjerene vrijednosti

intenziteta fluorescencije pozitivne kontrole ($I_F(\text{PK})$) i reakcije inhibicije ($I_F(\text{INH})$) korigirane su za vrijednosti intenziteta fluorescencije izmjerene za negativnu kontrolu ($I_F(\text{NK})$) odnosno slijepu probu ($I_F(\text{SP})$) kako bi se eliminirali pozadinski utjecaji samog supstrata i inhibitora. Na temelju dobivenih vrijednosti izračunati su postoci preostale aktivnosti BACE1 prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ akt. BACE1} = \frac{I_F(\text{INH}) - I_F(\text{SP})}{I_F(\text{PK}) - I_F(\text{NK})} * 100 \quad (4)$$

Dobiveni postoci preostale aktivnosti BACE1 preračunati su u postotak inhibicije BACE1. Mjerenje u nultom vremenu služilo je kako bi se usporedbom vrijednosti na početku reakcije i na kraju reakcije (nakon dva sata) provjerilo je li došlo do porasta intenziteta fluorescencije u pozitivnoj kontroli i reakcijama inhibicije što ukazuje na enzimsku aktivnost i hidrolizu supstrata. Sva mjerenja provedena su u duplikatu ili triplikatu te ponovljena u najmanje dva nezavisna eksperimenta.

Za mjerenja intenziteta fluorescencije korišteni su čitači mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (Tecan Group Ltd., Švicarska) ili SpectraMax iD3 (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, SAD).

3.4. Inhibicija samoagregacije amiloidnih- β -peptida

3.4.1. Puferi, reagensi

U svim pokusima korišteni su puferi 1X PBS (engl. *phosphate-buffered saline*) (pH 7,2) i 50 mmol L⁻¹ glicin-NaOH pufer (pH 8,0). 1X PBS priređivan je razrjeđivanjem ishodne otopine 10X PBS pufera. 10x PBS pufer priređen je otapanjem soli NaCl (1,37 mol L⁻¹), KCl (27 mmol L⁻¹), Na₂HPO₄ (100 mmol L⁻¹) i KH₂PO₄ (18 mmol L⁻¹) u destiliranoj vodi te je titriran vodenom otopinom NaOH do pH 7,2. Glicin-NaOH pufer koncentracije 50 mmol L⁻¹ priređen je razrjeđivanjem ishodne 100 mmol L⁻¹ otopine destiliranom vodom. Glicin-NaOH (100 mmol L⁻¹) pufer priređen je otapanjem glicina i krutog NaOH u destiliranoj vodi te titriranjem 36 %-tnom klorovodičnom kiselinom do pH 8,0.

Tioflavin T (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) korišten je kao fluorescentna boja čiji intenzitet fluorescencije se pojačava uslijed interakcije s amiloidnim fibrilnim strukturama. Tioflavin T (ThT) otopljen je u metanolu ili 50 mmol L⁻¹ glicin-NaOH puferu (pH 8,0) kao 1 mg mL⁻¹ otopina. Dobivena otopina razrjeđena je puferom do koncentracije 100 μ mol L⁻¹. U svakom

pokusu korištena je svježe priređena otopina Tioflavina T, vaganog i otopljenog neposredno prije dodatka u reakcijsku smjesu.

Kurkumin (*Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD) je korišten kao kontrolni spoj zbog njegove sposobnosti inhibicije amiloidne oligomerizacije i fibrilizacije.¹⁷⁰ Ishodna otopina kurkumina (100 mmol L^{-1}) i međurazrjeđenje ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) priređene su u DMSO-u jer pri navedenim koncentracijama kurkumin precipitira u vodenom mediju. Radne otopine (10 i $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) priređene u 1X PBS puferu neposredno prije pokusa. Za sve pokuse korištena je ishodna otopina kurkumina ne starija od 2 dana (čuvana na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.4.2. Amiloidni- β peptid

Kao izvor amiloidnih- β peptida korišten je humani rekombinantni amiloidni- β peptid (aminokiseline 1 – 42, A β 42) tretiran HFIP-om (1,1,1,3,3,3-heksafluoroizopropanol) (*Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD). Otopina amiloida priređena je prema uputama proizvođača¹⁷¹: jedan miligram amiloidnog- β peptida otopljen je u $100 \text{ } \mu\text{L}$ vodene otopine 1 %-tnog NH_4OH te soniciran 30 sekundi u vodenoj ultrazvučnoj kupelji. Odmah nakon sonikacije otopini je dodano $900 \text{ } \mu\text{L}$ 1X PBS pufera. Nakon ponovne sonikacije (30 sekundi) otopina amiloida je alikvotirana te su alikvoti pohranjeni na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do korištenja (pohrana je bila do najduže dva tjedna, prema uputama proizvođača). Radne otopine amiloida priređivane su neposredno prije pokusa razrjeđivanjem alikvota u 1X PBS puferu.

3.4.3. Optimizacija metode mjerenja inhibicije β -amiloidne samoagregacije

Samoagregacija amiloidnih- β peptida praćena je fluorescencijskom metodom prema protokolu C. Xue i suradnika.¹⁷² Praćeno je smanjenje intenziteta fluorescencije Tioflavina T uslijed njegova vezanja na fibrilne amiloidne strukture nastale samoagregacijom amiloidnih- β peptida.^{172,173}

Intenzitet fluorescencije ThT mjeren je u četiri različite reakcijske smjese: *blank* (pufer + ThT), kontrolna reakcija (pufer + A β 42 + ThT), slijepa proba (pufer + ispitivani spoj + ThT) te reakcija inhibicije (pufer + A β 42 + ispitivani spoj + ThT). U kontrolnoj reakciji u pufer je dodana količina DMSO-a koja odgovara količini DMSO-a u inhibiranoj reakciji budući da su ishodne otopine kurkumina i ispitivanih spojeva priređivane u istom organskom otapalu. U slijepoj probi u pufer je dodana količina NH_4OH koja odgovara količini navedene otopine u

kontrolnoj i inhibiranoj reakciji po dodatku β -amiloida, dok su u *blank* reakciji dodane odgovarajuće količine i DMSO i NH_4OH u pufer. Pritom je postotak DMSO-a ovisio o koncentraciji ishodne otopine testiranih spojeva/kurkumina. Konačni volumen svih reakcijskih smjesa iznosio je 100 μL , dok je koncentracijski omjer amiloida i ispitivanih spojeva bio 1:1.

Kod optimiziranja metode, prvo je određena koncentracija amiloida koja uslijed interakcije s ThT-om daje zadovoljavajući odziv u odnosu na *blank*, odnosno fluorescenciju samog ThT-a (poželjnim je smatrano da intenzitet fluorescencije *blank*-a iznosi oko 10 % ili manje intenziteta fluorescencije pozitivne kontrole). U tu svrhu ispitana je sposobnost kurkumina da inhibira β -amiloidnu samoagregaciju u koncentracijskom omjeru kurkumin: β -amiloid = 1:1 za dvije koncentracije kurkumina i $\text{A}\beta 42$ (4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Reakcijske smjese (bez dodatka ThT) inkubirane su 1 h pri 37 °C u termobloku sa zatvorenom komorom. Nakon 1 h priređena je svježa otopina ThT u metanolu koja je zatim razrijeđena u glicin-NaOH puferu do 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Tako svježe priređena otopina ThT po završetku inkubacije dodana je u sve reakcijske smjese, a konačna koncentracija ThT-a iznosila je 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Reakcijske smjese po dodatku ThT-a inkubirane su 15 minuta pri 25 °C te je nakon toga izmjerena fluorescencija. Sve reakcijske smjese priređene su u crnim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica, a fluorescencija je očitana na čitaču mikrotitarskih pločica SpectraMax iD3 (*Molecular Devices*, LLC, San Jose, CA, USA) na valnoj duljini pobude $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ i emisije $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$. Postotak inhibicije β -amiloidne samoagregacije izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - \frac{I_{\text{F}}(\text{INH}) - I_{\text{F}}(\text{SP})}{I_{\text{F}}(\text{KONTROLA}) - I_{\text{F}}(\text{BLANK})} * 100 \quad (5)$$

gdje je $I_{\text{F}}(\text{INH})$ intenzitet fluorescencije inhibirane reakcije, $I_{\text{F}}(\text{SP})$ intenzitet fluorescencije slijepe probe, $I_{\text{F}}(\text{KONTROLA})$ intenzitet fluorescencije kontrolne reakcije te $I_{\text{F}}(\text{BLANK})$ intenzitet fluorescencije *blank*-a.

Naredni korak bila je optimizacija duljine inkubacije reakcijskih smjesa sa ThT-om kako bi se odredio najbolji omjer duljine inkubacije i intenziteta fluorescencije. $\text{A}\beta 42$ i kurkumin, odnosno 4-aminokinolini, inkubirani su 24 h pri 37 °C u koncentracijskom omjeru $\text{A}\beta 42$ i kurkumina/aminokinolina 1:1 (konačne koncentracije 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ili 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Praćen je utjecaj duljine inkubacije reakcijskih smjesa sa ThT-om na intenzitet fluorescencije. Intenzitet fluorescencije očitavan je nakon 15, 30 odnosno 60 min inkubacije. Postotak inhibicije izračunat je prema jednadžbi (5).

Na temelju provedenih pokusa, zaključeno je da najbolji odziv daju reakcije u kojima je konačna koncentracija amiloida- β i ispitivanih spojeva $8 \mu\text{mol L}^{-1}$, dok je optimalno trajanje inkubacije amiloida i spojeva s ThT 15 minuta (rezultati prikazani u poglavlju 4. Rezultati i rasprava).

3.4.4. Optimizacija metode mjerenja inhibicije β -amiloidne samoagregacije

Sposobnost inhibicije β -amiloidne samoagregacije testirana je za spojeve iz grupe 4-aminokinolina (slika 3.1), hidrazona i *N*-acilhidrazona (slika 3.6), kinuklidinskih *O*-alkiloksima (slike 3.7, 3.8 i 3.9), kinuklidinskih karbamata (slike 3.10), karbamatnih derivata cinkonidina i cinkonina (slika 3.11) te monokarbamatnih (slika 3.12) i biskarbamatnih derivata bambuterola (slika 3.13). Svi navedeni spojevi, osim (*N*-acil)hidrazona, otopljeni su kao 100 mmol L^{-1} u DMSO-u, dok su (*N*-acil)hidrazoni otopljeni kao 10 mmol L^{-1} . Daljnja razrjeđenja pripremana su u 1X PBS puferu. Priređivane su četiri reakcijske smjese sastava opisanih u poglavlju 3.4.3. Koncentracijski omjer amiloida- β i kurkumina/ispitivanih spojeva u reakcijskim smjesama bio je 1:1 (finalna koncentracija $8 \mu\text{mol L}^{-1}$). Radna otopina ThT-a priređivana je kao $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ u glicin-NaOH puferu neposredno prije dodatka u reakcijske smjese. Reakcijske smjese inkubirane su 24 h pri 37°C prije dodatka ThT-a, te dodatnih 15 minuta na sobnoj temperature nakon dodatka ThT-a. Konačni volumen svih reakcijskih smjesa iznosio je $100 \mu\text{L}$. Intenzitet fluorescencije izmjeren je na čitaču mikrotitarskih pločica SpectraMax iD3 (*Molecular Devices*, LLC, San Jose, CA, USA) na valnoj duljini pobude $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ i emisije $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$. Postotak inhibicije β -amiloidne samoagregacije izračunat je prema jednadžbi (5). Sva mjerenja provedena su u triplikatu te ponovljena u najmanje dva nezavisna eksperimenta.

3.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih spojeva

3.5.1. FRAP metoda (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power)

3.5.2.1. Puferi, kemikalije, reagensi

U svim pokusima korišten je 300 mmol L⁻¹ acetatni pufer (pH 3,6) priređen otapanjem natrijevog acetata trihidrata (CH₃COONa · 3H₂O; *Kemika*, Zagreb, Hrvatska) u destiliranoj vodi i titriran ledenom octenom kiselinom do željenog pH.

Otopina 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) koncentracije 10 mmol L⁻¹ priređena je otapanjem soli TPTZ (*Fluka*, Buchs, Švicarska) u 40 mmol L⁻¹ HCl. Otopina HCl priređena je otapanjem 36,5 %-tne otopine HCl u destiliranoj vodi. Otopina željezovog(III) klorida koncentracije 20 mmol L⁻¹ priređena je otapanjem soli FeCl₃ · 6H₂O (*Kemika*, Zagreb, Hrvatska) u destiliranoj vodi. Obje otopine priređene su neposredno prije provođenja eksperimenta. FRAP reagens priređen je miješanjem acetatnog pufera, 10 mmol L⁻¹ otopine TPTZ i 20 mmol L⁻¹ otopine FeCl₃ · 6H₂O u omjeru 10:1:1.

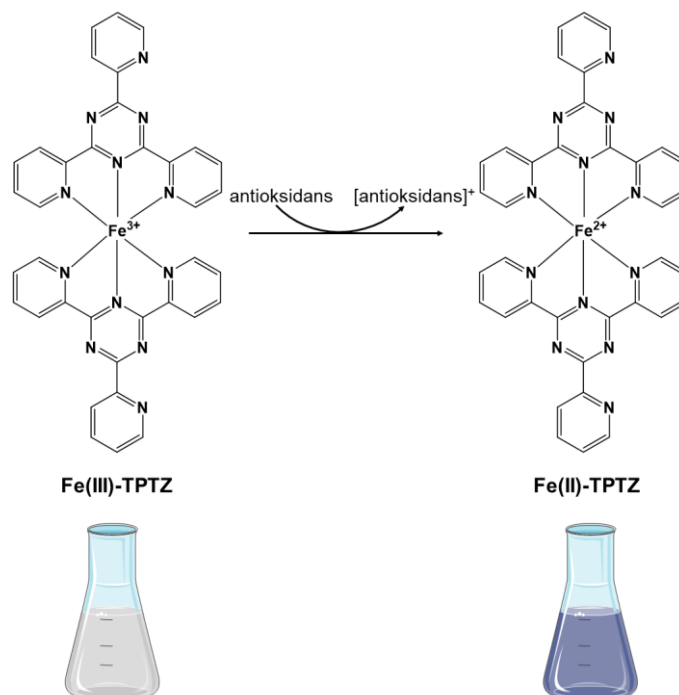
Kao standard korišten je željezov(II) sulfat čija je ishodna otopina (1 mmol L⁻¹) priređena otapanjem soli FeSO₄ · 7H₂O (*Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD) u destiliranoj vodi. Nakon pripreme otopina je alikvotirana, a alikvoti su bili pohranjeni na -20 °C do upotrebe.

Kao referentni antioksidansi korišteni su Trolox (analog vitamina E) (*Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD) i BHT (butilirani hidroksitoluen) (*Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD).

Ishodne otopine svih ispitivanih spojeva pripremljene su u DMSO-u i čuvane na 4 °C. Daljnja razrjeđenja spojeva pripremana su u destiliranoj vodi neposredno prije pokusa.

3.5.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih spojeva FRAP metodom

FRAP metoda temelji se na redukcijskom potencijalu antioksidansa, odnosno na njegovoj sposobnosti da prenese elektron na oksidirajuće vrste. Prijenos elektrona prati se porastom apsorbanције pri valnoj duljini $\lambda = 593 \text{ nm}$ kao posljedicom redukcije kompleksa Fe³⁺-tripiridiltriazin (blago žuta boja) u Fe²⁺ oblik (plava boja) u prisustvu antioksidansa pri niskom pH (slika 3.16).¹⁷⁴



Slika 3.16. Mehanizam reakcije prijenosa elektrona na kojem je bazirana FRAP metoda.¹⁷⁵

Mjerenja su provedena u četiri različite reakcijske smjese: *blank* (dH₂O + FRAP reagens), reakcija sa standardom (FeSO₄ · 7H₂O + FRAP reagens), slijepa proba (otopina spoja + acetatni pufer) i reakcija s ispitivanim spojem (otopina spoja/referentni antioksidans + FRAP reagens). Konačni volumen svih reakcijskih smjesa iznosio je 250 μL. Koncentracija TPTZ-a u reakcijskim smjesama bila je 0,8 mmol L⁻¹, dok je koncentracija FeCl₃ iznosila 1,6 mmol L⁻¹. Konačne koncentracije standarda FeSO₄ bile su u rasponu od 2,4 do 60 μmol L⁻¹. Nakon pripreme, reakcijske smjese inkubirane su 1 h u termobloku pri 37 °C, nakon čega je očitana vrijednost apsorbancije na valnoj duljini od λ = 593 nm i temperaturi od 25 °C. Za svaki ispitivani spoj i referentne antioksidanse provedena je odgovarajuća pozadinska korekcija. Sva mjerenja provedena su u triplicatu te ponovljena u tri nezavisna eksperimenta.

FRAP vrijednosti (izražene u μmol L⁻¹) za pojedine spojeve izračunate su iz baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda FeSO₄ · 7H₂O.

Sve reakcijske smjese priređene su u prozirnim mikrotitrskim pločicama s 96 jažica, a apsorbancija je izmjerena na čitaču mikrotitrskih pločica SpectraMax id3 (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA).

Antioksidacijski kapacitet temeljen na sposobnosti redukcije Fe³⁺ u Fe²⁺ testiran je za spojeve iz skupine hidrazona i *N*-acilhidrazona (slika 3.6). Konačna koncentracija testiranih

spojeva iznosila je $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, a odabrana je s obzirom na vrijednosti konstanti inhibicije ljudskih kolinesteraza (K_i) tih spojeva.

3.5.2. ORAC metoda (engl. *Oxygen Radical Antioxidant Capacity*)

3.5.2.1. Puferi, kemikalije, reagensi

U svim pokusima korištne su kemikalije i reagensi (otopina *Assay Diluent* (4X), 100X fluorescein, Trolox i inicijator peroksilnih radikala) koji su sastavnice komercijalno dostupnog kompleta *OxiSelect™ Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) Activity Assay kit* (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, SAD).¹⁷⁶ 1X PBS pufer (pH 7,4) dobiven je desetorostrukim razrjeđenjem 10X PBS pufera (priprema opisana u poglavlju 3.4.1.) koji je zatim titriran 36%-tnom vodenom otopinom HCl do željenog pH.

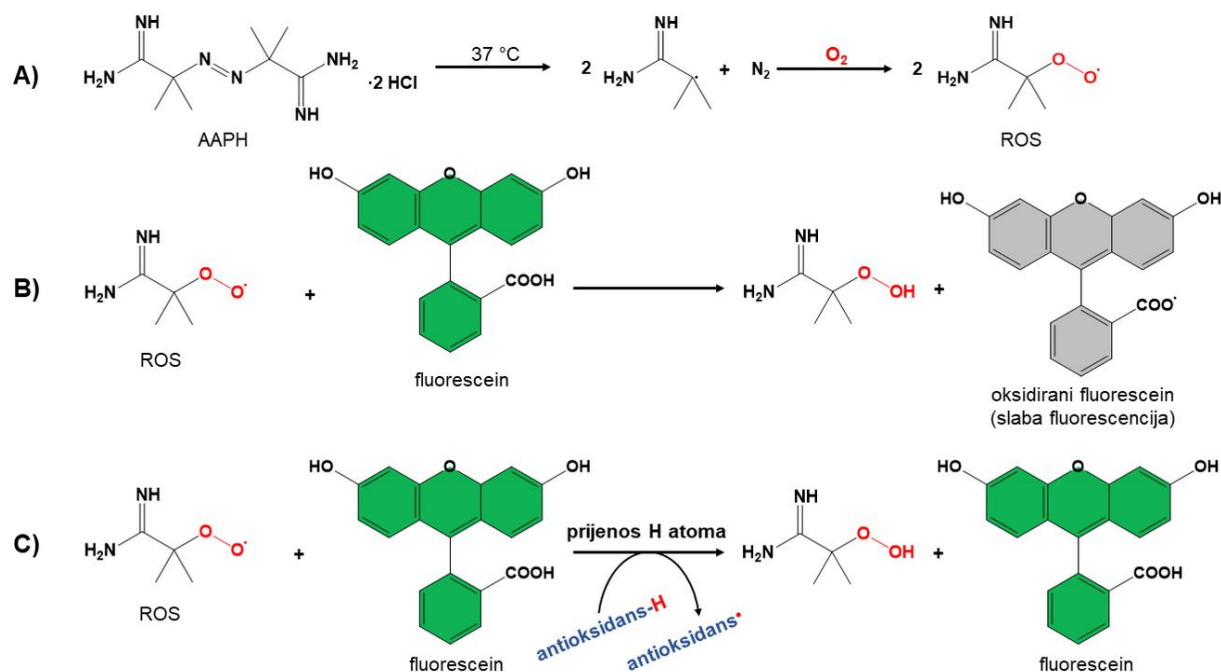
Kao otapala za pripravu reagensa i reakcijskih smjesa korištene su sljedeće otopine: *Assay Diluent* (1X) (dobiven četverostrukim razrjeđenjem *Assay Diluent* (4X) u destiliranoj vodi), 50 %-tna vodena otopina acetona i 1X PBS (pH 7,4). *Assay Diluent* (4X) je čuvan na 4°C , dok su vodena otopina acetona i 1X PBS čuvani na sobnoj temperaturi.

Kao standardni antioksidans korišten je Trolox koji je u komercijalnom kompletu dostupan u obliku 5 mmol L^{-1} otopine. Njegova daljnja razrjeđenja priređivana su u 50 %-tnoj vodenoj otopini acetona. Ishodne otopine ispitivanih spojeva pripravljanje su u DMSO-u, dok su daljnja razrjeđenja pripremana u 50 %-tnoj vodenoj otopini acetona. Prije uporabe, otopina 100X fluoresceina razrjeđena je 100 puta u *Assay Diluent*-u (1X) kako bi se dobila radna otopina 1X fluoresceina. Inicijator peroksilnih radikala 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) pripreman je neposredno prije uporabe kao 80 mg mL^{-1} otopina u 1X PBS puferu.

3.5.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih spojeva ORAC metodom

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta spojeva ORAC metodom temelji se na sposobnosti antioksidansa da spriječe oksidaciju fluorescentne probe (ovdje fluoresceina) izazvanu ROS-ovima (peroksilnim radikalima). Ukratko, reakcijom peroksilnih radikala s fluorescentnom probom nastaje oksidirani fluorescein slabe fluorescencije što uzrokuje opadanje intenziteta fluorescencije u vremenu. Spojevi koji mogu interferirati s navedenim procesom na način da prenesu vodikov atom na nastali radikal i tako „hvataju“ reaktivne kisikove ili dušikove vrste,

štite fluorescentnu probu od oksidacije zbog čega intenzitet fluorescencije sporije opada u vremenu, ovisno o antioksidacijskom kapacitetu ispitivanog spoja.^{176,177} Princip rada ORAC metode prikazan je na slici 3.17.



Slika 3.17. Princip rada ORAC metode. A) nastanak ROS-ova (peroksilni radikali) termalnom razgradnjom 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorida (AAPH) u prisustvu kisika. B) oksidacija fluoresceina peroksilnim radikalima pri čemu nastaje produkt slabe fluorescencije. C) sprječavanje oksidacije fluoresceina prisustvom antioksidansa. Slika je izrađena prema referenci 178.

Mjerenja su provedena u tri različite reakcijske smjese: slijepa proba (fluorescein i 50 %-tni aceton), reakcija sa standardnim antioksidansom (fluorescein, 50 %-tni aceton, Trolox), i reakcija s ispitivanim spojem (fluorescein, 50 %-tni aceton, ispitivani spoj). Po pripremi, sve reakcijske smjese inkubirane su 30 minuta u termobloku s poklopcem pri 37 °C. Nakon inkubacije, svim reakcijskim smjesama dodana je otopina AAPH te je mjeren intenzitet fluorescencije na valnoj duljini pobude $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ i valnoj duljini emisije $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ pri temperaturi od 37 °C. Snimanje je trajalo 3 sata, pri čemu je intenzitet fluorescencije očitavan svakih 60 sekundi. Konačno razrjeđenje ishodne otopine fluoresceina bilo je 133 puta, a konačna koncentracija AAPH bila je 37 mmol L^{-1} , dok su konačne koncentracije Troloxa bile

u rasponu od 2,5 – 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Konačni ukupni volumen svih reakcijskih smjesa iznosio je 200 μL .

Antioksidacijski kapacitet spojeva i Troloxa određen je iz površine ispod krivulje opadanja intenziteta fluorescencije (engl. *area under curve*, AUC) koji je korigiran za vrijednost AUC slijepe probe (50 %-tna vodena otopina acetona + 1X otopina fluoresceina + AAPH) kako bi se dobila neto AUC vrijednost. Vrijednosti neto AUC uspoređene su sa standardnom krivuljom Troloxa, a antioksidacijski kapacitet pojedinog spoja izražen je kao ekvivalent koncentracije Troloxa (TE) jednakog učinka.

Sva mjerenja provedena su u crnim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica korištenjem čitača mikrotitarskih pločica SpectraMax iD3 (*Molecular Devices*, LLC, San Jose, Kalifornija, SAD). Za sve izračune upotrijebljen je statistički paket GraphPad Prism (*Graph Pad Inc*, San Diego, SAD).

Antioksidacijski kapacitet temeljen na sposobnosti prijenosa vodikovog atoma na peroksilne radikale testiran je za spojeve iz skupine benzokinona (slika 3.5.) pri čemu je njihova konačna koncentracija u reakcijskim smjesama iznosila 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a koja je bila odabrana s obzirom na prosjek njihovih konstanti inhibicije ljudskih kolinesteraza (K_i).

3.6. Inhibicija aktivnosti monoamin-oksida (MAO)

3.6.1. Puferi, kemikalije, reagensi

Za mjerenje inhibicije monoamin-oksida korišteni su komercijalno dostupni ljudski rekombinantni enzimi MAO-A (kat. br. M7316) i MAO-B (kat. br. M7441). Vijale enzima sadržavale su ~5 mg/mL proteina (*Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD). Alikvoti originalne otopine enzima čuvani su na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Radne otopine enzima priređene su razrjeđivanjem 20 μL alikvota enzima u 10 mL kalijevog fosfatnog pufera neposredno prije mjerenja.

Kao supstrat MAO enzima korišten je komercijalno dostupan *p*-tiramin hidroklorid (kat. br. T2879, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD). Radna otopina 2 mmol L^{-1} supstrata priređena je otapanjem 17,3 mg *p*-tiramina u 50 mL kalijevog fosfatnog pufera.

Kao izvor enzima peroksidaze korištena je peroksidaza iz hrena (engl. *Horseradish Peroxidase*, HRP, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD). 2,5 mg enzima otopljeno je u 2 mL kalijevog fosfatnog pufera kako bi se dobila otopina koja sadrži ~400 U/mL HRP.

Kao fluorogeni supstrat enzima HRP korišten je 10-acetil-3,7-dihidroksifenoksazin (*Amplex Red*), koji je bio sintetiziran na Farmaceutskom fakultetu u Ljubljani pod vodstvom prof. Stanislava Gobeca prema ranije opisanom protokolu.¹⁷⁹ Radna otopina *Amplex Red*-a priređivana je u DMSO-u kao 50 mmol L⁻¹.

Smjesa reagensa priređena je miješanjem 13 mL 2 mmol L⁻¹ otopine *p*-tiramina, 130 µL ~ 400 U/mL otopine HRP i 65 µL 50 mmol L⁻¹ otopine *Amplex Red*-a.

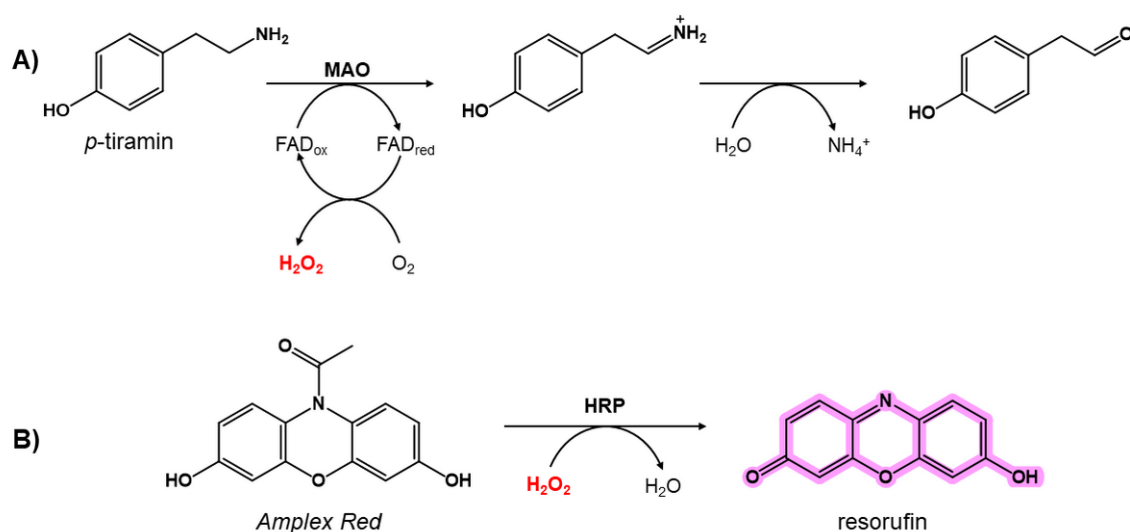
Sva mjerenja te priprava radnih otopina MAO enzima, HRP i *p*-tiramina provedena su u 50 mmol L⁻¹ kalijevom fosfatnom puferu s dodatkom 0,05 % detergenta Triton X-114 (pH 7,4) priređenom na Farmaceutskom fakultetu u Ljubljani, Slovenija. Pufer je pripremljen otapanjem 1,452 g KH₂PO₄ i 6,85 g K₂HPO₄ u 1 L destilirane vode uz dodatak 0,05 % detergenta Triton X-114, nakon čega je titriran s 10 %-tnom otopinom H₃PO₄ ili 1 mol L⁻¹ otopinom KOH do željenog pH. Svi potrebni reagensi pribavljeni su od proizvođača *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD.

Ishodne otopine ispitivanih spojeva (10 ili 100 mmol L⁻¹, ovisno o spoju) kao i sva daljnja razrjeđenja priređivana su u DMSO-u.

3.6.2. Mjerenje aktivnosti enzima MAO-A i MAO-B u prisustvu ispitivanih spojeva

Sposobnost inhibicije MAO-A i MAO-B enzima odabranim spojevima određena je u suradnji s dr. sc. Damijanom Knezom i prof. dr. sc. Stanislavom Gobcem s Farmaceutskog fakulteta u Ljubljani.

Aktivnost MAO enzima mjeri se spektrofotometrijskom metodom¹⁸⁰ koja se temelji na oksidaciji fluorogenog supstrata enzima HRP (*Amplex Red*) prilikom čega nastaje fluorescentni resorufin čiji intenzitet fluorescencije se mjeri na valnoj duljini pobude $\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm i emisije $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm. Za oksidaciju *Amplex Red*-a odgovoran je vodikov peroksid koji nastaje prilikom pretvorbe *p*-tiramina, supstrata MAO enzima, u aldehyd. Ovim načinom se posredno, putem mjerenja intenziteta fluorescencije nastalog resorufina, mjeri količina vodikovog peroksida nastalog djelovanjem MAO enzima. Princip rada metode prikazan je na slici 3.18.



Slika 3.18. Princip metode mjerenja aktivnosti MAO enzima. A) Oksidativna deaminacija *p*-tiramina katalizirana MAO enzimima pri čemu nastaje odgovarajući keton i vodikov peroksid. To je enzimska reakcija koja se odvija u dva koraka. U prvom (redukcijskom) koraku dva vodikova atoma prenose se s *p*-tiramina na kofaktor FAD koji se reducira u FADH₂. U drugom (oksidacijskom) koraku atomi vodika prenose se s reduciranog FADH₂ na molekulu kisika, pri čemu nastaje vodikov peroksid. Istovremeno, iminski intermedijer spontano hidrolizira u odgovarajući keton. B) Oksidacija fluorogenog supstrata enzima HRP (*Amplex Red*) pri čemu nastaje fluorescentni resorufin. Enzim HRP u prisustvu vodikovog peroksida katalizira oksidaciju *Amplex Red*-a u radikalni intermedijer (nije prikazano) čijim disproporcioniranjem nastaje resorufin. Slika je izrađena prema referencama 181 i 182.

Za određivanje inhibicije MAO enzima ispitivanim spojevima priređivane su tri reakcijske smjese: kontrolna reakcija (pufer, MAO enzim i DMSO), inhibirana reakcija (pufer, MAO enzim i inhibitor) i neenzimska kontrola (pufer i DMSO). Po dodatku MAO enzima, reakcijske smjese inkubirane su 15 minuta pri sobnoj temperaturi, nakon čega je svim reakcijskim smjesama dodana smjesa reagensa (sastav opisan u podpoglavlju 3.6.1.) i započeto je mjerenje u trajanju 20 – 30 minuta. Konačna koncentracija MAO enzima bila je ~5 µg/mL, *p*-tiramina 1 mmol L⁻¹, a *Amplex Red*-a 125 µmol L⁻¹. Aktivnost HRP u reakcijskoj smjesi iznosila je 2 U/mL. Ukupan volumen svih smjesa iznosio je 200 µL.

Postotak preostale aktivnosti MAO enzima u inhibiranim reakcijama izračunat je iz omjera brzina reakcije inhibirane i kontrolne reakcije (izmjerene kao promjena intenziteta fluorescencije u vremenu). Obje izmjerene vrijednosti korigirane su za iznos intenziteta fluorescencije u neenzimskoj kontroli. Postotak inhibicije ispitivanim spojevima izračunat je iz preostale enzimске aktivnosti.

Sposobnost inhibicije MAO-A i MAO-B enzima ispitana je za spojeve iz skupine 4-aminokinolina različitih duljina poveznice (slika 3.2.), kinuklidinskih karbamata (slika 3.10.) i monokarbamatnih derivata bambuterola (slika 3.12.). Za $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ spojeve iz obiju skupina najprije je izmjeren postotak inhibicije, a za spojeve za koje je izračunato da pri navedenoj koncentraciji inhibiraju barem 70 % enzimске aktivnosti određen je postotak inhibicije za najmanje osam koncentracija inhibitora u rasponu od 30 nmol L^{-1} do $300 \mu\text{mol L}^{-1}$. Iz dobivenih postotaka određena je vrijednost IC_{50} , odnosno koncentracija inhibitora potrebna da se inhibira 50 % molekula enzima.

Sve reakcijske smjese priređene su u crnim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica, a sva mjerenja provedena su na čitaču mikrotitarskih pločica BioTek Synergy HTX (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Za sve izračune i izradu grafičkih prikaza upotrijebljeni su program Microsoft Excel i statistički paket GraphPad Prism (Graph Pad Inc, San Diego, SAD).

3.7. Kelacija biometala

3.7.1. Kemikalije, reagensi i ispitivani spojevi

Kao izvor metalnih iona Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} korištene su komercijalno dostupne soli: željezov(II) klorid tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), bakrov(II) klorid dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i cinkov(II) klorid (ZnCl_2) (Sigma Aldrich, St. Louise, SAD). Metalne soli otopljene su u metanolu kao 100 mmol L^{-1} otopine neposredno prije pokusa. Ishodne otopine ispitivanih spojeva priređivane su kao 100 mmol L^{-1} u DMSO-u. Sva daljnja razrjeđenja ishodnih otopina metala i soli priređivan su u metanolu.

Sposobnost keliranja biometalnih iona testirana je za odabrane spojeve iz skupine 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice (tablica 3.2.).

3.7.2. Procjena kelacijske sposobnosti odabranih spojeva

Za $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ otopine spojeva i $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ otopine metala, te otopine dobivene miješanjem otopina spojeva i otopina metala u koncentracijskom omjeru 1:2 snimani su apsorpcijski spektri u rasponu valnih duljina $\lambda = 180 - 600 \text{ nm}$. Sposobnost odabranih spojeva da keliraju ione metala željeza, bakra i cinka procijenjena je na temelju promjena u UV–VIS spektrima otopina metala i spojeva u odnosu na spektre samih metala odnosno spojeva.^{25,183} Promjene u spektrima

ispitivanih spojeva (pomak apsorpcijskih maksimuma i/ili promjena intenziteta maksimuma) u odnosu na spektre samih spojeva i metala ukazuju na nastanak kompleksa spoj–metal. Za dodatnu potvrdu nastanka kompleksa korišten je prikaz diferencijalnih spektara. Diferencijalni spektri dobiveni su numeričkim oduzimanjem spektara spojeva i metala od spektra kompleksa metal–spoj.²⁵

Sva snimanja rađena su u kvarcnoj kiveti volumena zapremnine 1 mL na spektrofotometru Cary 3500 Multicell UV–VIS (*Agilent*, Santa Clara, SAD). Za sve izračune i izradu grafičkih prikaza korišten je statistički paket GraphPad Prism (*Graph Pad Inc*, San Diego, SAD).

3.8. Citotoksičnost spojeva

3.8.1. Stanice, puferi, kemikalije i ispitivanih spojevi

Za istraživanje citotoksičnosti odabranih spojeva korištene su certificirane stanične kulture: ljudske stanice hepatocita HepG2 (ATCC-HB-8065; *American Type Culture Collection*, SAD), ljudske embrionalne stanice bubrega HEK293 (ECACC 85120602; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska) i ljudske stanice neuroblastoma SH-SY5Y (ECACC 94030304; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska).

Za uzgoj stanica korišteni su mediji MEM (engl. *Minimum Essential Medium*; *Sigma Aldrich*, Njemačka) i DMEM F-12 (engl. *Dulbecco's Modified Eagle F-12*; *Sigma Aldrich*, Njemačka). Za određivanje citotoksičnosti, osim navedenih medija, korišten je i medij 1X RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute 1640*; *Thermo Fischer Scientific*, SAD).

10X fosfatni pufer (10X PBS, pH 7,4) pripremljen je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.4.1. Pufer je autoklaviran i čuvan u sterilnim uvjetima do korištenja. Prije korištenja pripremljena je otopina 1X PBS-a deseterostrukim razrjeđenjem 10X PBS pufera sterilnom deioniziranom vodom.

Za određivanje broja živih stanica korištena je otopina boje tripan plavo (0,4 % (v/v), *Sigma Aldrich*, Njemačka).

Za određivanje učinka odabranih spojeva na rast stanica korišten je komercijalni komplet *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit* (*Promega*, SAD) koji sadrži tetrazolijevu sol MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) i fenazin-etosulfat (PES) koji stabilizira MTS u otopini. Osim komercijalnog paketa, korišteni su MTS (*Promega*, SAD) te reagens fenazin-metosulfat (PMS; *Sigma Aldrich*,

Njemačka) kupljeni zasebno. U tom slučaju ishodna otopina MTS pripremljena je kao 2 mg/mL u 1X PBS, dok je PMS pripremljen kao 0,92 mg/mL u 1X PBS puferu. Kao i kod PES-a, uloga PMS-a je stabilizacija MTS-a u otopini. Tako priređene otopine pomiješane su u volumnom omjeru MTS:PMS = 20:1 kako bi se dobila *One Solution* otopina (iz komercijalnog kompleta) ili otopina MTS + PMS. Radna otopina MTS reagensa kojom su tretirane stanice dobivena je miješanjem *One Solution* otopine s medijem za uzgoj stanica u volumnom omjeru 1:6.

Ishodne otopine svih spojeva priređene su u DMSO-u kao 50 ili 100 mmol L⁻¹ otopine, ovisno o spoju. Učinak spojeva na rast i preživljenje stanica testiran je na spojevima iz skupine 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice (slika 3.2.) i *O*-alkiloksima (slike 3.7., 3.8. i 3.9.).

3.8.2. Uzgoj staničnih kultura

Sve stanice uzgajane su kao adherentne kulture pri kontroliranim uvjetima (5,2 % pCO₂ i temperaturi 37 °C) u odgovarajućim medijima uz dodatak 1 % otopine antibiotika penicilin-streptomycin (Pen-Strep, *Sigma Aldrich*, Njemačka). Stanice HepG2 i HEK293 uzgajane su u MEM-u uz dodatak 10 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma FBS (FBS; *Sigma Aldrich*, Njemačka) i 1 % neesencijalnih aminokiselina (*Sigma Aldrich*, Njemačka), dok je SH-SY5Y stanična linija uzgajana u mediju DMEM F12 uz dodatak 15 % (v/v) FBS i 1 % neesencijalnih aminokiselina. Stanice su uzgajane u plastičnim posudama za uzgoj do ~80 – 90 % konfluentnosti (praćeno pod svjetlosnim mikroskopom Carl Zeiss™ Axio Vert.A1, *Thermo Fisher Scientific - Fisher Scientific AS*, Oslo, Norveška). Za odvajanje stanica od podloge korištena je 0,25 %-tna otopina tripsina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (*Sigma Aldrich*, Njemačka), nakon čega su stanice resuspendirane u odgovarajućem mediju (uz prisustvo FBS-a) i nasađene u na prozirne mikrotitarske pločice s 96 jažica namijenjene za uzgoj stanica.

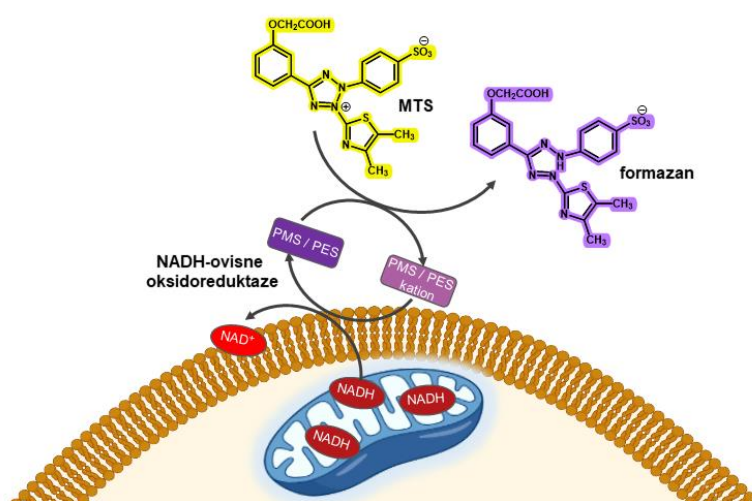
3.8.3. Određivanje broja živih stanica u uzorku

Broj živih/mrtvih stanica u uzorku određen je pomoću diferencijalnog bojanja bojom tripan plavo. Ova metoda temelji se na činjenici da žive stanice imaju staničnu membranu koja je nepropusna za određene boje, dok je kod mrtvih stanica integritet membrane narušen, zbog čega takve propuštaju boju u citoplazmu čime se one boje plavo.¹⁸⁴ Diferencijalno bojanje stanica odrađeno je prema protokolu proizvođača uređaja za brojanje stanica TC20 (*Bio-Rad*, SAD).

Nakon odvajanja stanica od podloge posude za uzgoj, u Eppendorf mikrotubici pomiješane su nerazrijeđena suspenzija stanica i otopina boje tripan plavo u volumnom omjeru 1:1 (po 10 ili 20 μL svake komponente). Potom je 10 μL dobivene smjese otpipetirano u komoricu pločice za brojanje stanica (*Cell Counting Slides*, BioRad, SAD) i postavljeno u uređaj TC20 koji automatski broji stanice promjera u rasponu od 6 – 50 μm i prikazuje broj stanica po mililitru otopine te postotak živih stanica u uzorku.

3.8.4. Određivanje citotoksičnosti spojeva

Citotoksičnost spojeva ispitana je na stanicama ljudskih hepatocita HepG2, ljudskim embrionalnim stanicama bubrega HEK293 i ljudskim stanicama neuroblastoma SH-SY5Y koje predstavljaju model jetre, kao organa u kojem se odvijaju procesi biotransformacija lijekova, model bubrega, kao organa koji izlučuje štetne tvari i metaboličke produkte, odnosno model mozga, kao cilnog organa lijekova koji djeluju na središnji živčani sustav. Za određivanje citotoksičnosti odabranih spojeva korištena je tzv. metoda MTS. Riječ je o kolorimetrijskoj metodi kojom se određuje broj vijabilnih stanica, a temelji se na redukciji žuto obojene soli MTS u ljubičasto obojeni produkt formazan. Reakcija redukcije odvija se u živim stanicama gdje je potpomognuta djelovanjem dehidrogenaza uz koenzime NADH ili NADPH. Pritom PMS/PES služi kao intermedijerni akceptor elektrona koji ubrzava redukciju MTS soli i nastanak stabilnog produkta. Kod neživih stanica ne dolazi do redukcije soli MTS te promjena boje izostaje.^{185,186} Na slici 3.19. prikazan je princip rada metode MTS.



Slika 3.19. Princip rada metode određivanja citotoksičnosti spojeva temeljene na redukciji soli MTS (žuto obojenje) u produkt formazan (ljubičasto obojenje) u živim stanicama.

U svaku jažicu prozirne mikrotitarske pločice od 96 jažica dodano je 100 μL suspenzije stanica koncentracije 100 000 ili 200 000 stanica/mL (ovisno o vrsti stanica i brzini njihovog rasta); rubne jažice pločice ispunjene su 1X PBS puferom kako bi sve stanice rasle u ujednačenim uvjetima. Stanice su inkubirane preko noći kako bi se zalijepile za dno jažice, nakon čega je medij u kojemu su uzgajane aspiriran te su tretirane s ispitivanim spojevima (8 različitih koncentracija spojeva u rasponu koncentracija 0.01 – 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$) otopljenima u MEM-u ili DMEM-u s dodatkom dogovarajuće količine FBS-a, Pen-Strep-a i neesencijalnih aminokiselina. U kontrolnim jažicama stanice su uzgajane samo u navedenim medijima te u medijima s dodatkom DMSO-a koji je odgovarao konačnoj koncentraciji DMSO-a u jažicama koje sadrže najveće koncentracije ispitivanih spojeva (do maksimalno 1,6%). Kao pozitivna kontrola citotoksičnosti korišten je DMSO, odnosno stanice su tretirane visokim koncentracijama DMSO-a (do 20 %). Nakon tretmana spojevima, stanice su inkubirane 24 h (37 °C, 5.2 % pCO_2), isprane 1X PBS puferom te je u svaku jažicu koja sadrži stanice dodano 120 μL radne otopine MTS reagensa. Otopina je dodana i u nekoliko praznih jažica kako bi se izmjerila apsorbancija samog reagensa (*blank*), što je služilo za pozadinsku korekciju tretiranih i kontrolnih jažica. Stanice su potom inkubirane na 37°C do razvoja boje (45 – 120 minuta), nakon čega je izmjerena apsorbancija uzorka. IC_{50} vrijednosti, koje predstavljaju koncentraciju spoja pri kojoj je 50% od ukupnog broja tretiranih stanica vijabilno, izračunate su prema jednadžbi:

$$\text{Citotoksičnost (\%)} = 100 - \frac{A(\text{uzorak}) - A(\text{blank})}{A(\text{kontrola}) - A(\text{blank})} \quad (6)$$

pri čemu “uzorak” predstavlja stanice tretirane odabranim spojevima. Konačni rezultati izračunati su na temelju najmanje 4 nezavisna pokusa.

Sva mjerenja očitana su na valnoj duljini $\lambda = 490 \text{ nm}$ na čitaču mikrotitarskih pločica SpectraMax iD3 (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA). IC_{50} vrijednosti izračunate su korištenjem statističkog paketa GraphPad Prism (Graph Pad Inc, San Diego, SAD).

3.9. In silico analiza ispitivanih spojeva

3.9.1. Molekulska uklapanje

Metoda molekuskog uklapanja (engl. *molecular docking*) korištena je u svrhu predviđanja orijentacije i neveznih interakcija ispitivanih spojeva u aktivnom mjestu AChE i BChE. Kao

enzimski receptori korištene su kristalne strukture slobodnih kolinesteraza dostupne u podatkovnoj bazi PDB (engl. *Protein data bank*)¹⁸⁷: za AChE korištena je struktura 4EY4¹⁸⁸, dok je za BChE korištena struktura 1POI¹⁸⁹. Strukture spojeva nacrtane su u programu ChemBio3D Ultra 21.0 (*PerkinElmer, Inc.*, Waltham, MA, SAD), nakon čega su, korištenjem *Prepare Ligands* protokola u programu Biovia Discovery Studio Client v21. (*Dassault Systèmes*, Vélizy-Villacoublay, Francuska), definirana njihova protonacijska stanja, izomeri i tautomeri pri pH 7,4. Spojovima je potom minimizirana energija korištenjem CHARMM polja sila i metode minimizacije *Smart Minimizer* pomoću protokola *Minimize Ligands* implementiranog u programu Biovia Discovery Studio. Također, pripremljeni su i enzimski receptori na način da im je definirano mjesto vezanja liganada unutar njihovih kristalnih struktura. Mjesto vezanja definirano je sferom koja okružuje aminokiselinske ostatke koji čine ždrijelo aktivnog mjesta ($r = 13,5 \text{ Å}$ kod AChE i $r = 14,0 \text{ Å}$ kod BChE). Molekule vode koje su zadržane za proces uklapanja molekula (tzv. očuvane molekule vode) identificirane su superpozicijom mreža molekula vode iz kristalnih struktura različitih AChE i BChE kompleksa dostupnih u podatkovnoj bazi PDB te su preslikane u kristalne strukture AChE i BChE koje su korištene kao enzimski receptori. Molekulsko uklapanje spojeva u aktivno mjesto enzimskih receptora učinjeno je u programu Biovia Discovery Studio korištenjem protokola *Flexible docking*. Protokol se sastoji od slijedećih koraka: izračuna enzimskih konformacija pomoću algoritma ChiFlex, generiranja mogućih konformacija liganada, uklapanja liganada u aktivno mjesto enzima pomoću algoritma LibDock, klusterske analize poza liganada kako bi se uklonile slične poze, rekonstrukcije enzimskih konformacija optimizacijom odabranih aminokiselinskih ostataka u prisutnosti nepomičnih liganada pomoću algoritma ChiRotor te konačne optimizacije orijentacije liganada pomoću algoritma CDOCKER.

Kao fleksibilne aminokiseline koje čine ždrijelo aktivnog mjesta odabrane su one aminokiseline koje najčešće ostvaruju nevezne interakcije s ligandima: Tyr72, Trp86, Tyr124, Tyr133, Ser203, Trp236, Trp286, Phe295, Phe297, Glu334, Tyr337, Phe338, Tyr341, His447 i Tyr449 kod AChE te Asn68, Asp70, Trp82, Gln119, Tyr128, Glu198, Ser198, Pro285, Leu286, Ser287, Trp231, Glu325, Phe329, Phe398 i His438 kod BChE. Za definiranje različitih konformacija receptora korištene su vrijednosti torzijskog kuta koji čini lanac atoma N – C α – C β – C γ u aminokiselinama. Prag za utvrđivanje jesu li dva torzijska kuta jednaka ili ne iznosio je 25° pri čemu su različitima smatrane samo konformacije fleksibilnih aminokiselina u kojima se opisani torzijski kut razlikuje za više od ove zadane vrijednosti. Kao algoritam za generaciju

konformacija liganada odabran je *BEST* koji osigurava najveću pokrivenost konformacijskog prostora liganada. Konformacije zasebnih izomera liganada generirane su unutar 20 kcal/mol (prag relativne energije). Tijekom modeliranja uklapanja korištenjem LibDock algoritma, primijenjena je RMSD tolerancija u svrhu prihvaćanja ili odbacivanja pojedinog podudaranja interakcijskih mjesta (engl. *hotspot*-ova) konformera liganada i receptora, koja je iznosila 0,25 Å. Ostali parametri LibDock algoritma za uklapanje postavljeni su prema unaprijed definiranim postavkama za provođenje uklapanja u načinu *High Quality*. Sačuvane orijentacije liganada zatim su podvrgnute molekularnoj dinamici korištenjem metode simuliranog kaljenja (engl. *simulated annealing*) pri čemu je temperatura povišena na 700 K (2000 ciklusa) i zatim spuštana na 310 K (5000 ciklusa). Nakon toga provedena je konačna minimizacija svake poboljšane poze liganada u rigidnom receptoru, nakon čega su za svaku konačnu pozu izračunate interakcijska energija i CHARMM energija (zbroj interakcijske energije i napetosti liganada). Reprezentativne poze za svaki kompleks enzim – ligand odabrane su identificiranjem poza s najvećim udjelom najbolje vrednovanih ocjenjivačkih funkcija (engl. *scoring functions*) koje procjenjuju afinitet enzima za ligand.

3.9.2. Procjena biodostupnosti spojeva u središnjem živčanom sustavu nakon oralne primjene

Biodostupnost istraživanih spojeva nakon oralne primjene procijenjena je na temelju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava izračunatih pomoću online platforme *Chemicalize 2018*¹⁹⁰: logaritma koeficijenta raspodjele oktanol/voda (logP), molekulske mase (M_w), polarne površine (engl. *polar surface area*; PSA), broja donora vodikovih veza (engl. *hydrogen bond donor*; HBD), broja akceptora vodikovih veza (engl. *hydrogen bond acceptor*; HBA) i molekulske fleksibilnosti koju karakterizira broj rotirajućih veza (engl. *rotational bond*; RB). Dobivene vrijednosti uspoređene su s preporučenim graničnim vrijednostima fizikalno-kemijskih parametara lijekova koji prolaze kroz KMB te djeluju u središnjem živčanom sustavu ($\log P \leq 5$; $M_w \leq 500$ Da; $HBD \leq 5$; $HBA \leq 10$, $RB \leq 10$ i $PSA \leq 70$ Å²).^{120,191–193}

3.9.3. Procjena prolaznosti spojeva kroz krvno-moždanu barijeru

Mogućnost prolaska spojeva kroz KMB procijenjena je korištenjem protokola *ADMET descriptors* unutar programa Biovia Discovery Studio Client v21. (Dassault Systèmes, Vélizy-

Villacoublay, Francuska). Protokol je utemeljen na kvantitativnom linearnom regresijskom modelu za procjenu prolaznosti kroz KMB s pouzdanošću od 95 % i 99 % prikazanom u obliku elipse koja predstavlja korelaciju između polarne površine molekule (PSA-2D) i atomske lipofilnosti (AlogP98), a koja je dobivena na temelju parametara više od 800 spojeva koji djeluju u središnjem živčanom sustavu nakon oralne primjene, a prolaznost kroz KMB određena im je eksperimentalno.¹⁹⁴ Prolaznosti kroz KMB izražena je u obliku parametra logBB (logaritam koeficijenta raspodjele koncentracije spoja u mozgu/krv), a dobivene vrijednosti mogu se svrstati u četiri razine procjene permeabilnosti kroz KMB: **0** (vrlo visoka mogućnost prolaska; $\log BB \geq 0,7$, koncentracija spoja u mozgu je barem pet puta veća nego u krvi), **1** (visoka mogućnost prolaska; $0 \leq \log BB < 0,7$), **2** (srednja mogućnost prolaska; $-0,52 < \log BB < 0$), **3** (niska mogućnost prolaska; $\log BB < -0,52$) i **4** (nedefinirano; izvan granica pouzdanosti).

3.9.4. Procjena apsorpcije spojeva u ljudskom probavnom sustavu

Apsorpcija istraživanih spojeva u ljudskom probavnom sustavu, odnosno u crijevima, procijenjena je korištenjem *online* platforme pkCSM.¹⁹⁵ Procjena se temelji na lipofilnosti molekule izraženoj kao vrijednost partijskog koeficijenta logP, izračunatoj prema Wildman-Crippenovoj metodi (WlogP), te na njihovoj izračunatoj topološkoj polarnoj površini (tPSA). Prema navedenom modelu, ako je apsorpcija spoja manja od 30%, njegova apsorpcija smatra se slabom.^{196,197}

§ 4. REZULTATI

U okviru ove doktorske disertacije ispitano je ukupno 189 spojeva podijeljenih u šest skupina: 63 spoja iz skupine 4-aminokinolina, 15 derivata amodiakina, 15 spojeva iz skupine benzokinona, 16 spojeva iz skupine (*N*-acil)hidrazona, 45 spojeva iz skupine *O*-alkiloksima te 35 spojeva iz skupine karbamata. Svim spojevima prvo je bila određena sposobnost inhibicije ljudskih kolinesteraza te je pomoću Hunter-Downsove jednadžbe ovisnosti $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata analiziran način vezanja spojeva u aktivno mjesto acetilkolinesteraze, budući da periferno mjesto AChE može tvoriti neurotoksične komplekse s amiloidnim peptidima.⁶¹ Za dodatnu potvrdu načina vezanja spojeva u aktivno mjesto kolinesteraza, kao i analizu doprinosa strukture spoja njegovom inhibitornom potencijalu, korištena je metoda molekuskog uklapanja. Nakon odabira, s obzirom na njihov inhibitorni učinak prema kolinesterazama i/ili njihovim strukturnim motivima, dio spojeva bio je podvrgnut istraživanjima njihovog mogućeg učinka na druge mete uključene u patofiziologiju AB: aktivnost enzima BACE1, samoagregaciju amiloidnih peptida A β 42, oksidacijski stres, poremećaj homeostaze biometala Fe²⁺, Cu²⁺ i Zn²⁺ te aktivnost enzima MAO A i B. Za daljnja istraživanja odabrani su spojevi koji su aktivnost kolinesteraza inhibirali u mikro ili nanomolarnom koncentracijskom području i/ili spojevi sa strukturnim motivima za koje je bilo pretpostavljeno da bi mogli doprinijeti nekoj od navedenih dodatnih bioloških aktivnosti (prema biološki aktivnim strukturama opisanima u poglavlju Literaturni pregled). Pojedininim skupinama spojeva istražen je i citotoksični učinak na stanične linije SH-SY5Y, HepG2 i HEK293 nakon 24-satne izloženosti kako bi se procijenila sigurnost njihove primjene *in vivo*. Uz navedene eksperimentalne metode, u svrhu procjene njihove bioraspoloživosti kao potencijalnih lijekova, primjenom *in silico* metoda analizirana su i fizikalno-kemijska svojstva odabranih spojeva.

4.1. Inhibicija kolinesteraza

Kao inhibitori ljudskih kolinesteraza, AChE_{rec} i BChE, ispitani su spojevi iz skupina 4-aminokinolina, derivata amodiakina, benzokinona, hidrazona i *N*-acilhidrazona te *O*-alkiloksima. Inhibitorna sposobnost karbamatnih spojeva bila je određena u prethodnim istraživanjima, a njihove konstante inhibicije prikazane su u Dodatku. Sposobnost inhibicije

kolinesteraza spojevima iz skupina 4-aminokinolina, derivata amodiakina, benzokinona, hidrazona i *N*-acilhidrazona te *O*-alkiloksima određena je konstantom disocijacije kompleksa enzim–inhibitor, K_i , koja je izražena kao srednja vrijednost najmanje tri nezavisna pokusa ($\pm$ standardna devijacija). Recipročna vrijednost K_i konstante ($1/K_i$) odgovara afinitetu enzima prema spoju. Iz Hunter-Downsovog prikaza ovisnosti eksperimentalno određenih konstanti $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata, za ljudsku AChE_{rec} procijenjen je i tip inhibicije: kompetitivni (k), nekompetitivni (n) ili mješoviti (m) tip inhibicije. Selektivnost spojeva prema jednoj od kolinesteraza određena je iz izraza $SI = K_i(AChE)/K_i(BChE)$ gdje SI predstavlja indeks selektivnosti. U slučaju kada je $SI < 1$ tada AChE ima veći afinitet prema spoju, dok u slučaju kada je $SI > 1$ veći afinitet ima BChE.

4.1.1. Inhibicija kolinesteraza 4-aminokinolinima

Skupina 4-aminokinolina bila je podijeljena u tri podskupine s obzirom na duljinu alkilne poveznice između aminokinolinskog prstena i terminalne amino grupe ili supstituenta na položaju C(7) aminokinolinskog prstena: 4-amino-7-klorkinoline s *n*-oktilnom poveznicom (slika 3.1.), 4-amino-7-klorkinoline s poveznicom različitih duljina (slika 3.2.) i 4-amino-7-trifluormetilkinoline s *n*-oktilnom poveznicom (slika 3.3.).

Podskupinu 4-amino-7-klorkinolina s *n*-oktilnom poveznicom (slika 3.1.) čine spojevi koji se razlikuju po supstituentu na terminalnoj amino grupi. U slučaju spojeva CIAQ-1 do CIAQ-25 supstituenti na amino terminalnoj grupi su alkilni lanci, cikloheksan ili nesupstituirani odnosno monosupstituirani aromatski sustavi. Inhibicijski potencijal navedenih spojeva prema hAChE_{rec} i hBChE određen je u radu Matošević i suradnika,¹⁹⁸ a njihove K_i konstante prikazane su u Dodatku, u tablici D1. U ovoj disertaciji određen je inhibicijski potencijal spojeva CIAQ-28 do CIAQ-39 na čiju su terminalnu amino grupu vezane jedna ili dvije disupstituirane benzilne grupe. Pritom je jedan supstituent uvijek halogeni element (F, Cl ili Br), dok je drugi supstituent također halogeni element ili jedna od grupa ($-CH_3$, $-CF_3$ ili $-NO_2$). Navedeni spojevi sintetizirani su kao derivati spoja CIAQ-8, na čijoj terminalnoj amino grupi se nalazi *m*-fluorbenzilni supstituent, za koji je ranije pokazano da je vrlo snažan inhibitor obiju kolinesteraza s K_i konstantama u nanomolarnom području ($K_i(hAChE_{rec}) = 0,0032 \mu\text{mol L}^{-1}$; $K_i(hBChE) = 0,0084 \mu\text{mol L}^{-1}$).¹⁹⁸ Derivati CIAQ-8 pripremljeni su kako bi se utvrdio mogući utjecaj dodatnog supstituenta na benzilnoj grupi na inhibicijski potencijal molekule.

Rezultati inhibicije hAChE_{rec} i hBChE pokazali su da svi derivati CIAQ-8 s dodatnim supstituentima na benzilnoj grupi inhibiraju aktivnost obiju kolinesteraza, pri čemu su određene K_i vrijednosti bile u rasponu od 0,0082 do 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (tablica 4.1).

Tablica 4.1. Inhibicija ljudskih AChE_{rec} i BChE 4-amino-7-klorkinolinima s *n*-oktilnom poveznicom. Disocijacijske konstante kompleksa enzim–ligand ($K_i \pm$ standardna devijacija) izračunate su prema jednadžbi (2). Selektivnost spojeva prema jednoj od kolinesteraza izražena je kao indeks selektivnosti SI.

SPOJ	K_i (hAChE _{rec}) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	K_i (hBChE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SI
CIAQ-8*	$0,0032 \pm 0,0001$ (m)	$0,0084 \pm 0,0004$	0,38
CIAQ-28	$0,0082 \pm 0,0005$ (n)	$0,041 \pm 0,008$	0,20
CIAQ-29	$0,016 \pm 0,001$ (n)	$0,28 \pm 0,02$	0,057
CIAQ-30	$0,024 \pm 0,002$ (m)	$0,22 \pm 0,01$	0,11
CIAQ-31	$0,021 \pm 0,001$ (n)	$0,27 \pm 0,01$	0,078
CIAQ-32	$0,11 \pm 0,01$ (n)	$0,23 \pm 0,1$	0,48
CIAQ-33	$0,15 \pm 0,01$ (m)	$1,1 \pm 0,1$	0,14
CIAQ-34	$0,12 \pm 0,01$ (n)	$0,62 \pm 0,05$	0,19
CIAQ-35	$0,036 \pm 0,003$ (n)	$0,18 \pm 0,02$	0,20
CIAQ-36	$0,26 \pm 0,03$ (n)	$1,3 \pm 0,1$	0,20
CIAQ-37	$0,70 \pm 0,07$ (m)	$1,5 \pm 0,1$	0,47
CIAQ-38	$0,045 \pm 0,002$ (n)	$0,041 \pm 0,001$	1,1
CIAQ-39	$0,28 \pm 0,01$ (n)	$0,65 \pm 0,05$	0,43

* K_i konstante određene u radu Matošević i suradnika.¹⁹⁸

Najsnažniji inhibitor hAChE_{rec} iz ispitivane serije bio je spoj CIAQ-28 s 2,5-difluorbenzilnim supstituentom na terminalnoj amino grupi ($K_i = 0,0082 \mu\text{mol L}^{-1}$), dok su se najsnažnijim inhibitorima hBChE pokazali CIAQ-28 i CIAQ-38 s 2,5-dibrombenzilnom odnosno 3,4-dibrombenzilnom grupom na terminalnoj amino grupi, za koje je K_i iznosila $0,041 \mu\text{mol L}^{-1}$. Najslabijim inhibitorom obiju kolinesteraza, s $K_i = 0,70 \mu\text{mol L}^{-1}$ za hAChE_{rec} i $K_i = 1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ za hBChE, pokazao se spoj CIAQ-37 na čijoj se terminalnoj amino grupi nalaze dva 2-fluor-5-trifluormetil benzilna supstituenta. Usporedbom K_i konstanti ispitivanih derivata s onom za CIAQ-8, vidljivo je da se uvođenjem dodatnog supstituenta na benzilnu grupu, ili uvođenjem druge disupstituirane benzilne grupe na terminalnu amino grupu, inhibicijski potencijal prema objema kolinesterazama smanjuje. U slučaju hAChE_{rec}, inhibicijski potencijal se smanjuje do gotovo 220 puta, a u slučaju hBChE do 180 puta. Nadalje, vrijednosti SI pokazuju da gotovo svi ispitivani derivati CIAQ-8 preferiraju vezanje u hAChE_{rec} u odnosu na hBChE (2 – 18 puta). Najselektivnijim inhibitorom pokazao se spoj CIAQ-29, s 2-brom-5-fluorbenzilnim supstituentom na terminalnoj amino grupi, koji je gotovo 18 puta snažnije

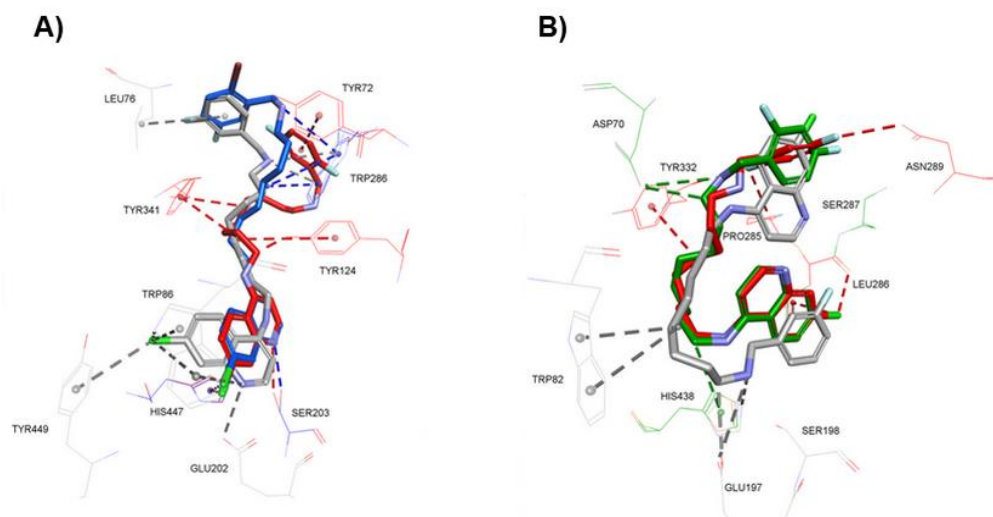
inhibirao hAChE_{rec} u odnosu na hBChE. Iznimka je bio spoj CIAQ-38, s 3,4-dibrombenzilnim supstituentom, koji nije pokazivao selektivnost ni prema jednoj od kolinesteraza.

Iz Hunter-Downsovog prikaza ustanovljeno je da svi spojevi djeluju kao mješoviti ili nekompetitivni inhibitori, odnosno da ostvaruju nekovalentne interakcije s aminokiselinama iz katalitičkog i perifernog, ili samo s aminokiselinama iz perifernog mjesta hAChE_{rec}.

Kako bi se objasnile razlike u inhibicijskom potencijalu pojedinih spojeva prema hAChE_{rec} i hBChE, korištena je metoda molekulskog uklapanja kojom je pretpostavljeno smještanje odabranih spojeva unutar aktivnog mjesta obiju ljudskih kolinesteraza. Molekulsko uklapanje korišteno je i kako bi se potvrdila pretpostavka mjesta vezanja pojedinog spoja unutar aktivnog mjesta hAChE_{rec}. Tako su analizirane nekovalentne interakcije ostvarene između aminokiselina aktivnog mjesta AChE (PDB kod: 4EY4¹⁸⁸) i CIAQ-28, najsnažnijeg inhibitora AChE u ovdje istraživanoj podskupini, a čija terminalna amino grupa je supstituirana 2,5-difluorbenzilom, te CIAQ-29 koji je bio dva puta slabiji inhibitor i kod kojeg je supstituent 2-brom-5-fluorbenzilna grupa. Također su analizirane nekovalentne interakcije ostvarene između aminokiselina aktivnog mjesta BChE (PDB kod: 1P0I¹⁸⁹) i CIAQ-28, najsnažnijeg inhibitora BChE u ovoj podskupini spojeva te interakcije sa 6,6 puta slabijim inhibitorom CIAQ-31 čija je terminalna amino grupa supstituirana 2,4-difluorbenzilom. Za usporedbu, modelirani su i kompleksi AChE-CIAQ-8 te BChE-CIAQ-8.

Spoj CIAQ-8, za koji je iz Hunter-Downsovog prikaza pretpostavljeno da djeluje kao mješoviti tip inhibitora, smješta se u aktivno mjesto AChE na način da ostvaruje interakcije s aminokiselinama i katalitičkog (Glu202, Ser203, His447, Tyr449, Trp86) i perifernog mjesta AChE (Leu76), pri čemu se ističu jake elektrostatske interakcije s Glu202 (slika 4.1 A). Uvođenje dodatnog atoma na benzilnu grupu (F kod CIAQ-28, odnosno Br kod CIAQ-29) mijenja položaj molekule unutar aktivnog mjesta AChE zbog čega ti spojevi ostvaruju veći broj interakcija s aminokiselinama perifernog mjesta (Tyr72, Trp286, Tyr 124 i Tyr341), dok u katalitičkom mjestu ostvaruju samo vodikovu vezu sa Ser203 iz katalitičke trijade, što za posljedicu ima smanjenje inhibitornog učinka u odnosu na CIAQ-8, a također potvrđuje i pretpostavljeni tip inhibitornog djelovanja (nekompetitivni). U slučaju BChE (slika 4.1 B), CIAQ-8 ostvaruje interakcije s aminokiselinama katalitičke trijade, Ser198 i His438, te s Trp82 iz kolineskog mjesta. Pritom se aminokinolinski prsten CIAQ-8 smješta prema izlazu iz aktivnog mjesta, dok je terminalna amino grupa smještena u dno aktivnog mjesta gdje je stabilizirana interakcijama s katalitičkom trijadom. S druge strane, spojevi CIAQ-28 i CIAQ-

31, koji sadrže 2,5- odnosno 2,4-difluorobenzilnu grupu, u aktivno mjesto BChE smještaju se obrnuto: benzilna grupa orijentirana je prema izlazu iz aktivnog mjesta te ostvaruje interakcije s aminokiselinama perifernog mjesta (Tyr332, Asn289), dok je aminokinolinski prsten orijentiran prema katalitičkom mjestu, gdje ostvaruje manji broj interakcija u odnosu na CIAQ-8, što rezultira smanjenjem inhibitornog potencijala spojeva CIAQ-28 i CIAQ-31.



Slika 4.1. Modeli kompleksa ljudskih kolinesteraza i 4-amino-7-klorkinolina s *n*-oktilnom poveznicom. A) model kompleksa hAChE i CIAQ-8 (sivo), CIAQ-28 (crveno) odnosno CIAQ-29 (plavo). B) model kompleksa hBChE i CIAQ-8 (sivo), CIAQ-28 (crveno) odnosno CIAQ-31 (plavo). Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih interakcija, a njihova boja odgovara boji kojom je prikazan pojedini spoj.

Generalno, iako dodatni supstituenti (halogeni atomi) na benzilnoj grupi te uvođenje dodatne disupstituirane benzilne grupe na terminalnu amino grupu uzrokuje 3 – 220 puta slabiji inhibicijski učinak u usporedbi s CIAQ-8, svi spojevi iz ove podskupine pokazuju inhibicijski potencijal u submikromolarnom koncentracijskom području prema barem jednoj od kolinesteraza.

Podskupinu 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice (slika 3.2.) čine ukupno 22 spoja. Tom podskupinom istraživao je utjecaj duljine alkilne poveznice na njihovu biološku aktivnost. Seriju čine spojevi kod kojih su 4-aminokinolinska jezgra i terminalna amino grupa povezane *n*-butilnom, *n*-heksilnom ili *n*-oktilnom poveznicom. Dodatno, spojevi s istom duljinom linkera razlikuju se i po heterocikličkim supstituentima na terminalnoj amino grupi. Svi spojevi iz

podskupine pokazali su sposobnost inhibicije obje kolinesteraze, pri čemu su K_i vrijednosti bile u rasponu od 0,0017 do 1,02 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (tablica 4.2).

Tablica 4.2. Inhibicija ljudskih AChE_{rec} i BChE 4-amino-7-klorkinolinima različitih duljina poveznice. Disocijacijske konstante kompleksa enzim–ligand ($K_i \pm$ standardna devijacija) izračunate su prema jednadžbi (2). Selektivnost spojeva prema jednoj od kolinesteraza izražena je kao indeks selektivnosti SI.

SPOJ	K_i (hAChE _{rec}) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	K_i (hBChE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SI
CIAQn-1	0,56 $\pm$ 0,02 (m)	0,18 $\pm$ 0,01	3,1
CIAQn-2	0,14 $\pm$ 0,01 (m)	0,0078 $\pm$ 0,0003	18
CIAQn-3	0,36 $\pm$ 0,02 (m)	0,035 $\pm$ 0,004	10
CIAQn-4	0,13 $\pm$ 0,01 (m)	0,0084 $\pm$ 0,0009	16
CIAQn-5	0,19 $\pm$ 0,03 (m)	0,073 $\pm$ 0,005	2,6
CIAQn-6	0,068 $\pm$ 0,005 (m)	0,012 $\pm$ 0,002	5,7
CIAQn-7	0,32 $\pm$ 0,02 (m)	0,024 $\pm$ 0,002	13
CIAQn-8	0,24 $\pm$ 0,02 (n)	0,023 $\pm$ 0,003	10
CIAQn-9	0,12 $\pm$ 0,02 (n)	0,011 $\pm$ 0,001	11
CIAQn-10	0,036 $\pm$ 0,004 (n)	0,015 $\pm$ 0,002	2,4
CIAQn-11	0,18 $\pm$ 0,01 (m)	0,072 $\pm$ 0,006	2,5
CIAQn-12	0,018 $\pm$ 0,002 (m)	0,016 $\pm$ 0,002	1,1
CIAQn-13	0,0027 $\pm$ 0,0007 (m)	0,0017 $\pm$ 0,0002	1,6
CIAQn-14	0,57 $\pm$ 0,03 (m)	1,02 $\pm$ 0,09	0,56
CIAQn-15	0,14 $\pm$ 0,01 (m)	0,43 $\pm$ 0,06	0,33
CIAQn-16	0,028 $\pm$ 0,003 (m)	0,075 $\pm$ 0,008	0,37
CIAQn-17	0,81 $\pm$ 0,04 (m)	0,059 $\pm$ 0,005	14
CIAQn-18	0,38 $\pm$ 0,02 (m)	0,035 $\pm$ 0,003	11
CIAQn-19	0,12 $\pm$ 0,01 (m)	0,019 $\pm$ 0,002	6,3
CIAQn-20	0,57 $\pm$ 0,03 (m)	0,38 $\pm$ 0,03	1,5
CIAQn-21	0,34 $\pm$ 0,01 (m)	0,15 $\pm$ 0,01	2,3
CIAQn-22	0,11 $\pm$ 0,01 (m)	0,053 $\pm$ 0,005	2,1

Usporedba ovisnosti vrijednosti K_i o duljini alkilne poveznice pokazala je da jačina inhibicije raste produljenjem alkilne poveznice kod obje kolinesteraze. Generalno, spojevi s *n*-oktilnom poveznicom inhibirali su hAChE_{rec} 3 – 67 puta snažnije, a hBChE 2 – 42 puta snažnije u usporedbi s njihovim analogima s *n*-butilnom poveznicom. Najveća razlika u inhibicijskom potencijalu između analognih spojeva s *n*-butilnom i *n*-oktilnom poveznicom za obje kolinesteraze uočena je između spojeva CIAQn-11 i CIAQn-13, kod kojih se na terminalnoj amino grupi kao supstituent nalazi *N*-metil-3-metilindol, dok je najmanja razlika u inhibicijskom potencijalu zabilježena između spojeva CIAQn-7 i CIAQn-9, kod kojih je supstituent 3-metilindol.

Najsnažnijim inhibitorom hAChE_{rec} pokazao se spoj ClAQn-13 s $K_i = 0,0027 \mu\text{mol L}^{-1}$, nakon kojega slijedi spoj ClAQn-12 koji hAChE_{rec} inhibira otprilike 6,7 puta slabije u usporedbi s ClAQn-13. Kod oba spoja terminalna amino grupa supstituirana je s *N*-metil-3-metilindolnom, ali se razlikuju u duljini poveznice: kod ClAQn-13 poveznica je duga 8 metilnih grupa, dok je kod ClAQn-12 duga 6 metilnih grupa. Spoj ClAQn-13 također je i najsnažniji inhibitor hBChE ($K_i = 0,0017 \mu\text{mol L}^{-1}$), a slijede ga oko 4,8 puta slabiji ClAQn-2 s 2-metilbenzofuranom i ClAQn-4 s 2-metilbenzotiofenom kao supstituentom. Oba spoja imaju *n*-heksil kao poveznicu. Trend povećanja inhibitornog potencijala s povećanjem duljine alkilne poveznice u skladu je s rezultatima ranijih istraživanja inhibicijskog potencijala derivata 4-aminokinolina prema ljudskim kolinesterazama; u radu Bosak i suradnika najjači inhibicijski potencijal pokazao je spoj s najduljom (*n*-oktilnom) poveznicom.¹⁹⁹ Isto je uočeno u radu Komatović i suradnika, u kojem su kao inhibitori kolinesteraza ispitani derivati 4-aminokinolina s adamantanom na terminalnoj amino grupi i s različitim duljinama alkilne poveznice ili alkilnim lanacem s uklopljenom heterocikličkom strukturom.¹²⁶ Usporedbom spojeva s *n*-butilnom i *n*-heksilnom poveznicom iz podskupine 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice istražene u ovom doktorskom radu s njihovim analozima koji sadrže *n*-oktilni lanac istraženima u radu Matošević i suradnika,¹⁹⁸ potvrđeno je da produljenje lanca pridonosi inhibicijskom potencijalu molekula iz serije. Tako su spojevi s *n*-oktilnom poveznicom ClAQ-23, ClAQ-24 i ClAQ-25 u pravilu snažniji inhibitori obje kolinesteraze u usporedbi s njihovim kraćim analozima (ClAQn-1 i 2, ClAQn-3 i 4, odnosno ClAQn-5 i 6). Prema opisanim rezultatima može se zaključiti da je *n*-oktilna poveznica optimalne duljine za smještanje ovakve vrste spojeva u aktivno mjesto ljudskih kolinesteraza.

Svi spojevi iz podskupine 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice, prema grafičkom prikazu Hunter-Downsove jednadžbe, ponašaju se kao mješoviti ili nekompetitivni inhibitori AChE, što znači da ostvaruju interakcije s aminokiselinama perifernog mjesta AChE, a neki i dodatne s aminokiselinama katalitičkog mjesta. Ovi podaci u skladu su s predviđenim kinetičkim modelom inhibicije AChE 4-aminokinolinima s *n*-oktilnom poveznicom utvrđenom u radu Matošević i suradnika.¹⁹⁸

Gotovo svi spojevi pokazali su se jačim inhibitorima hBChE nego hAChE_{rec}, pri čemu se spoj ClAQn-2, s *n*-heksilnom poveznicom i 2-metilbenzofuranom supstituiranom amino grupom, pokazao najselektivnijim inhibitorom koji je hBChE inhibirao gotovo 18 puta snažnije u odnosu na hAChE_{rec}. Jedini derivati iz podskupine koji snažnije inhibiraju hAChE_{rec} u odnosu na

hBChE bili su ClAQn-14, ClAQn-15 i ClAQn-16 čija je terminalna amino grupa supstituirana s *N*-metil-2-metilimidazolom. Za spojeve koji su se pokazali selektivnima za hBChE uočeno je da duljina alkilnog lanca može utjecati na selektivnost inhibicije, no trend nije bilo moguće ustanoviti sa sigurnošću. Naime, ClAQn-1, analog ClAQn-2 s *n*-butilnom poveznicom, bio je 3 puta snažniji inhibitor hBChE u odnosu na hAChE_{rec}. Slično je ustanovljeno i kod spojeva s 3-metilbenzotiofenom, ClAQn-5 i ClAQn-6. S druge strane, spojevi ClAQn-17 (*n*-butilna poveznica) i ClAQn-18 (*n*-heksilna poveznica), s 2-metil-1-(*p*-tolil)-1H-imidazolnim supstituentom, su 14 odnosno 11 puta snažnije inhibirali hBChE u odnosu na hAChE_{rec}, dok je njihov *n*-oktilni analog ClAQn-19 bio 6,3 puta snažniji inhibitor hBChE.

Posljednju podskupinu 4-aminokinolina čine 4-amino-7-trifluormetilkinolini s *n*-oktilnom poveznicom dizajnirani kao trifluorometilni analozi 4-amino-7-klorkinolina istraženih u radu Matošević i suradnika¹⁹⁸ kako bi se istražio utjecaj supstituenta na poziciji C(7) aminokinolinskog prstena na inhibicijski potencijal prema ljudskim kolinesterazama. Spojevi unutar podskupine međusobno se razlikuju u supstituentu na terminalnoj amino grupi. Svi spojevi iz podskupine pokazali su sposobnost inhibicije i hAChE_{rec} i hBChE, pri čemu su određene K_i vrijednosti bile u rasponu od 0,0044 do 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (tablica 4.3).

Tablica 4.3. Inhibicija ljudskih AChE_{rec} i BChE 4-amino-7-trifluormetilkinolinima s *n*-oktilnom poveznicom. Disocijacijske konstante kompleksa enzim–ligand ($K_i \pm$ standardna devijacija) izračunate su prema jednadžbi (2). Selektivnost spojeva prema jednoj od kolinesteraza izražena je kao indeks selektivnosti SI.

SPOJ	K_i (hAChE _{rec}) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	K_i (hBChE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SI
CF ₃ AQ-1	0,0071 ± 0,0002 (m)	0,0067 ± 0,0005	1,1
CF ₃ AQ-2	0,011 ± 0,000 (m)	0,0059 ± 0,0003	1,9
CF ₃ AQ-3	0,013 ± 0,001 (m)	0,019 ± 0,004	0,68
CF ₃ AQ-4	0,070 ± 0,003 (k)	0,021 ± 0,002	3,3
CF ₃ AQ-5	0,0080 ± 0,0004 (n)	0,021 ± 0,001	0,38
CF ₃ AQ-6	0,012 ± 0,001 (n)	0,0061 ± 0,0005	2,0
CF ₃ AQ-7	0,16 ± 0,01 (n)	0,071 ± 0,006	2,3
CF ₃ AQ-8	0,14 ± 0,01 (n)	0,036 ± 0,003	3,9
CF ₃ AQ-9	0,29 ± 0,03 (k)	1,3 ± 0,1	0,22
CF ₃ AQ-10	0,20 ± 0,01 (n)	0,19 ± 0,01	1,1
CF ₃ AQ-11	0,54 ± 0,09 (k)	0,049 ± 0,009	11,0
CF ₃ AQ-12	0,070 ± 0,010 (m)	0,0044 ± 0,0003	16

Najsnažnijim inhibitorima hAChE_{rec} pokazali su se spojevi CF₃AQ-1 ($K_i = 0,0071 \mu\text{mol L}^{-1}$), kojemu se na terminalnoj amino grupi nalazi benzil s F u *meta*-položaju, i CF₃AQ-5 ($K_i = 0,0080 \mu\text{mol L}^{-1}$) kojemu je na terminalnu amino grupu vezana nesupstituirana benzilna grupa. Premještanje fluora na benzilnoj grupi iz *meta*-položaja (CF₃AQ-1) u *para*-položaj (CF₃AQ-6) rezultiralo je 1,7 puta slabijim inhibicijskim potencijalom spoja CF₃AQ-6 ($K_i = 0,012 \mu\text{mol L}^{-1}$) u usporedbi s CF₃AQ-1. Uvođenje *tert*-butilne (CF₃AQ-7) ili nitro grupe (CF₃AQ-8) na *para*-položaj benzilne grupe, kao i zamjena benzilnog supstituenta s 4-metilpiridinom ili 2-metilimidazolom, smanjilo je inhibicijski potencijal spojeva prema hAChE_{rec} oko 20 do 40 puta u usporedbi s CF₃AQ-1. Najslabijim inhibitorom hAChE_{rec} pokazao se spoj CF₃AQ-11 ($K_i = 0,54 \mu\text{mol L}^{-1}$) čija je terminalna amino grupa supstituirana s 2-metilbenzofuranom. Usporedbom K_i konstanti spojeva CF₃AQ-2 ($K_i = 0,011 \mu\text{mol L}^{-1}$), CF₃AQ-3 ($K_i = 0,013 \mu\text{mol L}^{-1}$) i CF₃AQ-4 ($K_i = 0,070 \mu\text{mol L}^{-1}$), koji se razlikuju po položaju klora na benzilnom prstenu terminalne amino grupe, može se zaključiti da položaj supstituenta na benzilnom prstenu može značajno utjecati na inhibični potencijal prema hAChE_{rec}, budući da CF₃AQ-4, kod kojeg se Cl nalazi u *para*-položaju, oko 6 puta slabije inhibira hAChE_{rec} u usporedbi s CF₃AQ-2 i CF₃AQ-3 kod kojih se Cl nalazi u *meta*- odnosno *ortho*-položaju.

U usporedbi s njihovim 7-Cl analozima,¹⁹⁸ inhibicijski potencijal prema hAChE_{rec} generalno se nije promijenio zamjenom klora s trifluormetilnom grupom. Tako je spoj ClAQ-8, 7-Cl analog spoja CF₃AQ-1, inhibirao hAChE_{rec} otprilike 2,2 puta snažnije, dok je spoj ClAQ-7, 7-Cl analog spoja CF₃AQ-5, nešto slabiji inhibitor hAChE_{rec} (tablica D1. u Dodatku). Utjecaj položaja atoma klora na benzilnoj grupi spojeva iz ove serije pratio je isti trend koji je uočen kod 7-Cl analoga,¹⁹⁸ odnosno spoj s klorom u *para*-položaju bio je oko 14 puta slabiji inhibitor u usporedbi s analozima gdje je klor u *ortho*- ili *meta*-položaju. Međutim, u ovoj disertaciji uočene su određene razlike u inhibičnom potencijalu između 7-Cl i 7-CF₃ analoga u slučaju kada je supstituent na terminalnoj amino grupi benzofuran ili benzotiofen. Dok spoj CF₃AQ-12, s 2-metilbenzotiofenom kao supstituentom, inhibira hAChE_{rec} 7,7 puta jače u odnosu na CF₃AQ-11 kod kojeg je supstituent 2-metilbenzofuran, inhibicijski potencijal njihovih 7-Cl analoga (spojevi ClAQ-23 i ClAQ-24) gotovo je isti (tablica D1. u Dodatku).¹⁹⁸ Posljedično, CF₃AQ-11 je otprilike 4,5 puta slabiji inhibitor od svog 7-Cl analoga (ClAQ-23), dok je CF₃AQ-12 otprilike jednako snažan inhibitor kao i njegov 7-Cl analog (ClAQ-24), što govori da supstituent na C(7)-položaju aminokinolinskog prstena može utjecati na afinitet spoja za vezanje u aktivno mjesto AChE.

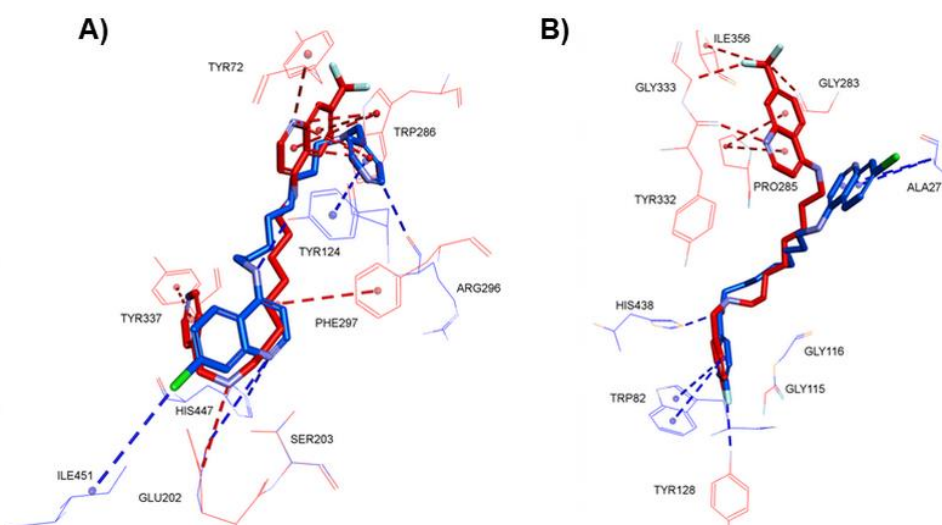
Kod hBChE, najsnažniji inhibitor bio je CF₃AQ-12 ($K_i = 0,0044 \mu\text{mol L}^{-1}$), s 2-metilbenzotiofenom vezanom na terminalnu amino grupu, a slijede ga CF₃AQ-2 ($K_i = 0,0059 \mu\text{mol L}^{-1}$) s 3-klorbenzilnim supstituentom, CF₃AQ-6 ($K_i = 0,0061 \mu\text{mol L}^{-1}$) s 4-fluorbenzilnim supstituentom te CF₃AQ-1 ($K_i = 0,0067 \mu\text{mol L}^{-1}$) s 3-fluorbenzilnim supstituentom na terminalnoj amino grupi. Najslabijim inhibitorom hBChE pokazao se spoj CF₃AQ-9 ($K_i = 1,3 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) kod kojega se na terminalnoj amino grupi nalazi 4-metilpiridin, a čiji inhibicijski potencijal prema hBChE je gotovo 300 puta slabiji u usporedbi s CF₃AQ-12. Uočeno je da utjecaj položaja halogenog atoma na benzilnom supstituentu na inhibitorski učinak spojeva ovisi prvenstveno o vrsti atoma. Tako spojevi CF₃AQ-6 i CF₃AQ-1, koji se razlikuju u položaju atoma F na benzilnoj grupi (*para* kod CF₃AQ-6 i *meta* kod CF₃AQ-1) pokazuju jednaki inhibicijski potencijal prema hBChE. Međutim, kod spojeva gdje je supstituent na benzilnoj grupi Cl, CF₃AQ-2 (Cl u *meta*-položaju) otprilike 3,5 puta snažnije inhibira hBChE u odnosu na spojeve gdje je Cl u *ortho*- (CF₃AQ-3) odnosno *para*-položaju (CF₃AQ-4).

Kada se usporedi inhibitorski učinak ovdje istraženih spojeva s njihovim 7-Cl analozima, CF₃AQ-12 s 2-metilbenzotiofenom kao supstituentom je gotovo 2 puta snažniji inhibitor hBChE u usporedbi s njegovim 7-Cl analogom ClAQ-24 ($K_i = 0,0078 \mu\text{mol L}^{-1}$), dok je spoj CF₃AQ-9, s 4-metilpiridinom kao supstituentom, oko 3 puta slabiji inhibitor od svojeg 7-Cl analoga ClAQ-21 (tablica D1. u Dodatku).¹⁹⁸ Najveća razlika u inhibitorskom potencijalu između 7-Cl i 7-CF₃ analoga uočena je kod spojeva s klorom u *ortho*-položaju na benzilnoj grupi; spoj CF₃AQ-3 bio je gotovo 4 puta snažniji inhibitor u odnosu na svoj 7-Cl analog (tablica D1. u Dodatku). Svi ostali spojevi u ovoj podskupini generalno su pokazali podjednaki ili malo snažniji inhibicijski potencijal prema hBChE u usporedbi s njihovim 7-Cl analozima.¹⁹⁸

Većina spojeva iz ove podskupine snažnije inhibira hBChE u odnosu na hAChE_{rec}, pri čemu su se najselektivnijima pokazali spojevi CF₃AQ-11, s 2-metilbenzofuranom i CF₃AQ-12 s 2-metilbenzotiofenom kao supstituentom, koji 11 odnosno 16 puta snažnije inhibiraju hBChE. Neselektivnima su se pokazali spojevi CF₃AQ-1 i CF₃AQ-10, s 3-fluorbenzilnim, odnosno 2-metilimidazolnim supstituentom dok su spojevi CF₃AQ-3 i CF₃AQ-5 s klorom u *ortho*-odnosno *para*-položaju na benzenskom prstenu te CF₃AQ-9, s 4-metilpiridinom, pokazali do 4,5 puta veći afinitet prema hAChE_{rec} u odnosu na hBChE.

Iz grafičkih prikaza Hunter-Downsove jednadžbe zaključeno je da većina spojeva pokazuje mješoviti ili nekompetitivni tip inhibicije hAChE_{rec}; iznimka su CF₃AQ-4, CF₃AQ-9 i CF₃AQ-11 za koje je predviđen kompetitivni tip inhibicije.

Kako bi se objasnile razlike u inhibicijskom potencijalu između 7-CF₃ i 7-Cl analoga, metodom molekuskog uklapanja proučavane su interakcije između CF₃AQ-9 i njegovog 7-Cl analoga ClAQ-21 s aminokiselinama aktivnog mjesta AChE (PDB kod: 4EY4¹⁸⁸) te spoja CF₃AQ-6 i njegovog 7-Cl analoga ClAQ-9 s aminokiselinama aktivnog mjesta BChE (PDB kod: 1P0I¹⁸⁹) (slika 4.2).



Slika 4.2. Modeli kompleksa ljudskih kolinesteraza i 4-amino-7-trifluormetilkinolina s *n*-oktilnom poveznicom. A) model kompleksa hAChE i CF₃AQ-9 (crveno) i njegovog 7-Cl analoga ClAQ-21 (plavo). B) model kompleksa hBChE i CF₃AQ-6 (crveno) i njegovog 7-Cl analoga ClAQ-9 (plavo). Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih interakcija, a njihova boja odgovara boji kojom je prikazan pojedini spoj.

U aktivno mjesto AChE (slika 4.2. A), CF₃AQ-9 se smješta tako da njegov supstituent na terminalnoj amino grupi, 4-metilpiridin, ostvaruje vodikove veze sa Ser203 iz katalitičke trijade kao i elektrostatske interakcije s Glu202 u njoj blizini, dok aminokinolinski prsten ostvaruje interakcije s aminokiselinama perifernog mjesta (hidrofobne interakcije s Trp286 te elektrostatske interakcije i vodikovu vezu s Tyr72). Njegov 7-Cl analog, ClAQ-21, u aktivno mjesto AChE smješta se obrnuto, aminokinolinski prsten orijentiran je prema katalitičkoj trijadi gdje ostvaruje manji broj interakcija u odnosu na CF₃AQ-9, dok 4-metilpiridin ostvaruje hidrofobne interakcije s aminokiselinama perifernog mjesta, Trp286 i Tyr124. Orijentacija spoja ClAQ-21 unutar aktivnog mjesta AChE odgovara onoj pretpostavljenoj za ClAQ-8¹⁹⁸

(slika 4.1 A) što može objasniti snažniji inhibitorni učinak ClAQ-21 u usporedbi s CF₃AQ-9. Model kompleksa BChE s CF₃AQ-6 i njegovim 7-Cl analogom (ClAQ-9) pokazao je da se oba spoja u aktivnom mjestu enzima orijentiraju na jednak način – aminokinolinski prsten nalazi se na izlazu iz aktivnog mjesta enzima gdje ostvaruje interakcije s aminokiselinama perifernog mjesta (Ala227 u slučaju ClAQ9 te Ile356 i Pro285 u slučaju CF₃AQ-6), dok je *p*-fluorbenzilna grupa smještena unutar katalitičkog mjesta te ostvaruje hidrofobne interakcije s aminokiselinom kolinskog mjesta, Trp82. Razlika u inhibicijskom potencijalu između CF₃AQ-6 i ClAQ-9 može biti posljedica većeg broja interakcija koje CF₃AQ-6 ostvaruje s aminokiselinama perifernog mjesta (Pro285, Ile356) u odnosu na ClAQ-9.

4.1.2. Inhibicija kolinesteraza derivatima amodiakina

Iz skupine derivata amodiakina ispitan je amodiakin (AMQ) i 14 njegovih derivata sa različitim supstituentima na tercijarnom aminu (–H, –OH) i/ili položajem supstituenta na kinolinskom prstenu (–H, –Cl, –F, –CF₃, –CN, –NO₂, –OCH₃, –COOH) (slika 3.4.). Rezultati inhibicije ljudskih kolinesteraza pokazali su da svi ispitivani spojevi iz skupine amodiakina inhibiraju obje kolinesteraze, pri čemu su određene vrijednosti K_i konstanti bile u rasponu 0,025 – 21 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (tablica 4.4).

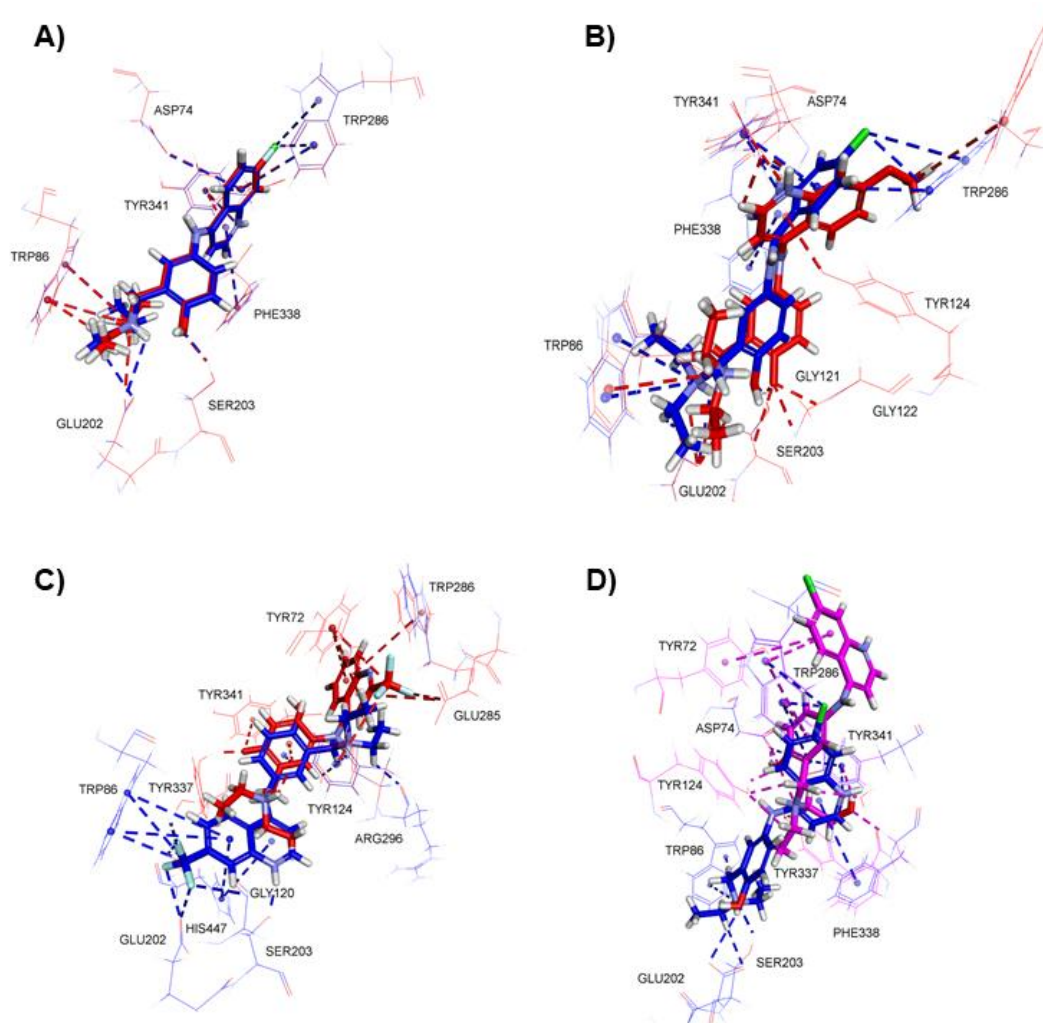
Tablica 4.4. Inhibicija ljudskih AChE_{rec} i BChE derivatima amodiakina. Disocijacijske konstante kompleksa enzim–ligand ($K_i \pm$ standardna devijacija) izračunate su prema jednadžbi (2). Selektivnost spojeva prema jednoj od kolinesteraza izražena je kao indeks selektivnosti SI.

SPOJ	K_i (hAChE _{rec}) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	K_i (hBChE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SI
AMQ	0,046 $\pm$ 0,001 (k)	9,1 $\pm$ 0,7	0,0051
AMQ-1	0,17 $\pm$ 0,01 (m)	13 $\pm$ 1	0,013
AMQ-2	0,075 $\pm$ 0,003 (m)	7,3 $\pm$ 0,8	0,010
AMQ-3	0,078 $\pm$ 0,004 (m)	19 $\pm$ 1	0,0041
AMQ-4	0,084 $\pm$ 0,003 (m)	14 $\pm$ 1	0,0060
AMQ-5	0,025 $\pm$ 0,001 (k)	7,6 $\pm$ 0,4	0,0033
AMQ-6	0,23 $\pm$ 0,01 (k)	5,9 $\pm$ 0,8	0,039
AMQ-7	0,051 $\pm$ 0,002 (m)	11 $\pm$ 1	0,0046
AMQ-8	0,51 $\pm$ 0,03 (m)	5,4 $\pm$ 0,5	0,094
AMQ-9	0,093 $\pm$ 0,003 (m)	14 $\pm$ 1	0,0066
AMQ-10	1,2 $\pm$ 0,1 (k)	20 $\pm$ 1	0,060
AMQ-11	7,6 $\pm$ 0,3 (k)	1,7 $\pm$ 0,1	4,5
AMQ-12	0,19 $\pm$ 0,01 (m)	21 $\pm$ 1	0,0090
AMQ-13	1,3 $\pm$ 0,1 (k)	16 $\pm$ 1	0,081
AMQ-14	0,11 $\pm$ 0,00 (m)	6,8 $\pm$ 0,3	0,016

Inhibicijski potencijal derivata amodiakina prema $hAChE_{rec}$ ovisio je o elektronegativnosti i veličini supstituenta na atomu C(7) aminokinolinskog prstena te o položaju supstituenta na kinolinskom prstenu. Zamjenom klora na poziciji C(7) kod AMQ s jačim i voluminoznijim elektron-odvlačućim supstituentima poput CF_3 , CN ili NO_2 (AMQ-2, AMQ-3 i AMQ-4, redom) inhibicijski potencijal se smanjuje do 2 puta, dok se zamjenom klora s manjim supstituentima poput fluora ili vodika (AMQ-1 i AMQ-6) inhibicijski potencijal smanjuje oko 4 puta. Međutim, zamjena klora na C(7) poziciji s elektron-donirajućom metoksi-grupom, što je slučaj kod spoja AMQ-5, rezultirala je gotovo dva puta snažnijim inhibitornim učinkom u usporedbi s AMQ. Nadalje, pomak atoma F s pozicije C(7) (AMQ-1) na C(6) (AMQ-7) rezultirao je tri puta snažnijom inhibicijom $hAChE_{rec}$. No, kada se atom F nalazi na poziciji C(8) u blizini kinolinskog dušika (kakav je slučaj kod AMQ-8), inhibicijski potencijal se u usporedbi s AMQ-1 tri puta smanjuje. Slično je primjećeno i kod spojeva kojima je supstituent na aminokinolinskom prstenu CF_3 . Pomak CF_3 grupe s pozicije C(7) aminokinolinskog prstena (AMQ-2) na poziciju C(6) (AMQ-9) gotovo da nije imao utjecaj na inhibicijski potencijal, no pomak CF_3 grupe na pozicije bliže kinolinskom dušiku, C(8) (AMQ-1) i C(2) (AMQ-11) rezultirao je 16 do čak 100 puta slabijim inhibicijskim učinkom u odnosu na spoj AMQ-2. Supstitucijom etilne grupe na tercijarnom aminu s hidroksietilnom grupom (AMQ-14) inhibicijski potencijal se u odnosu na AMQ smanjio oko dva puta.

Grafički prikazi ovisnosti dobivenih $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata ATCh ukazuju da svi spojevi pokazuju mješoviti ili kompetitivni tip inhibicije $hAChE_{rec}$.

Metodom molekuskog uklapanja analizirane su nekovalentne interakcije ostvarene između aminokiselina aktivnog mjesta AChE (PDB kod: 4EY4¹⁸⁸) i spojeva AMQ, AMQ-1, AMQ-2, AMQ-5, AMQ-11, i AMQ-14 kako bi se, s obzirom na njihove strukturne razlike, objasnile razlike u inhibicijskom potencijalu prema $hAChE_{rec}$ (slika 4.3).



Slika 4.3. Modeli kompleksa ljudske AChE i derivata amodiakina. A) model kompleksa hAChE i AMQ (plavo) i AMQ-1 (crveno); B) model kompleksa hAChE i AMQ (plavo) i AMQ-5 (crveno); C) model kompleksa hAChE i AMQ-2 (plavo) i AMQ-11 (crveno); i D) model kompleksa hAChE i AMQ (plavo) i AMQ-14 (magenta). Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih interakcija, a njihova boja odgovara boji kojim je prikazan pojedini spoj.

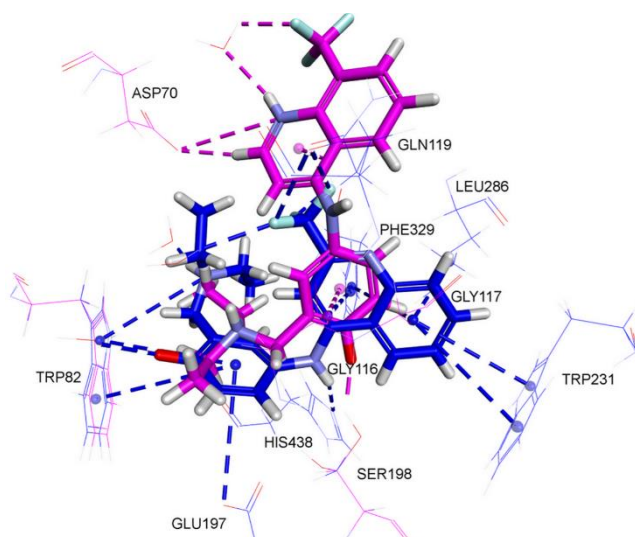
Spojevi AMQ i AMQ-1 kod kojih je na poziciji C(7) klor, odnosno fluor, smještaju se unutar katalitičkog mjesta AChE (slika 4.3. A) na način da oba spoja ostvaruju elektrostatske interakcije s Glu202 u blizini katalitičke trijade, ali se razlikuju u interakcijama ostvarenima s aminokiselinama perifernog mjesta. AMQ preko kinolinskog prstena i atoma Cl ostvaruje veći broj hidrofobnih interakcija s Trp286, aminokiselinom odgovornom za stabilizaciju i usmjeravanje liganada unutar aktivnog mjesta AChE,²⁰⁰ dok u slučaju AMQ-1, takvih interakcija nema. Dva puta snažnija inhibicija hAChE_{rec} spojem AMQ-5 u usporedbi s AMQ može se objasniti činjenicom da prilikom vezanja spoja AMQ-5 u aktivno mjesto AChE dolazi do promjene konformacije aminokiseline Trp286 čiji se indolni prsten zakreće iz hidrofobnog

okruženja perifernog mjesta prema otapalu (slika 4.3. B). Ovaj efekt ranije je uočen kod kompleksa mišje AChE s derivatom takrina i fenilfenantridina,²⁰¹ gdje je također primjećeno značajno povećanje inhibitorne aktivnosti u usporedbi sa spojevima čije smještanje ne uzrokuje opisano zakretanje Trp286. Modelom kompleksa AChE i spojeva AMQ-2 i AMQ-11, koji se razlikuju u položaju CF₃ grupe na aminokinolinskom prstenu, proučavan je utjecaj položaja CF₃ grupe na vezanje spoja u aktivno mjesto enzima (slika 4.3. C). Spoj AMQ-2, kod kojeg se CF₃ grupa nalazi na C(7) poziciji, smješta se u aktivno mjesto AChE na način da se kinolinski prsten nalazi u katalitičkom mjestu gdje ostvaruje interakcije s aminokiselinama katalitičke trijade (Ser203, His447), dok CF₃ ostvaruje hidrofobne π - π interakcije s Trp86, aminokiselinom iz kolinskog mjesta. S druge strane, AMQ-11, kod kojeg se CF₃ grupa nalazi na poziciji C(2), smješta se na način da je kinolinski prsten orijentiran prema izlazu iz aktivnog mjesta te ostvaruje interakcije s aminokiselinama perifernog mjesta, dok je ostatak molekule orijentiran prema katalitičkom mjestu, ali ne ostvaruje interakcije s aminokiselinama katalitičke trijade. Iako ova razlika u smještanju može objasniti 100 puta slabiji inhibični učinak spoja AMQ-11 u odnosu na AMQ-2, nije u skladu s predviđenim modelom inhibicije prema Hunter-Downsovom prikazu, prema kojemu se AMQ-11 ponaša kao kompetitivni inhibitor što pretpostavlja ostvarivanje značajnog broja interakcija s aminokiselinama katalitičkog mjesta. AMQ-14 (slika 4.3. D), kod kojega je jedna etilna grupe na tercijarnom aminu zamijenjena hidroksietilnom grupom, u aktivno mjesto smješta se na način koji mu omogućuje ostvarivanje većeg broja interakcija s aminokiselinama perifernog mjesta (Tyr72, Tyr124, Tyr337, Tyr341 i Trp286), za razliku od AMQ koji se sa dietilnom grupom na tercijarnom dušiku smješta u samo dno katalitičkog mjesta i ostvaruje interakcije s aminokiselinama katalitičke trijade.

Svi derivati amodiakina inhibirali su hBChE s konstantama K_i u rasponu od 1,7 do 21 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Najsnažniji inhibitor hBChE bio je spoj AMQ-11 s CF₃ grupom na C(2) poziciji kinolinskog prstena, koji je pet puta snažnije inhibirao hBChE od AMQ. Najslabiji inhibitori hBChE bili su spojevi AMQ-10 (s CF₃ grupom na položaju C(8)) te AMQ-12 i AMQ-3 kod kojih se na položajima C(6) odnosno C(7) nalazi CN grupa. Rezultati inhibicije pokazali su da, kao i kod hAChE_{rec}, inhibičijski potencijal spoja prema hBChE ovisi o položaju CF₃ grupe na aminokinolinskom prstenu, ali na drugačiji način: iako se kod spojeva AMQ-10 i AMQ-11 CF₃ grupa nalazi u neposrednoj blizini kinolinskog dušika, spoj AMQ-11, kod kojeg se CF₃ nalazi na poziciji C(2) je gotovo 12 puta snažniji inhibitor od AMQ-10, kod kojeg je CF₃ grupa na položaju C(8). Također, spojevi AMQ-2 i AMQ-9, s CF₃ grupom na položajima C(7) odnosno

C(6) aminokinolinskog prstena, bili su 4 do 8 puta slabiji inhibitori hBChE u usporedbi s AMQ-11. Zamjena klora na poziciji C(7) aminokinolinskog prstena elektron-donirajućom metoksi grupom kod AMQ-5 nije značajno utjecala na inhibicijski potencijal prema hBChE u usporedbi s AMQ.

Iako ne u istoj mjeri kao kod hAChE_{rec}, i u slučaju BChE položaj supstituenta na kinolinskom prstenu utjecao je na smještanje spoja u aktivno mjesto enzima. Kako bi se objasnile razlike u njihovom inhibicijskom potencijalu s obzirom na različiti položaj CF₃ grupe, analizirano je smještanje spojeva AMQ-10, kod kojeg se CF₃ grupa nalazi na poziciji C(8), i AMQ-11, kod kojeg se CF₃ grupa nalazi na poziciji C(2), u aktivno mjesto hBChE (PDB kod: 1P0I¹⁸⁹) (slika 4.4).



Slika 4.4. Model kompleksa ljudske BChE i derivata amodiakina AMQ-10 (magenta) i AMQ-11 (plavo). Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih interakcija, a njihova boja odgovara boji kojom je prikazan pojedini spoj.

Rezultati molekulskog uklapanja pokazali su da AMQ-10 i AMQ-11 zauzimaju različite orijentacije unutar aktivnog mjesta hBChE. Tako je AMQ-11, s CF₃ grupom na položaju C(2) aminokinolinskog prstena, orijentiran okomito na os koja spaja ulaz u aktivno mjesto i dno aktivnog mjesta, zbog čega se ostvaruju hidrofobne π - π interakcije između aminokiselina Trp82 i Trp237 i aromatskih sustava samog spoja (hidroksifenilamino grupe i kinolinskog prstena) te elektrostatske interakcije s Glu197 u blizini katalitičke trijade, dok su mu dietilne grupe i CF₃ grupa orijentirani prema središtu aktivnog mjesta. S druge strane, AMQ-10, kod kojeg je CF₃ grupa na položaju C(8), u aktivno mjesto smješta se duž osi koja spaja ulaz i dno aktivnog

mjesta, pri čemu je kinolinski prsten orijentiran prema otvoru aktivnog mjesta što AMQ-10 omogućava nastanak znatno manjeg broja interakcija s aminokiselinama katalitičkog mjesta i objašnjava gotovo 12 puta slabiji inhibicijski potencijal spoja AMQ-10 u odnosu na AMQ-11.

Generalno, svi derivati amodiakina, uz iznimku AMQ-11, pokazali su se 11 do 304 puta snažnijim inhibitorima hAChE_{rec} u odnosu na hBChE, pri čemu se najselektivnijim pokazao spoj AMQ-5, a još je šest spojeva (AMQ, AMQ-3, AMQ-4, AMQ-7, AMQ-9 i AMQ-12) više od 100 puta snažnije inhibiralo hAChE_{rec}. AMQ-11, naj snažniji inhibitor hBChE, ujedno je i jedini spoj koji je pokazao selektivnost prema hBChE, koju je inhibirao 5 puta snažnije u odnosu na hAChE_{rec}.

4.1.3. Inhibicija kolinesteraza benzokinonima

Iz skupine benzokinona (slika 3.5.) ispitano je ukupno 15 derivata 2-*tert*-butil-1,4-benzokinona koji se međusobno razlikuju u supstituentima na pozicijama C(5) i C(6) benzokinonskog prstena, odnosno *para*- i *meta*-položajima s obzirom na *tert*-butilnu grupu. Dobivene konstante K_i prikazane su u tablici 4.5.

Tablica 4.5. Inhibicija ljudskih AChE_{rec} i BChE benzokinonima. Disocijacijske konstante kompleksa enzim–ligand ($K_i \pm$ standardna devijacija) izračunate su prema jednadžbi (2). Selektivnost spojeva prema jednoj od kolinesteraza izražena je kao indeks selektivnosti SI.

SPOJ	K_i (hAChE _{rec}) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	K_i (hBChE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SI
tBQ	52 $\pm$ 6 (n)	55 $\pm$ 5	0,95
tBQ-1	80 $\pm$ 7 (m)	33 $\pm$ 1	2,4
tBQ-2	57 $\pm$ 4 (m)	8,8 $\pm$ 0,8	6,5
tBQ-3	56 $\pm$ 8 (m)	30 $\pm$ 6	1,9
tBQ-4	29 $\pm$ 5 (k)	5,2 $\pm$ 0,7	5,6
tBQ-5	136 $\pm$ 13 (n)	18 $\pm$ 4	7,6
tBQ-6	37 $\pm$ 4 (k)	23 $\pm$ 2	1,6
tBQ-7	85 $\pm$ 5 (m)	29 $\pm$ 3	2,9
tBQ-8	24 $\pm$ 1 (n)	25 $\pm$ 3	0,96
tBQ-9	30 $\pm$ 3 (m)	37 $\pm$ 5	0,81
tBQ-10	–	–	–
tBQ-11	n. o.	228 $\pm$ 56	n. o.
tBQ-12	n. o.	n. o.	–
tBQ-13	21 $\pm$ 1 (m)	36 $\pm$ 2	0,58
tBQ-14	59 $\pm$ 5 (k)	34 $\pm$ 2	1,7

n.o. nije određeno

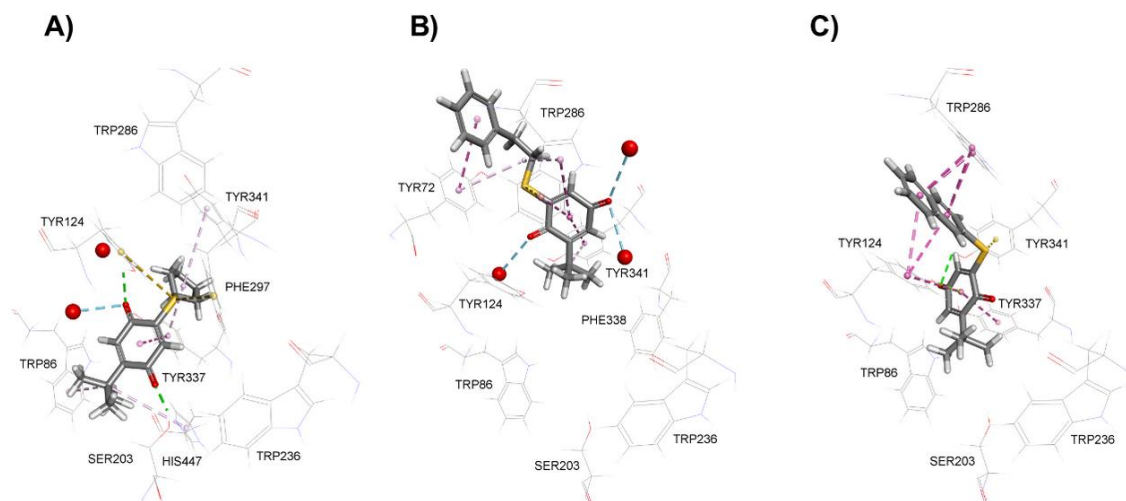
Od 15 testiranih spojeva, njih 13 inhibira barem jednu od kolinesteraza, uz konstante K_i u rasponu od 5,2 do 228 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Spoj *t*BQ-10 nije testiran iz razloga što je taložio po dodatku u fosfatni pufer koji čini osnovnu komponentu reakcijske smjese za mjerenje aktivnosti kolinesteraza. Spoj *t*BQ-12 nije pokazao inhibitornu aktivnost pri koncentracijama do maksimalno 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Najsnažniji inhibitor hAChE_{rec} bio je spoj *t*BQ-13 ($K_i = 21 \mu\text{mol L}^{-1}$) s prolinom na *para*-položaju. Gotovo jednaka konstanta inhibicije određena je za spojeve *t*BQ-8 ($K_i = 24 \mu\text{mol L}^{-1}$), kod kojeg se u *meta*-položaju nalazi 2-feniletantiol kao supstituent, *t*BQ-4 ($K_i = 29 \mu\text{mol L}^{-1}$) kod kojeg se supstituent (tiociklopentan) nalazi u *para*-položaju, te *t*BQ-9 ($K_i = 30 \mu\text{mol L}^{-1}$) s 2-naftotiolom u *meta*-položaju. Navedeni spojevi u prosjeku su dva puta snažniji inhibitori hAChE_{rec} u usporedbi s *t*BQ koji na benzokinonskom prstenu ima samo *tert*-butilnu grupu. Najslabiji inhibicijski potencijal pokazao je spoj *t*BQ-5 ($K_i = 136 \mu\text{mol L}^{-1}$) kod kojeg se u *meta*-položaju nalazi tiobenzen kao supstituent. Iako je analizirana serija sačinjena od malog broja spojeva, primjećeno je da hAChE_{rec} preferira vezanje spojeva s tiolnim supstituentom u *para*-položaju s obzirom na *tert*-butilnu grupu, odnosno da pokazuje određenu regioselektivnost. Tako je spoj *t*BQ-2 1,4 puta snažniji inhibitor od svog regioizomera *t*BQ-1, dok je *t*BQ-4 gotovo 2 puta jači inhibitor od svog regioizomera *t*BQ-3. U slučaju spojeva čiji supstituent je s benzokinonskim prstenom povezan preko N atoma nije bilo moguće donijeti zaključak o regioselektivnosti hAChE_{rec} budući da su u seriji samo 4 takva spoja, od kojih regioizomeri *t*BQ-11 i *t*BQ-12 ne inhibiraju hAChE_{rec} pri koncentracijama do maksimalno 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nadalje, uočeno je da hAChE_{rec} preferira spojeve s voluminoznijim supstituentom budući da spojevi *t*BQ-8 s 2-feniletantiolom, i *t*BQ-9 s 2-naftotiolom kao supstituentima u *meta*-položaju inhibiraju hAChE_{rec} 4,5 do 5,7 puta snažnije od *t*BQ-5 kod kojeg se na istom položaju nalazi tiobenzen.

Prema analizi ovisnosti $K_{i,\text{app}}$ o koncentraciji supstrata većina spojeva pokazuje mješoviti ili nekompetitivni tip inhibicije hAChE_{rec}. Iznimke su bili spojevi *t*BQ-4, *t*BQ-6 i *t*BQ-14, kod kojih je $K_{i,\text{app}}$ linearno ovisila o koncentraciji supstrata (slika 3.15.), odnosno spojevi su djelovali kao kompetitivni inhibitori hAChE_{rec}.

Kako bi se potvrdio pretpostavljeni model vezanja inhibitora u aktivno mjesto hAChE_{rec}, metodom molekuskog uklapanja analizirane su nekovalentne interakcije ostvarene između spojeva *t*BQ-4, *t*BQ-8 i *t*BQ-9, za koje je iz Hunter-Downsovih prikaza predviđeno da se

ponašaju kao kompetitivni, nekompetitivni odnosno mješoviti tip inhibitora, redom, i aminokiselina aktivnog mjesta AChE (PDB kod: 4EY4¹⁸⁸) (slika 4.5).



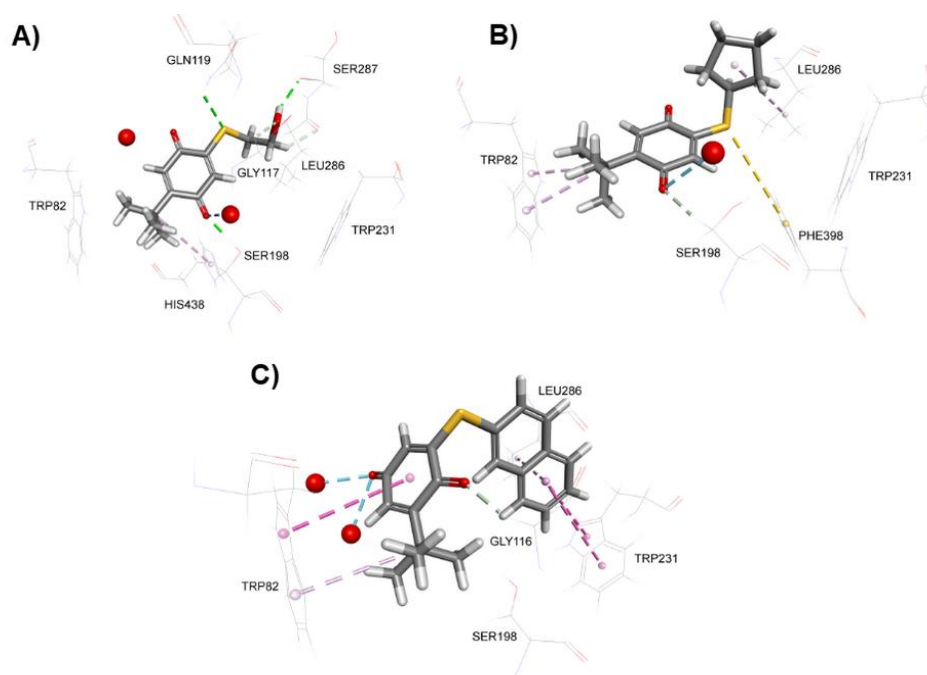
Slika 4.5. Modeli kompleksa ljudske AChE i benzokinona. A) model kompleksa hAChE i *t*BQ-4; B) model kompleksa hAChE i *t*BQ-8 i C) model kompleksa hAChE i *t*BQ-9. Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih interakcija (magenta – π -alkil π - π interakcije; narančasta – elektrostatske interakcije; zelena – vodikova veza; plava – vodikova veza s vodom). Crvenim sferama prikazane su molekule očuvane vode koje ostvaruju interakcije s ligandima.

Spoj *t*BQ-4 (slika 4.5. A) smjestio se na dno aktivnog mjesta AChE, odnosno u katalitičko mjesto gdje ostvaruje vodikove i π -alkil interakcije s aminokiselinama katalitičke trijade (Ser203 i His447), kolinskog mjesta (Trp86, Tyr337) te elektrostatsku interakciju s Phe297 iz acilnog džepa. Mali broj vodikovih veza i π -interakcija ostvaruje i s aminokiselinama perifernog mjesta (Tyr124, Tyr341), ali one, s obzirom na njihov broj i slabiji intenzitet, nemaju utjecaja na uočeni kompetitivni tip vezanja. *t*BQ-8 (slika 4.5. B), kao nekompetitivni inhibitor, veže se u sam izlaz iz aktivnog mjesta te ostvaruje elektrostatske i π -interakcije isključivo s aminokiselinama perifernog mjesta (Tyr72, Tyr341 i Trp86). *t*BQ-9 (slika 4.5. C) ostvaruje π -interakcije i vodikove veze s aminokiselinama perifernog mjesta (Tyr124, Tyr341, Trp286) i s Tyr337 iz kolinskog mjesta, zbog čega djeluje kao mješoviti inhibitor. U sva tri slučaja atom sumpora ostvaruje elektrostatske interakcije s obližnjim aminokiselinama aktivnog mjesta, što potvrđuje da je prisutnost ovog atoma važna za stabilizaciju spojeva unutar aktivnog mjesta AChE.

hBChE su najjače inhibirali spojevi *t*BQ-4 ($K_i = 5,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) s tiociklopentilom te *t*BQ-2 ($K_i = 8,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) s 2-hidroksietiltiolom kao supstituentom u *para*-položaju. Oba spoja su bili 6,3 odnosno 10,6 puta snažniji inhibitori od nesupstituiranog *t*BQ. Također, uočeno je da hBChE, kao i hAChE_{rec}, pokazuje određenu regioselektivnost preferirajući spojeve kod kojih je tiolni supstituent u *para*-položaju s obzirom na *tert*-butilnu grupu, pa tako spojevi *t*BQ-4 i *t*BQ-2 u prosjeku 5 puta slabije inhibiraju hBChE od njihovih regioizomera *t*BQ-3 i *t*BQ-1 kod kojih je supstituent u *meta*-položaju. Najslabijim inhibitorom hBChE pokazao se spoj *t*BQ-11 ($K_i = 228 \mu\text{mol L}^{-1}$) s metilaminom kao supstituentom u *para*-položaju, dok njegov regioizomer *t*BQ-12 nije inhibirao hBChE u koncentracijama do maksimalno $400 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Većina spojeva pokazala se jačim inhibitorima hBChE nego hAChE_{rec}, pri čemu je spoj *t*BQ-5 bio najselektivniji inhibirajući hBChE 7,6 puta snažnije u odnosu na hAChE_{rec}.

Kako bi se objasnile razlike u inhibicijskom potencijalu prema hBChE, metodom molekuskog uklapanja predviđene su interakcije između aminokiselina aktivnog mjesta BChE (PDB kod: 1P0I¹⁸⁹) i spojeva *t*BQ-2, *t*BQ-4 i *t*BQ-9 (slika 4.6).



Slika 4.6. Modeli kompleksa ljudske BChE i benzokinona. A) model kompleksa hBChE i *t*BQ-2; B) model kompleksa hBChE i *t*BQ-4 i C) model kompleksa hBChE i *t*BQ-9. Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih interakcija (magenta – π -alkil π - π interakcije; žuta – π -sumpor interakcije; zelena – vodikova veza; plava – vodikova veza s vodom). Crvenim sferama prikazane su očuvane molekule vode koje ostvaruju interakcije s ligandima.

Rezultati molekuskog modeliranja pokazali su da se spojevi *t*BQ-2 (slika 4.6 A) i *t*BQ-4 (slika 4.6 B), najsnažniji inhibitori hBChE u seriji, smještavaju u donji dio aktivnog mjesta BChE te ostvaruju nekovalentne interakcije s aminokiselinama katalitičke trijade; oba spoja ostvaruju vodikovu vezu sa Ser198, dok *t*BQ-2 ostvaruje i π -alkilnu interakciju s His438. U oba slučaja atom sumpora također ostvaruje interakcije s aminokiselinama aktivnog mjesta (*t*BQ-2 ostvaruje vodikovu vezu s Gln119, a *t*BQ-4 π -sumpor interakciju s Phe398). Za razliku od njih, *t*BQ-9 koji u prosjeku 5,7 puta slabije inhibira hBChE od *t*BQ-2 i *t*BQ-4, ne ostvaruje interakcije s aminokiselinama katalitičke trijade niti atom sumpora sudjeluje u stabilizaciji spoja unutar aktivnog mjesta, što može objasniti njegov značajno slabiji inhibicijski učinak.

4.1.4. Inhibicija kolinesteraza hidrazonima

Skupinu hidrazona činilo je osam hidrazonskih derivata piridoksala i piridin-4-karbaldehida te osam *N*-acilhidrazonskih derivata piridoksala (slika 3.6.). Unutar pojedinih serija, spojevi su se razlikovali u supstituentima na hidrazonskoj, odnosno *N*-acilhidrazonskoh grupi (fenil supstituiran s -H, -NO₂, -F, -Cl, -OH, ili -CH₃, ili piridin). Vrijednosti dobivenih konstanti K_i prikazane su u tablici 4.6.

Tablica 4.6. Inhibicija ljudskih AChE_{rec} i BChE hidrazonima i *N*-acilhidrazonima. Disocijacijske konstante kompleksa enzim–ligand ($K_i \pm$ standardna devijacija) izračunate su prema jednadžbi (2). Selektivnost spojeva prema jednoj od kolinesteraza izražena je kao indeks selektivnosti SI.

SPOJ	K_i (hAChE _{rec}) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	K_i (hBChE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SI
HID1	77 $\pm$ 9 (m)	10 $\pm$ 2	7,7
HID2	16 $\pm$ 1 (n)	n.o.	–
HID3	59 $\pm$ 6 (m)	87 $\pm$ 13	0,68
HID4	38 $\pm$ 5 (m)	25 $\pm$ 5	1,5
HID5	301 $\pm$ 34 (m)	32 $\pm$ 7	9,4
HID6	n.o.	n.o.	–
HID7	211 $\pm$ 23 (n)	254 $\pm$ 59	0,83
HID8	155 $\pm$ 12 (n)	51 $\pm$ 11	3,0
AcHID1	199 $\pm$ 17 (k)	135 $\pm$ 7	1,5
AcHID2	131 $\pm$ 13 (m)	121 $\pm$ 4	1,1
AcHID3	126 $\pm$ 1 (k)	58 $\pm$ 2	2,2
AcHID4	89 $\pm$ 5 (m)	68 $\pm$ 3	1,3
AcHID5	102 $\pm$ 3 (k)	38 $\pm$ 6	2,7
AcHID6	192 $\pm$ 12 (k)	90 $\pm$ 9	2,1
AcHID7	120 $\pm$ 8 (k)	98 $\pm$ 7	1,2
AcHID8	144 $\pm$ 6 (k)	63 $\pm$ 3	2,3

n.o. nije određeno

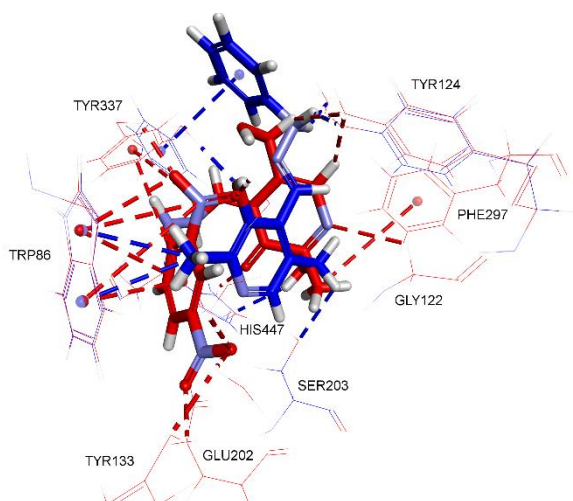
Od 16 spojeva, njih 14 inhibiralo je obje kolinesteraze. Iznimke su bili spojevi HID6, hidrazonski derivat piridin-4-karbaldehida s 2,4-dinitrofenilom kao supstituentom, koji nije testiran zbog slabe topljivosti i brzog taloženja po dodatku u fosfatni pufer, te HID2 koji nije inhibirao hBChE pri koncentracijama do $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, a pri većim koncentracijama je taložio po dodatku u fosfatni pufer. Budući da oba spoja, HID2, derivat piridoksala, i HID6, derivat piridin-karbaldehida, imaju 2,4-dinitrofenilnu grupu kao supstituent na hidrazonskoj grupi, čini se da je upravo navedeni supstituent odgovoran za slabu topljivost HID2 i HID6 u vodenom mediju.

Najsnažnijim inhibitorom hAChE_{rec} u cijeloj skupini pokazao se spoj HID2 ($K_i = 16 \mu\text{mol L}^{-1}$) koji je svoj inhibicijski potencijal ostvario u niskim mikromolarnim koncentracijama kod kojih nije dolazilo do problema s taloženjem. Generalno, spojevi iz serije hidrazonskih derivata piridoksala ($K_i = 16 - 77 \mu\text{mol L}^{-1}$) pokazali su se snažnijim inhibitorima hAChE_{rec} od spojeva iz serije hidrazonskih derivata piridin-4-karbaldehida ($K_i = 155 - 301 \mu\text{mol L}^{-1}$), dok su K_i vrijednosti za seriju *N*-acilhidrazona bile u rasponu $89 - 199 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ovi rezultati u skladu su sa rezultatima istraživanja inhibicije kolinesteraza drugim hidrazonskim derivatima. U istraživanju de Freitas Silva i suradnika najsnažnijim inhibitorom AChE iz električne jegulje (eeAChE) pokazao se hibrid *N*-acilhidrazona i triazola ($\text{IC}_{50} = 26,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) koji nije utjecao na aktivnost konjske BChE (eqBChE).¹⁴³ Slično, u istraživanju Petronilho i suradnika najsnažnijim inhibitorom eeAChE pokazao se derivat gvanilhidrazona i 2,4-dinitrobenzaldehida s $\text{IC}_{50} = 11,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ koji je pri $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji inhibirao manje od 10 % aktivnosti eqBChE.²⁰² Za hidrazonske derivate aminogvanidina IC_{50} vrijednosti za eeAChE bile su u rasponu od $17,95 - 54,93 \mu\text{mol L}^{-1}$, a za eqBChE $\geq 1,69 \mu\text{mol L}^{-1}$.¹⁴¹ Kod svih derivata hidrazona i *N*-acilhidrazona istraženih u ovom doktoratu, sposobnost inhibicije hAChE_{rec} povećava se uvođenjem supstituenta na fenilnu grupu. Tako su u svakoj od tri serije najslabiji inhibitori hAChE_{rec} bili spojevi s nesupstituiranim benzenskim prstenom: derivat piridoksala HID1, derivat piridin-4-karbaldehida HID5 te AcHID1. Što se tiče vrste supstituenta na benzenskom prstenu, kod sve tri serije derivata snažniji inhibicijski potencijal prema hAChE_{rec} pokazali su spojevi s klorom kao supstituentom na fenilnoj grupi, u odnosu na one kod kojih se na istom mjestu nalazio fluor (HID4 vs HID3; HID8 vs HID7; AcHID4 vs AcHID3). U seriji *N*-acilhidrazona, najjači inhibitor hAChE_{rec} bio je upravo derivat s *p*-klorfenilnom grupom, AcHID4. Kod ove serije spojeva, zamjena fenilne grupe 3-piridinom (AcHID7) ili 4-piridinom (AcHID8) rezultirala je vrlo malom promjenom inhibitorne

sposobnosti u usporedbi s AchID1 s nesupstituiranim fenilnim prstenom. Također, uvođenje OH grupe na fenilnu grupu *N*-acilhidrazona (AchID6) nije imalo utjecaja na inhibiciju u odnosu na nesupstituirani AchID1. Ovdje ispitivani *N*-acilhidrazoni pokazali su se značajno slabijim inhibitorima hAChE_{rec} u usporedbi s *N*-acilhidrazonskim derivatima 3-klorbenzohidrazida čije IC₅₀ vrijednosti su u niskom mikromolarnom ili submikromolarnom području.²⁰³

Na temelju grafičkih prikaza Hunter-Downsove jednadžbe zaključeno je da svi hidrazonski derivati pokazuju mješoviti ili nekompetitivni tip inhibicije, dok se *N*-acilhidrazoni u većoj mjeri ponašaju kao kompetitivni inhibitori hAChE_{rec}. Iznimka su bili spojevi AchID2 (s *p*-nitrofenilom kao supstituentom na *N*-acilhidrazonskoj grupi) i AchID4 (s *p*-klorfenilom kao supstituentom na *N*-acilhidrazonskoj grupi) kod kojih je pretpostavljen mješoviti tip inhibicije.

Kako bi se dobio uvid u mogući razlog različitog inhibitornog potencijala spojeva, metodom molekuskog uklapanja analizirane su interakcije koje se ostvaruju između aminokiselina aktivnog mjesta AChE (PDB kod: 4EY4¹⁸⁸) i spojeva HID1 i HID2, kao najslabijeg i najsnažnijeg inhibitora hAChE_{rec} iz serije derivata piridoksala, pri čemu je HID2 bio ujedno i najjači inhibitor cijele skupine hidrazona (slika 4.7).



Slika 4.7. Model kompleksa ljudske AChE i spojeva HID1 (plavo) i HID2 (crveno). Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih interakcija, a njihova boja odgovara boji kojom je prikazan pojedini spoj.

Analiza modela kompleksa AChE–HID1 i AChE–HID2 pokazala je da se spojevi HID1, kod kojega se na hidrazonskoj grupi nalazi nesupstituirani fenil, i HID2, kod kojega se na istom mjestu nalazi 2,4-dinitrofenil, različito smještavaju unutar aktivnog mjesta AChE. Spoj HID1

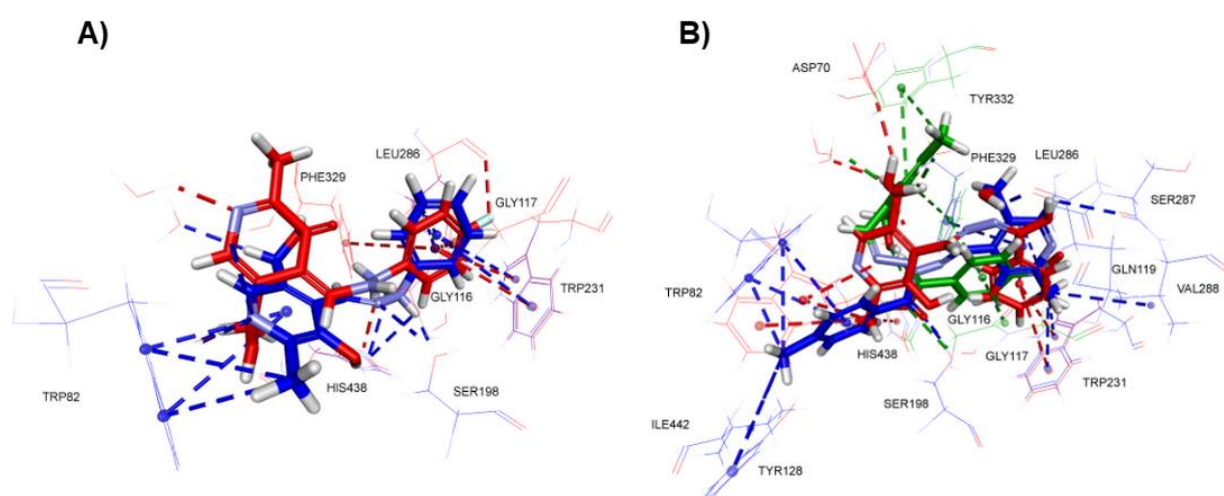
ostvaruje vodikovu vezu sa Ser203 i His447, aminokiselinama katalitičke trijade, te hidrofobne interakcije s aminokiselinama kolinskog mjesta Trp86 i Tyr337. Spoj HID2, iako se smješta dublje u aktivno mjesto u usporedbi s HID1, ostvaruje samo vodikovu vezu s His447 iz katalitičke trijade, ali zato ostvaruje elektrostatsku interakciju s Glu202. Nadalje, HID2 ostvaruje gotovo dvostruko veći broj neveznih interakcija s aminokiselinama aktivnog mjesta u usporedbi s HID1, uključujući veći broj hidrofobnih interakcija s aminokiselinama kolinskog (Trp86, Tyr337) i perifernog mjesta (Tyr124, Phe297) što može objasniti 5 puta snažniji inhibitorni učinak u usporedbi s HID1.

Kada je riječ o hBChE, najsnažnijim inhibitorom pokazao se spoj HID1 ($K_i = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$). I kod hBChE, generalno najsnažniji inhibitori su hidrazonski derivati piridoksala s K_i vrijednostima u rasponu $10 - 87 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nakon njih slijede *N*-acilhidrazoni s K_i vrijednostima u rasponu $38 - 135 \mu\text{mol L}^{-1}$ i hidrazonski derivati piridin-4-karbaldehida, čije su K_i vrijednosti u rasponu $32 - 254 \mu\text{mol L}^{-1}$. Unutar serija hidrazona, najsnažniji inhibitori bili su spojevi s nesupstituiranim fenilom, HID1 i HID5, dok su najslabiji inhibitori bili hidrazoni s fluorom na fenilu, HID3 ($K_i = 87 \mu\text{mol L}^{-1}$) i HID7 ($K_i = 254 \mu\text{mol L}^{-1}$), što sugerira da elektron-odvlačeća grupa na tom položaju negativno utječe na inhibicijski potencijal prema hBChE. Kod *N*-acilhidrazona, najslabiji inhibitor hBChE bio je spoj AchID1 ($K_i = 135 \mu\text{mol L}^{-1}$) s nesupstituiranim fenilom, dok je najjači inhibicijski potencijal pokazao spoj AchID5, kod kojeg se na benzenskom prstenu u *para*-položaju nalazi elektron-donirajuća metilna grupa ($K_i = 38 \mu\text{mol L}^{-1}$). Uvođenje jake elektron-odvlačeće grupe na benzenski prsten, poput NO₂, ne mijenja inhibicijski potencijal u odnosu na nesupstituirani benzen (AchID1), kao što je vidljivo kod spoja AchID2. S druge strane, uvođenje nešto slabijih elektron-odvlačećih grupa poput F (spoj AchID3) ili Cl (spoj AchID4) rezultira otprilike dva puta snažnijim inhibicijskim potencijalom u usporedbi s nesupstituiranim benzenom. Iz navedenog, može se zaključiti da elektron-donirajuća grupa na fenilnom supstituentu doprinosi snažnijem inhibicijskim potencijalom prema hBChE u usporedbi s elektron-odvlačećim supstituentima ili nesupstituiranim prstenom. Zamjena benzenkog prstena 3-piridinom ili 4-piridinom pridonosi inhibicijskom potencijalu spoja; u slučaju spoja AchID8 zamjena benzena s 4-piridinom uzrokuje dva puta snažniju inhibiciju hBChE u usporedbi sa spojem AchID1.

Generalno, hidrazoni i *N*-acilhidrazoni preferirano inhibiraju hBChE u odnosu na hAChE_{rec}. Kao najselektivnijima istakli su se spojevi HID1 i HID5 koji su oko 9 puta snažnije inhibirali hBChE što se može pripisati komplementarnom afinitetu enzima; hBChE ima veći afinitet za

hidrazone kod kojih je fenilni prsten nesupstituiran, dok hAChE_{rec} upravo prema tim spojevima ima najslabiji afinitet.

Kako bi se utvrdilo kako strukturne razlike doprinose inhibicijskom potencijalu spojeva, metodom molekulskog uklapanja predviđene su interakcije između aminokiselina BChE (PDB kod: 1P0I¹⁸⁹) i hidrazonskih derivata piridoksala HID1 i HID3 koji predstavljaju najsnažniji i najslabiji inhibitor u navedenoj seriji hidrazona (slika 4.8 A) te *N*-acilhidrazona AcHID1, AcHID2, kao najslabijih inhibitora i AcHID5, kao najsnažnijeg inhibitora u seriji *N*-acilhidrazona (slika 4.8 B).



hidrofobne interakcije s Trp82, Trp231 i Val288. Nadalje, ovakav smještaj omogućava mu i stvaranje vodikove interakcije sa Ser198 iz katalitičke trijade. Veći broj ostvarenih interakcija s aminokiselinama katalitičkog aktivnog mjesta, kao i interakcija s katalitičkim serinom, vjerojatan je razlog tri puta snažnijeg inhibitornog učinka spoja AchID5 prema hBChE u usporedbi s AchID1 i AchID2.

4.1.5. Inhibicija kolinesteraza O-alkiloksimima

Ispitivane su tri serije kinuklidinskih O-alkiloksima; prvu seriju činili su derivati kod kojih je na oksimski kisik vezan metil (O-metiloksimi, slika 3.7.), drugu su činili derivati kod kojih je na oksimski kisik vezan *tert*-butil (O-*tert*-butiloksimi, slika 3.8.), dok se u trećoj seriji na oksimskom kisiku nalazila benzilna grupa (O-benziloksimi, slika 3.9.). Unutar svake serije, derivati se razlikuju po supstituentu na kinuklidinskom dušiku, a riječ je o metilnoj ili različito supstituiranoj benzilnoj grupi (supstituenti: -H, -F, -Cl, -Br, -NO₂, -CF₃, -OCF₃, *tert*-butil).

U tablici 4.7 prikazane su vrijednosti dobivenih konstanti K_i za inhibiciju ljudskih kolinesteraza O-metiloksimima. Spojevi MetOX-1 (spoj bez supstituenta na kinuklidinskom dušiku) i MetOX-4 (spoj kod kojeg se na benzilnoj grupi u *para*-položaju nalazi Br) nisu ni pri najvećoj testiranoj koncentraciji (600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) inhibirali aktivnost ni hAChE_{rec} ni hBChE. Ostali spojevi iz ove serije inhibirali su obje kolinesteraze uz raspon K_i vrijednosti 14 – 154 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Tablica 4.7. Inhibicija ljudskih AChE_{rec} i BChE O-metiloksimima. Disocijacijske konstante kompleksa enzim–ligand ($K_i \pm$ standardna devijacija) izračunate su prema jednadžbi (2). Selektivnost spojeva prema jednoj od kolinesteraza izražena je kao indeks selektivnosti SI.

SPOJ	K_i (hAChE _{rec}) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	K_i (hBChE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SI
MetOX-1	n.o.	n.o.	–
MetOX-2	154 $\pm$ 6 (k)	47 $\pm$ 9	3,3
MetOX-3	117 $\pm$ 7 (k)	34 $\pm$ 7	3,4
MetOX-4	n.o.	n.o.	–
MetOX-5	73 $\pm$ 3 (m)	33 $\pm$ 3	2,2
MetOX-6	130 $\pm$ 7 (m)	53 $\pm$ 10	2,5
MetOX-7	61 $\pm$ 3 (k)	35 $\pm$ 5	1,7
MetOX-8	47 $\pm$ 2 (k)	27 $\pm$ 4	1,7
MetOX-9	14 $\pm$ 1 (k)	18 $\pm$ 1	0,78

n.o. nije određeno

Najsnažnijim inhibitorom hAChE_{rec} iz serije *O*-metiloksima pokazao se spoj MetOX-9 ($K_i = 14 \mu\text{mol L}^{-1}$) čiji je kinuklidinski dušik supstituiran *m*-nitrobenzilom. Tri, odnosno pet puta slabijim inhibitorima pokazali su se spojevi MetOX-8 i MetOX-9 s bromom, odnosno klorom u *meta* položaju na benzilnoj grupi. Najslabiji inhibitori hAChE_{rec} u seriji bili su spojevi MetOX-2 ($K_i = 154 \mu\text{mol L}^{-1}$) i MetOX-6 ($K_i = 130 \mu\text{mol L}^{-1}$) s atomom F u *para*- odnosno *meta*-položaju na benzilnoj grupi. Generalno, inhibicijski potencijal spojeva sa supstituentom na benzilnoj grupi u *meta*-položaju bio je 2 – 5 puta veći u odnosu na spojeve gdje je supstituent bio u *para*-položaju. Kod spojeva sa supstituentom u *meta*-položaju, inhibicijski potencijal slijedio je trend: $\text{NO}_2 > \text{Br} > \text{Cl} > \text{F}$, odnosno smanjenjem elektronegativnosti supstituenta, inhibicijski potencijal je rastao. Prema grafičkim prikazima Hunter-Downsovih jednadžbi, za sve spojeve se pretpostavlja kompetitivni ili mješoviti tip inhibicije hAChE_{rec}, što sugerira da svi ispitivani spojevi ostvaruju interakcije s aminokiselinama katalitičkog mjesta, a neki i dodatne s aminokiselinama perifernog mjesta.

Kada je riječ o hBChE, najsnažniji inhibitor bio je MetOX-9 ($K_i = 18 \mu\text{mol L}^{-1}$) s *m*-nitrobenzilom na kinuklidinskom dušiku, nakon kojega slijedi MetOX-8 ($K_i = 27 \mu\text{mol L}^{-1}$) s *m*-brombenzilom na istom položaju. Slično kao i kod hAChE_{rec}, najjači inhibitoryni potencijali pokazali su spojevi kod kojih se u *meta*-položaju na benzilnoj grupi nalaze NO_2 odnosno Br, dok su najslabiji inhibitori bili spojevi kod kojih se na benzilnoj grupi nalazi F u *para*- ili *meta*-položaju. Ostali spojevi pokazuju relativno sličan inhibicijski potencijal te nema izražene preferencije prema određenom supstituentu ili njegovom položaju.

Generalno, spojevi iz ove serije su 2 – 3 puta selektivniji prema hBChE u odnosu na hAChE_{rec}; iznimka je spoj MetOX-9, najjači inhibitor obje kolinesteraze, koji nije pokazao izraženu selektivnost ni prema jednoj od kolinesteraza.

Vrijednosti dobivenih konstanti K_i za inhibiciju ljudskih kolinesteraza *O*-*tert*-butiloksimima prikazane su u tablici 4.8.

Tablica 4.8. Inhibicija ljudskih AChE_{rec} i BChE *O*-*tert*-butiloksimima. Disocijacijske konstante kompleksa enzim–ligand ($K_i \pm$ standardna devijacija) izračunate su prema jednadžbi (2). Selektivnost spojeva prema jednoj od kolinesteraza izražena je kao indeks selektivnosti SI.

SPOJ	K_i (hAChE _{rec}) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	K_i (hBChE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SI
<i>t</i> BuOX-1	n.o.	59 $\pm$ 19	–
<i>t</i> BuOX-2	n.o.	149 $\pm$ 22	–
<i>t</i> BuOX-3	683 $\pm$ 117 (m)	48 $\pm$ 6	14
<i>t</i> BuOX-4	257 $\pm$ 26 (m)	79 $\pm$ 14	3,3
<i>t</i> BuOX-5	233 $\pm$ 26 (m)	20 $\pm$ 2	12
<i>t</i> BuOX-6	123 $\pm$ 19 (m)	7,4 $\pm$ 0,9	17
<i>t</i> BuOX-7	237 $\pm$ 31 (m)	66 $\pm$ 10	3,6
<i>t</i> BuOX-8	241 $\pm$ 12 (m)	7,9 $\pm$ 0,6	31
<i>t</i> BuOX-9	351 $\pm$ 24 (m)	30 $\pm$ 19	12
<i>t</i> BuOX-10	246 $\pm$ 21 (m)	49 $\pm$ 7	5,0
<i>t</i> BuOX-11	173 $\pm$ 13 (m)	14 $\pm$ 1	12
<i>t</i> BuOX-12	83 $\pm$ 6 (m)	46 $\pm$ 2	1,8
<i>t</i> BuOX-13	262 $\pm$ 28 (m)	21 $\pm$ 2	12
<i>t</i> BuOX-14	>800 (n)	59 $\pm$ 13	/
<i>t</i> BuOX-15	414 $\pm$ 41 (m)	43 $\pm$ 7	9,6
<i>t</i> BuOX-16	135 $\pm$ 12 (m)	2,3 $\pm$ 0,2	59
<i>t</i> BuOX-17	28 $\pm$ 2 (m)	10 $\pm$ 1	2,8

n.o. nije određeno

Kada je riječ o inhibiciji hAChE_{rec}, spojevi *t*BuOX-1, čiji kinuklidinski dušik nije supstituiran i *t*BuOX-2, kod kojeg je na kinuklidinski dušik vezana metilna grupa, nisu inhibirali aktivnost enzima ni kod koncentracije 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Spoj *t*BuOX-14, kod kojeg je kinuklidinski dušik supstituiran s 3,5-difluorbenzilnom grupom, je pri istom rasponu koncentracija pokazao vrlo slab inhibicijski potencijal te je konstanta K_i procijenjena kao > 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ostali spojevi inhibirali su hAChE_{rec} uz raspon K_i vrijednosti 28 – 683 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Najsnajzniji inhibicijski potencijal pokazao je spoj *t*BuOX-17 ($K_i = 28 \mu\text{mol L}^{-1}$) čiji kinuklidinski dušik je supstituiran s 3,5-di-*tert*-butilbenzilnom grupom, nakon kojega slijedi tri puta slabiji *t*BuOX-12 na čiji kinuklidinski dušik je vezan *m*-nitrobenzil. Najslabiji inhibitor iz serije bio je spoj *t*BuOX-3 kod kojeg je na kinuklidinski dušik vezana nesupstituirana benzilna grupa. Analiza strukture spojeva iz serije i vrijednosti njihovih K_i konstanti sugerirala je da položaj supstituentata na benzilnoj grupi (*meta* ili *para*) nema značajnog utjecaja na inhibicijski potencijal. Iznimka su spojevi koji imaju nitro grupu kao supstituent: spoj *t*BuOX-12, kod kojeg se nitro grupa nalazi u *meta*-položaju, je tri puta snažniji inhibitor od spoja *t*BuOX-7 kod kojeg se supstituent nalazi u *para*-položaju. Uvođenje dodatnog supstituenta na benzilnu grupu dalo je naslutiti da

inhibicija ovisi o veličini drugog supstituenta na benzilnoj grupi. Naime, u slučaju kada je benzenski prsten disupstituiran halogenim elementima, kao što je to kod spojeva *t*BuOX-14 (3,5-difluorobenzil) i *t*BuOX-15 (2-klor-6-fluorbenzil), inhibicijski potencijal se smanjuje u odnosu na spojeve *t*BuOX-4, *t*BuOX-9 i *t*BuOX-10, čije benzilne grupe su monosupstituirane s atomima F ili Cl, dok se u slučaju uvođenja dodatne *tert*-butilne grupe (spoj *t*BuOX-17) inhibicijski potencijal pojačava gotovo pet puta u odnosu na monosupstituirani analog *t*BuOX-16. Prema Hunter-Downsovom prikazu ovisnosti $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata, za sve *O-tert*-butiloksime iz serije predviđen je mješoviti tip inhibicije $hAChE_{rec}$, odnosno vezanje u katalitičko i periferno mjesto. Jedina iznimka je spoj *t*BuOX-14 kod kojega je predviđen nekompetitivni tip inhibicije.

U slučaju hBChE, K_i vrijednosti za sve *O-tert*-butiloksime iz serije bile su u rasponu 2,3 – 149 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Naj snažniji inhibitor bio je spoj *t*BuOX-16 ($K_i = 2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) kod kojeg se na benzilnoj grupi nalazi *tert*-butilna grupa u *para*-položaju, nakon čega slijede tri puta slabiji *t*BuOX-6 i *t*BuOX-8 koji na *para*-položaju benzilnog prestena imaju atom Br, odnosno metilnu grupu. Najslabiji inhibitor hBChE bio je spoj *t*BuOX-2 kod kojeg se na kinuklidinskom dušiku nalazi metilna grupa. Uočeno je da su spojevi *t*BuOX-5, *t*BuOX-6 i *t*BuOX-8, kojima se u *para*-položaju na benzilnoj grupi nalaze Cl, Br ili CH_3 , snažnije inhibirali hBChE u usporedbi s analogima kod kojih su navedeni supstituenti u *meta*-položaju (*t*BuOX-10, *t*BuOX-11 odnosno *t*BuOX-13). Suprotno tome, kada je benzilna grupa supstituirana s NO_2 ili F, snažnijim inhibitorima pokazali su se spojevi kod kojih su navedeni supstituenti u *meta*-položaju (*t*BuOX-12 odnosno *t*BuOX-9) u usporedbi sa spojevima gdje su isti supstituenti u *para*-položaju (*t*BuOX-7 odnosno *t*BuOX-4). Uvođenje dodatne *tert*-butilne grupe na benzilni prsten (*t*BuOX-17) ili uvođenje dodatnog halogenog atoma (F ili Cl na *t*BuOX-14, odnosno *t*BuOX-15) je oko četiri puta smanjilo inhibicijski potencijal spojeva u odnosu na monosupstituirane spojeve (*t*BuOX-16, *t*BuOX-5 i *t*BuOX-9).

Kada je riječ o selektivnosti spojeva, svi *O-tert*-butiloksimi preferirano inhibiraju hBChE u odnosu na $hAChE_{rec}$, pri čemu se najviše ističe spoj *t*BuOX-16, koji je 59 puta snažnije inhibirao hBChE od $hAChE_{rec}$.

Svi spojevi iz serije *O*-benziloksima inhibirali su obje kolinesteraze uz raspon K_i vrijednosti 0,079 – 360 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (tablica 4.9).

Tablica 4.9. Inhibicija ljudskih AChE_{rec} i BChE O-benziloksimima. Disocijacijske konstante kompleksa enzim–ligand ($K_i \pm$ standardna devijacija) izračunate su prema jednadžbi (2). Selektivnost spojeva prema jednoj od kolinesteraza izražena je kao indeks selektivnosti SI.

SPOJ	K_i (hAChE _{rec}) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	K_i (hBChE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SI
BnzOX-1	360 $\pm$ 25 (m)	18 $\pm$ 1	20
BnzOX-2	124 $\pm$ 8 (k)	4,1 $\pm$ 0,3	30
BnzOX-3	41 $\pm$ 2 (k)	0,66 $\pm$ 0,02	62
BnzOX-4	22 $\pm$ 2 (m)	1,2 $\pm$ 0,1	18
BnzOX-5	53 $\pm$ 2 (m)	0,72 $\pm$ 0,04	74
BnzOX-6	39 $\pm$ 1 (m)	0,30 $\pm$ 0,01	130
BnzOX-7	30 $\pm$ 2 (m)	0,64 $\pm$ 0,02	47
BnzOX-8	21 $\pm$ 1 (m)	0,84 $\pm$ 0,05	25
BnzOX-9	27 $\pm$ 2 (m)	0,47 $\pm$ 0,03	57
BnzOX-10	26 $\pm$ 1 (m)	0,35 $\pm$ 0,01	74
BnzOX-11	41 $\pm$ 2 (m)	0,39 $\pm$ 0,01	105
BnzOX-12	6,1 $\pm$ 0,3 (m)	0,48 $\pm$ 0,02	13
BnzOX-13	28 $\pm$ 2 (k)	0,82 $\pm$ 0,02	34
BnzOX-14	17 $\pm$ 1 (m)	0,13 $\pm$ 0,00	131
BnzOX-15	106 $\pm$ 17 (m)	0,32 $\pm$ 0,01	331
BnzOX-16	42 $\pm$ 3 (m)	0,13 $\pm$ 0,00	323
BnzOX-17	72 $\pm$ 5 (m)	0,74 $\pm$ 0,03	97
BnzOX-18	28 $\pm$ 1 (k)	0,079 $\pm$ 0,004	354
BnzOX-19	16 $\pm$ 1 (m)	0,19 $\pm$ 0,02	84

Naj snažnijim inhibitorom hAChE_{rec} pokazao se spoj BnzOX-12 ($K_i = 6,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) kod kojeg se na kinuklidinskom dušiku nalazi *m*-nitrobenzil, nakon kojega slijede oko tri puta slabiji BnzOX-19 kod kojeg je kinuklidinska benzilna grupa disupstituirana *tert*-butilnom grupom u *meta*-položajima, i BnzOX-14 kod kojeg se na benzilnoj grupi nalaze atomi klora na *meta*- i *para*-položajima. Najslabiji inhibitor hAChE_{rec} bio je spoj BnzOX-1 ($K_i = 360 \mu\text{mol L}^{-1}$) bez supstituenta na kinuklidinskom dušiku. Kod analize utjecaja strukture supstituenta na benzilnoj grupi na inhibicijsku moć spojeva s monosupstituiranom benzilnom grupom na kinuklidinu, obrazac utjecaja nije bilo moguće odrediti. Naime, u slučaju kada su supstituenti bili NO₂ ili Cl, hAChE_{rec} je pokazivala 2 – 3 puta veći afinitet prema spojevima u *meta*-položaju (BnzOX-12, BnzOX-10), u odnosu na spojeve kod kojih su se NO₂ ili Cl nalazili na *para*-položaju (BnzOX-8, BnzOX-5). Nasuprot tome, hAChE_{rec} nije pokazivala razliku u afinitetu prema *meta* ili *para* položaju u slučaju kada su supstituenti bili Br ili F (BnzOX-11 i BnzOX-6 odnosno BnzOX-9 i BnzOX-4). U slučaju kada je kinuklidinska benzilna grupa bila disupstituirana, uvođenje dodatne *tert*-butilne grupe (BnzOX-19) dovodi do gotovo dva puta većeg afiniteta hAChE_{rec} u odnosu na spoj sa samo jednom *tert*-butilnom grupom (BnzOX-18). S druge strane,

uvođenje dodatnog halogenog atoma utjecalo je na inhibicijski potencijal spoja ovisno o halogenu i njegovom položaju na benzilnoj grupi. Naime, ako se usporede K_i konstante monosupstituiranih spojeva (BnzOX-4 i BnzOX-9) sa spojevima koji imaju 3,4-difluor- (BnzOX-13) i 3,5-difluor-supstituiranu benzilnu grupu (BnzOX-15), može se uočiti da hAChE_{rec} pokazuje oko 4,5 puta slabiji afinitet prema spoju BnzOX-15 kod kojeg su oba atoma F na *meta*-pozicijama (3,5-difluorobenzilni supstituent). Disupstitucija benzilne grupe atomima Cl (BnzOX-14) rezultira snažnijim inhibicijskim učinkom u odnosu monosupstituirane analoge BnzOX-5, kod kojeg se nalazi jedan atom Cl na *para*-položaju, i BnzOX-10, kod kojeg je Cl na *meta*-položaju. U slučaju kombinacije različitih supstituenata kao kod spoja BnzOX-16, inhibicijski potencijal uvođenjem dodatnog halogenog elementa smanjio se u usporedbi sa spojevima koji su monosupstituitani atomima F (BnzOX-9 i BnzOX-4) te atomom Cl na *meta*-poziciji (BnzOX-10).

Prema grafičkim prikazima Hunter-Downsove jednadžbe, većina spojeva djeluje kao mješoviti tip inhibitora hAChE_{rec}. Iznimke su spojevi BnzOX-2, BnzOX-3, BnzOX-18 i BnzOX-13 za koje je predviđeno vezanje isključivo u katalitičko mjesto AChE, odnosno kompetitivni tip inhibicije.

U slučaju inhibicije hBChE, većina O-benziloksima imala je vrijednosti K_i konstanti u submikromolarnom koncentracijskom području, pri čemu je najsnažniji inhibitor bio spoj BnzOX-18 ($K_i = 0,079 \mu\text{mol L}^{-1}$) čija je kinuklidinska benzilna grupa supstituirana *tert*-butilnom grupom. Nakon njega slijede spojevi BnzOX-14 s 3,4-diklor-, BnzOX-16 s 2-klor-5-fluor- i spoj BnzOX-19 s 3,5-di-*tert*-butil-supstituiranom benzilnom grupom kinuklidina, ukazujući da BChE preferira molekule većeg volumena. Najslabiji inhibicijski potencijal pokazao je spoj BnzOX-1 ($K_i = 18 \mu\text{mol L}^{-1}$), kod kojeg kinuklidinski dušik nije supstituiran. Generalno, BChE je pokazivala veći afinitet prema spojevima sa supstituentima u *meta*-položaju u odnosu na njihove *para*-supstituirane analoge. Razlika u inhibicijskom potencijalu najizraženija je u slučaju kada je supstituent bio F, budući da je spoj BnzOX-9, kod kojeg se on nalazi u *meta*-položaju, oko 2,6 puta snažnije inhibirao hBChE u odnosu na spoj BnzOX-4 gdje se F nalazi u *para*-položaju. S obzirom na prirodu supstituenta na benzilnoj grupi, može se pretpostaviti da hBChE preferira elektron-donirajuće supstituente. Naime, najsnažniji inhibitor iz serije, spoj BnzOX-18, s *tert*-butilnom grupom na benzenskom prstenu kinuklidina bio je oko 9 puta jači inhibitor od BnzOX-17 s elektron-odvlačećom trifluormetoksi grupom.

Svi *O*-benziloksimi su se pokazali kao iznimno selektivni inhibitori hBChE, pri čemu se posebno ističu spojevi BnzOX-15, BnzOX-16 i BnzOX-18 koji su bili više od 300 puta jači inhibitori hBChE u odnosu na hAChE_{rec}.

Gledajući sveobuhvatno, *O*-benziloksimi predstavljaju seriju najjačih inhibitora obiju ljudskih kolinesteraza u cijeloj skupini alkiloksima, što sugerira da vrsta supstituenta na kisiku oksimske grupe značajno pridonosi inhibicijskom potencijalu spojeva. Također, *O*-benziloksimi su bili i najselektivniji prema BChE u odnosu na preostale dvije serije oksima. Kod sve tri serije oksima, inhibicijski potencijal spojeva raste uvođenjem benzilne grupe na kinuklidinski dušik u odnosu na manje supstituente poput metilne grupe ili vodika, odnosno na nesupstituirani, nenabijeni dušik, što je trend koji je posebno izražen kod hAChE_{rec}. Jači afinitet kolinesteraza prema većim supstituentima na kinuklidinskom dušiku pokazan je i ranije kod kinuklidinskih imidazolijskih soli, hidroksilnih i karboksilnih derivata kinuklidin-3-ola te kinuklidinskih mono-oksima.^{204–206} Kada je riječ o supstituentima na kinuklidinskoj benzilnoj grupi, *O*-metiloksimi kod kojih je supstituent u *meta*-položaju u pravilu su snažnije inhibirali hAChE_{rec} u usporedbi s njihovim *para*-analogima, što je uočeno i kod kinuklidinskih oksima s nesupstituiranom oksimskom grupom.²⁰⁶ Isto vrijedi i za *O*-*tert*-butiloksime u slučajevima kada je supstituent NO₂. Kod hBChE, u pojedinim slučajevima čini se da afinitet enzima prema određenom položaju supstituenta na benzilnoj grupi također ovisi o supstituentu na oksimskom kisiku; kod *O*-*tert*-butiloksima i *O*-benziloksima snažniji inhibitori bili su oni kod kojih su elektronegativniji supstituenti (NO₂ ili F) bili u *meta*-položaju u odnosu na one u *para*-položaju. Što se prirode supstituenta tiče, najsnažniji inhibitori obje kolinesteraze iz sve tri serije bili su spojevi koji su kao supstituent na benzilnoj grupi imali ili NO₂ ili *tert*-butilnu grupu, pri čemu je hAChE_{rec} u pravilu preferirala NO₂ kao supstituent (kod *O*-*tert*-butiloksima je navedeni supstituent imao drugi po redu najsnažniji inhibicijski potencijal), dok je hBChE pokazala preferenciju prema spojevima kod kojih je supstituent bio *tert*-butil. U seriji *O*-metiloksima najsnažniji inhibitor hBChE i hAChE_{rec} bio je spoj kod kojeg je supstituent NO₂, no u navedenoj seriji nije prisutan derivat s *tert*-butilom kao supstituentom.

4.1.6. Inhibicija kolinesteraza karbamatima

Inhibitorna sposobnost karbamatnih spojeva (kinuklidinskih karbamata, karbamatnih derivata cinkonidina i cinkonina te monokarbamatnih i biskarbamatnih derivata bambuterola) određena je u okviru ranijih istraživanja.²²⁻²⁵ Svi ispitivani karbamatni spojevi djelovali su kao progresivni odnosno vremenski ovisni inhibitori ljudskih kolinesteraza, što znači da nakon smještanja spoja u aktivno mjesto enzima nastaje kovalentna veza između katalitičkog serina kolinesteraze i karbamatne grupe spoja.^{160,207} Stoga je njihova inhibitorna sposobnost izražena sveukupnom konstantom brzine inhibicije k_i .

Konstante k_i , određene iz inhibicije hAChE kinuklidinskim karbamatima (slika 3.10.), bile su u rasponu $1,0 - 15 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, dok su vrijednosti k_i za inhibiciju hBChE bile u rasponu $1,5 - 24 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (tablica D2. u Dodatku).²²

Konstante k_i , određene iz inhibicije hAChE karbamatnim derivatima cinkonidina i cinkonina (slika 3.11.) bile su u rasponu $0,55 - 1,78 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, dok su vrijednosti k_i za inhibiciju hBChE iznosile $0,78 - 3,65 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (tablice D3. i D4. u Dodatku).²³

Konstante k_i , određene iz inhibicije hAChE monokarbamatnim derivatima bambuterola (slika 3.12.) bile su u rasponu $0,21 - 3,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, dok su za hBChE bile u rasponu $0,0044 - 4,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (A. Matošević, rukopis u pripremi; tablica D5. u Dodatku).

Za inhibiciju hAChE biskarbamatnim derivatima bambuterola (slika 3.13.) određene su konstante brzine inhibicije k_i u rasponu $0,00109 - 4,56 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, dok su vrijednosti k_i za inhibiciju hBChE iznosile $0,0144 - 38,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (tablica D6. u Dodatku).^{24,25}

Generalno, svi ispitani karbamatni spojevi pokazali su se selektivnim inhibitorima hBChE u odnosu na AChE, pri čemu su najsnažniji inhibicijski potencijal, odnosno najveću konstantu brzine inhibicije, pokazali spojevi iz skupine biskarbamatnih derivata bambuterola.

4.2. Inhibicija BACE1

Sposobnost inhibicije ljudske rekombinantne BACE1 ispitana je za odabrane spojeve iz skupine 4-aminokinolina (slike 3.1, 3.2 i 3.3), benzokinona (slika 3.5), hidrazona i *N*-acilhidrazona (slika 3.6), *O*-alkiloksima (slike 3.7, 3.8 i 3.9) te karbamata (kinuklidinski karbamati (slika 3.10), derivati karbamata cinkonidina i cinkonina (slika 3.11) te biskarbamati (slika 3.13)). Sposobnost inhibicije BACE1 izražena je kao postotak inhibicije BACE1 pri koncentraciji spoja koja je odgovarala vrijednostima konstanti K_i za inhibiciju ljudskih kolinesteraza

odabranih spojeva unutar pojedine skupine. Kao pozitivna kontrola korišten je komercijalno dostupan inhibitor BACE1 β -Secretase Inhibitor III – Calbiochem (BACE1 inh. III) koji pri 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji u potpunosti inhibira β -sekretaznu aktivnost u BACE1-transfeciranim MDCK (engl. *Madin-Darby canine kidney*) stanicama.²⁰⁸ Tijekom uhodavanja metode mjerenja aktivnosti BACE1, najprije je bio korišten komercijalni komplet za mjerenje aktivnosti BACE1. Međutim, kako se komponente komercijalnog paketa nisu mogle iskoristiti ravnomjerno, prijedeno je na zasebno dobavljanje pojedinih komponenti kompleta. Pufer iz komercijalnog kompleta *β -Secretase (BACE1) Activity Detection Kit (Fluorescent)* (CS0010) zamijenjen je s 50 mmol L^{-1} natrijevim acetatnim puferom (pH = 4,5) s neionskim detergentom Triton X-100 odabranom prema dostupnim literaturnim podacima za mjerenje BACE1 aktivnosti.¹⁶⁹ Kako bi se ustanovio odgovarajući udio Triton X-100 u fosfatnom puferu, odnosno sastav pufera u kojemu će aktivnost BACE1 odgovarati onoj mjerenoj u komercijalnom kompletu, mjerena je inhibicija BACE1 s BACE1 inh. III u puferima priređenima s različitim udjelom Triton X-100.

4.2.1. Aktivnost BACE1 u puferima različitog sastava

Aktivnost BACE1 mjerena je usporedno u natrijevim acetatnim puferima bez ili s dodatkom detergenta Triton X-100 i u komercijalno dostupnom *Fluorescence Assay Buffer*-u. Sva mjerenja provedena su u prisustvu komercijalnog inhibitora BACE1 inh. III. Rezultati su prikazani u tablici 4.10.

Tablica 4.10. Usporedba aktivnosti BACE1 mjerene u *Fluorescence Assay Buffer*-u i 50 mmol L⁻¹ natrijevim acetatnim puferima (pH = 4,5) bez ili s dodatkom detergenta.

Koncentracija BACE1 inh. III ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	% inhibicije BACE1 (<i>Fluorescence Assay Buffer</i>)		% inhibicije BACE1 (50 mmol L ⁻¹ natrijev acetatni pufer)	
	POKUS 1	POKUS 2	POKUS 1	POKUS 2
0,05	9,6	2,9	23,1	33,5
0,1	16,6	9,2	39,7	33,2
0,5	49,9	48,2	71,6	69,3
1	68,4	60,2	85,6	78,2
5	101,9	83,2	102,7	102,7

Koncentracija BACE1 inh. III ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	% inhibicije BACE1 (<i>Fluorescence Assay Buffer</i>)		% inhibicije BACE1 (50 mmol L ⁻¹ natrijev acetatni pufer + 0,01 % Triton X-100)	
	POKUS 1		POKUS 1	
0,05	47,5		31,9	
0,1	45,7		34,8	
0,5	62,0		52,2	
1	78,8		63,5	
5	100,3		80,7	

Koncentracija BACE1 inh. III ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	% inhibicije BACE1 (<i>Fluorescence Assay Buffer</i>)		% inhibicije BACE1 (50 mmol L ⁻¹ natrijev acetatni pufer + 0,005 % Triton X-100)	
	POKUS 1	POKUS 2	POKUS 1	POKUS 2
0,05	14,4	13,8	26,6	24,6
0,1	13,8	21,6	22,7	18,8
0,5	47,5	55,4	64,3	53,5
1	57,7	69,2	71,8	62,7
5	82,5	93,4	97,9	68,8

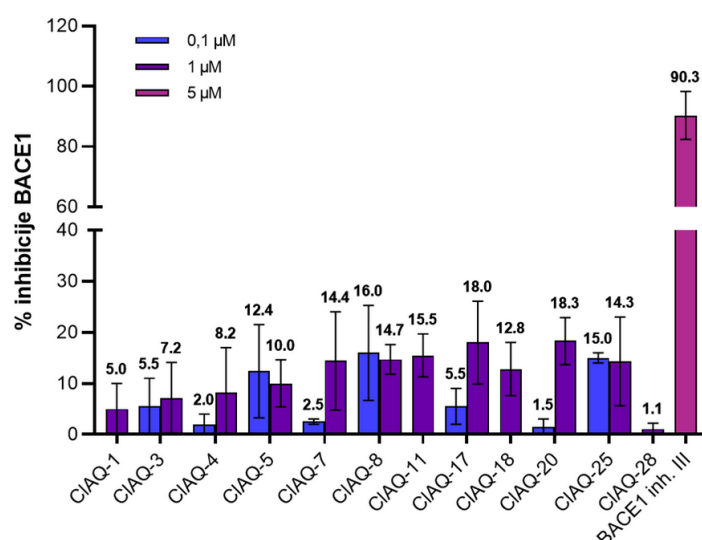
Prvo je uspoređena inhibicija BACE1 u *Fluorescence Assay Buffer*-u i 50 mmol L⁻¹ natrijevom acetatnom puferu (pH = 4,5) bez dodatka detergenta. Iz dobivenih rezultata bilo je vidljivo da je aktivnost BACE1 u prisustvu 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BACE1 inh. III u potpunosti blokirana, dok je pri nižim koncentracijama inhibitora u acetatnom puferu bila značajno niža u usporedbi s aktivnošću u *Fluorescence Assay Buffer*-u. Ovakav rezultat odgovarao je ranijim istraživanjima koja su pokazala da aktivnost BACE1 ovisi o vrsti i koncentraciji detergenta te da najmanju aktivnost pokazuje u natrijevom acetatnom puferu bez dodatka detergenta.¹⁶⁹

U sljedećem koraku ispitan je utjecaj dodatka 0,01 % Triton X-100 na aktivnost enzima. Dodatak 0,01 % Triton X-100 pokazao je slične rezultate inhibicije BACE1 pri nižim koncentracijama inhibitora (0,05 i 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) kao i kod mjerenja u puferu bez dodatka detergenta, dok je kod većih koncentracija inhibitora inhibicija enzima bila veća u puferu bez dodanog detergenta. Stoga je priređen i testiran natrijev acetatni pufer sa smanjenim udjelom Triton X-100 (0,005 %).

Dobiveni rezultati pokazali su da je aktivnost BACE1 u oba testirana pufera (*Fluorescence Assay Buffer* i 50 mmol L⁻¹ natrijevom acetatnom puferu s dodatkom 0,005 % detergenta) bila usporediva pri svim koncentracijama inhibitora, uz par pojedinačnih odstupanja. Ovakva odstupanja pripisana su osjetljivosti same metode, budući da je riječ o praćenju promjene intenziteta fluorescencije. S obzirom na konzistentnost aktivnosti neovisno o koncentraciji inhibitora, pufer s dodatkom 0,005 % Triton X-100 odabran je kao pouzdana zamjena za komercijalni *Fluorescence Assay Buffer*.

4.2.2. Inhibicija BACE1 4-aminokinolinima

Sposobnost inhibicije BACE1 spojevima iz skupine 4-amino-7-klorkinolina s *n*-oktilnom poveznicom određena je za dvanaest spojeva pri 0,1 i/ili 1,0 μmol L⁻¹ koncentraciji spojeva (slika 4.9).

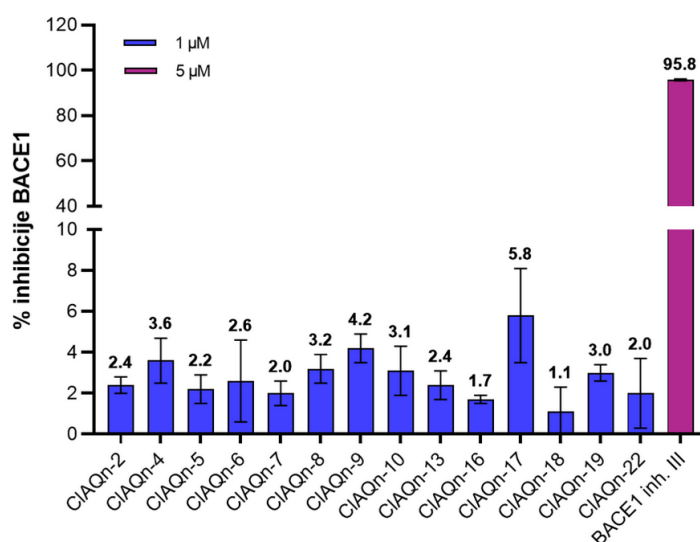


Slika 4.9. Postoci inhibicije BACE1 4-amino-7-klorkinolinima s *n*-oktilnom poveznicom. Postotak inhibicije određivan je pri 0,1 (plavi stupci) i 1,0 μmol L⁻¹ (ljubičasti stupci) koncentraciji spojeva te pri 5,0 μmol L⁻¹ koncentraciji komercijalnog inhibitora BACE1 inh. III (stupac boje ciklame).

Odabrani spojevi pokazali su vrlo slabu sposobnost inhibicije BACE1 pri koncentraciji 0,1 μmol L⁻¹ (slika 4.9.), a ≥ 5 % inhibicije izmjereno je samo kod spojeva CIAQ-3, CIAQ-5, CIAQ-8, CIAQ-17 i CIAQ-25. Najveći postotak inhibicije pokazali su spojevi CIAQ-8 (16,0 %), na čijoj terminalnoj amino grupi se nalazi *m*-fluorbenzil, i CIAQ-25 (15,0 %) kod kojeg se na istoj poziciji kao supstituent nalazi 3-metilbenzotiofen. Pri 1 μmol L⁻¹ koncentraciji svi su spojevi, osim CIAQ-1 i CIAQ-28, inhibirali više od 5 % β-sekretazne aktivnosti. Više od 15% inhibicije određeno je za CIAQ-20 (18,3 %) kod kojeg je terminalna amino grupa supstituirana

3-piridinom, CIAQ-17 (18,0 %) kod kojeg je na istoj poziciji 3-metoksibenzil te CIAQ-11 (15,5 %) kod kojega se u *meta*-položaju na benzilnom supstituentu nalazi klor. Najslabiju inhibitornu sposobnost pri $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji pokazali su spojevi kod kojih terminalna amino grupa nije supstituirana, kao što je to kod spoja CIAQ-1 (5,0 %), ili je supstituirana alifatskom grupom poput izopropila kod CIAQ-3 (7,2 %) ili *n*-butila kod CIAQ-4 (8,2 %), što sugerira da BACE1 ima veći afinitet prema spojevima kod kojih terminalna amino grupa ima cikličke ili aromatske sustave. Zanimljivo je da pri istoj koncentraciji spoj CIAQ-28, kod kojeg se na amino-terminalnoj benzilnoj grupi nalaze dva atoma F na položajima C(2) i C(5), ne pokazuje inhibitornu sposobnost. Ako se uspoređi sa spojem CIAQ-8 kod kojeg se na benzilnoj grupi nalazi samo jedan atom F, a koji je jedan od najsnažnijih inhibitora u seriji, može se pretpostaviti da dodatni atom F nepovoljno djeluje na aktivnost spoja.

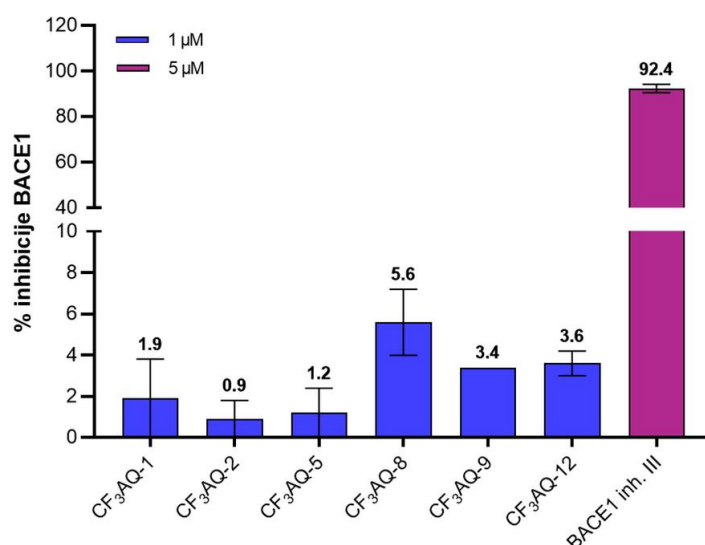
Iz skupine 4-amino-7-klorkinolina različite duljine poveznice odabrano je četrnaest spojeva kojima je postotak inhibicije BACE1 određen pri $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji spojeva (slika 4.10.).



Slika 4.10. Postoci inhibicije BACE1 4-amino-7-klorkinolinima s različitom duljinom poveznice. Postotak inhibicije određen je pri $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji spojeva (plavi stupci) te pri $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji komercijalnog inhibitora BACE1 inh. III (stupac boje ciklame).

Od svih odabranih spojeva jedino je spoj CIAQn-17 s *n*-butilnom poveznicom pokazao inhibitornu sposobnost nešto veću od 5 %. Iz dobivenih rezultata nije bilo moguće donijeti zaključak o utjecaju duljine poveznice na sposobnost vezanja spojeva u aktivno mjesto BACE1 i inhibiranja njene aktivnosti pri navedenim uvjetima.

Iz skupine 4-amino-7-trifluormetilkinolina s *n*-oktilnom poveznicom odabrano je sedam spojeva kojima je postotak inhibicije određivan pri 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji (slika 4.11.).

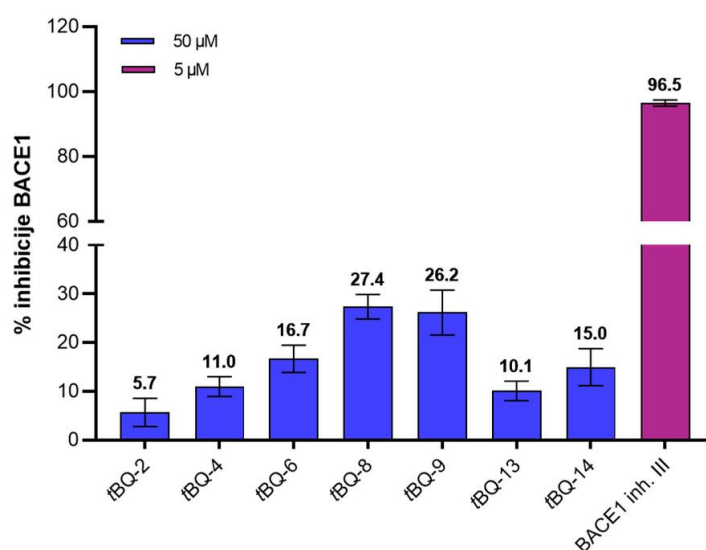


Slika 4.11. Postoci inhibicije BACE1 4-amino-7-trifluormetilkinolinima s *n*-oktilnom poveznicom. Postotak inhibicije određivan je pri 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji spojeva (plavi stupci) te pri 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji komercijalnog inhibitora BACE1 inh. III (stupac boje ciklame).

Iz navedene skupine samo je spoj CF₃AQ-8, s *p*-nitrobenzilom kao supstituentom na terminalnoj amino grupi, pokazao inhibitornu sposobnost nešto veću od 5 % (slika 4.11.). Među preostalim spojevima, CF₃AQ-5, CF₃AQ-1 i CF₃AQ-2 predstavljaju 7-CF₃ analoge ranije opisanih spojeva ClAQ-7, ClAQ-8 i ClAQ-11. Budući da 7-CF₃ spojevi, za razliku od 7-Cl analoga koji pri istoj koncentraciji inhibiraju 14,4 – 16,0 % BACE1 aktivnosti, ne inhibiraju BACE1, može se zaključiti da CF₃ grupa na poziciji C(7) 4-aminokinolinskog prstena pridonosi smanjenju inhibitorne sposobnosti prema BACE1.

4.2.3. Inhibicija BACE1 benzokinonima

Iz skupine benzokinona inhibitorna aktivnost izmjerena je za sedam spojeva i to pri 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji. Rezultati su prikazani na slici 4.12.

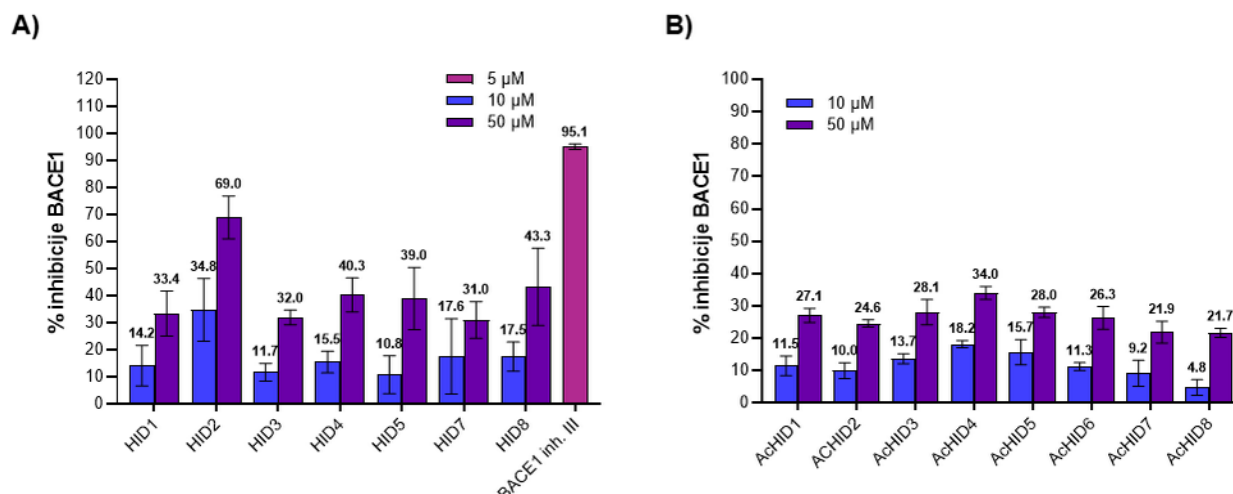


Slika 4.12. Postoci inhibicije BACE1 benzokinonima. Postotak inhibicije određivan je pri $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji spojeva (plavi stupci) te pri $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji komercijalnog inhibitora BACE1 inh. III (stupac boje ciklame).

Testirani benzokinoni inhibirali su 5,7 – 27,4 % aktivnosti BACE1, ovisno o spoju. Najveći postotak inhibicije određen je za spojeve *tBQ*-8 (27,4 %) i *tBQ*-9 (26,2 %), kod kojih se u *meta*-položaju s obzirom na *tert*-butilnu grupu nalaze feniletantioi odnosno 2-naftiltioi. Oko dva puta manji postotak inhibicije određen je za *tBQ*-6 (16,7 %), kod kojeg se u *meta*-položaju nalazi 4-hidroksifeniltioi grupa, te *tBQ*-14 (15 %), gdje je na istoj poziciji fenilalanin. Najslabiji inhibitorski učinak pokazao je spoj *tBQ*-2 (5,7 %), koji u *para*-poziciji s obzirom na *tert*-butil ima 2-hidroksietiltioi kao supstituent. Dobiveni rezultati sugeriraju da na inhibitorski učinak 1,4-benzokinona prema BACE1 utječe veličina bočnog lanca, odnosno voluminoznost supstituenta, budući da je najmanji postotak inhibicije izmjeren kod spoja s kratkim bočnim lancem, a najjači kod spojeva s većim, aromatskim supstituentima. U prilog tome govori i slučaj embelina, prirodnog derivata 1,4-benzokinona, čiji bočni lanac ima jedanaest metilnih grupa, a koji pokazuje snažan inhibitorski učinak prema BACE1 *in vitro* ($\text{IC}_{50} = 2,11 \mu\text{mol L}^{-1}$).¹³⁴ Također, budući da je najmanji postotak inhibicije izmjeren kod spojeva kod kojih je supstituent u *para*-položaju (*tBQ*-2, *tBQ*-13, *tBQ*-4), moguće je da na inhibitorski učinak utječe i položaj supstituenta s obzirom na *tert*-butilnu grupu.

4.2.4. Inhibicija BACE1 hidrazonima i *N*-acilhidrazonima

Sposobnost inhibicije BACE1 određena je za sedam spojeva iz skupine hidrazona i osam spojeva iz skupine *N*-acilhidrazona pri 10 i 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracijama. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 4.13.



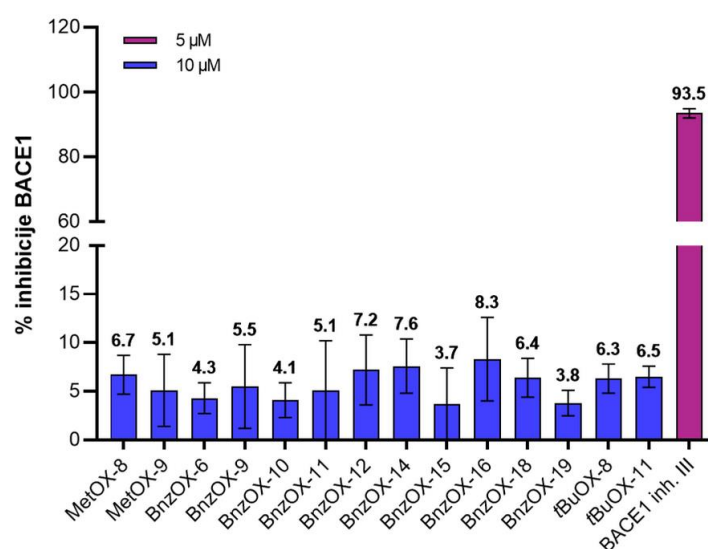
Slika 4.13. Postoci inhibicije BACE1 A) hidrazonima i B) *N*-acilhidrazonima. Postotak inhibicije određivan je pri 10 (plavi stupci) i 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (ljubičasti stupci) koncentraciji spojeva te pri 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji komercijalnog inhibitora BACE1 inh. III (stupac boje ciklame).

Odabrani spojevi inhibirali su 10 – 69 % aktivnosti BACE1 pri obje ispitivane koncentracije. Jedino su spojevi AchID7 i AchID8 inhibirali manje od 10 % aktivnosti BACE1 pri koncentraciji od 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Najsnažnijim inhibitorom BACE1 pokazao se spoj HID2, derivat piridoksala i 2,4-dinitrofenilhidrazona, koji je inhibirao 34,8 % aktivnosti BACE1 pri 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, odnosno 69,0 % pri 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji. Svi preostali hidrazoni u seriji su pri 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji inhibirali više od 30 % aktivnosti BACE1. U slučaju *N*-acilhidrazona, najsnažniji inhibicijski potencijal pokazao je spoj AchID4, derivat piridoksala i *p*-klorfenilhidrazona, koji je pri 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji inhibirao 34,0 % aktivnosti BACE1, dok su ostali spojevi u navedenoj seriji pri istoj koncentraciji inhibirali 21,7 – 28,1 % aktivnosti, ovisno o spoju. Budući da su svi *N*-acilhidrazoni derivati piridoksala, bilo je moguće usporediti inhibicijski učinak spojeva HID1, HID3 i HID4 sa učinkom spojeva AchID1, AchID3 odnosno AchID4, koji se razlikuju samo u hidrazonskoj odnosno *N*-acilhidrazonskoj poveznici. Tako se moglo uočiti da spojevi sa hidrazonskom poveznicom ostvaruju snažniji inhibicijski učinak od analoga s *N*-acilhidrazonom pri obje testirane koncentracije, što sugerira da prisutnost karbonilne grupe negativno utječe na inhibiciju BACE1. Prema istraživanjima koja su pokazala

da smanjenje do oko 50 % normalne aktivnosti BACE1 ne rezultira narušavanjem homeostaze njenih ostalih prirodnih supstrata,⁹⁷ svi spojevi koji inhibiraju aktivnost BACE1 u rasponu od 30 – 60 % pokazuju potencijal za razvoj inhibitora BACE1 s mogućim terapijskim učinkom. Iz ove serije kao takav ističe se spoj HID2 koji preporučeni postotak inhibicije postiže već pri koncentraciji od 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, dok bi pri višim koncentracijama mogao izazvati neželjene nuspojave.

4.2.5. Inhibicija BACE1 O-alkiloksimima

Iz skupina O-metiloksima, O-*tert*-butiloksima i O-benziloksima odabrano je četrnaest spojeva kojima je sposobnost inhibicije aktivnosti BACE1 izmjerena pri 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji. Rezultati su prikazani na slici 4.14.



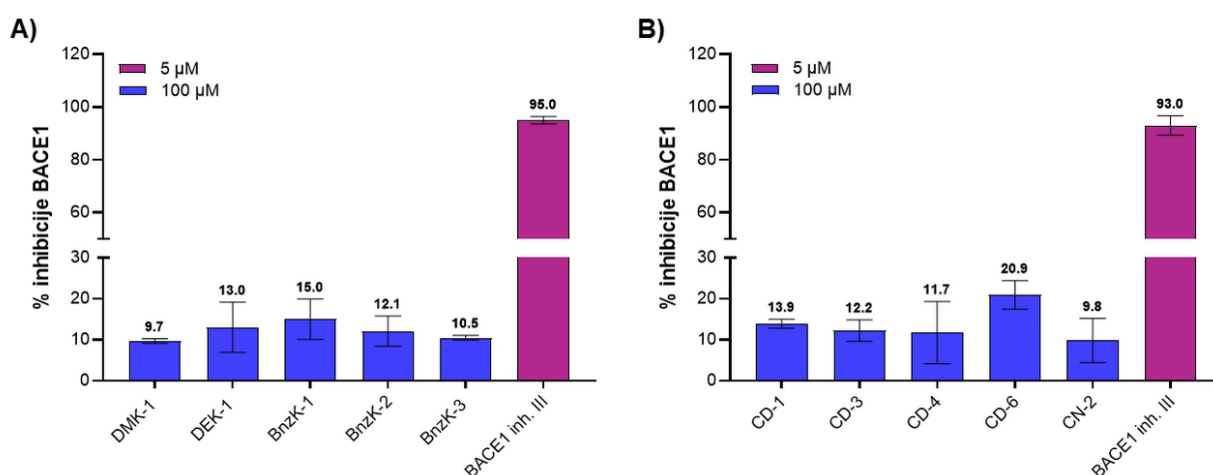
Slika 4.14. Postoci inhibicije BACE1 O-alkiloksimima. Postotak inhibicije određivan je pri 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji spojeva (plavi stupci) te pri 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji komercijalnog inhibitora BACE1 inh. III (stupac boje ciklame).

Svi testirani O-alkiloksimi pokazali su vrlo slab inhibicijski potencijal prema BACE1, uz postotke inhibicije u rasponu 3,7 – 8,3 %, ovisno o spoju. Od četrnaest testiranih spojeva, niti jedan nije pokazao više od 10 % inhibicije aktivnosti BACE1, dok su četiri spoja (BnzOX-6, BnzOX-10, BnzOX-19, BnzOX-15) inhibirala manje od 5 % aktivnosti enzima. Najveće postotke inhibicije ostvarili su O-benziloksimi BnzOX-16 (8,3 %), BnzOX-14 (7,6 %) i BnzOX-12 (7,2 %). S obzirom na vrlo niske postotke inhibicije i njihov vrlo mali raspon, nije

bilo moguće donijeti zaključak o utjecaju strukture na aktivnost spojeva te bi za daljnju evaluaciju bilo potrebno provesti testiranja pri višim koncentracijama ($50 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$).

4.2.6. Inhibicija BACE1 karbamatima

Sposobnost inhibicije aktivnosti BACE1 određena je za pet kinuklidinskih karbamata i pet derivata karbamata cinkonidina i cinkonina. Svi spojevi testirani su pri $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji, a rezultati su prikazani na slici 4.15.



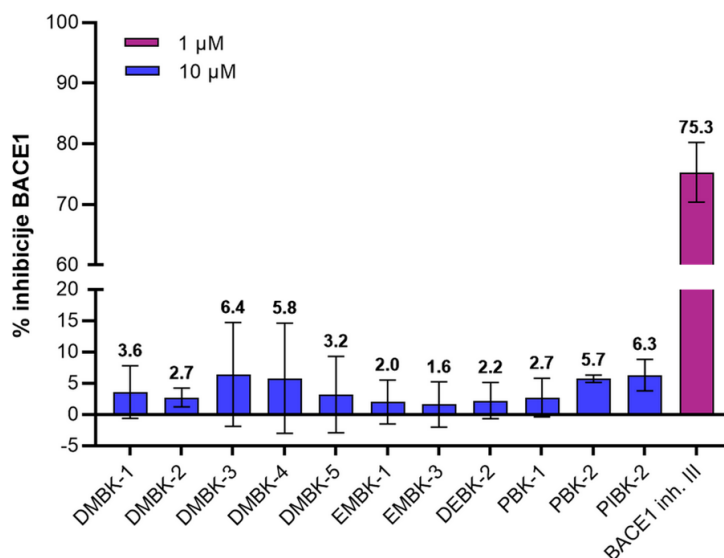
Slika 4.15. Postoci inhibicije BACE1 A) kinuklidinskim karbamatima i B) derivatima karbamata cinkonidina (CD) i cinkonina (CN). Postotak inhibicije određivan je pri $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji spojeva (plavi stupci) te pri $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji komercijalnog inhibitora BACE1 inh. III (stupci boje ciklame).

Kinuklidinski karbamati inhibirali su $9,7 - 15,0 \%$ aktivnosti BACE1 (slika 4.15. A). Najsnažnijim inhibitorom pokazao se spoj BnzK-1, kod kojeg je na karbamatni dušik vezana fenilna grupa, dok je najslabiji inhibitor bio DMK-1, kojemu je karbamatni dušik disupstituiran s dvije metilne grupe. Budući da je spoj DEK-1, čiji karbamatni dušik je disupstituiran etilnim grupama, drugi najsnažniji inhibitor u skupini (13%), čini se da na inhibicijsku sposobnost kinuklidinskih karbamata utječe voluminoznost supstituenta na karbamatnom dušiku. Budući da su spojevi BnzK-2 i BnzK-3 analozi spoja BnzK-1 kod kojih je kinuklidinski dušik supstituiran i pozitivno nabijen, smanjenje inhibicijskog potencijala u odnosu na spoj BnzK-1 ukazuje na mogući negativan utjecaj supstitucije kinuklidinskog dušika na inhibiciju BACE1.

Derivati karbamata cinkonidina (CD) i cinkonina (CN), koji se razlikuju prema supstituentu na karbamatnom dušiku te apsolutnoj konfiguraciji ugljika na koji je karbamatna grupa vezana, inhibirali su $9,8 - 20,9 \%$ aktivnosti BACE1 (slika 4.15. B). Najveću inhibitornu sposobnost pokazao je cinkonidin CD-6, čiji je karbamatni dušik supstituiran jednom etilnom grupom, dok

su ostali cinkonidini, s dvije metilne grupe te cikloheksilnim ili fenilnim prstenom na karbamatnom dušiku, u prosjeku 1,6 puta slabije inhibirali BACE1. Jedini cinkonin iz serije (CN-2) pokazao je najslabiji inhibicijski potencijal ($< 10\%$) od svih spojeva u seriji.

Inhibitorna sposobnost prema BACE1 također je izmjerena za biskarbamatne derivate bambuterola pri $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji. Rezultati su prikazani na slici 4.16.



Slika 4.16. Postoci inhibicije BACE1 biskarbamatnim derivatima bambuterola. Postotak inhibicije određen je pri $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji spojeva (plavi stupci) te pri $5,0\ \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji komercijalnog inhibitora BACE1 inh. III (stupac boje ciklame).

Od jedanaest testiranih biskarbamata, niti jedan spoj nije inhibirao aktivnost BACE1 više od 10% , a samo četiri spoja (DMBK-3, DMBK-4, PBK-2, PIBK-2) inhibirala su $> 5\%$ aktivnosti BACE1.

4.3. Inhibicija samoagregacije amiloidnih- β peptida

Sposobnost inhibicije samoagregacije amiloidnih- β peptida, A β 42, ispitana je za odabrane spojeve iz skupina 4-aminokinolina (slika 3.1.), hidrazona i *N*-acilhidrazona (slika 3.6.), *O*-alkiloksima (slike 3.7., 3.8. i 3.9.) i karbamata (slike 3.10., 3.11., 3.12. i 3.13.), a izražena je u obliku postotka inhibicije $\pm$ standardna devijacija (SD). Kao pozitivna kontrola korišten je kurkumin.¹⁷⁰ Mjerenju inhibitornog učinka spojeva prethodilo je uhadovanje protokola i optimizacija uvjeta mjerenja.

4.3.1. Uhodavanje i optimizacija metode mjerenja inhibicije samoagregacije peptida A β

Protokol za mjerenje inhibicijskog učinka spojeva na samoagregaciju peptida A β 42 korišten u ovome radu temeljen je na rezultatima istraživanja tioflavina T (ThT) kao bojila amiloida.¹⁷² Tijekom uhodavanja metode optimizirana je koncentracija amiloida i kurkumina (inhibitora samoagregacije), pri kojoj je fluorescencijski odziv smjese u kojoj je prisutan amiloid (pozitivna kontrola) u odnosu na fluorescencijski odziv reakcijske smjese bez dodanog amiloida i inhibitora (*blank*) bio zadovoljavajući, odnosno tražene su koncentracije amiloida i kurkumina pri kojima je intenzitet fluorescencije *blank*-a iznosio oko 10 % intenziteta fluorescencije pozitivne kontrole. Također je optimizirana i duljina inkubacije reakcijskih smjesa s ThT-om s obzirom na njihov fluorescencijski odziv, odnosno praćen je utjecaj duljine inkubacije reakcijskih smjesa na intenzitet fluorescencije.

Kod određivanja optimalne koncentracije amiloida pri kojoj će omjer intenziteta fluorescencije reakcijskih smjesa s dodatnim amiloidom i bez njega biti oko 10:1 ili veći, ispitana je sposobnost inhibicije samoagregacije peptida A β 42 kurkuminom u koncentracijskom omjeu 1:1 pri dvije različite koncentracije: 4 μ M i 8 μ M. Konačna koncentracija ThT u svim reakcijskim smjesama bila je 20 μ mol L⁻¹. Izmjereni fluorescencijski odzivi nakon 1 h inkubacije amiloida i kurkumina (pri 37 °C), a zatim 15 min inkubacije svih reakcijskih smjesa s ThT-om (pri 25 °C) prikazani su u tablici 4.11.

Tablica 4.11. Intenzitet fluorescencije (I_F) i postotak inhibicije β -amiloidne samoagregacije kurkuminom u koncentracijskom omjeru 1:1 pri 4 μ M i 8 μ M (KR – kontrolna reakcija; SP – slijepa proba; INH – inhibirana reakcija).

kurkumin	$I_F / 10^4$				% inhibicije amiloidne agregacije
	BLANK	KR	SP	INH	
4 μ mol L ⁻¹	9,82*	51,72	11,75	41,03	30,1
8 μ mol L ⁻¹	10,48**	91,61	13,47	68,71	31,9
—	9,65***				

blank* uz dodatak 1% DMSO-a; *blank* uz dodatak 2 % DMSO-a; *** *blank* bez dodatka DMSO-a

Iz dobivenih rezultata bilo je vidljivo da se intenzitet fluorescencije značajno povećava u reakcijskim smjesama u kojima je prisutan amiloid- β (kontrola i inhibirana reakcija) u odnosu na reakcijske smjese u kojima nije prisutan amiloid (*blank* i slijepa proba) već nakon jednog sata inkubacije, što je potvrdilo da se ThT uspješno veže na amiloidne strukture prisutne u reakcijskoj smjesi. Smanjenje intenziteta fluorescencije u inhibiranoj reakciji u odnosu na

kontrolnu reakciju ukazalo je na inhibitorno djelovanje kurkumina na amiloidnu samoagregaciju, pri čemu je bilo vidljivo povećanje intenziteta fluorescencije ThT-a kod $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracije amiloida- β i kurkumina u odnosu na $4 \mu\text{mol L}^{-1}$. Utjecaj samog kurkumina na fluorescenciju slobodnog ThT-a (odnos intenziteta fluorescencije slijepe probe i *blank*-a) pokazao se minimalnim. Minimalan učinak na intenzitet fluorescencije ThT-a pokazan je i za DMSO-a (intenzitet fluorescencije mjeren je u prisustvu 1 % i 2 % DMSO-a).

Kako bi se utvrdilo utječe li vrijeme trajanja inkubacije s ThT-om na intenzitet fluorescencije odnosno na sam postotak inhibicije, mjeren je intenzitet fluorescencije 15 min, 30 min i 60 min nakon dodatka ThT-a. Inhibicija β -amiloidne samoagregacije izmjerena je nakon 24 h inkubacije peptida A β 42 i kurkumina odnosno 4-aminokinolina pri 37 °C za $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ili $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracije A β 42 i kurkumina/4-aminokinolina u omjeru 1:1 te dodatnih 15, 30 ili 60 min inkubacije svih reakcijskih smjesa s ThT-om pri 25 °C. Rezultati su prikazani u tablicama 4.12. i 4.13.

Tablica 4.12. Intenziteti fluorescencije reakcijskih smjesa (I_F) i postotak inhibicije β -amiloidne samoagregacije kod $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracije spojeva i A β 42. Mjerenja su provedena 15, 30 i 60 minuta nakon dodatka ThT-a u reakcijsku smjesu.

SPOJ	I _F / 10 ⁴				% inhibicije amiloidne agregacije
	BLANK	KR	SP	INH	
15 minuta					
kurkumin	13,1	60,9	15,5	64,9	−3,2
CIAQ-2	10,6	81,6	10,9	94,2	−17,2
CIAQ-7	10,6	81,6	11,1	74,1	11,3
CIAQ-9	10,6	81,6	12,1	74,5	12,2
30 minuta					
kurkumin	12,8	59,3	12,6	62,1	−6,4
CIAQ-2	10,8	87,7	11,2	94,0	−7,7
CIAQ-7	10,8	87,7	12,0	75,7	17,1
CIAQ-9	10,8	87,7	12,7	77,2	16,1
60 minuta					
kurkumin	12,3	67,5	11,8	62,6	8,1
CIAQ-2	8,0	86,6	11,2	96,4	−8,4
CIAQ-7	8,0	86,6	12,5	82,4	11,0
CIAQ-9	8,0	86,6	12,0	76,8	17,4

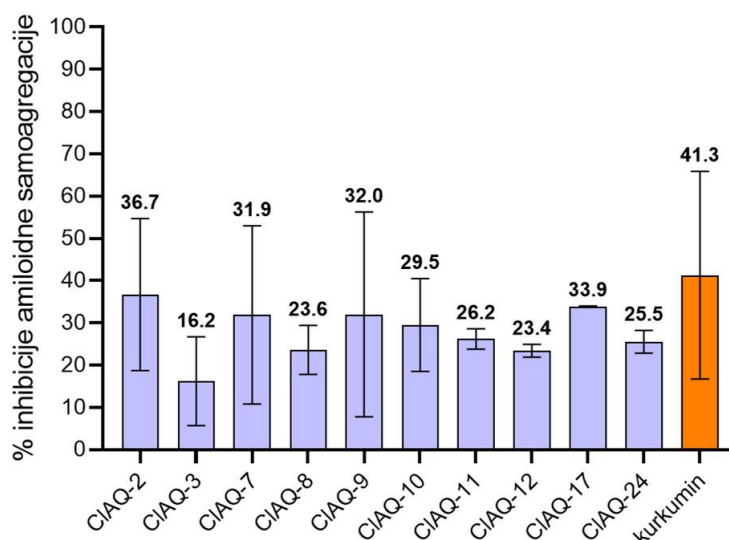
Tablica 4.13. Intenziteti fluorescencije reakcijskih smjesa (I_F) i postotak inhibicije β -amiloidne samoagregacije kod $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracije spojeva i A β 42. Mjerenja su provedena **15, 30 i 60 minuta** nakon dodatka ThT-a u reakcijsku smjesu.

SPOJ	I _F / 10 ⁴				% inhibicije amiloidne agregacije
	BLANK	KR	SP	INH	
15 minuta					
kurkumin	13,4	186,3	9,3	74,9	62,1
CIAQ-2	12,8	275,9	9,8	133,5	53,0
CIAQ-7	12,8	275,9	9,2	124,9	56,0
CIAQ-9	12,8	275,9	10,1	116,5	59,5
30 minuta					
kurkumin	12,8	159,1	9,1	68,8	59,2
CIAQ-2	12,2	212,2	10,1	118,5	45,8
CIAQ-7	12,2	212,2	9,2	128,1	40,5
CIAQ-9	12,2	212,2	10,1	124,8	42,6
60 minuta					
kurkumin	12,5	141,6	9,0	69,9	52,9
CIAQ-2	11,7	185,8	10,0	124,7	34,1
CIAQ-7	11,7	185,8	9,4	122,7	34,9
CIAQ-9	11,7	185,8	10,0	127,1	32,8

Iz usporedbe rezultata u tablicama 4.12 i 4.13 bilo je vidljivo da je intenzitet fluorescencije značajno veći u prisustvu $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ amiloida u odnosu na $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ i kod kontrolne i kod reakcije inhibicije. U reakcijskim smjesama koje sadrže $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ amiloid i kurkumin bila su vidljiva velika odstupanja u postotku inhibicije amiloidne samoagregacije ovisno o duljini inkubacije s ThT-om. Reakcijske smjese koje sadrže $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ spojeve i amiloid pokazale su konzistentnije rezultate za mjerenja provedena u sve tri vremenske točke po dodatku ThT-a. No, i u navedenim reakcijskim smjesama uočen je značajan pad u vrijednostima intenziteta fluorescencije u svim reakcijskim smjesama ovisno o duljini inkubacije s ThT-om, što je rezultiralo i padom postotka inhibicije s duljim periodom inkubacije. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da su spojevi i amiloid koncentracije $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ te vrijeme inkubacije reakcijskih smjesa sa ThT-om u trajanju 15 minuta optimalni uvjeti za mjerenje inhibicije amiloidne samoagregacije. 15-minutni period inkubacije s ThT-om omogućava mjerenje inhibicije prije nego što dođe do potencijalnog slabljenja interakcija između spojeva i amiloida i nastavka samoagregacije i/ili interferencije ThT-a s interakcijama između spojeva i amiloida.

4.3.2. Inhibicija samoagregacije peptida $A\beta$ u prisustvu 4-aminokinolina

Iz skupine 4-aminokinolina (slika 3.1.) sposobnost inhibicije amiloidne samoagregacije izmjerena je za 10 odabranih spojeva. Rezultati su prikazani na slici 4.17.



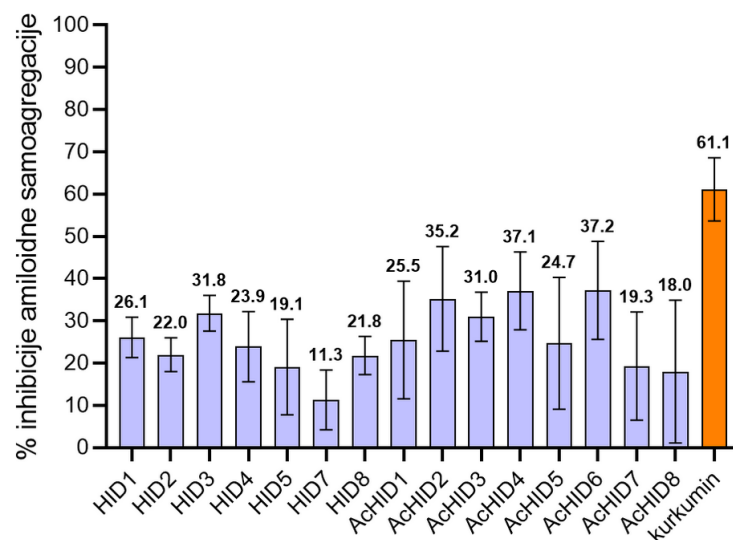
Slika 4.17. Postoci inhibicije amiloidne samoagregacije 4-aminokinolinima nakon 24 sata inkubacije.

Svi testirani 4-aminokinolini inhibirali su samoagregaciju peptida $A\beta_{42}$ u rasponu 16,2 – 36,7 %. Pri tome su spojevi CIAQ-2, CIAQ-7, CIAQ-9 i CIAQ-17 inhibirali više od 30 % amiloidne samoagregacije. Najslabijim inhibitorom pokazao se spoj CIAQ-3 (16,2 %), dok su svi preostali spojevi inhibirali između 20 i 30 % amiloidne samoagregacije. Svi spojevi, uz iznimku CIAQ-2 i CIAQ-3, na terminalnoj amino grupi imaju vezanu benzilnu grupu, pri čemu u slučaju CIAQ-7 benzenski prsten nije supstituiran, dok je u slučaju ostalih spojeva supstituent elektron-odvlačeći halogeni element (F ili Cl) ili elektron-donirajuća metoksi-grupa. Spojevi CIAQ-2 i CIAQ-3, koji predstavljaju najsnažniji i najslabiji inhibitor amiloidne samoagregacije u ovoj skupini, na terminalnoj amino grupi imaju vezanu metilnu odnosno izopropilnu grupu. Iz navedenih rezultata moguće je zaključiti da supstituent na terminalnoj amino grupi ima utjecaja na inhibični učinak spoja, pri čemu je uočeno povećanje inhibicije sa smanjenjem veličine supstituenta u slučaju kada je riječ o malim, alkilnim lancima. Slični postoci inhibicije samoagregacije peptida $A\beta_{42}$ (16,3 – 29,9 %) izmjereni su u istraživanju Viayne i suradnika za derivate huprina (sadrži strukturni motiv 4-amino-7-klorkinolina) i donepezila, koji su testirani u koncentracijskom omjeru amiloida i spojeva 5:1.²⁰⁹ U ovom slučaju inhibitorna sposobnost spojeva s metilnim supstituentom i/ili metilenskom poveznicom bila je malo veća u usporedbi

sa spojevima s etilnim supstuentom i/ili etilenskom poveznicom, dok je u slučaju samog huprina inhibitorna sposobnost bila veća kada je supstuent etilna grupa u odnosu na metilnu.²⁰⁹ Budući da su i u ovoj doktorskoj disertaciji i u navedenom istraživanju bila prisutna samo dva različita mala, alkilna supstuenta, a među ovdje istraženim spojevima s arilnim supstuentima nije bilo veće razlike u inhibitornoj sposobnosti, nije moguće potvrditi ni interpretirati trend ovisnosti inhibitornog učinka s obzirom na veličinu supstuenta.

4.3.3. Inhibicija samoagregacije peptida A β u prisustvu hidrazona i N-acilhidrazona

Sposobnost sprječavanja samoagregacije peptida A β 42 izmjerena je za 7 spojeva iz skupine hidrazona i 8 spojeva iz skupine N-acilhidrazona (slika 3.6.). Rezultati su prikazani na slici 4.18.



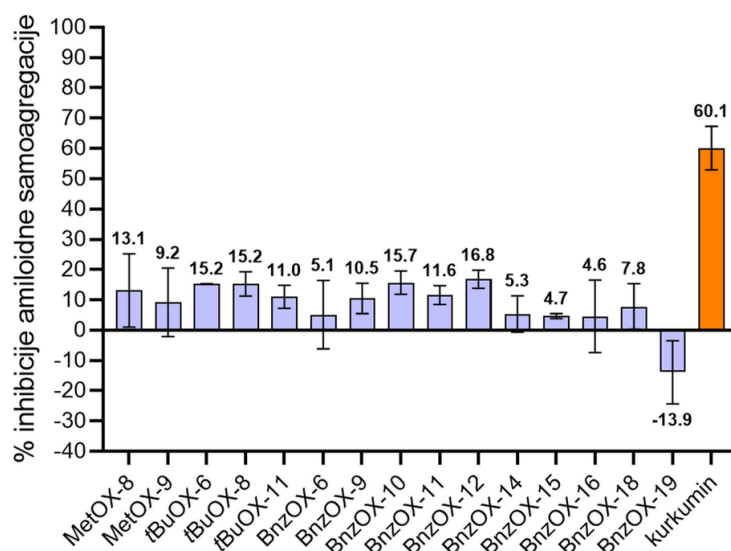
Slika 4.18. Postoci inhibicije amiloidne samoagregacije hidrazonima i N-acilhidrazonima nakon 24 sata inkubacije.

Svi ispitivani hidrazoni i N-acilhidrazoni pokazali su sposobnost sprječavanja amiloidne samoagregacije, uz postotke inhibicije 11,3 – 37,2 %. Najsnajžnijim inhibitorima, s više od 30% inhibicije, pokazali su se N-acilhidrazoni AchID2 (35,2 %), AchID4 (37,1 %) i AchID6 (37,2 %), dok je iz podskupine hidrazona najsnajžniji inhibitor bio HID3 (31,8 %). Najslabijim inhibitorom pokazao se spoj HID7, derivat piridin-4-karbaldehida čiji supstuent je *p*-fluorfenil, a koji je otprilike 3 puta slabije inhibirao samoagregaciju amiloida u usporedbi s njegovim piridoksalnim analogom, spojem HID3. Dobiveni postoci usporedivi su s IC₅₀

vrijednostima za inhibiciju samoagregacije kraćeg fragmenta A β peptida hidrazonskim derivatima 1,4-supstituiranog piridina.¹⁵⁰

4.3.4. Inhibicija samoagregacije peptida A β u prisustvu O-alkiloksima

Sposobnost inhibicije samoagregacije amiloidnih peptida izmjerena je za 15 spojeva iz skupine O-alkiloksima. Rezultati su prikazani na slici 4.19.

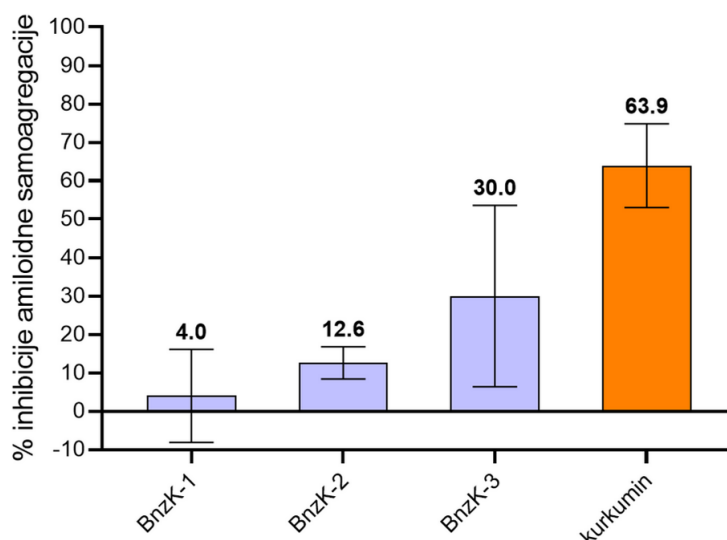


Slika 4.19. Postoci inhibicije amiloidne samoagregacije O-alkiloksimima nakon 24 sata inkubacije.

Od 14 testiranih O-alkiloksima, njih 8 inhibiralo je više od 10 % samoagregacije amiloidnih peptida, pri čemu su najviše postotke inhibicije postigli O-benziloksimi BnzOX-12 (16,8 %) BnzOX-10 (15,7 %) te O-*tert*-butiloksimi tBuOX-6 i tBuOX-8 (15,2 %). Spoj BnzOX-19 nije pokazao inhibitornu sposobnost, već je kod njega zabilježen porast intenziteta fluorescencije ThT-a, što bi se moglo pripisati prisustvu većeg broja agregiranih struktura u odnosu na kontrolnu reakciju. S obzirom na niske i relativno slične postotke inhibicije testiranih spojeva, nije bilo moguće provesti analizu mogućeg doprinosa strukturnih promjena inhibicijskom potencijalu spojeva.

4.3.5. Inhibicija samoagregacije peptida A β u prisustvu karbamata

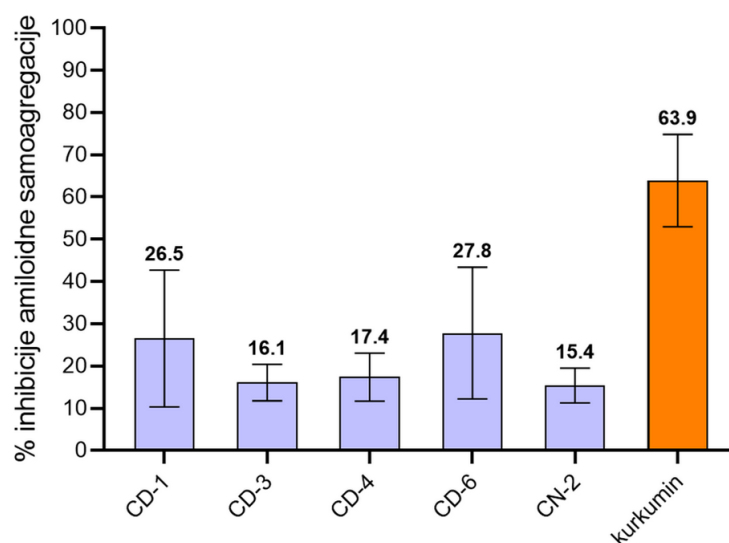
Sposobnost inhibicije samoagregacije peptida A β 42 ispitana je za tri spoja iz skupine kinuklidinskih karbamata (slika 3.10.). Rezultati su prikazani na slici 4.20.



Slika 4.20. Postoci inhibicije amiloidne samoagregacije kinuklidinskim karbamatima nakon 24 sata inkubacije.

Najsnažniji inhibitorski potencijal pokazao je spoj BnzK-3 (30 %), čiji je kinuklidinski dušik supstituiran *m*-klorbenzilom, nakon kojega slijedi spoj BnzK-2 (12,6 %), na čijem kinuklidinskom dušiku se nalazi nesupstituirana benzilna grupa. Spoj BnzK-1, čiji kinuklidinski dušik nije supstituiran, inhibirao je manje od 5 % amiloidne samoagregacije. Iako se radi o malom broju spojeva, uočen je trend povećanja inhibicije s povećavanjem volumena supstituenta na kinuklidinskom dušiku budući da je uvođenje benzilne grupe povećalo inhibitorski učinak spoja BnzK-2 otprilike tri puta u odnosu na nesupstituirani BnzK-1, dok je supstitucija benzilne grupe elektron-odvlačećim klorom inhibitorski učinak spoja BnzK-3 pojačala još otprilike dva puta. Opažanje je u skladu s ranijim istraživanjima koja su pokazala da spojevi koji u strukturi sadrže dva ili više aromatska sustava pokazuju inhibitorski učinak na samoagregaciju peptida A β 40 i A β 42,^{210–212} pri čemu u slučaju derivata pirimidin-2,4-diamina inhibitorski potencijal raste uvođenjem elektron-odvlačećih supstituenata u usporedbi s elektron-donirajućim.²¹¹ Slično, spojevi poput polifenola koji mogu ostvariti interakcije s aromatskim aminokiselinama amiloidnih peptida ključnima za proces samoagregacije, mogu usporiti proces fibrilizacije ili uzrokovati konformacijske promjene amiloidnih agregata.^{213–215}

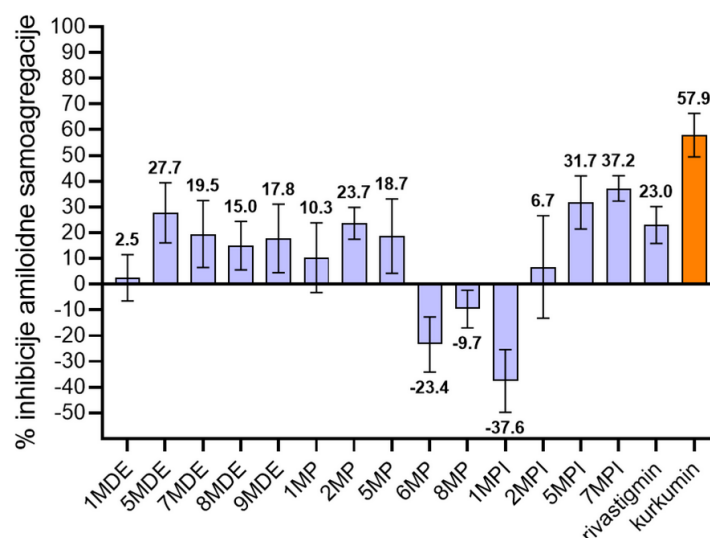
Inhibicija nastanka amiloidnih agregata ispitana je i za 5 spojeva iz skupine karbamatnih derivata cinkonidina i cinkonina (slika 3.11.). Rezultati su prikazani na slici 4.21.



Slika 4.21. Postoci inhibicije amiloidne samoagregacije karbamatnim derivatima cinkonidina (CD) i cinkonina (CN) nakon 24 sata inkubacije.

Svi ispitivani spojevi inhibirali su proces amiloidne samoagregacije u rasponu 15,4 – 27,8 %. Spojevi CD-1 i CD-6, na čijem karbamatnom dušiku se nalazi dimetilna odnosno jedna etilna grupa, inhibirali su samoagregaciju oko 27 %, dok su preostali spojevi, čiji karbamatni dušik je supstituiran cikloheksilom, fenilom ili dietilnom grupom, pokazali oko 16 % inhibicije. Dobiveni rezultati sugeriraju da na inhibitorni učinak spojeva povoljnije utječe manji, nerazgranati supstituent na karbamatnom dušiku molekule.

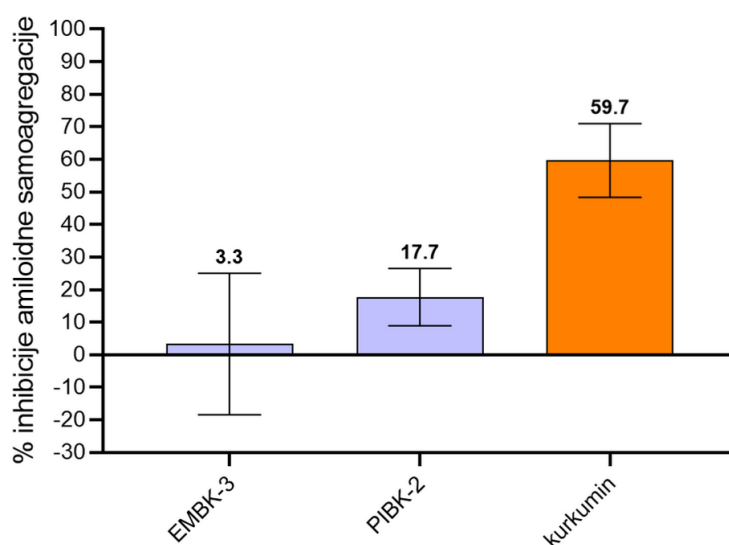
Nadalje, sposobnost inhibicije samoagregacije amiloidnih peptida ispitana je za 14 spojeva iz skupine monokarbamatnih derivata bambuterola (slika 3.12.). Rezultati su prikazani na slici 4.22.



Slika 4.22. Postoci inhibicije amiloidne samoagregacije monokarbamatnim derivatima bambuterola nakon 24 sata inkubacije.

Od 14 testiranih spojeva, njih 9 inhibiralo je više od 10 % samoagregacije amiloidnih peptida. Pritom su se najsnažnijim inhibitorima pokazali spojevi 7MPI (37,2 %) i 5MPI (31,7 %), piperidinski derivati kod kojih je amino grupa supstituirana adamantanom, odnosno dio je piperidinskog prstena, te dietilni derivat 5MDE (27,7 %). Navedeni spojevi bili su oko 1,8 puta slabiji inhibitori amiloidne samoagregacije u usporedbi s kurkuminom. Najslabijim inhibitorima pokazali su se dietilni derivat 1MDE (2,5 %), čija amino grupa je supstituirana *tert*-butilom, i piperidinski derivat 2MPI (6,7 %), s cikloheksilom kao supstituentom na amino grupi. U slučaju pirolidinskih derivata 6MP i 8MP te piperidinskog derivata 1MPI došlo je do značajnog porasta intenziteta fluorescencije ThT-a, što sugerira da je u njihovom prisustvu nastalo više fibrilnih struktura u odnosu na kontrolnu reakciju, te da navedeni spojevi potencijalno ubrzavaju proces samoagregacije. U usporedbi s rivastigminom, za koji je izmjereno 23 % inhibicije samoagregacije, spojevi 5MPI i 7MPI pokazali su zamjetno snažniji inhibicijski potencijal.

Inhibicijski potencijal ispitan je i za dva biskarbamatna derivata bambuterola (slika 3.13.). rezultati su prikazani na slici 4.23.



Slika 4.23. Postoci inhibicije amiloidne samoagregacije biskarbamatnim derivatima bambuterola nakon 24 sata inkubacije.

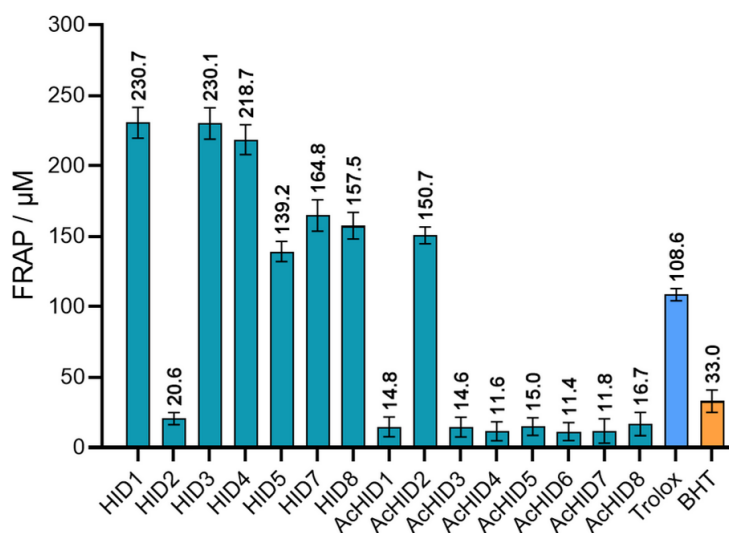
Biskarbamati EMBK-3 i PIBK-2 inhibirali su 3,3 % odnosno 17,7 % samoagregacije amiloidnih peptida. S obzirom na značajnu razliku u postotku inhibicije dva spoja koji se razlikuju u supstituentima na karbamatnim dušicima (kod EMBK-3 to su metilna i etilna grupa, a kod PIBK-2 dušik je dio cikličkog sustava piperidina), može se pretpostaviti da supstituenti na karbamatnom dušiku u velikoj mjeri doprinose povećanju inhibicije samoagregacije amiloida, ali zaključak o utjecaju strukture na proces amiloidne samoagregacije nije bilo moguće donijeti.

4.4. Antioksidacijski kapacitet spojeva

Antioksidacijski kapacitet spojeva ispitan je dvjema različitim metodama, FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) i ORAC (engl. *Oxygen Radical Antioxidant Capacity*). FRAP metoda temelji se na sposobnosti spojeva da prenesu elektron na oksidirajuće vrste, dok se metoda ORAC temelji na sposobnosti spojeva da prijenosom vodikova atoma na radikal spriječe njegovo oksidirajuće djelovanje.

4.4.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Antioksidacijski kapacitet temeljen na prijenosu elektrona na oksidirajuće vrste, odnosno sposobnosti redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} , ispitan je za 7 hidrazona i 8 *N*-acilhidrazona pri $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji, uz Trolox i BHT kao referentne antioksidanse. Rezultati su prikazani na slici 4.24.



Slika 4.24. FRAP vrijednosti $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ hidrazona i *N*-acilhidrazona te referentnih antioksidansa Trolox-a i BHT-a.

Svi testirani spojevi pokazali su određeni redukcijski potencijal u usporedbi s referentnim antioksidansima Trolox-om i BHT-om. Svi hidrazoni, uz iznimku HID2, s 2,4-dinitro supstituiranom fenilnom grupom, pokazali su do dva puta snažniji redukcijski potencijal u usporedbi s Trolox-om. Što se tiče *N*-acilhidrazona, jedino je spoj AchID2, s *p*-nitrofenilnim supstutuentom, pokazao snažniji redukcijski potencijal u odnosu na referentne antioksidanse. Ostali *N*-acilhidrazoni pokazali su do tri puta slabiji redukcijski potencijal u usporedbi s BHT-om.

4.4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Antioksidacijski kapacitet temeljen na prijenosu vodikovog atoma na radikal izmjeren je za 9 spojeva iz skupine 1,4-benzokinona pri $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji. Pritom je praćeno opadanje intenziteta fluorescencijskog signala u vremenu. Redukcijski potencijal spojeva izražen je kao ekvivalent koncentracije Troloxa (TE) jednakog učinka. Rezultati su prikazani u tablici 4.14.

Tablica 4.14. ORAC vrijednosti $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ 1,4-benzokinona izražene kao TE (ekvivalentna koncentracija Trolox-a) ($\mu\text{mol L}^{-1}$) $\pm$ standardna devijacija.

SPOJ	TE / $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>t</i> BQ	$16,7 \pm 0,1$
<i>t</i> BQ-2	$23,9 \pm 1,6$
<i>t</i> BQ-4	$11,0 \pm 0,3$
<i>t</i> BQ-6	≥ 50
<i>t</i> BQ-7	$3,6 \pm 0,6$
<i>t</i> BQ-8	$5,2 \pm 0,0$
<i>t</i> BQ-9	$9,3 \pm 0,5$
<i>t</i> BQ-13	$19,7 \pm 1,6$
<i>t</i> BQ-14	$43,2 \pm 1,6$

Najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren je za spoj *t*BQ-6, s 4-hidroksitiobenzenom u *meta*-položaju s obzirom na *tert*-butilnu grupu, koji je pri koncentraciji od $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ pokazao snažnije antioksidacijsko djelovanje u usporedbi s Trolox-om iste koncentracije. Nakon njega slijedi spoj *t*BQ-14, s fenilalaninom u *meta*-položaju, čiji antioksidacijski kapacitet je bio približan onome izmjerenom za Trolox. Spojevi *t*BQ-2, s 2-hidroksietiltiolnim supstituentom u *para*-položaju s obzirom na *tert*-butilnu grupu, *t*BQ-13, s prolinom na *para*-položaju, te nesupstituirani *t*BQ pokazali su 2 do 3 puta slabije antioksidacijsko djelovanje u usporedbi s Trolox-om, dok su ostali spojevi bili otprilike 4,5 slabiji antioksidansi. S obzirom da je redukcijski potencijal spojeva iz serije benzokinona, određen FRAP metodom, bio u prosjeku 5 do 20 puta slabiji u usporedbi s Trolox-om,²¹⁶ čini se da je primarni mehanizam antioksidacijskog djelovanja ove skupine spojeva prijenos vodikovog atoma na radikal.

4.5. Inhibicija monoamin-oksidaža MAO-A i MAO-B

Inhibitorna sposobnost prema monoamin-oksidažama MAO-A i MAO-B procijenjena je za 20 spojeva iz skupine 4-amino-7-klorkinolina različite duljine poveznice (slika 3.2.), 4 spoja iz skupine kinuklidinskih karbamata (slika 3.10.) te 14 spojeva iz skupine monokarbatnih derivata bambuterola (slika 3.12.). Za sve ispitivane spojeve najprije je načinjen probir pri $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji, a zatim za spojeve za koje je ustanovljeno da inhibiraju najmanje 70 % enzimске aktivnosti barem jedne od monoamin-oksidaža, određena je vrijednost IC_{50} .

4.5.1. Inhibicija monoamin-oksidaza MAO-A i MAO-B 4-aminokinolinima

Rezultati probira 4-amino-7-klorkinolina različite duljine poveznice prikazani su u tablici 4.15.

Tablica 4.15. Postoci inhibicije enzima MAO-A i MAO-B pri $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji 4-amino-7-klorkinolina različite duljine poveznice ($\pm$ standardna devijacija).

SPOJ	% inhibicije	
	MAO-A	MAO-B
CIAQn-1	93,7 $\pm$ 0,1	56,5 $\pm$ 0,8
CIAQn-2	95,6 $\pm$ 0,1	81,6 $\pm$ 0,3
CIAQn-3	96,7 $\pm$ 0,1	70,8 $\pm$ 0,3
CIAQn-4	95,9 $\pm$ 0,0	92,8 $\pm$ 0,2
CIAQn-5	97,0 $\pm$ 0,0	58,1 $\pm$ 0,6
CIAQn-6	97,3 $\pm$ 0,0	85,7 $\pm$ 0,2
CIAQn-7	84,9 $\pm$ 0,7	53,4 $\pm$ 1,3
CIAQn-8	94,2 $\pm$ 0,1	88,8 $\pm$ 0,2
CIAQn-9	95,1 $\pm$ 0,3	75,2 $\pm$ 0,0
CIAQn-10	96,2 $\pm$ 0,1	51,4 $\pm$ 0,1
CIAQn-13	98,9 $\pm$ 0,1	59,0 $\pm$ 0,9
CIAQn-14	42,6 $\pm$ 0,1	25,6 $\pm$ 3,1
CIAQn-15	84,8 $\pm$ 0,0	31,1 $\pm$ 0,3
CIAQn-16	93,9 $\pm$ 0,0	45,3 $\pm$ 1,6
CIAQn-17	70,4 $\pm$ 0,2	31,3 $\pm$ 2,6
CIAQn-18	89,6 $\pm$ 0,1	66,9 $\pm$ 2,5
CIAQn-19	95,7 $\pm$ 0,2	64,9 $\pm$ 0,6
CIAQn-20	67,1 $\pm$ 0,9	31,5 $\pm$ 3,3
CIAQn-21	76,5 $\pm$ 0,7	68,7 $\pm$ 2,4
CIAQn-22	94,5 $\pm$ 0,3	56,6 $\pm$ 0,2

Ispitivani spojevi su pri $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji inhibirali 42,6 – 98,9 % aktivnosti MAO-A, te 25,6 – 92,8 % aktivnosti MAO-B, ovisno o spoju. Spojevima koji su inhibirali ≥ 70 % aktivnosti enzima (devetnaest spojeva u slučaju MAO-A i četiri spoja u slučaju MAO-B) određena je IC_{50} vrijednost. IC_{50} vrijednost određena je iz postotaka inhibicije enzima pri 8 različitih koncentracija u rasponu od 30 nmol L^{-1} do $300 \mu\text{mol L}^{-1}$. Rezultati su prikazani u tablici 4.16.

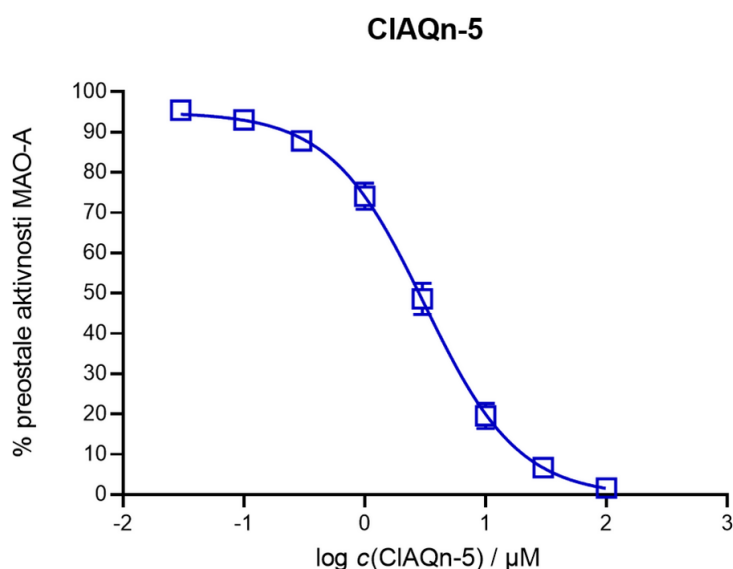
Tablica 4.16. IC₅₀ vrijednosti (μmol L⁻¹) za inhibiciju enzima MAO-A i MAO-B 4-amino-7-klorkinolinima različite duljine poveznice (± standardna pogreška).

SPOJ	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)
	MAO-A	MAO-B
CIAQn-1	6,5 ± 0,4	–
CIAQn-2	6,4 ± 0,5	4,6 ± 0,6
CIAQn-3	4,8 ± 0,2	n.o.
CIAQn-4	5,5 ± 0,3	1,1 ± 0,1
CIAQn-5	3,1 ± 0,2	–
CIAQn-6	5,7 ± 0,5	5,4 ± 0,9
CIAQn-7	22,0 ± 1,0	–
CIAQn-8	7,4 ± 0,2	2,8 ± 0,3
CIAQn-9	6,8 ± 0,4	n. o.
CIAQn-10	6,2 ± 0,3	–
CIAQn-13	3,3 ± 0,5	–
CIAQn-14	–	–
CIAQn-15	23,5 ± 1,9	–
CIAQn-16	6,9 ± 0,6	–
CIAQn-17	39,1 ± 3,9	–
CIAQn-18	12,8 ± 0,9	–
CIAQn-19	6,8 ± 0,5	–
CIAQn-20	40,0 ± 3,9	–
CIAQn-21	29,2 ± 2,7	–
CIAQn-22	6,9 ± 0,5	–

* n. o. nije određeno

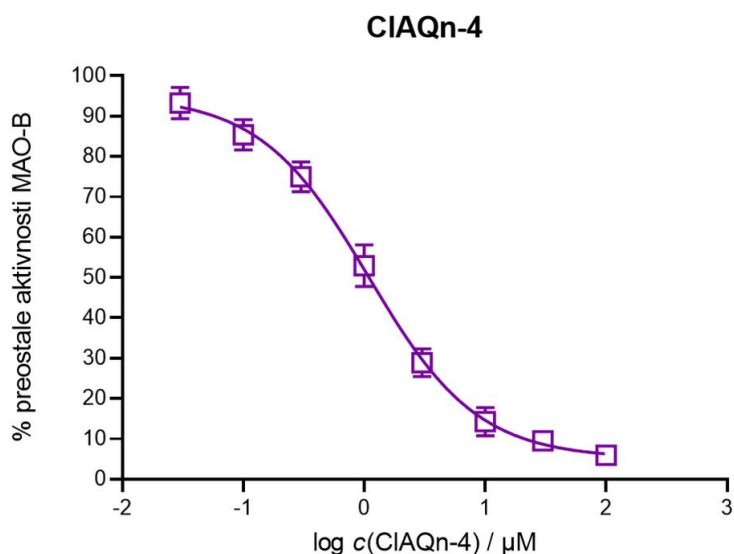
U slučaju MAO-A, određene vrijednosti IC₅₀ bile su u rasponu 3,3 – 40,0 μmol L⁻¹. Najsnajnijim inhibitorima pokazali su se spojevi CIAQn-5, s *n*-butilnim poveznicom i 3-metilbenzotiofenom kao supstituentom na terminalnoj amino grupi (IC₅₀ = 3,1 μmol L⁻¹) i CIAQn-13, s *n*-oktilnom poveznicom i *N*-metil-3-metilindolom kao supstituentom (IC₅₀ = 3,3 μmol L⁻¹). Grafički prikaz IC₅₀ krivulje najsnajnijeg inhibitora, CIAQn-5, dan je na slici 4.25. Od ukupno devetnaest ispitivanih spojeva, njih jedanaest inhibiralo je MAO-A s IC₅₀ vrijednostima u rasponu 4,8 – 10 μmol L⁻¹ (CIAQn-1, CIAQn-2, CIAQn-3, CIAQn-4, CIAQn-6, CIAQn-8, CIAQn-9, CIAQn-10, CIAQn-16, CIAQn-19 i CIAQn-22). Najslabiji inhibitori bili su spojevi CIAQn-20 (IC₅₀ = 40,0 μmol L⁻¹) s *N*-*p*-fluorfenil-4-metilpirazolom i CIAQn-17 (IC₅₀ = 39,1 μmol L⁻¹) s *N*-*p*-tolil-4-metilpirazolom kao supstituentom, koji su bili oko 12 puta slabiji inhibitori od CIAQn-5 i CIAQn-13. Oba spoja (CIAQn-17 i CIAQn-20) imaju *n*-butilnu poveznicu između aminokinolinskog prstena i terminalne amino grupe. U slučaju spojeva kod kojih je supstituent na terminalnoj amino grupi bio heterocikl s atomom dušika u strukturi (2-metilindol (CIAQn-7, CIAQn-8 i CIAQn-9), *N*-metil-2-metilimidazol (CIAQn-14,

ClAQn-15 i ClAQn-16), *N-p*-tolil-4-metilpirazol (ClAQn-17, ClAQn-18 i ClAQn-19) ili *N-p*-fluorfenil-4-metilpirazol (ClAQn-20, ClAQn-21 i ClAQn-22)) primjećeno je da inhibitorni učinak prema MAO-A enzimu raste s porastom duljine alkilne poveznice, što upućuje na vjerojatnost da enzim ima veći afinitet prema spojevima s duljom poveznicom. Kod spojeva koji kao supstituent imaju heterocikl s atomom kisika ili sumpora taj trend nije uočen. No, da bi se ova pretpostavka mogla potvrditi, potrebno bi bilo prirediti i testirati *n*-oktilne analoge preostalih spojeva.



Slika 4.25. IC_{50} krivulja inhibicije enzima MAO-A spojem ClAQn-5.

Kada je riječ o inhibiciji MAO-B, IC_{50} vrijednosti određene su za četiri spoja. Unatoč tome što su pri $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji inhibirali oko 70% aktivnosti MAO-B, spojevima ClAQn-3 i ClAQn-9 nije bilo moguće odrediti IC_{50} vrijednost jer u ispitivanom rasponu koncentracija krivulja odnosa koncentracije i postotka preostale aktivnosti enzima nije dostigla plato, odnosno nije bila sigmoidalna. Spojevi ClAQn-2, ClAQn-4, ClAQn-6 i ClAQn-8 inhibirali su MAO-B s IC_{50} vrijednostima u rasponu $1,1 - 5,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, pri čemu je najsnažniji inhibitor bio spoj ClAQn-4, s 2-metilbenzotiofenom kao supstituentom na terminalnoj amino grupi. Grafički prikaz IC_{50} krivulje inhibitora ClAQn-4 dan je na slici 4.26. Svi navedeni spojevi imaju *n*-heksilnu poveznicu između aminokinolinskog prstena i terminalne amino grupe s različitim supstituentima (2-metilbenzofuran, 2- ili 3-metilbenzotiofen te 2-metilindol). S obzirom na inhibitorne učinke ostalih spojeva pri $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji i određenih IC_{50} vrijednosti, čini se da MAO-B preferira *n*-heksilnu poveznicu.



Slika 4.26. IC₅₀ krivulja inhibicije enzima MAO-B spojem CIAQn-4.

4.5.2. Inhibicija monoamin-oksidaza MAO-A i MAO-B karbamatima

Od karbamata, probir inhibitorne aktivnosti prema enzimima MAO-A i MAO-B načinjen je za četiri spoja iz skupine kinuklidinskih karbamata i četrnaest spojeva iz skupine monokarbamatnih derivata bambuterola.

Postoci inhibicije pri 100 μmol L⁻¹ koncentraciji spojeva iz skupine kinuklidinskih karbamata prikazani u tablici 4.17.

Tablica 4.17. Postoci inhibicije enzima MAO-A i MAO-B pri 100 μmol L⁻¹ koncentraciji kinuklidinskih karbamata (± standardna devijacija).

SPOJ	% inhibicije	
	MAO-A	MAO-B
DMK-1	8,2 ± 4,4	5,9 ± 2,2
DEK-1	7,3 ± 5,7	5,9 ± 4,1
BnzK-1	5,5 ± 2,5	4,7 ± 1,3
BnzK-3	16,5 ± 3,4	9,2 ± 3,1

Ispitivani kinuklidinski karbamati inhibirali su 5,5 – 16,5 % aktivnosti MAO-A, te 4,7 – 9,2 % aktivnosti MAO-B. S obzirom na vrlo niske postotke inhibicije, ovoj seriji spojeva nije određivana IC₅₀ vrijednost.

Postoci inhibicije pri 100 μmol L⁻¹ koncentraciji spojeva iz skupine monokarbamatnih derivata bambuterola prikazani u tablici 4.18.

Tablica 4.18. Postoci inhibicije enzima MAO-A i MAO-B pri 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji monokarbamatnih derivata bambuterola ($\pm$ standardna devijacija).

SPOJ	% inhibicije	
	MAO-A	MAO-B
1MDE	9,2 $\pm$ 0,9	4,7 $\pm$ 4,4
5MDE	13 $\pm$ 0,0	7,2 $\pm$ 0,9
7MDE	23,5 $\pm$ 3,5	13,1 $\pm$ 3,5
8MDE	10,4 $\pm$ 4,2	9,2 $\pm$ 1,6
9MDE	14,2 $\pm$ 4,4	9,1 $\pm$ 0,8
1MP	30,8 $\pm$ 2,9	36,9 $\pm$ 0,2
2MP	24,7 $\pm$ 0,0	22,0 $\pm$ 0,3
5MP	13,6 $\pm$ 0,6	7,3 $\pm$ 0,3
6MP	16,1 $\pm$ 0,3	15,9 $\pm$ 1,7
8MP	27,0 $\pm$ 2,3	52,7 $\pm$ 0,3
1MPI	21,4 $\pm$ 1,5	41,8 $\pm$ 0,4
2MPI	25,1 $\pm$ 0,9	44,8 $\pm$ 0,6
5MPI	8,9 $\pm$ 0,8	3,0 $\pm$ 0,7
7MPI	27,5 $\pm$ 5,7	15,9 $\pm$ 3,2

Monokarbamatni derivati bambuterola inhibirali su 8,9 – 30,8 % aktivnosti MAO-A, pri čemu je najveći postotak inhibicije (30,8%) pokazao spoj 1MP, s pirolidinom na karbamatnom dušiku i *tert*-butilnim supstituentom na amino grupi. Najmanji postotak inhibicije, manje od 10 % aktivnosti MAO-A, pokazali su spojevi 5MPI (8,9 %), kod kojeg su karbamatni i aaminski dušik dio piperidinskog sustava, i 1MDE (9,2%) s dimetilnom grupom na karbamatnom dušiku i *tert*-butilom na amino grupi. Kada je riječ o MAO-B, svi spojevi inhibirali su 3,0 – 52,7 % aktivnosti enzima, pri čemu je najsnažniji inhibitor bio spoj 8MP, kod kojeg je karbamatni dušik dio pirolidinskog prstena te kojemu je amino grupa supstituirana 1-metilbenzilom. Više od 30% inhibitorne aktivnosti pri 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji pokazali su spojevi 2MPI (44,8 %), 1MPI (41,8 %) i 1MP (36,9 %). Budući da nijedan spoj iz ove serije nije inhibirao ≥ 70 % aktivnosti MAO-B pri 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji, nijednom spoju nije određena IC_{50} vrijednost.

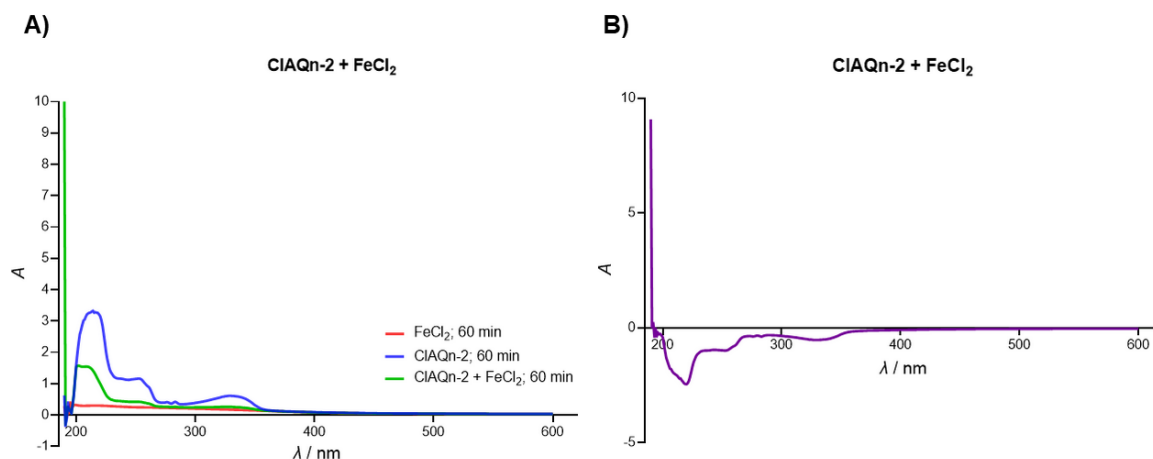
4.6. Procjena kelacijske sposobnosti spojeva

Sposobnost keliranja biometala Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} određena je za 9 spojeva iz skupine 4-amino-7-klorkinolina različite duljine poveznice (slika 3.2.). Procjena kelacijske sposobnosti urađena je usporedbom UV-VIS apsorpcijskih spektara spoja, soli metala te smjese soli metala i spoja (koncentracijski omjer spoja i metala bio je 1:2). Spektri reakcijskih smjesa snimani su nakon 1., 30. i 60. minute inkubacije. Razlike u apsorpcijskim spektrima samih spojeva i samih soli

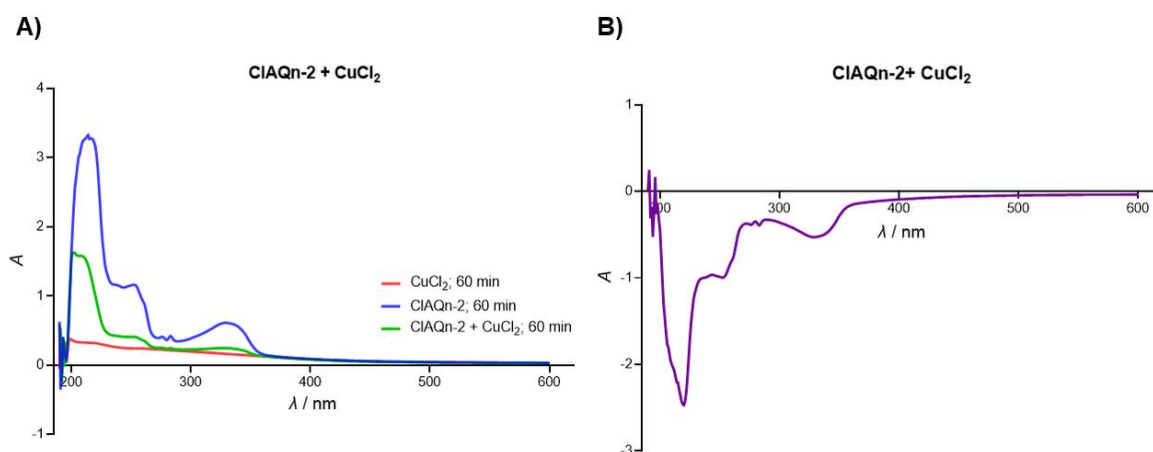
metala u usporedbi sa smjesom metala i spoja uočene su u 60. minuti inkubacije. Za potvrdu pretpostavke nastanka kompleksa metal–spoj analizirani su diferencijalni spektri dobiveni numeričkim oduzimanjem spektara spojeva i metala od spektra kompleksa metal–spoj.

Sposobnost keliranja biometala ispitana je za spojeve ClAQn-2, ClAQn-4, ClAQn-8, ClAQn-11, ClAQn-12, ClAQn-13, ClAQn-14, ClAQn-15 i ClAQn-16. Analizom apsorpcijskih spektara smjese metala i spoja i njihovih diferencijalnih spektara utvrđeno je da spojevi ClAQn-2, ClAQn-12, ClAQn-13 i ClAQn-16 formiraju kompleks sa sva tri biometala nakon 60 minuta inkubacije. Apсорpcijski i diferencijalni spektri smjese metala i spoja ClAQn-2 prikazani su na slikama 4.27. – 4.29. Spojevi ClAQn-4 i ClAQn-11 formirali su komplekse s biometalima Fe^{2+} i Cu^{2+} , dok je spoj ClAQn-8 kelirao samo Fe^{2+} . U slučaju spojeva ClAQn-14 i ClAQn-15 nije potvrđen nastanak kompleksa ni sa jednim od testiranih metalnih iona.

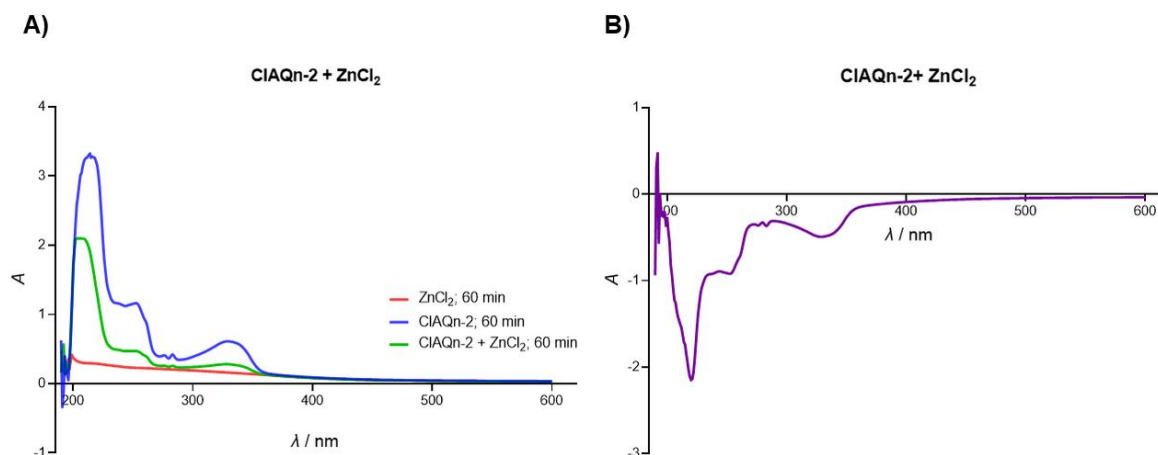
Analiza utjecaja strukture spoja na njegovu sposobnost keliranja pokazala je da na mogućnost spojeva da formiraju stabilne komplekse s metalnim ionima utječe duljina alkilne poveznice budući da spoj ClAQn-16, s *n*-oktilnom poveznicom i *N*-metil-2-metilimidazolom na terminalnoj amino grupi, kelira sva tri metalna iona, dok njegovi *n*-butilni i *n*-heksilni analozi, spojevi ClAQn-14 i ClAQn-15, ne stvaraju komplekse ni sa jednim biometalom. U prilog pretpostavci govori i činjenica da su spojevi ClAQn-12 i ClAQn-13, s *N*-metil-3-indolnim supstituentom na terminalnoj amino grupi i *n*-heksilnom odnosno *n*-oktilnom poveznicom, kelirali sva tri biometala, no njihov *n*-butilni analog, ClAQn-11, formirao je komplekse s Fe^{2+} i Cu^{2+} , ali ne i Zn^{2+} . Ovi rezultati u skladu su s ranijim opažanjima gdje je pokazano da 4-amino-7-klorkinolini s *n*-oktilnom poveznicom formiraju komplekse sa sva tri ovdje testirana biometala.¹⁹⁸



Slika 4.27. A) UV-VIS apsorpcijski spektri spoja CIAQn-2 (plavo), soli FeCl_2 (crveno) i smjese spoja CIAQn-2 i FeCl_2 (zeleno) nakon 60 minuta inkubacije; B) prikaz diferencijalnog spektra kompleksa Fe^{2+} -CIAQn-2.



Slika 4.28. A) UV-VIS apsorpcijski spektri spoja CIAQn-2 (plavo), soli CuCl_2 (crveno) i smjese spoja CIAQn-2 i CuCl_2 (zeleno) nakon 60 minuta inkubacije; B) prikaz diferencijalnog spektra kompleksa Cu^{2+} -CIAQn-2.



Slika 4.29. A) UV-VIS apsorpcijski spektri spoja CIAQn-2 (plavo), soli ZnCl_2 (crveno) i smjese spoja CIAQn-2 i ZnCl_2 (zeleno) nakon 60 minuta inkubacije; B) prikaz diferencijalnog spektra kompleksa Zn^{2+} -CIAQn-2.

4.7. Citotoksičnost spojeva

Kako bi se procjenila sigurnost spojeva za primjenu *in vivo*, ispitan je *in vitro* učinak spojeva iz skupina 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice (slika 3.2.) i O-alkiloksima (slike 3.7 – 3.9.) na preživljenje staničnih linija SH-SY5Y, HepG2 i HEK293 nakon 24-satne izloženosti. Citotoksičnost spojeva izražena je kao IC_{50} vrijednost, odnosno koncentracija spoja pri kojoj je 50% ukupnog broja tretiranih stanica vijabilno. IC_{50} vrijednost je određena iz izloženosti stanica pri osam različitih koncentracija spojevima u rasponu 0,01 – 200 ili 0,01 – 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (ovisno o topljivosti spojeva) za 4-amino-7-klorkinoline različitih duljina poveznice, odnosno 0,01 – 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za O-alkiloksime, odabranima na temelju njihovih konstanti inhibicije kolinesteraza, K_i .

4.7.1. Učinak 4-aminokinolina na preživljenje stanica

Iz skupine 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice, toksični učinak spojeva na preživljenje staničnih linija SH-SY5Y, HepG2 i HEK293 određen je za ukupno 22 spoja (tablica 4.19). Za nekolicinu ispitivanih spojeva odnos koncentracija i učinka nije bio sigmoidalan ili nije dosegnut plato, i u tim slučajevima IC_{50} vrijednosti su procijenjene ili je dan raspon koncentracija unutar kojega se nalazi IC_{50} , ovisno o mogućnosti izračuna. U slučajevima kada s najvećom ispitivanom koncentracijom spoja nije postignuta 100 %-tna

inhibicija rasta stanica, vrijednost IC_{50} je procijenjena većom od maksimalne ispitivane koncentracije spoja.

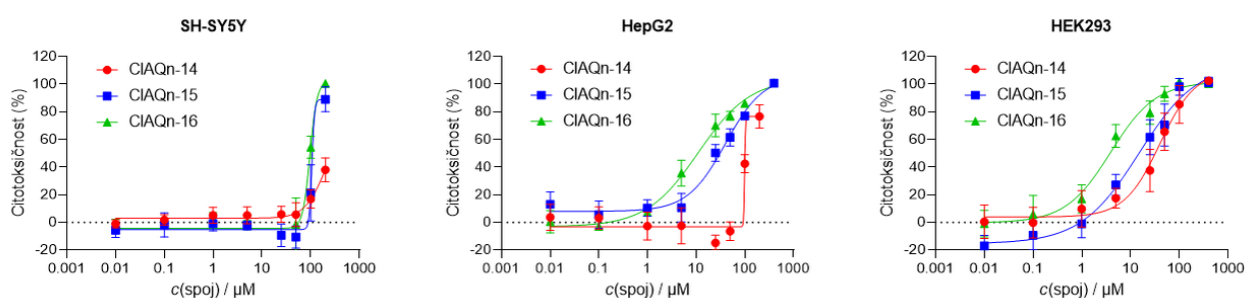
Tablica 4.19. IC_{50} vrijednosti ($\mu\text{mol L}^{-1}$) 4-amino-7-klorkinolina različite duljine poveznice nakon 24-satne izloženosti stanica ($\pm$ standardna pogreška).

SPOJ	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
	SH-SY5Y	HepG2	HEK293
CIAQn-1	≈ 19	$8,7 \pm 1,5$	$5,4 \pm 0,9$
CIAQn-2	$9,8 \pm 1,9$	$6,7 \pm 1,8$	$\approx 4,8$
CIAQn-3	$\approx 7,1$	$8,0 \pm 1,2$	$4,3 \pm 0,6$
CIAQn-4	$\approx 6,1$	$\approx 5,7$	$\approx 4,7$
CIAQn-5	$\approx 5,7$	$5,0 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,6$
CIAQn-6	$4,4 \pm 0,5$	$6,0 \pm 3,5$	$3,7 \pm 1,1$
CIAQn-7	$\approx 5,9$	$\approx 7,4$	$\approx 6,2$
CIAQn-8	$3,1 \pm 1,1$	$3,6 \pm 1,5$	$\approx 4,0$
CIAQn-9	$\approx 7,1$	$6,3 \pm 3,3$	$2,8 \pm 0,5$
CIAQn-10	$\approx 5,0$	$\approx 4,5$	$2,5 \pm 0,3$
CIAQn-11	$7,7 \pm 5,0$	≈ 16	$8,3 \pm 3,2$
CIAQn-12	$\approx 5,6$	10 ± 4	$5,4 \pm 0,7$
CIAQn-13	$5,8 \pm 0,7$	$4,0 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,3$
CIAQn-14	≥ 200	$100 - 200$	40 ± 9
CIAQn-15	≈ 106	40 ± 7	15 ± 4
CIAQn-16	97 ± 4	11 ± 2	$3,9 \pm 0,8$
CIAQn-17	$5,8 \pm 0,7$	$\approx 6,6$	$3,1 \pm 0,5$
CIAQn-18	$\approx 4,8$	$4,5 \pm 0,8$	$\approx 3,9$
CIAQn-19	$\approx 1,6$	$2,2 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,6$
CIAQn-20	$\approx 6,0$	$8,1 \pm 2,6$	$\approx 5,5$
CIAQn-21	$6,1 \pm 0,8$	$\approx 5,6$	$3,9 \pm 1,2$
CIAQn-22	$4,1 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,2$

$\approx$ označava procijenjenu vrijednost IC_{50}

Od 22 spoja, za njih 19 je IC_{50} vrijednost inhibicije rasta barem jedne od tri testirane stanične linije procijenjena iz razloga što krivulja ili nije bila u potpunosti sigmoidalna, zbog čega je standardna pogreška vrijednosti točke infleksije bila vrlo velika, ili pri testiranim koncentracijama nije došlo do 100 %-tne inhibicije rasta stanica (kao u slučaju SH-SY5Y stanica tretiranih spojem CIAQn-14). Većina spojeva kojima je IC_{50} određena, pokazala je citotoksičan učinak na sve tri stanične linije s IC_{50} vrijednostima u rasponu od 1 – 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Najmanje toksičnima pokazali su se spojevi s *N*-metil-2-metilimidazolnim supstituentom na terminalnoj amino grupi (CIAQn-14, CIAQn-15 i CIAQn-16). Spoj CIAQn-14, kod kojeg je poveznica između aminokinolinskog prstena i terminalne amino grupe *n*-butil, nije ni pri najvećoj testiranoj koncentraciji (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) u potpunosti inhibirao rast SH-SY5Y i HepG2

stanica te su njegove IC_{50} vrijednosti procijenjene kao ≥ 200 , odnosno kao $100 - 200 \mu\text{mol L}^{-1}$, dok je na stanicama HEK293 određena vrijednosti $IC_{50} = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$. Spoj CIAQn-15, kod kojeg je povezica *n*-heksil, najmanje toksičan učinak pokazao je prema stanicama SH-SY5Y ($IC_{50} \approx 106 \mu\text{mol L}^{-1}$), dok su mu na stanicama HepG2 i HEK293 određene IC_{50} vrijednosti 40 odnosno $15 \mu\text{mol L}^{-1}$, redom. Spoj CIAQn-16, s *n*-oktilnom poveznicom, pokazao se toksičnijim od svojih kraćih analoga, s izmjerenim IC_{50} vrijednostima $97 \mu\text{mol L}^{-1}$ nakon tretmana SH-SY5Y stanica, $11 \mu\text{mol L}^{-1}$ nakon tretmana HepG2 te $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ nakon tretmana HEK293 stanica. U slučaju ova tri spoja vidljivo je da se toksičan učinak prema sve tri testirane stanične linije povećavao s porastom duljine alkilne poveznice između aminokinolinskog prstena i terminalne amino grupe: najmanje toksičan učinak pokazao je spoj CIAQn-14 s najkraćom, *n*-butilnom, poveznicom, dok je najtoksičniji učinak izmjeren kod spoja CIAQn-16 s najduljom, *n*-oktilnom, poveznicom. Također, sva tri spoja pokazala su se najmanje toksičnima prema SH-SY5Y stanicama. Najtoksičnijima pokazali su se prema HEK293 stanicama. Krivulje ovisnosti toksičnosti spojeva CIAQn-14, CIAQn-15 i CIAQn-16 (vrijednost izražena kao % citotoksičnosti) o koncentraciji spoja za sve tri stanične linije prikazane su na slici 4.30. Kod ostalih spojeva iz ove skupine IC_{50} vrijednosti generalno su bile slične za sve tri stanične linije te stoga nije moguće analizirati utjecaj supstituenta na terminalnoj amino grupi i duljine alkilne poveznice na preživljenje stanica. Generalno su IC_{50} vrijednosti spojeva bile za jedan do tri reda veličine manje od njihovih konstanti inhibicije kolinesteraza (K_i) te istog reda veličine kao njihove IC_{50} vrijednosti za inhibiciju MAO enzima.



Slika 4.30. Krivulje ovisnosti citotoksičnosti 4-aminokinolina o njihovoj koncentraciji nakon 24-satne izloženosti stanica različitim koncentracijama spojeva ($0,01 - 200$ ili $400 \mu\text{mol L}^{-1}$).

4.7.2. Učinak O-alkiloksima na preživljenje stanica

Citotoksični učinak 42 spoja iz skupine O-alkiloksima ispitan je na staničnim linijama SH-SY5Y i HepG2 nakon 24 sata izloženosti stanica spojevima pri osam različitih koncentracija u rasponu 0,01 – 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Testirani su svi spojevi čije su konstante inhibicije (K_i) za barem jednu od ljudskih kolinesteraza bile $\leq 100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Rezultati su prikazani u tablici 4.20.

Tablica 4.20. IC_{50} vrijednosti ($\mu\text{mol L}^{-1}$) O-alkiloksima nakon 24-satne izloženosti stanica ($\pm$ standardna pogreška).

IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)								
SPOJ	SH-SY5Y	HepG2	SPOJ	SH-SY5Y	HepG2	SPOJ	SH-SY5Y	HepG2
O-metiloksimi			O-tert-butiloksimi			O-benziloksimi		
MetOX-2	≥ 800	≥ 800	tBuOX-1	≥ 800	≥ 800	BnzOX-1	≥ 800	≥ 800
MetOX-3	≥ 800	≥ 800	tBuOX-3	≥ 800	≥ 800	BnzOX-2	≥ 800	≥ 800
MetOX-5	≥ 800	≥ 800	tBuOX-4	≥ 800	≥ 800	BnzOX-3	≥ 800	≥ 800
MetOX-6	≥ 800	≥ 800	tBuOX-5	≥ 800	≥ 800	BnzOX-4	≥ 800	≥ 800
MetOX-7	≥ 800	≥ 800	tBuOX-6	≥ 800	≥ 800	BnzOX-5	≥ 800	≥ 800
MetOX-8	≥ 800	≥ 800	tBuOX-7	≥ 800	≥ 800	BnzOX-6	≥ 800	≥ 800
MetOX-9	≥ 800	≥ 800	tBuOX-8	≥ 800	≥ 800	BnzOX-7	≥ 800	≥ 800
			tBuOX-9	≥ 800	≥ 800	BnzOX-8	≥ 800	≥ 800
			tBuOX-10	≥ 800	≥ 800	BnzOX-9	≥ 800	≥ 800
			tBuOX-11	≥ 800	≥ 800	BnzOX-10	≥ 800	≥ 800
			tBuOX-12	≥ 800	≥ 800	BnzOX-11	≥ 800	≥ 800
			tBuOX-13	≥ 800	≥ 800	BnzOX-12	≥ 800	≥ 800
			tBuOX-14	≥ 800	≥ 800	BnzOX-13	≥ 800	≥ 800
			tBuOX-15	≥ 800	≥ 800	BnzOX-14	≥ 800	400 – 800
			tBuOX-16	400 – 800	400 – 800	BnzOX-15	≥ 800	≥ 800
			tBuOX-17	10 – 100	10 – 100	BnzOX-16	≥ 800	400 – 800
						BnzOX-17	≥ 800	≥ 800
						BnzOX-18	400 – 800	100 – 200
						BnzOX-19	10 – 100	10 – 100

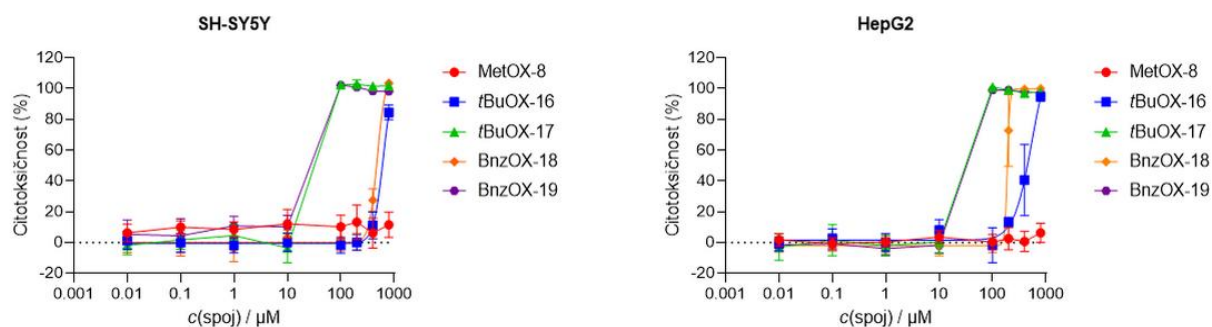
Ni jedan od testiranih O-metiloksima nije inhibirao preživljenje više od 50% ukupnog broja stanica ni kod jedne od staničnih linija (SH-SY5Y ni u slučaju HepG2) pri najvećoj testiranoj koncentraciji (800 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Slična je bila situacija i u slučaju O-tert-butiloksima. Iz te serije spojeva iznimke su bile tBuOX-16 i tBuOX-17, čije su benzilne grupe na kinuklidinskom dušiku mono- odnosno disupstituirane tert-butilom. U slučaju spoja tBuOX-16, više od 50 % inhibicije rasta stanica obiju staničnih linija uočeno je pri 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji, dok je kod tBuOX-17 isto zapaženo pri 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji. Stoga je za IC_{50} vrijednosti procijenjeno da se nalaze u rasponu

koncentracija testiranih spojeva unutar kojih je izmjereno 50 – 100 % inhibicije rasta stanica (u slučaju *t*BuOX-16 to je 400 – 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$, dok je kod *t*BuOX-17 riječ o 10 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). U oba slučaja nije bilo moguće izračunati pravu IC_{50} vrijednost (kod *t*BuOX-16 nije dostignut plato, a u slučaju *t*BuOX-17 krivulja nije bila potpuno sigmoidalna zbog čega je standardna pogreška vrijednosti točke infleksije bila velika).

Kada je riječ o *O*-benziloksimima, većina testiranih spojeva nije inhibirala preživljenje više od 50 % ukupnog broja stanica ni kod jedne od staničnih linija (SH-SY5Y ni HepG2) pri najvećoj testiranoj koncentraciji (800 $\mu\text{mol L}^{-1}$), te su stoga njihove IC_{50} vrijednosti izražene kao $\geq 800 \mu\text{mol L}^{-1}$. Spojevi BnzOX-14 i BnzOX-16, čije su benzilne grupe na kinuklidinskom dušiku disupstituirane atomima klora odnosno klorom i fluorom, pri 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji inhibirali su više od 50 % rasta stanica HepG2, zbog čega je za njihove IC_{50} vrijednosti procijenjeno da su u rasponu od 400 – 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Spojevi BnzOX-18 i BnzOX-19, s kinuklidinskom benzilnom grupom koja je mono- odnosno disupstituirana *tert*-butilom, pokazali su citotoksičan učinak (inhibicija više od 50 % rasta stanica) prema obje testirane stanične linije pri većim testiranim koncentracijama: BnzOX-18 inhibirao je preživljenje više od 50 % ukupnog broja stanica SH-SY5Y pri 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a stanica HepG2 pri 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, dok je spoj BnzOX-19 pri 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ inhibirao preživljenje više od 50 % stanica obju testiranih staničnih linija. Shodno tome, za njihove IC_{50} vrijednosti procijenjeno je da se nalaze u rasponu koncentracija testiranih spojeva unutar kojih je izmjereno 50 – 100 % inhibicije rasta stanica: u slučaju BnzOX-14 i BnzOX-16 taj raspon bio je 400 – 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za HepG2 stanice, kod BnzOX-18 400 – 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za SH-SY5Y i 100 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za HepG2 stanice, dok je u slučaju BnzOX-19 iznosio 10 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za obje stanične linije. U svim navedenim slučajevima nije bilo moguće izračunati pravu IC_{50} vrijednost; u slučaju BnzOX-19 kod obje stanične linije, te BnzOX-18 kod HepG2 stanica jer krivulja nije bila potpuno sigmoidalna zbog čega je standardna pogreška vrijednosti točke infleksije bila velika, dok u preostalim slučajevima krivulja nije dostigla plato.

Krivulje ovisnosti postotka citotoksičnosti o koncentraciji spojeva *t*BuOX-16, *t*BuOX-17, BnzOX-18 i BnzOX-19, kod kojih je primjećen toksičan učinak na obje stanične linije, te MetOX-8, odabranog kao primjer spoja koji ni pri jednoj testiranoj koncentraciji nije pokazao citotoksičan učinak ni na jednoj testiranoj staničnoj liniji, prikazane su na slici 4.31.



Slika 4.31. Krivulje ovisnosti citotoksičnosti oksima o njihovoj koncentraciji nakon 24-satne izloženosti stanica različitim koncentracijama spojeva ($0,01 - 800 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Generalno, svi *O*-alkiloksimi su pri koncentracijama do $800 \mu\text{mol L}^{-1}$ pokazali vrlo slabi toksični učinak na obje testirane stanične linije, SH-SY5Y i HepG2, s IC_{50} vrijednostima koje su bile barem za jedan red veličine veće od njihovih konstanti inhibicije (K_i) određene za AChE ili BChE. Određeni citotoksični učinak uočen je samo kod *O*-*tert*-butil- i *O*-benziloksima čiji je kinuklidinski dušik supstituiran benzilnom grupom na kojoj se nalazi jedna ili dvije *tert*-butilne grupe (*t*BuOX-16, *t*BuOX-17, BnzOX-18 i BnzOX-19). Pritom su se spojevi s dvije *tert*-butilne grupe (*t*BuOX-17 i BnzOX-19) pokazali toksičnijima prema objema staničnim linijama, s IC_{50} vrijednostima nižima od $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, dok su kod monosupstituiranih analoga (*t*BuOX-16 i BnzOX-18) IC_{50} vrijednosti bile više od 100 ili čak $400 \mu\text{mol L}^{-1}$. Čini se da na preživljenje staničnih linija SH-SY5Y i HepG2 negativno utječu veći i hidrofobniji supstituenti na kinuklidinskom dušiku. Slično je uočeno kod kinuklidinskih mono-oksima u istraživanju Zandone i suradnika, gdje je jedini spoj koji je pokazao citotoksični učinak na SH-SY5Y i HepG2 stanice bio derivat kod kojeg se na kinuklidinskom dušiku nalazio *n*-dodecilni lanac, dok spojevi koji su na istom mjestu bili supstituirani propilenom, butilenom ili benzilnom grupom s Br, Cl, NO_2 ili CH_3 kao supstituentom nisu bili toksični pri koncentracijama do $800 \mu\text{mol L}^{-1}$.²⁰⁶

4.8. *In silico* analiza fizikalno-kemijskih svojstava spojeva

Korištenjem *in silico* metoda izračunati su parametri fizikalno-kemijskih svojstava odabranih spojeva, a na temelju kojih su urađene procjene biodostupnosti spojeva nakon oralne primjene, mogućnosti prolaska spojeva kroz krvno-moždanu barijeru te apsorpcije spojeva u ljudskom probavnom sustavu. Navedene procjene služile su za evaluaciju spojeva kao potencijalnih lijekova čiji cilj djelovanja je središnji živčani sustav.

4.8.1. Procjena biodostupnosti spojeva nakon oralne primjene

Bioraspoloživost spojeva nakon oralne primjene procijenjena je na temelju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava: logaritma koeficijenta raspodjele oktanol/voda ($\log P$), molekulske mase (M_w), polarne površine (PSA), broja donora vodikovih veza (HBD), broja akceptora vodikovih veza (HBA) i molekulske fleksibilnosti koju karakterizira broj rotirajućih veza (RB). Dobiveni parametri zatim su uspoređivani s vrijednostima fizikalno-kemijskih parametara lijekova koji prolaze kroz KMB te djeluju u središnjem živčanom sustavu.^{120,191–193} Procjena biodostupnosti spojeva nakon oralne primjene urađena je za spojeve iz skupine 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice (slika 3.2), 1,4-benzokinona (slika 3.5), hidrazona i *N*-acilhidrazona (slika 3.6) te *O*-alkiloksima (slika 3.7 – 3.9).

Izračunata fizikalno-kemijska svojstva 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice prikazana su u tablici 4.21.

Tablica 4.21. *In silico* izračunata fizikalno-kemijska svojstva 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice i preporučene vrijednosti istih: molekulska masa (M_w), $\log P$, broj donora (HBD) i akceptora (HBA) vodikovih veza, broj rotacijskih veza (RB) te polarna površina molekule (PSA).

SPOJ	$M_w / 100$	$\log P$	HBD	HBA	RB	PSA / 10
CIAQn-1	3,799	4,224	2	3	8	5,009
CIAQn-2	4,079	5,113	2	3	10	5,009
CIAQn-3	3,960	5,154	2	3	8	3,695
CIAQn-4	4,240	6,043	2	3	10	3,695
CIAQn-5	3,960	5,021	2	3	8	3,695
CIAQn-6	4,240	5,910	2	3	10	3,695
CIAQn-7	3,789	4,164	3	3	8	5,274
CIAQn-8	4,070	5,053	3	3	10	5,274
CIAQn-9	4,350	5,942	3	3	12	5,274
CIAQn-10	4,350	6,022	3	3	12	5,274
CIAQn-11	3,929	4,468	2	3	8	4,188
CIAQn-12	4,210	5,357	3	3	10	4,188
CIAQn-13	4,490	6,246	2	3	12	4,188
CIAQn-14	3,439	2,323	2	4	8	5,477
CIAQn-15	3,719	3,213	2	4	10	5,477
CIAQn-16	4,000	4,102	2	4	12	5,477
CIAQn-17	4,200	4,744	2	4	9	5,477
CIAQn-18	4,480	5,633	2	4	11	5,477
CIAQn-19	4,761	6,523	2	4	13	5,477
CIAQn-20	4,239	4,374	2	4	9	5,477
CIAQn-21	4,520	5,263	2	4	11	5,477
CIAQn-22	4,800	6,152	2	4	13	5,477
Preporučene vrijednosti	5	5	5	10	10	7

Vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava 4-amino-7-klorkinolina ClAQn-1, ClAQn-7, ClAQn-11, ClAQn-14, ClAQn-15, ClAQn-17 i ClAQn-20 bile su u granicama vrijednosti preporučenih za lijekove biodostupne u središnjem živčanom sustavu^{120,191} te je stoga za te spojeve pretpostavljena mogućnost prolaska kroz KMB pasivnim transportom. Procjena je napravljena na temelju 6 parametara, što je proširena metoda u odnosu na klasični *Lipinski rule of 5* koji u obzir uzima 5 parametara i pretpostavlja da kršenje jednog pravila može i dalje rezultirati bioraspoloživom molekulom.^{120,191,193} Stoga je za spojeve ClAQn-2, ClAQn-3, ClAQn-4, ClAQn-5, ClAQn-6, ClAQn-8 i ClAQn-12, čiji su logP vrijednosti malo veće od preporučene granične vrijednosti ($\Delta\log P = 0,021 - 1,043$), i ClAQn-16, čiji je broj rotacijskih veza veći od preporučenog ($\Delta RB = 2$), pretpostavljena ograničena mogućnost prolaska kroz KMB nakon oralne primjene. Za ostale spojeve, kod kojih su vrijednosti dvaju ili više parametara veće od preporučenih vrijednosti, pretpostavljeno je da nisu biodostupni nakon oralne primjene te da ne prolaze kroz KMB.

Izračunata fizikalno-kemijska svojstva 1,4-benzokinona prikazana su u tablici 4.22.

Tablica 4.22. *In silico* izračunata fizikalno-kemijska svojstva 1,4-benzokinona i preporučene vrijednosti istih: molekulska masa (M_w), logP, broj donora (HBD) i akceptora (HBA) vodikovih veza, broj rotacijskih veza (RB) te polarna površina molekule (PSA).

SPOJ	$M_w / 100$	logP	HBD	HBA	RB	PSA / 10
tBQ	1,642	2,451	0	2	1	3,414
tBQ-1	2,403	1,883	1	3	4	5,437
tBQ-2	2,403	1,883	1	3	4	5,437
tBQ-3	2,644	3,980	0	2	3	3,414
tBQ-4	2,644	3,980	0	2	3	3,414
tBQ-5	2,724	4,211	0	2	3	3,414
tBQ-6	2,884	3,907	1	3	3	5,437
tBQ-7	4,053	4,040	0	3	4	4,337
tBQ-8	3,004	4,743	0	2	5	3,414
tBQ-9	3,224	5,201	0	2	3	3,414
tBQ-10	2,544	2,524	0	2	1	3,414
tBQ-11	1,933	1,728	1	3	2	4,617
tBQ-12	1,933	1,728	1	3	2	4,617
tBQ-13	2,773	2,207	1	5	3	3,695
tBQ-14	3,274	3,431	2	5	6	8,347
Preporučene vrijednosti	5	5	5	10	10	7

Fizikalno-kemijska svojstva svih 1,4-benzokinona u granicama su preporučenih vrijednosti; jedina iznimka je spoj tBQ-9 čija je lipofilnost veća od granične vrijednosti ($\Delta\log P = 0,201$). Stoga je za sve ostale spojeve pretpostavljeno da će biti bioraspoloživi nakon oralne primjene te da mogu proći kroz KMB pasivnim transportom, dok je za spoj tBQ-9 pretpostavljen ograničeni prolazak kroz KMB i ulazak u središnji živčani sustav.

Izračunata fizikalno-kemijska svojstva hidrazona i *N*-acilhidrazona prikazana su u tablici 4.23.

Tablica 4.23. *In silico* izračunata fizikalno–kemijska svojstva hidrazona i *N*-acilhidrazona i preporučene vrijednosti istih: molekulska masa (M_w), logP, broj donora (HBD) i akceptora (HBA) vodikovih veza, broj rotacijskih veza (RB) te polarna površina molekule (PSA).

SPOJ	$M_w / 100$	logP	HBD	HBA	RB	PSA / 10
HID1	2,573	2,293	3	5	4	7,774
HID2	3,473	2,823	3	9	6	16,402
HID3	2,753	2,436	3	5	4	7,774
HID4	2,917	2,897	3	5	4	7,774
HID5	1,972	2,583	1	3	3	3,728
HID7	2,152	2,726	1	3	3	3,728
HID8	2,317	3,187	1	3	3	3,728
AcHID1	3,218	1,456	3	5	4	9,481
AcHID2	3,668	1,396	3	7	5	13,795
AcHID3	3,340	1,599	3	5	4	9,481
AcHID4	3,562	2,060	3	5	4	9,481
AcHID5	3,358	1,969	3	5	4	9,481
AcHID6	3,378	1,802	4	6	4	11,504
AcHID7	3,228	0,238	3	6	4	10,770
AcHID8	3,228	0,238	3	6	4	10,770
Preporučene vrijednosti	5	5	5	10	10	7

Hidrazoni HID5, HID7 i HID8 zadovoljavaju sva ograničenja fizikalno-kemijskih svojstava lijekova koji su biodostupni u središnjem živčanom sustavu te je za njih procijenjena mogućnost prolaska kroz KMB pasivnim transportom. Svi ostali spojevi iz ove skupine krše jedno pravilo, a to je ograničenje polarne površine molekule ($PSA = 70 \text{ \AA}$) te je za te spojeve, koji su redom derivati piridoksala, pretpostavljena ograničena mogućnost ulaska u središnji živčani sustav.

Izračunata fizikalno-kemijska svojstva *O*-alokloksima prikazana su u tablici 4.24.

Tablica 4.24. *In silico* izračunata fizikalno–kemijska svojstva O-alkiloksima i preporučene vrijednosti istih: molekulska masa (M_w), logP, broj donora (HBD) i akceptora (HBA) vodikovih veza, broj rotacijskih veza (RB) te polarna površina molekule (PSA).

SPOJ	$M_w / 100$	logP	HBD	HBA	RB	PSA / 10
O-metiloksimi						
MetOX-2	3,432	−1,613	0	2	3	2,159
MetOX-3	3,597	−1,152	0	2	3	2,159
MetOX-5	3,702	−1,816	0	4	4	6,473
MetOX-6	3,432	−1,613	0	2	3	2,159
MetOX-7	3,597	−1,152	0	2	3	2,159
MetOX-8	4,041	−0,987	0	2	3	2,159
MetOX-9	3,702	−1,816	0	4	4	6,473
O-tert-butiloksimi						
tBuOX-1	1,963	1,736	0	3	2	2,483
tBuOX-2	3,382	−2,427	0	2	2	2,159
tBuOX-3	3,673	−0,702	0	2	4	2,159
tBuOX-4	3,853	−0,56	0	2	4	2,159
tBuOX-5	4,018	−0,098	0	2	4	2,159
tBuOX-6	4,462	0,067	0	2	4	2,159
tBuOX-7	4,123	−0,762	0	4	5	6,473
tBuOX-8	3,814	−0,189	0	2	4	2,159
tBuOX-9	3,853	−0,56	0	2	4	2,159
tBuOX-10	4,018	−0,098	0	2	4	2,159
tBuOX-11	4,462	0,067	0	2	4	2,159
tBuOX-12	4,123	−0,762	0	4	5	6,473
tBuOX-13	3,814	−0,189	0	2	4	2,159
tBuOX-14	4,033	−0,417	0	2	4	2,159
tBuOX-15	4,198	0,045	0	2	4	2,159
tBuOX-16	4,234	0,843	0	2	5	2,159
tBuOX-17	4,795	2,388	0	2	6	2,159
O-benziloksimi						
BnzOX-1	2,303	2,406	0	3	3	2,483
BnzOX-2	3,723	−1,756	0	2	3	2,159
BnzOX-3	4,013	−0,032	0	2	5	2,159
BnzOX-4	4,193	0,111	0	2	5	2,159
BnzOX-5	4,358	0,572	0	2	5	2,159
BnzOX-6	4,802	0,737	0	2	5	2,159
BnzOX-7	4,693	0,846	0	2	6	2,159
BnzOX-8	4,463	−0,092	0	4	6	6,473
BnzOX-9	4,193	0,111	0	2	5	2,159
BnzOX-10	4,358	0,572	0	2	5	2,159
BnzOX-11	4,802	0,737	0	2	5	2,159
BnzOX-12	4,463	−0,092	0	4	6	6,473
BnzOX-13	4,373	0,254	0	2	5	2,159
BnzOX-14	4,702	1,176	0	2	5	2,159
BnzOX-15	4,373	0,254	0	2	5	2,159
BnzOX-16	4,538	0,715	0	2	5	2,159
BnzOX-17	4,854	1,399	0	3	7	3,082
BnzOX-18	4,575	1,513	0	2	6	2,159
BnzOX-19	5,136	3,058	0	2	7	2,159
Preporučene vrijednosti	5	5	5	10	10	7

Vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava svih analiziranih spojeva iz skupine *O*-alkiloksima su unutar granica preporučenih vrijednosti za lijekove aktivne u središnjem živčanom sustavu te je za sve procijenjena mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Jedina iznimka je spoj BnzOX-19 iz podskupile *O*-benziloksima, čija molekulska masa je malo veća od preporučene ($\Delta M_w = 0,136$) te je zbog toga moguće da će prolaznost navedenog spoja kroz KMB biti ograničena.

4.8.2. Procjena prolaznosti spojeva kroz krvno-moždanu barijeru

Za odabrane spojeve (4-amino-7-klorkinolini različitih duljina poveznice (slika 3.2.) i *O*-alkiloksima (slike 3.7. – 3.9.)) urađena je i procjena prolaznosti kroz KMB temeljena na parametru logBB (logaritam koeficijenta raspodjele koncentracije spoja u mozgu/krv), a kojom se, s obzirom na dobivenu vrijednost, spojevi svrstavaju u 4 razine procjene permeabilnosti: 0 (vrlo visoka mogućnost prolaska; $\log BB \geq 0.7$, koncentracija spoja u mozgu je barem 5 puta veća nego u krvi), 1 (visoka mogućnost prolaska; $0 \leq \log BB < 0.7$), 2 (srednja mogućnost prolaska; $-0.52 < \log BB < 0$), 3 (niska mogućnost prolaska; $\log BB < -0.52$) i 4 (nedefinirano; izvan granica pouzdanosti).

Izračunate vrijednosti logBB za spojeve iz skupine 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice prikazane su u tablici 4.25

Tablica 4.25. *In silico* procjena sposobnosti prolaska 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice kroz KMB. Razina procjene temeljena je na izračunatoj vrijednosti logBB.

Razina procjene permeabilnosti kroz KMB				
0	1	2	3	4
CIAQn-4, CIAQn-6, CIAQn-9, CIAQn-10, CIAQn-13, CIAQn-19, CIAQn-22	CIAQn-1, CIAQn-2, CIAQn-3, CIAQn-5, CIAQn-7, CIAQn-8, CIAQn-11, CIAQn-12, CIAQn-16, CIAQn-17, CIAQn-18, CIAQn-20, CIAQn-21	CIAQn-14, CIAQn-15	–	–

Svim testiranim 4-amino-7-klorkinolima različitih duljina poveznice temeljem njihovih izračunatih logBB vrijednosti (tablica D7. u Dodatku) procijenjena je vrlo visoka, visoka ili srednja mogućnost prolaska kroz KMB. Za 7 spojeva izračunate vrijednosti logBB bile su u

rasponu 0,744 – 0,961 čime je procijenjeno da ovi spojevi imaju vrlo visoku mogućnost prolaska kroz KMB. Svi ti spojevi imaju *n*-heksilnu (ClAQn-4 i ClAQn-6) ili *n*-oktilnu poveznicu (ClAQn-9, ClAQn-10, ClAQn-13, ClAQn-19, ClAQn-22) između aminokinolinskog prstena i različitih supstituenata na terminalnoj amino grupi. Za još 13 spojeva pretpostavljena je visoka mogućnost prolaska kroz KMB, dok je jedino za spojeve ClAQn-14 i ClAQn-15, *n*-butilne i *n*-heksilne analoge s *N*-metil-2-metilimidazolom na terminalnoj amino grupi, procijenjena srednja mogućnost prolaska kroz KMB. Ovi rezultati djelomično su u skladu s procjenom bioraspoloživosti spojeva i njihovom mogućnošću prolaska kroz KMB na temelju *Lipinski rule of 5* (tablica 4.21.). Najznačajnija odstupanja vidljiva su u slučaju spojeva ClAQn-9, ClAQn-10, ClAQn-13, ClAQn-18, ClQn-19, ClAQn-21 i ClAQn-22 za koje je prema logBB vrijednostima procijenjena vrlo visoka ili visoka mogućnost prolaska kroz KMB, dok se prema pravilu Lipinskoga zbog prevelike lipofilnosti i broja rotacijskih veza pretpostavlja da ne mogu ući u središnji živčani sustav. Razlog neslaganja mogao bi biti u tome što se izračun logBB vrijednosti temelji na atomskoj lipofilnosti koja je, prema pravilu Lipinskoga, za navedene spojeve bila nešto veća od preporučenih graničnih vrijednosti, te polarnoj površini molekule, čije su vrijednosti bile unutar graničnih. No, pravilo Lipinskoga u obzir uzima i broj rotacijskih veza u molekuli, koji je kod navedenih 4-aminokinolina bio veći od granične preporučene vrijednosti. Nadalje, spojevima ClAQn-14 i ClAQn-15, čije su vrijednosti logP bile najniže, a vrijednosti PSA najviše u usporedbi s ostalim 4-amino-7-klorkinolinima u ovoj seriji, dok su im svi ostali parametri bili u granicama preporučenih vrijednosti prema pravilu Lipinskoga, procijenjena je dobra mogućnost prolaska kroz KMB. Međutim, prema njihovim logBB vrijednostima, ovim spojevima pretpostavljena je srednja mogućnost prolaska. I prema vrijednostima logBB i prema pravilu Lipinskoga, pretpostavlja se da je prolaznost kroz KMB moguća za 13 spojeva: ClAQn-1, ClAQn-2, ClAQn-3, ClAQn-4, ClAQn-5, ClAQn-6, ClAQn-7, ClAQn-8, ClAQn-11, ClAQn-12, ClAQn-16, ClAQn-17 i ClAQn-20, kod kojih je, uz iznimku spoja ClAQn-16, alkilna poveznica *n*-butilna ili *n*-heksilna.

U tablici 4.26. prikazane su izračunate vrijednosti logBB za spojeve iz skupine *O*-metiloksima.

Tablica 4.26. *In silico* procjena sposobnosti prolaska O-alkiloksima kroz KMB. Razina procjene temeljena je na izračunatoj vrijednosti logBB.

Razina procjene permeabilnosti kroz KMB				
O-metiloksimi				
0	1	2	3	4
–	–	MetOX-2, MetOX-3, MetOX-6, MetOX-7, MetOX-8	MetOX-5, MetOX-9	–
O-tert-butiloksimi				
0	1	2	3	4
tBuOX-17	tBuOX-3, tBuOX-4, tBuOX-5, tBuOX-6, tBuOX-8, tBuOX-9, tBuOX-10, tBuOX-11, tBuOX-13, tBuOX-14, tBuOX-15, tBuOX-16	–	tBuOX-7, tBuOX-12	tBuOX-1, tBuOX-2
O-benziloksimi				
0	1	2	3	4
BnzOX-17, BnzOX-19	BnzOX-3, BnzOX-4, BnzOX-5, BnzOX-6, BnzOX-7, BnzOX-9, BnzOX-10, BnzOX-11, BnzOX-13, BnzOX-14, BnzOX-15, BnzOX-16, BnzOX-18	BnzOX-1, BnzOX-2, BnzOX-8, BnzOX-12	–	–

Svim spojevima iz skupine O-metiloksima na temelju njihovih izračunatih logBB vrijednosti (tablica D8. u Dodatku) procijenjena je srednja ili niska mogućnost prolaska kroz KMB. Spojevi kojima je procijenjena niska mogućnost prolaska kroz KMB temeljem logBB vrijednosti (MetOX-5 i MetOX-9), prema pravilu Lipinskoga procijenjena je dobra mogućnost prolaska. Ti spojevi imaju nitro grupu na benzilnom supstituentu te su njihove logP vrijednosti (izračunate u tablici 4.24.) bile najnegativnije u ovoj podskupini O-alkiloksima (–1,816) što ih čini hidrofilnim molekulama, te se može prepostaviti da je upravo njihov hidrofilan karakter odgovoran za slabu procjenu pasivne difuzije kroz KMB na temelju logBB vrijednosti.

Većini analiziranih spojeva iz podskupine O-tert-butiloksima procijenjena je vrlo visoka ili visoka mogućnost prolaska kroz KMB na temelju njihovih logBB vrijednosti (tablica D8. u Dodatku). Iznimke su spojevi tBuOX-7 i tBuOX-12, koji na benzilnom kinuklidinskom supstituentu imaju nitro grupu, a za koje je procijenjena niska mogućnost prolaska kroz KMB. Ovi spojevi također su hidrofilni (logP vrijednosti u tablici 4.24.) što je vjerojatno ograničavajući faktor njihovog pasivnog prolaska kroz KMB. Za spojeve tBuOX-1 i tBuOX-2, s nesupstituiranim kinuklidinskim dušikom odnosno metilnom grupom na kinuklidinskom

dušiku, vrijednosti parametara bile su izvan granica pouzdanosti korištenog modela, zbog čega je njihova mogućnost prolaska kroz KMB nedefinirana.

Na temelju izračunatih logBB vrijednosti (tablica D8. u Dodatku), za sve spojeve iz skupine *O*-benziloksima pretpostavljena je vrlo visoka, visoka ili srednja mogućnost prolaska kroz KMB. Spojevi kojima je pretpostavljena srednja mogućnost prolaska kroz KMB (BnzOX-1, BnzOX-2, BnzOX-8, BnzOX-12) redom su spojevi s nesupstituiranim kinuklidinskim dušikom, metilnom grupom kao supstituentom na kinuklidinskom dušiku odnosno benzilnim supstituentom na koji je vezana nitro grupa. Benzilna grupa na oksimskom kisiku pridonijela je porastu lipofilnosti *O*-benziloksimskih spojeva u odnosu na njihove *O*-*tert*-butilne analoge (usporedba logP vrijednosti iz tablica 4.24.) što je vidljivo i iz procjena uspješnijeg prolaska kroz KMB *O*-benzilnih spojeva BnzOX-1, BnzOX-2, BnzOX-8 i BnzOX-12 u usporedbi s njihovim *O*-*tert*-butilnim analogima *t*BuOX-1, *t*BuOX-2, *t*BuOX-7 i *t*BuOX-12.

4.8.3. Procjena apsorpcije spojeva u ljudskom probavnom sustavu

Apsorpcija spojeva iz skupina 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice (slika 3.2.), 1,4-benzokinona (slika 3.5.) i hidrazona i *N*-acilhidrazona (slika 3.6.) u ljudskom probavnom sustavu procijenjena je na temelju njihove lipofilnosti (logP) i topološke polarne površine (tPSA). Izračuni su urađeni korištenjem *online* platforme pkCSM.¹⁹⁵ Rezultati su izraženi kao postotak apsorpcije u ljudskim crijevima.

Postoci apsorpcije 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice u ljudskom probavnom sustavu dani su u tablici 4.27.

Tablica 4.27. Izračunati postoci apsorpcije 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice u ljudskom probavnom sustavu.

SPOJ	% apsorpcije spoja u ljudskim crijevima	SPOJ	% apsorpcije spoja u ljudskim crijevima
CIAQn-1	88,9	CIAQn-12	85,0
CIAQn-2	85,5	CIAQn-13	84,7
CIAQn-3	87,2	CIAQn-14	91,8
CIAQn-4	83,8	CIAQn-15	88,8
CIAQn-5	87,4	CIAQn-16	88,1
CIAQn-6	84,0	CIAQn-17	90,6
CIAQn-7	88,0	CIAQn-18	87,6
CIAQn-8	84,7	CIAQn-19	86,9
CIAQn-9	83,9	CIAQn-20	90,0
CIAQn-10	84,3	CIAQn-21	87,1
CIAQn-11	87,9	CIAQn-22	86,4

Za 22 spoja iz skupine 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice izračunati su postoci apsorpcije spoja u ljudskim crijevima u rasponu 83,8 – 91,8 %. Budući da se slabom smatra apsorpcija manja od 30 %, ^{196,197} za sve spojeve pretpostavljeno je da će biti dobro apsorbirani u ljudskom probavnom sustavu.

Postoci apsorpcije 1,4-benzokinona u ljudskom probavnom sustavu dani su u tablici 4.28.

Tablica 4.28. Izračunati postoci apsorpcije 1,4-benzokinona različitih duljina poveznice u ljudskom probavnom sustavu.

SPOJ	% apsorpcije spoja u ljudskim crijevima	SPOJ	% apsorpcije spoja u ljudskim crijevima
<i>t</i> BQ	96,9	<i>t</i> BQ-8	95,0
<i>t</i> BQ-1	94,9	<i>t</i> BQ-9	94,2
<i>t</i> BQ-2	94,0	<i>t</i> BQ-10	94,7
<i>t</i> BQ-3	95,1	<i>t</i> BQ-11	88,4
<i>t</i> BQ-4	93,7	<i>t</i> BQ-12	88,4
<i>t</i> BQ-5	98,5	<i>t</i> BQ-13	93,1
<i>t</i> BQ-6	92,2	<i>t</i> BQ-14	93,3
<i>t</i> BQ-7	96,4		

Izračunati postoci apsorpcije 1,4-benzokinona u ljudskim crijevima bili su u rasponu od 88,4 – 98,5 % te, s obzirom da se radi o vrlo visokim postocima, za svih 15 spojeva procjenjena je mogućnost dobre apsorpcije u ljudskom probavnom sustavu.

Postoci apsorpcije hidrazona i *N*-acilhidrazona u ljudskom probavnom sustavu dani su u tablici 4.29.

Tablica 4.29. Izračunati postoci apsorpcije hidrazona i *N*-acilhidrazona različitih duljina poveznice u ljudskom probavnom sustavu.

SPOJ	% apsorpcije spoja u ljudskim crijevima	SPOJ	% apsorpcije spoja u ljudskim crijevima
HID1	90,3	AcHID1	68,9
HID2	71,6	AcHID2	65,8
HID3	89,9	AcHID3	69,4
HID4	89,0	AcHID4	69,9
HID5	93,5	AcHID5	63,3
HID7	93,0	AcHID6	62,9
HID8	92,1	AcHID7	66,4
		AcHID8	66,5

Prema izračunatim postocima apsorpcije hidrazona i *N*-acilhidrazona u ljudskim crijevima (62,9 – 93,5 %), procijenjeno je da će se svih 15 spojeva dobro apsorbirati u ljudskom probavnom sustavu. Valja uočiti da je za *N*-acilhidrazone predviđeno do 30% manje apsorpcije u usporedbi s hidrazonskim derivatima. Također, među piridoksalnim derivatima hidrazona, značajno niži postotak apsorpcije u odnosu na ostale pokazao je spoj HID2, s 2,4-dinitrofenilnim supstituentom, što upućuje da navedeni supstituent smanjuje mogućnost apsorpcije spoja u crijevima.

§ 5. RASPRAVA

Porast broja stanovništva, produljenje životnog vijeka i generalno starenje svjetske populacije uzrok su jednog od vodećih javnozdravstvenih problema u svijetu, a to je kontinuirani porast broja oboljelih od AB.^{2,3} Trenutno odobreni lijekovi za liječenje AB mogu se podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine lijekovi koji djeluju na simptome bolesti, a riječ je o inhibitorima kolinesteraza čiji je cilj povećati koncentracije neurotransmitera acetilkolina u mozgu te regulatorima glutamatergične neurotransmisije.^{11,12} Druga skupina lijekova usmjerena je na tretiranje uzroka bolesti, tj. usporavanje njezinog razvoja i tijeka, a radi se o monoklonalnim antitijelima koja sprječavaju agregaciju i taloženje amiloidnih plakova u mozgu. Ta skupina lijekova na tržištu je od 2021. godine, kada je odobren prvi lijek ove vrste.^{11–14} Budući da je patofiziologija AB vrlo kompleksna te se razvija kao posljedica poremećaja različitih bioloških procesa,^{1,6–9} bolest se ne razvija kod svakog pojedinca jednako pa tako ni učinak pojedinih lijekova nije isti kod svih oboljelih.² Stoga se unazad dva desetljeća počelo intenzivno istraživati koncept višeciljnih lijekova, odnosno molekula čije strukture sadrže dva ili više farmakofora koje mogu djelovati na više meta bolesti odjednom.^{15,16}

U sklopu ove doktorske disertacije istražena je biološka aktivnost spojeva s različitim strukturnim motivima i funkcionalnim grupama na nekoliko različitih meta uključenih u razvoj AB. Cilj disertacije bio je ustanoviti mogu li ispitivane skupine spojeva djelovati kao potencijalni višeciljni lijekovi za tretman AB. S obzirom na strukturne motive ili funkcionalne grupe, spojevi su bili podijeljeni u 6 glavnih skupina: 4-aminokinolini (63 spoja), derivati amodiakina (15 spojeva), 1,4-benzokinoni (15 spojeva), hidrazoni i *N*-acilhidrazoni (16 spojeva), *O*-alkiloksimi (45 spojeva) i karbamati (35 spojeva). Ukupno je testirano 189 spojeva. Budući da se dijagnoza AB danas još uvijek uglavnom postavlja kada je bolest već uznapredovala,² potreba za simptomatskim lijekovima koji bi bili djelotvorniji i/ili djelovali s manje nuspojava od trenutnih lijekova je velika. Stoga je svim spojevima prvo određena sposobnost inhibicije ljudskih kolinesteraza kako bi se utvrdilo imaju li predispoziciju za ublažavanje simptoma narušene neurotransmisije posredovane acetilkolinom. Budući da su istraživanja pokazala da aktivnost AChE u mozgu oboljelih od AB opada napredovanjem bolesti, dok se aktivnost BChE ne mijenja ili raste,⁶⁰ inhibitorni učinak svih spojeva ispitan je i na AChE i na BChE. Dodatno je i analiziran način vezanja spojeva u aktivno mjesto AChE,

budući da vezanje spoja u periferno aktivno mjesto AChE potencijalno može spriječiti nastanak toksičnih AChE-A β kompleksa.⁶¹ Nakon toga, probrani su spojevi koji su se pokazali najsnažnijim inhibitorima AChE i/ili BChE ili oni za koje je, s obzirom na strukturu i dostupne literaturne podatke, pretpostavljeno da će pokazati aktivnost prema nekim od sljedećih meta: BACE1, enzim uključen u produkciju amiloidnih peptida, a za koju se preporuča do 50 % inhibicije aktivnosti kako ne bi došlo do neželjenih nuspojava izazvanih narušavanjem homeostaze ostalih njenih supstrata,⁹⁷ samoagregaciju amiloidnih peptida A β 42, prisutnost oksidirajućih vrsta, poremećaj homeostaze biometala Fe, Cu i Zn i/ili aktivnost enzima MAO-A i MAO-B koji sudjeluju u metabolizmu neurotransmitera. Također, testiran je učinak spojeva na preživljenje SH-SY5Y, HepG2 i HEK293 stanica koje su odabrane kao model mozga, jetre i bubrega, kako bi se procijenila njihova mogućnost primjene *in vivo*. Primjenom *in silico* računskih metoda, određena su fizikalno-kemijska svojstva spojeva te je procijenjena njihova mogućnost prolaska kroz KMB i ulaska u središnji živčani sustav kao i apsorpcija u ljudskom probavnom sustavu. Dobiveni eksperimentalni i računalni podaci dali su uvid u odnos strukture i aktivnosti pojedinih spojeva te su omogućili izdvajanje onih molekula iz pojedinih serija koje pokazuju višestruke biološke aktivnosti i za koje je procijenjeno da imaju potencijal za razvoj višeciljnih lijekova za tretman AB ili daljnju derivatizaciju.

Skupina 4-aminokinolina bila je podjeljena u tri podskupine s obzirom na duljinu alkilne poveznice između aminokinolinskog prstena i terminalne amino grupe ili supstituent na položaju C(7) aminokinolinskog prstena: 4-amino-7-klorkinoline s *n*-oktilnom poveznicom (29 spojeva; slika 3.1), 4-amino-7-klorkinoline s poveznicom različitih duljina (22 spoja; slika 3.2) i 4-amino-7-trifluorometilkinoline s *n*-oktilnom poveznicom (12 spojeva; slika 3.3). Ova skupina spojeva odabrana je na temelju ranijih spoznaja da spojevi s 4-aminokinolinskom jezgrom i alkilnom poveznicom između nje i terminalne amino grupe pokazuju inhibitorna svojstva prema kolinesterazama u nanomolarnom i mikromolarnom području.^{126,198,199} Svi ovdje istraživani spojevi inhibirali su obje ljudske kolinesteraze s konstantama inhibicije K_i u nanomolarnom i niskom mikromolarnom koncentracijskom području.

4-amino-7-klorkinolini s *n*-oktilnom poveznicom generalno su se pokazali najsnažnijim inhibitorima kolinesteraza od svih istraženih 4-aminokinolina, pri čemu se ističe spoj CIAQ-8, s *m*-fluorbenzilnim supstituentom na terminalnoj amino grupi, čije su konstante inhibicije iznosile $K_i(\text{hAChE}_{\text{rec}}) = 0,0032 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ i $K_i(\text{hBChE}) = 0,0084 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.¹⁹⁸ Spoj CIAQ-8 također je pokazao sposobnost inhibicije aktivnosti BACE1 (16 % pri $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji)

te inhibicije samoagregacije peptida A β 42 (23,6 %). Derivatizacijom spoja CIAQ-8, istražen je utjecaj uvođenja dodatnog halogenog elementa na benzilni supstituent na inhibitornu sposobnost derivata prema kolinesterazama i BACE1. Inhibitorna aktivnost prema kolinesterazama tako dobivenih spojeva smanjila se u odnosu na CIAQ-8 (tablica 4.1). Među tim derivatima najpotentnijim inhibitorom kolinesteraza pokazao se spoj CIAQ-28, s 2,5-difluorbenzilnim supstituentom, koji je obje kolinesteraze u prosjeku inhibirao oko 4 puta slabije u usporedbi s CIAQ-8. Nadalje, isti spoj nije pokazao sposobnost inhibicije BACE1, što upućuje na nepovoljan utjecaj dodatnog halogenog supstituenta na benzilnoj grupi na inhibitornu sposobnost prema BACE1. Kako bi se ustanovilo utječe li supstituent na poziciji C(7) aminokinolinskog prstena na inhibitornu aktivnost spojeva prema kolinesterazama i BACE1, sintetizirani su analozi odabranih 4-amino-7-klorkinolina iz rada Matošević i suradnika¹⁹⁸ s trifluormetilnom grupom na poziciji C(7). Za 5 spojeva određene su konstante inhibicije niže od 10 nmol L⁻¹ prema barem jednoj od kolinesteraza (tablica 4.3.). Pritom su se istaknuli spojevi CF₃AQ-1, analog spoja CIAQ-8, koji je hBChE inhibirao s nešto nižom konstantom inhibicije u usporedbi s CIAQ-8, i spoj CF₃AQ-12, s 2-metilbenzotiofenom kao supstituentom (analog spoja CIAQ-24),¹⁹⁸ koji je hBChE inhibirao približno dva puta snažnije u usporedbi s CIAQ-8 i svojim analogom CIAQ-24. No, navedeni derivati nisu pokazali sposobnost inhibicije BACE1, što upućuje da je zamjena klora s trifluormetilnom grupom na poziciji C(7) aminokinolinskog prstena djelovala nepovoljno na inhibitornu aktivnost spojeva prema BACE1.

Kada je riječ o 4-amino-7-klorkinolima s različitom duljinom alkilne poveznice između terminalne amino grupe i aminokinolinskog prstena, istraživani su spojevi čija je terminalna amino grupa supstituirana heterocikličkim sustavima (poput benzofurana, benzotiofena, indola, piridina i pirazola). Ovi spojevi sintetizirani su po uzoru na strukturno slične *n*-oktilne spojeve iz rada Matošević i suradnika koji su inhibirali obje kolinesteraze u submikromolarnom koncentracijskom području.¹⁹⁸ Varijacijom duljine alkilne poveznice između aminokinolinskog prstena i terminalne amino grupe cilj je bio proučiti utjecaj duljine poveznice spojeva s heterocikličkim supstituentima na inhibitorni potencijal prema kolinesterazama i BACE1. Uočeno je da spojevi s *n*-butilnom i *n*-heksilnom poveznicom generalno slabije inhibiraju obje kolinesteraze u usporedbi s njihovim *n*-oktilnim analogima (tablica 4.2.). Ovaj efekt ranije je primjećen kod 4-aminokinolinskih derivata s različitim supstituentima na terminalnoj grupi (primarni amin, različito supstituirani sekundarni i tercijarni amini, hidroksilna grupa).^{126,199}

Tako se najpotentnijim inhibitorom kolinesteraza pokazao spoj ClAQn-13, s *N*-metil-2-metilindolnim supstituentom i *n*-oktilnom poveznicom. Ovaj spoj ujedno predstavlja najpotentniji inhibitor kolinesteraza među u ovoj disertaciji testiranim 4-aminokinolinima, s konstantama inhibicije $K_i(\text{hAChE}_{\text{rec}}) = 0,0027 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $K_i(\text{hBChE}) = 0,0017 \mu\text{mol L}^{-1}$. No, od 14 testiranih aminokinolina s različitom duljinom poveznice, gotovo svi su inhibirali manje od 5 % aktivnosti BACE1, što sugerira da kombinacije duljina poveznice i heterocikličkih sustava ovdje sintetiziranih spojeva nisu pogodovala njihovoj inhibitornoj aktivnosti prema BACE1, budući da je spojevima ClAQ-20, s 3-metilpiridinom kao supstituentom, i ClAQ-25, s 3-metilbenzotiofenom, kod kojih je poveznica *n*-oktilna, izmjerena inhibitorna aktivnost prema BACE1 18,3 odnosno 14,3 %. Spojevima iz ove podskupine 4-aminokinolina (njih 20) također je određen inhibicijski potencijal prema monoamin-oksidadama MAO-A i MAO-B. Svi testirani spojevi inhibirali su MAO-A ($\text{IC}_{50} = 3,3 - 40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), dok su 4 spoja (ClAQn-2, ClAQn-4, ClAQn-6 i ClAQn-8) inhibirali i MAO-B ($\text{IC}_{50} = 1,1 - 5,4 \mu\text{mol L}^{-1}$). Nadalje, za spojeve ClAQn-2 i ClAQn-13 utvrđeno je da keliraju ione biometala Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} , dok je ClAQn-4 kelirao Fe^{2+} i Cu^{2+} , a spoj ClAQn-8 kelirao je samo Fe^{2+} . Temeljem dobivenih rezultata, ova podskupina spojeva predstavlja dualne inhibitore kolinesteraza i monoamin-oksidadu sa sposobnošću keliranja biometalnih iona, pri čemu se ističu spojevi ClAQn-13, kao snažan inhibitor AChE i BChE te selektivni inhibitor MAO-A ($\text{IC}_{50} = 3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) koji djeluje i kao kelator Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} iona, te spojevi ClAQn-2, s 2-metilbenzofuranom, i ClAQn-4, s 2-metilbenzotiofenom kao supstituentom na benzilnoj grupi, kao selektivni inhibitori BChE i inhibitori oba MAO enzima s kelirajućim svojstvima. No, kako bi se ovi spojevi mogli uzeti u obzir za razvoj potencijalnih lijekova, treba uzeti u obzir da su gotovo svi pokazali toksičnost prema SH-SY5Y, HepG2 i HEK293 stanicama s IC_{50} vrijednostima u niskom mikromolarnom području ($1 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$), što upućuje da je za njihovu primjenu *in vivo* potrebno optimirati strukturu kako bi se smanjila toksičnosti i/ili povećala aktivnost prema MAO enzimima.

Generalno, svi ovdje istraženi 4-aminokinolini, zahvaljujući vrlo jakom inhibicijskom učinku prema kolinesterazama, pokazuju potencijal za razvoj simptomatskih lijekova za AB. Pritom su inhibitorne aktivnosti prema ljudskim kolinesterazama svih ispitanih spojeva bile veće ili slične onima donepezila ($K_i(\text{AChE}) = 0,024 \mu\text{mol L}^{-1}$; $K_i(\text{BChE}) = 2,33 \mu\text{mol L}^{-1}$).²¹⁷ Predikcije prolaznosti kroz KMB za većinu spojeva predviđaju mogućnost prolaska. 4-amino-7-klorkinolini s *n*-oktilnom poveznicom pri niskim mikromolarnim koncentracijama također inhibiraju BACE1 (do 18,3 %) te samoagregaciju A β 42 peptida (16,2 – 36,7 %), dok spojevi s

varijabilnom duljinom poveznice djeluju kao inhibitori kolinesteraza i MAO enzima. Kao primjer potentnih inhibitora s višeciljnim djelovanjem izdvajaju se spojevi CIAQ-8, koji inhibira obje kolinesteraze u nanomolarnom području, dok u niskom mikromolarnom koncentracijskom području inhibira i BACE1 i samoagregaciju amiloidnih peptida, te CIAQn-13, koji također inhibira obje kolinesteraze pri niskim nanomolarnim koncentracijama, te MAO-A u niskom mikromolarnom koncentracijskom području. Oba spoja također pokazuju sposobnost keliranja biometalnih iona Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} (za CIAQ-8 određeno u radu Matošević i suradnika¹⁹⁸) čime mogu regulirati njihovu koncentraciju i potencijalnu asocijaciju s amiloidnim plakovima. Strukture istaknutih spojeva prikazane su na slici 5.1. na kraju poglavlja. Većina 4-aminokinolina djelovala je kao mješoviti ili nekompetitivni inhibitori AChE, što pretpostavlja vezanje u periferno aktivno mjesto enzima zbog čega postoji mogućnost da mogu spriječiti i nastanak toksičnih AChE-A β kompleksa.⁶¹

Derivati amodiakina za istraživanje su odabrani s obzirom na njihovu strukturu, koja sadrži 4-aminokinolinski prsten. Ovu skupinu spojeva činio je amodiakin i 14 spojeva dobivenih promjenom supstituenta i/ili položaja supstituenta na kinolinskom prstenu ili tercijarnom aminu amodiakina (slika 3.4). Gotovo svi spojevi iz ove serije pokazali su se selektivnim inhibitorima AChE, koju su inhibirali u submikromolarnom području (tablica 4.4). Antikolinesteraznom aktivnošću istaknuli su se amodiakin i njegov derivat AMQ-5, kod kojeg se na poziciji C(7) aminokinolinskog prstena umjesto atoma klora nalazi metoksi grupa, koji je u usporedbi s amodiakinom dva puta snažnije inhibirao $\text{hAChE}_{\text{rec}}$ ($K_i = 0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$). Svim derivatima amodiakina utvrđena je i sposobnost keliranja iona biometala Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} , dok je spoj AMQ-5 pokazao i antioksidacijski potencijal temeljen na prijenosu elektrona u razini standardnog antioksidansa BHT-a²¹⁸ što taj spoj izdvaja kao potencijalni višeciljni ligand koji djeluje na tri mete AB (struktura AMQ-5 prikazana je na slici 5.1.). Također, ova skupina spojeva nije pokazala toksičnost prema SH-SY5Y, HEK293 ni HepG2 stanicama pri koncentracijama u kojima ostvaruju biološku aktivnost, dok su *in silico* analize pretpostavile dobru prolaznost kroz KMB i apsorpciju u ljudskom probavnom sustavu²¹⁸ čime pokazuju potencijal za razvoj lijekova s djelovanjem u središnjem živčanom sustavu.

Skupinu 1,4-benzokinona činilo je 15 spojeva (slika 3.5) s različitim supstituentima u *meta*- ili *para*-položaju s obzirom na *tert*-butilnu grupu. Ova skupina spojeva za istraživanje je odabrana na temelju poznatih antioksidacijskih svojstava spojeva koji sadrže benzokinon u strukturi.¹³³ 12 spojeva inhibiralo je obje kolinesteraze, pri čemu je raspon konstanti K_i za

$\text{hAChE}_{\text{rec}}$ iznosio $21 - 136 \mu\text{mol L}^{-1}$, dok je za hBChE iznosio $5,2 - 55 \mu\text{mol L}^{-1}$. Antikolinesteraznom aktivnošću istaknuo se spoj *t*BQ-4, s tiociklopentanom u *para*-položaju s obzirom na *tert*-butilnu grupu, čije su konstante inhibicije iznosile $5,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ za hBChE i $29 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $\text{hAChE}_{\text{rec}}$. Nadalje, odabranim spojevima testirana je i njihova sposobnost inhibicije BACE1 te antioksidacijska aktivnost temeljena na prijenosu vodikovog atoma. Inhibitornom aktivnošću prema BACE1 istaknuli su se spojevi *t*BQ-8 (27,4 %) i *t*BQ-9 (26,2 %) s 2-feniletanolom odnosno 2-naftotiolom u *meta*-položaju s obzirom na *tert*-butilnu grupu. Oko dva puta slabiju inhibitornu aktivnost pokazao je spoj *t*BQ-6 (16,7 %), kod kojeg se na istom položaju nalazi 4-hidroksitiobenzen. Antioksidacijskom aktivnošću ističu se spojevi *t*BQ-6 i *t*BQ-14, kod kojeg se na *meta*-položaju nalazi fenilalanin. Oba spoja pokazala su veći ili jednaki antioksidacijski kapacitet u usporedbi s Trolox-om. Svim spojevima *in silico* analizom fizikalno-kemijskih svojstava pretpostavljena je mogućnost prolaska kroz KMB i bioraspoloživost u središnjem živčanom sustavu. Prema ovim rezultatima, spoj *t*BQ-4 pokazuje potencijal za derivatizaciju i razvoj selektivnog inhibitora BChE, no slab inhibitorni učinak prema BACE1 (11 %) i oko 4,5 puta manji antioksidacijski kapacitet u usporedbi s Trolox-om ne predstavljaju ga potencijalnim višeciljnim ligandom. S druge strane, spojevi *t*BQ-8 i *t*BQ-9, koji inhibiraju obje kolinesteraze s prosječnom vrijednošću K_i oko $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, pokazuju potencijal za razvoj dualnih ChE/BACE1 inhibitora, dok spojevi *t*BQ-6 i *t*BQ-14, s konstantama K_i za obje kolinesteraze u rasponu $23 - 59 \mu\text{mol L}^{-1}$ predstavljaju inhibitore kolinesteraza s antioksidirajućim djelovanjem. Strukture spojeva *t*BQ-6, *t*BQ-8, *t*BQ-9 i *t*BQ-14 prikazane su na slici 5.1.

Spojevi koji u strukturi sadrže motiv hidrazona za istraživanje su odabrani na temelju literaturnih podataka o inhibitornoj aktivnosti hidrazonskih spojeva prema kolinesterazama i BACE1, kao i njihovim antioksidacijskim i kelirajućim svojstvima.^{140–150} Hidrazoni i *N*-acilhidrazoni činili su skupinu u kojoj je bilo 8 hidrazonskih derivata piridoksala i piridin-4-karbaldehida, dok su preostalih 8 spojeva bili *N*-acilhidrazonski derivati piridoksala. Spojevi su se razlikovali po supstituentu na fenilnoj grupi. (slika 3.6). 14 spojeva inhibiralo je obje kolinesteraze s vrijednostima K_i u mikromolarnom koncentracijskom području, pri čemu su se hidrazonski derivati piridoksala pokazali snažnijim inhibitorima obiju kolinesteraza (tablica 4.6.). Istaknuli su se spojevi HID1, kao selektivni inhibitor BChE ($K_i = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$), HID2, koji je selektivno inhibirao AChE ($K_i = 16 \mu\text{mol L}^{-1}$) te spoj HID4 koji je inhibirao obje kolinesteraze s prosječnom vrijednosti K_i oko $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. Svim spojevima, osim HID6,

određen je i inhibitorni potencijal prema BACE1, sposobnost inhibicije samoagregacije amiloidnih peptida te antioksidacijski kapacitet temeljen na prijenosu elektrona. Svi testirani spojevi pri $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji inhibirali su 21,7 – 69,0 % aktivnosti BACE1, pri čemu su se generalno snažnijim inhibitorima pokazali hidrazoni u odnosu na *N*-acilhidrazone (slika 4.13.). Spojevi HID1 i HID4 uz antikolinesteraznu aktivnost pokazali su i zadovoljavajući inhibitorni potencijal prema BACE1, 33,4% odnosno 40,3%, što odgovara preporučenim do 50 % inhibicije aktivnosti BACE1 kako se ne bi narušila homeostaze ostalih supstrata BACE1.⁹⁷ HID2 je pri $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji inhibirao više od 50 % aktivnosti BACE1 (69,0 %) što bi moglo dovesti do prekomjerne inhibicije njene aktivnosti i neželjenih nuspojava, no pri $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji pokazao je inhibitornu aktivnost sličnu kao i HID1 i HID4 (34,8 %) što ulazi u preporučena ograničenja. Svi testirani spojevi također su inhibirali samoagregaciju peptida A β 42 (11,3 – 37,2 %), pri čemu su generalno snažniji inhibitor bili *N*-acilhidrazoni (slika 4.18.). Spojevi HID1 (26,1 %), HID2 (22,0 %) i HID4 (23,9 %) pokazali su sličan inhibicijski potencijal prema samoagregaciji amiloidnih peptida. Kada je riječ o antioksidacijskom kapacitetu, istaknuli su se hidrazonski derivati koji su pokazali do 2 puta snažniji redukcijski potencijal u usporedbi s Trolox-om (slika 4.24.). Jedina iznimka bio je HID2, koji je pokazao oko 9 puta slabiji redukcijski potencijal u usporedbi s ostalim hidrazonima. Dodatna istraživanja pokazala su da svi ovdje testirani spojevi također posjeduju sposobnost keliranja Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} .²¹⁹ Temeljem *in silico* analiza fizikalno-kemijskih svojstava, svim spojevima procijenjena je dobra ili ograničena mogućnost prolaska kroz KMB (tablica 4.23.) kao i visok postotak apsorpcije u ljudskom probavnom sustavu (tablica 4.29.). Svi rezultati upućuju na veliki potencijal za razvoj ovdje testiranih hidrazonskih derivata piridoksala kao višeciljnih lijekova za tretman AB, pri čemu se ističu spojevi HID1, kao selektivni inhibitor BChE, i HID4, kao inhibitor AChE/BChE, koji oboje pokazuju inhibitorni potencijal prema BACE1 i samoagregaciji amiloidnih peptida te kelirajuća svojstva i veliki antioksidacijski kapacitet pri koncentracijama do $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Spoj HID2, uz ograničenje slabe topljivosti pri koncentracijama većima od $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, predstavlja selektivni inhibitor hAChE uz dodatni inhibitorni potencijal prema BACE1 i samoagregaciji A β 42 te sposobnost keliranja biometala pri koncentracijama do oko $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Budući da se navedeni spojevi ponašaju kao mješoviti (HID1 i HID4) odnosno nekompetitivni inhibitori (HID2) hAChE_{rec} te ostvaruju interakcije s njenim perifernim mjestom, pretpostavlja se da sva tri spoja imaju mogućnost

sprječavanja nastanka neurotoksičnih kompleksa AChE-A β .⁶¹ Strukture spojeva HID1, HID2 i HID4 prikazane su na slici 5.1.

Spojevi iz skupine *O*-alkiloksima (slike 3.7 – 3.9) bili su podijeljeni u 3 serije s obzirom na supstituent na oksimskom kisiku: *O*-metiloksimi (9 spojeva), *O*-*tert*-butil-oksimi (17 spojeva) i *O*-benziloksimi (19 spojeva). Naj snažnijim inhibitorima obiju kolinesteraza pokazali su se *O*-benziloksimi čije su vrijednosti konstanti inhibicije K_i bile u rasponu 0,079 – 360 $\mu\text{mol L}^{-1}$, nakon kojih su slijedili *O*-*tert*-butiloksimi ($K_i = 2,3 - 414 \mu\text{mol L}^{-1}$), dok su najslabiji inhibitori obiju kolinesteraza bili *O*-metiloksimi ($K_i = 14 - 154 \mu\text{mol L}^{-1}$). Generalno su svi testirani *O*-alkiloksimi bili selektivniji prema hBChE. Ističu se BnzOX-18, s *p*-*tert*-butilbenzilnim supstituentom na kinuklidinskom dušiku, BnzOX-16, s 2-klor-6-fluorbenzilnim supstituentom i BnzOX-15, s 3,5-difluorbenzilom, koji su u prosjeku oko 330 puta snažnije inhibirali hBChE. Iz serije *O*-*tert*-butiloksima kao selektivni inhibitori hBChE istaknuli su se spojevi *t*BuOX-16, s *p*-*tert*-butilbenzilnim supstituentom na kinuklidinskom dušiku, *t*BuOX-6, s *p*-brombenzilnim supstituentom, i *t*BuOX-8, s *p*-toluenom kao supstituentom koji su bili 59, 17 odnosno 31 puta snažniji inhibitori hBChE u odnosu na hAChE_{rec}. Najpotentnijim inhibitorima kolinesteraza iz sve tri serije *O*-alkiloksima testirana je inhibitorna sposobnost prema BACE1 i samoagregaciji amiloidnih peptida. Niti jedan testirani spoj nije pokazao inhibitorski potencijal prema BACE1 pri 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji (slika 4.14.). Kada je riječ o inhibiciji amiloidne samoagregacije, spojevi *t*BuOX-6 i *t*BuOX-8 inhibirali su oko 15 % posto samoagregacije peptida A β 42 (slika 4.19.). Oko 16 % inhibicije amiloidne samoagregacije pokazali su i *O*-benziloksimi BnzOX-10 i BnzOX-12. Ovi spojevi također su se pokazali značajno selektivnijim inhibitorima hBChE u odnosu na hAChE_{rec} (74 odnosno 13 puta selektivniji), ali su bili otprilike 4 puta slabiji inhibitori hBChE u usporedbi s BnzOX-16 i BnzOX-18. S obzirom na sve rezultate, BnzOX-16 i BnzOX-18 pokazuju potencijal za razvoj selektivnih inhibitora BChE s obzirom da pokazuju snažniji inhibitorski učinak prema ovoj kolinesterazi u usporedbi s trenutno odobrenim lijekovima donepezilom i galantaminom.²¹⁷ No, kod ovih spojeva ne očekuje se višeciljni učinak s obzirom na druge testirane mete (BACE1, samoagregacija peptida A β 42). Spojevi BnzOX-10 i BnzOX-12 pokazuju potencijal za razvoj dualnih inhibitora BChE i amiloidne samoagregacije čime bi mogli djelovati na raniji stadij bolesti, odnosno prevenciju nakupljanja amiloidnih plakova, te na kasniji stadij kada dolazi do povećanja aktivnosti BChE.⁶⁰ Navedeni spojevi nisu pokazali toksičnost prema SH-SY5Y i HepG2 stanicama pri koncentracijama do 100 (za BnzOX-16 i BnzOX-18) odnosno 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (za BnzOX-10 i BnzOX-12), dok im

in silico analize na temelju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava predviđaju mogućnost prolaska kroz KMB. Strukture potencijalnih višeciljnih liganada, spojeva BnzOX-10 i BnzOX-12, dane su na slici 5.1.

Skupina karbamata bila je podijeljena na kinuklidinske karbamate (5 spojeva), karbamatne derivate cinkonidina i cinkonina (5 spojeva), monokarbatne derivate bambuterola (14 spojeva) i biskarbatne derivate bambuterola (11 spojeva). Svi spojevi djelovali su kao vremenski ovisni (progresivni) inhibitori obiju kolinesteraza, uz izraženu selektivnost prema hBChE. Konstante brzine inhibicije svih karbatnatnih spojeva određene su u prethodnim istraživanjima^{22–25} te su prikazane u tablicama D2. – D6. u Dodatku.

Generalno, najsnažniji inhibitorni potencijal pokazali su biskarbatni derivati bambuterola čije su konstante brzine inhibicije k_i bile u rasponu $0,00109 - 38,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za obje kolinesteraze.^{24,25} Pritom se istaknuo spoj PIBK-2, s karbatnatnim i aminskim dušicima unutar piperidinskog sustava, čije su konstante brzine inhibicije k_i za hAChE i hBChE iznosile $0,0382$ odnosno $38,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. No, niti jedan testirani biskarbat nije pri $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji inhibirao 10 ili više posto aktivnosti BACE1. Kada je riječ o inhibiciji amiloidne samoagregacije, spoj PIBK-2 inhibirao je 17,7 % samoagregacije peptida A β 42, čime ovaj spoj pokazuje mogući dualni inhibicijski učinak prema kolinesterazama i samoagregaciji amiloidnih peptida. S obzirom da ovaj spoj nije pokazao toksičnost prema staničnim linijama SH-SY5Y, HepG2 i HEK293, a posjeduje sposobnost keliranja Fe^{2+} i Zn^{2+} iona te zadovoljava gornje granične vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava spojeva koji prolaze kroz KMB,^{24,25} spoj PIBK-2 predstavlja izrazito brzi inhibitor hBChE (gotovo 700 puta brži u usporedbi s odobrenim lijekom rivastigminom)²⁵ s mogućim višeciljnim djelovanjem na samoagregaciju amiloidnih peptida i kelirajućim svojstvima. Struktura spoja PIBK-2 prikazana je na slici 5.1. Što se tiče monokarbatnatnih derivata bambuterola, ti spojevi pokazali su se sporijim inhibitorima hAChE i hBChE u usporedbi s biskarbatima, s konstantama brzine k_i u rasponu $0,0044 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ do $4,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za obje kolinesteraze, pri čemu pokazuju selektivnost prema hBChE (A. Matošević rukopis u pripremi; tablica D5 u Dodatku). Kao vrlo brzi i selektivni inhibitori hBChE iz ove skupine ističu se spojevi 5MPI, s karbatnatnim i aminskim dušikom unutar piperidinskog sustava, 1MP, s karbatnatnim dušikom unutar pirolidinskog sustava te aminskim dušikom supstituiranim *tert*-butilom, i 5MDE, s dietilaminom na karbatnatnom dušiku i aminskim dušikom unutar piperidinskog sustava. Svim spojevima testirana je i sposobnost inhibicije amiloidne samoagregacije, pri čemu se izdvajaju

spojevi 5MDE i 5MPI koji su inhibirali 27,7 % odnosno 31,7% samoagregacije A β 42 peptida. Također je ispitan inhibitorni učinak monokarbamatnih derivata bambuterola na aktivnost MAO-A i MAO-B enzima. Budući da su svi spojevi pri 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji pokazali do 50 % inhibicije obaju enzima, za njih nije određivana IC₅₀ vrijednost. Na temelju ovih rezultata izdvajaju se spojevi 5MDE i 5MPI kao vrlo brzi i selektivni inhibitori hBChE (otprilike 70 puta brži u odnosu na rivastigmin)²⁵ koji također posjeduju sposobnost inhibicije amiloidne samoagregacije. Strukture spojeva 5MDE i 5MPI prikazane su na slici 5.1.

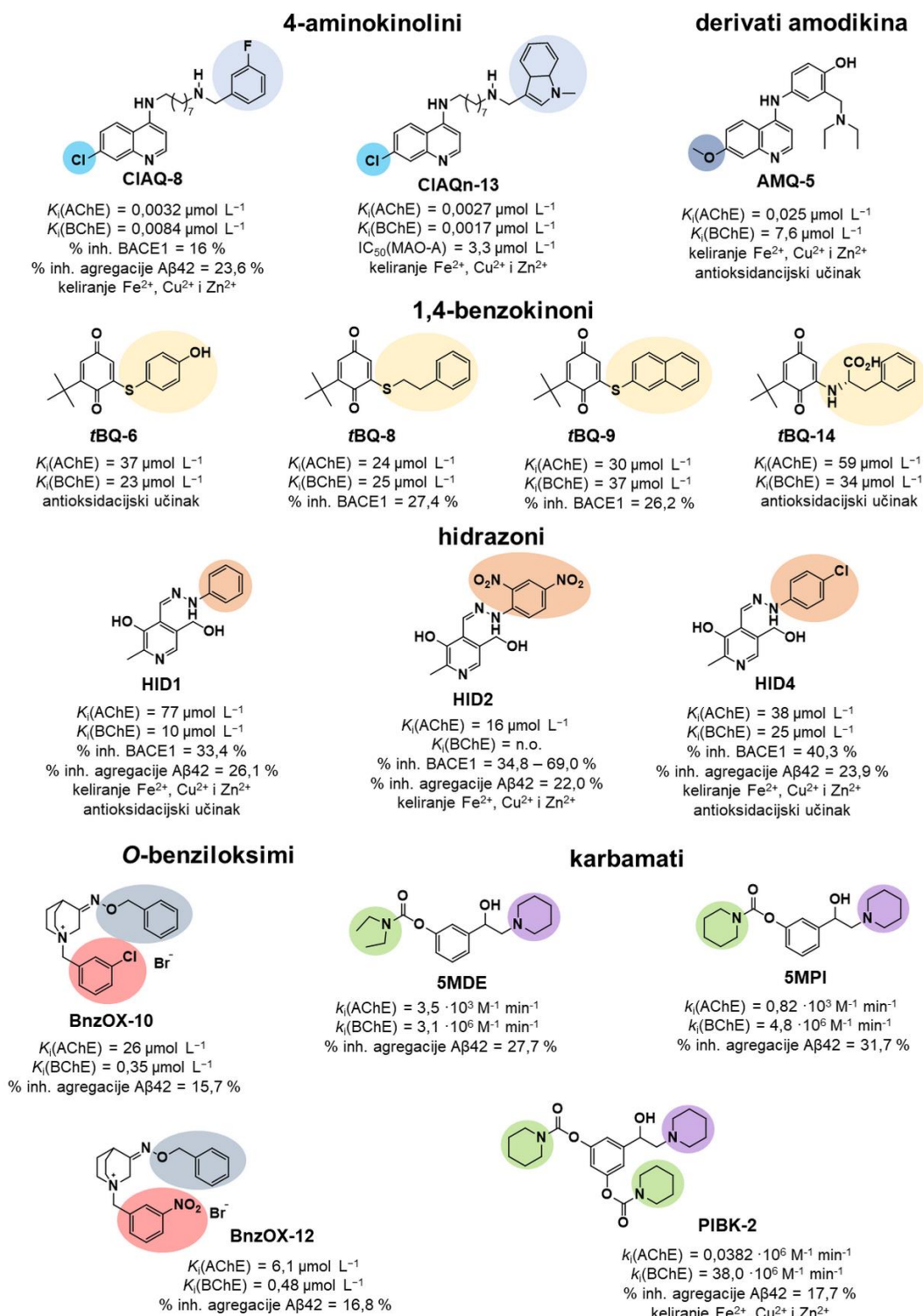
Iz podskupine kinuklidinskih karbamata u ovoj disertaciji istraživani su spojevi za koje je na temelju strukture pretpostavljeno da bi mogli pokazati inhibitornu aktivnost prema BACE1 i samoagregaciji amiloidnih peptida: DMK-1, s dimetilnom grupom na karbamatnom dušiku i nesupstituiranom kinuklidinskom dušiku, DEK-1, s dietilnom grupom na karbamatnom dušiku i nesupstituiranim kinuklidinskim dušikom, te spojevi BnzK-1, BnzK-2 i BnzK-3 kod kojih se na karbamatnom dušiku nalazi fenil, a na kinuklidinskom dušiku ili nema supstituenta ili je riječ o benzilnoj odnosno *m*-klorbenzilnoj grupi. Navedeni spojevi inhibirali su obje kolinesteraze s rasponom k_i vrijednosti 1,0 – 3,8 · 10³ M⁻¹ min⁻¹.²² Odabrani spojevi inhibirali su 9,7 – 15,0 % aktivnosti BACE1 (slika 4.15. A)) pri 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji, dok se spoj BnzK-3 istaknuo i kao inhibitor amiloidne samoagregacije (30 %) (slika 4.20). Na temelju ovih rezultata izdvaja se spoj BnzK-3 kao progresivni neselektivni inhibitor kolinesteraza koji posjeduje i sposobnost sprječavanja agregacije amiloidnih peptida.

Derivati karbamata cinkonidina (CD) i cinkonina (CN) istraživani u ovoj doktorskoj disertaciji (CD-1, CD-3, CD-4, CD-6 i CN-2) inhibirali su obje kolinesteraze s konstantama k_i u rasponu 0,55 – 3,65 · 10³ M⁻¹ min⁻¹.²³ Najbržim inhibitorom obiju kolinesteraza pokazao se spoj CN-2, čiji je karbamatni dušik supstituiran dietilnom grupom. Također je testirana inhibitorna aktivnost spojeva prema BACE1, pri čemu se istaknuo spoj CD-6, s etilnim supstituentom na karbamatnom dušiku, koji je inhibirao 20,9 % aktivnosti enzima pri 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji (slika 4.15. B)). Nadalje, svih 5 spojeva inhibiralo je samoagregaciju peptida A β 42 za 15,4 – 27,8 % (slika 4.21.). Najsnažnijim inhibitorima pokazali su se spoj CD-6 (27,8 %) i CD-1 (26,5 %), čiji je karbamatni dušik supstituiran dimetilnom grupom. Niti jedan spoj iz ove skupine nije inhibirao aktivnost ni jednog MAO enzima pri 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji. S obzirom na dobivene rezultate, iako je spoj CD-6 otprilike 2 do 3 puta sporiji inhibitor kolinesteraza u usporedbi s CN-2, s obzirom na njegovu sposobnost inhibicije BACE1 i samoagregacije

amiloidnih peptida može se smatrati da ovaj spoj ima potencijal za razvoj višeciljnog liganda za tretman AB.

Osim što je iz svake skupine spojeva izdvojen najmanje jedan spoj koji uz snažan inhibicijski potencijal prema hAChE i/ili hBChE pokazuje i učinak prema barem još jednoj meti u AB, na temelju analize različitih bioloških učinaka svih ovdje istraživanih skupina spojeva, moguće je postaviti određene smjernice za dizajn liganada s potencijalnim višeciljnim djelovanjem prema različitim metama AB. Ovdje testirani 4-aminokinolini i derivati amodiakina predstavljaju dobru okosnicu za dizajn inhibitora ljudskih kolinesteraza s konstantama inhibicije u submikromolarnom koncentracijskom području i kelirajućim svojstvima, pri čemu je poželjno da je poveznica između 4-aminokinolinskog prstena i terminalnog supstituenta *n*-oktilna. Kinuklidinski *O*-benzil i *O*-tert-butiloksimi sa supstituiranim kinuklidinskim dušikom također predstavljaju strukture s vrlo jakim inhibitornim potencijalom prema hBChE, pri čemu valja uzeti u obzir da, kako bi se izbjegla toksičnost spojeva, supstituent na kinuklidinskom dušiku ne smije biti vrlo hidrofoban, poput dugačkih alkilnih lanaca ili više od jedne *tert*-butilne grupe. U slučaju karbamata, monokarbatni i biskarbatni derivati bambuterola predstavljaju izrazito brze i selektivne inhibitore hBChE s potencijalnim inhibitornim učinkom na samoagregaciju amiloidnih peptida, pri čemu je poželjno da je aaminski i/ili karbatni dušik dio cikličkog sustava piperidina. Hidrazonski derivati piridoksala i fenila (s ili bez elektron-odvlačećeg supstituenta) pokazali su inhibitorni učinak prema BACE1, amiloidnoj samoagregaciji te antioksidirajuća i kelirajuća svojstva. Kombinacija hidrazonskog derivata piridoksala ili fenila (kako bi se smanjila molekulska masa) s ovdje opisanim 4-aminokinolinima, oksimima ili karbatima mogla bi dati spoj koji uz snažan inhibitorni učinak prema kolinesterazama posjeduje i sposobnost inhibicije nastanka amiloidnih peptida kao i sprječavanja njihovog samoudruživanja te antioksidirajuća svojstva. Isto vrijedi i za 1,4-benzokinone, koji zbog svoje male molekulske mase predstavljaju interesantan fragment s antioksidirajućim svojstvima i inhibitornim učinkom prema BACE1, pogodan za povezivanje s drugim strukturama putem tiolne ili aminske poveznice.

Strukture svih izdvojenih ovdje istraženih spojeva s višestrukim biološkim aktivnostima dane su na slici 5.1.



Slika 5.1. Strukture spojeva s višeciljnim djelovanjem prema različitim metama AB odabrane na temelju testiranja bioloških aktivnosti 189 spojeva iz 6 skupina (4-aminokinolini, derivati amodiakina, 1,4-benzokinoni, hidrazoni i *N*-acilhidrazoni, *O*-alkiloksimi, karbamati). Bojama su označeni različiti strukturni motivi koji su kod pojedinih skupina spojeva rezultirali najsnažnijim biološkim aktivnostima.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Mogućnost višeciljnog djelovanja prema biološkim metama AB testirana je za ukupno 189 spojeva podijeljenih u 6 glavnih skupina s obzirom na strukturne motive: 4-aminokinolini (63 spoja), derivati amodiakina (15 spojeva), 1,4-benzokinoni (15 spojeva), hidrazoni i *N*-acilhidrazoni (16 spojeva), *O*-alkiloksimi (45 spojeva) i karbamati (35 spojeva).
- Svim spojevima ispitana je sposobnost inhibicije ljudskih AChE i BChE, a odabranim inhibitorima kolinesteraza (prema jačini inhibicije ili strukturnim elementima) ispitana je i mogućnost inhibicije BACE1, amiloidne samoagregacije i MAO enzima, te mogući antioksidacijski učinak i/ili kelirajuća svojstva
- 184 spoja inhibirala su barem jednu ljudsku kolinesterazu
- 4-aminokinolini inhibirali su obje kolinesteraze s konstantama inhibicije K_i u nanomolarnom ili niskom mikromolarnom koncentracijskom području, a pojedini spojevi pokazali su sposobnost inhibicije BACE1, samoagregacije amiloidnih peptida A β 42, MAO-A i MAO-B enzima te kelirajuća svojstva prema metalnim ionima Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} . U ovoj skupini spojeva ističu se spoj CIAQ-8, s *n*-oktilnom poveznicom i *m*-fluorbenzilnim supstituentom na terminalnoj amino grupi, i CIAQn-13, s *n*-oktilnom poveznicom i *N*-metil-2-metilindolom kao supstituentom. CIAQ-8 inhibirao je obje kolinesteraze s konstantama K_i u niskom nanomolarnom koncentracijskom području ($< 10 \text{ nmol L}^{-1}$), 16 % aktivosti BACE1 pri $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentraciji i samoagregaciju peptida A β 42 (23,6 %) te je kelirao sva tri biometalna iona. CIAQn-13 također je inhibirao obje kolinesteraze s konstantama K_i u niskom nanomolarnom području ($< 5 \text{ nmol L}^{-1}$), a dodatno je pokazao inhibitornu sposobnost prema MAO-A ($IC_{50} = 3,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) te kelirajuća svojstva za sva tri biometalna iona.
- Derivati amodiakina djelovali su kao selektivni inhibitori hAChE u submikromolarnom koncentracijskom području. Najsnažnijim inhibitornim potencijalom prema kolinesterazama istaknuli su se amodiakin i njegov derivat AMQ-5, kod kojeg se na C(7) poziciji aminokinolinskog prstena nalazi metoksi grupa, koji su inhibirali hAChE s konstantama inhibicije $K_i \leq 0,05 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ i hBChE s konstantama $K_i \leq 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Oba spoja također keliraju biometalne ione Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} , a AMQ-5 posjeduje i redukcijski potencijal u razini standardnog antioksidansa BHT-a.

- 1,4-benzokinoni inhibirali su obje kolinesteraze s rasponom K_i vrijednosti 5,2 – 136 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Unutar ove skupine kao inhibitori kolinesteraza i BACE1 istaknuli su se spojevi *tBQ*-8 i *tBQ*-9, s 2-feniletantiolom odnosno 2-naftotiolom u *meta*-položaju s obzirom na *tert*-butilnu grupu, koji inhibiraju obje kolinesteraze s prosječnom vrijednošću K_i oko 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i oko 27 % aktivnosti BACE1 u istom koncentracijskom području. Kao inhibitori kolinesteraza s antioksidacijskim djelovanjem istaknuli su se spojevi *tBQ*-6, s *para*-tiofenolnim prstenom u *meta*-položaju s obzirom na *tert*-butilnu grupu, i *tBQ*-14, s fenilalaninom na istom položaju, koji su obje kolinesteraze inhibirali s konstantama K_i u rasponu 23 – 59 $\mu\text{mol L}^{-1}$ te posjeduju antioksidacijska svojstva (s mehanizmom djelovanja prijenosa vodikovog atoma na oksidans).
- Hidrazoni i *N*-acilhidrazoni inhibirali su obje kolinesteraze s rasponom vrijednosti K_i 16 – 199 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za hAChE i 10 – 254 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za hBChE, pri čemu su se najsnažnijim inhibitorima pokazali piridoksalni derivati hidrazona. Ističu se spojevi HID1, s fenilnim supstituentom, i HID4, s *p*-klorfenilnim supstituentom, koji pri koncentracijama $\leq 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ djeluju kao selektivni inhibitor hBChE odnosno dualni inhibitor hBChE/hAChE, koji uz antikolinesteraznu aktivnost pokazuju sposobnost inhibicije BACE1 (33,4 % odnosno 40,3 %), samoagregacije amiloidnih peptida (26,1 % odnosno 23,9 %), dva puta snažniji redukcijski potencijal u usporedbi sa standardnim antioksidansom Trolox-om te sposobnost keliranja biometalnih iona Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} . Spoj HID2 pri koncentracijama $\leq 20 \mu\text{mol L}^{-1}$ djeluje kao selektivni inhibitor hAChE te inhibira BACE1 (33,4 %) i samoagregaciju amiloidnih peptida (22,0 %) te također posjeduje sposobnost keliranja biometalnih iona Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} .
- U skupini *O*-alkiloksima, najsnažniji inhibitorni potencijal prema kolinesterazama pokazali su *O*-benziloksimi ($K_i = 0,079 - 360 \mu\text{mol L}^{-1}$) i *O*-*tert*-butiloksimi ($K_i = 2,3 - 414 \mu\text{mol L}^{-1}$). Generalno su se svi oksimi pokazali selektivnim inhibitorima hBChE. *O*-benziloksimi BnzOX-10, s *m*-klorbenzilnim supstituentom na kinuklidinskom dušiku, i BnzOX-12, s *m*-nitrobenzilnim supstituentom, inhibirali su hBChE 74 odnosno 13 puta snažnije u usporedbi s hAChE, uz konstantu inhibicije K_i oko 0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ovi spojevi također su inhibirali 16 % posto samoagregacije peptida A β 42.

- Iz skupine karbamata, najbržim inhibitorima obiju kolinesteraza pokazali su se biskarbamatni i monokarbamatni derivati bambuterola. Generalno su se svi spojevi pokazali i bržim inhibitorima hBChE u odnosu na hAChE. Ističe se biskarbamat PIBK-2, s karbamatnim i aminskim dušicima unutar piperidinskog prstena, kao gotovo 700 puta brži inhibitor hBChE ($k_i = 38,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) u usporedbi s lijekom rivastigminom, koji inhibira 17,7 % samoagregacije amiloidnih peptida te posjeduje sposobnost keliranja biometalnih iona Fe^{2+} i Zn^{2+} . Također, monokarbamatni derivati bambuterola 5MPI, s karbamatnim i aminskim dušikom unutar piperidinskog sustava, i 5MDE, s dietilaminom na karbamatnom dušiku i aminskim dušikom unutar piperidinskog sustava, inhibirali su hBChE s prosječnom konstantom brzine inhibicije k_i oko $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ te su inhibirali samoagregaciju amiloidnih peptida 31,7 % odnosno 27,7 %.
- Svim istaknutim spojevima *in silico* analizama fizikalno-kemijskih svojstava procijenjena je dobra ili ograničena mogućnost prolaska kroz KMB.
- Kao okosnica za razvoj potentnih inhibitora ljudskih kolinesteraza ističu se 4-aminokinolini s *n*-oktilnim lancem, kinuklidinski *O*-benzil i *O*-*tert*-butiloksimi s halogenom ili *tert*-butilom supstituiranim benzilnim prstenom na kinuklidinskom dušiku te mono/biskarbamatni derivati bambuterola čiji su karbamatni i/ili aminski dušici dio piperidinskog sustava.
- Za daljnji razvoj inhibitora kolinesteraza s višeciljnim djelovanjem na različite mete AB (aktivnost BACE1 enzima, samoagregacija amiloidnih peptida, aktivnost MAO-A i MAO-B enzima, nastanak reaktivnih kisikovih vrsta, poremećaj homeostaze biometala Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+}) predlaže se kombinacija navedenih okosnica s hidrazonskim derivatima piridoksala ili samo fenila, koji pokazuju inhibitorna svojstva prema BACE1, samoagregaciji amiloidnih peptida te posjeduju antioksidirajuća i kelirajuća svojstva, odnosno s 1,4-benzokinonima koji pokazuju antioksidirajuća svojstva te sposobnost inhibicije BACE1.

§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid

A β – amiloidni- β peptid

ACh - acetilkolin

AChE – acetilkolinesteraza (hAChE_{rec} – ljudska rekombinantna AChE)

ATCh - acetiltiokolin

APP – prekursor amiloidnog proteina (engl. *amyloid precursor protein*)

BACE1 – β -site APP cleaving enzyme 1 (β -sekretaza)

BChE – butirilkolinesteraza (hBChE – ljudska BChE)

BHT – butilirani hidroksitoluen

DMEM – medij za uzgoj stanica; engl. *Dulbecco's Modified Eagle F-12*

DMSO – dimetil-sulfoksid

DTNB – 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina

FRAP – engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*

HBA – broj akceptora vodikovih veza (engl. *hydrogen bond acceptor*)

HBD - broj donora vodikovih veza (engl. *hydrogen bond donor*)

HEK293 – ljudske embrionalne stanice bubrega

HepG2 – stanice ljudskih hepatocita

HRP – peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*)

K_i – konstanta disocijacije kompleksa enzima i inhibitora

$K_{i,app}$ – prividna konstanta disocijacije kompleksa enzima i inhibitora

KMB – krvno-moždana barijera

logBB – logaritam koeficijenta raspodjele koncentracije spoja u mozgu/krvi

logP – logaritam koeficijenta raspodjele oktanol/voda

MAO – monoamin-oksidaza

MEM – medij za uzgoj stanica; engl. *Minimum Essential Medium*

MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij

M_w – molekulska masa

ORAC - engl. *Oxygen Radical Antioxidant Capacity*

PBS – fosfatni pufer (engl. *phosphate-buffered saline*)

PDB – baza proteinskih struktura; engl. Protein Data Bank

PES – fenazin-etosulfat

PMS – fenazin-metosulfat

PSA – polarna površina molekule (engl. *polar surface area*)

p-tau – (hiper)fosforilirani protein tau

RB – broj rotirajućih veza (engl. *rotational bond*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

RPMI – medij za uzgoj stanica; engl. Roswell Park Memorial Institute 1640

SH-SY5Y – ljudske stanice neuroblastoma

ThT – Tioflavin T

TPTZ – 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. M. V. F. Silva, C. de M. G. Loures, L. C. V. Alves, L. C. de Souza, K. B. G. Borges, M. das G. Carvalho, *J Biomed Sci* **26** (2019) 33.
2. Alzheimer's Association Report, *Alzheimers Dement.* **18** (2022) 700–789.
3. E. Nichols, J. D. Steinmetz, S. E. Vollset, K. Fukutaki, J. Chalek, F. Abd-Allah, A. Abdoli, A. Abualhasan, E. Abu-Gharbieh, T. T. Akram, H. Al Hamad, F. Alahdab, F. M. Alanezi, V. Alipour, S. Almustanyir, H. Amu, I. Ansari, J. Arabloo, T. Ashraf, T. Astell-Burt, G. Ayano, J. L. Ayuso-Mateos, A. A. Baig, A. Barnett, A. Barrow, B. T. Baune, Y. Béjot, W. M. M. Bezabhe, Y. M. Bezabih, A. S. Bhagavathula, S. Bhaskar, K. Bhattacharyya, A. Bijani, A. Biswas, S. R. Bolla, A. Boloor, C. Brayne, H. Brenner, K. Burkart, R. A. Burns, L. A. Cámara, C. Cao, F. Carvalho, L. F. S. Castro-de-Araujo, F. Catalá-López, E. Cerin, P. P. Chavan, N. Cherbuin, D.-T. Chu, V. M. Costa, R. A. S. Couto, O. Dadras, X. Dai, L. Dandona, R. Dandona, V. De la Cruz-Góngora, D. Dhamnetiya, D. Dias da Silva, D. Diaz, A. Douiri, D. Edvardsson, M. Ekholuenetale, I. El Sayed, S. I. El-Jaafary, K. Eskandari, S. Eskandarieh, S. Esmaeilnejad, J. Fares, A. Faro, U. Farooque, V. L. Feigin, X. Feng, S.-M. Fereshtehnejad, E. Fernandes, P. Ferrara, I. Filip, H. Fillit, F. Fischer, S. Gaidhane, L. Galluzzo, A. Ghashghaee, N. Ghith, A. Gialluisi, S. A. Gilani, I.-R. Glavan, E. V. Gnedovskaya, M. Golechha, R. Gupta, V. B. Gupta, V. K. Gupta, M. R. Haider, B. J. Hall, S. Hamidi, A. Hanif, G. J. Hankey, S. Haque, R. K. Hartono, A. I. Hasaballah, M. T. Hasan, A. Hassan, S. I. Hay, K. Hayat, M. I. Hegazy, G. Heidari, R. Heidari-Soureshjani, C. Herteliu, M. Househ, R. Hussain, B.-F. Hwang, L. Iacoviello, I. Iavicoli, O. S. Ilesanmi, I. M. Ilic, M. D. Ilic, S. S. N. Irvani, H. Iso, M. Iwagami, R. Jabbarinejad, L. Jacob, V. Jain, S. K. Jayapal, R. Jayawardena, R. P. Jha, J. B. Jonas, N. Joseph, R. Kalani, A. Kandel, H. Kandel, A. Karch, A. S. Kasa, G. M. Kassie, P. Keshavarz, M. A. Khan, M. N. Khatib, T. A. M. Khoja, J. Khubchandani, M. S. Kim, Y. J. Kim, A. Kisa, S. Kisa, M. Kivimäki, W. J. Koroshetz, A. Koyanagi, G. A. Kumar, M. Kumar, H. M. Lak, M. Leonardi, B. Li, S. S. Lim, X. Liu, Y. Liu, G. Logroscino, S. Lorkowski, G. Lucchetti, R. Lutzky Saute, F. G. Magnani, A. A. Malik, J. Massano, M. M. Mehndiratta, R. G. Menezes, A. Meretoja, B. Mohajer, N. Mohamed Ibrahim, Y. Mohammad, A. Mohammed, A. H. Mokdad, S. Mondello, M. A. A. Moni, M. Moniruzzaman, T. B. Mossie, G. Nagel, M. Naveed, V. C. Nayak, S. Neupane Kandel, T. H. Nguyen, B. Oancea, N. Otstavnov, S. S. Otstavnov, M. O. Owolabi, S. Panda-Jonas, F. Pashazadeh Kan, M. Pasovic, U. K. Patel, M. Pathak, M. F. P. Peres, A. Perianayagam, C. B. Peterson, M. R. Phillips, M. Pinheiro, M. A. Piradov, C. D. Pond, M. H. Potashman, F. H. Pottot, S. I. Prada, A. Radfar, A. Raggi, F. Rahim, M. Rahman, P. Ram, P. Ranasinghe, D. L. Rawaf, S. Rawaf, N. Rezaei, A. Rezapour, S. R. Robinson, M. Romoli, G. Roshandel, R. Sahathevan, A. Sahebkar, M. A. Sahraian, B. Sathian, D. Sattin, M. Sawhney, M. Saylan, S. Schiavolin, A. Seylani, F. Sha, M. A. Shaikh, K. Shaji, M. Shannawaz, J. K. Shetty, M. Shigematsu, J. Il Shin, R. Shiri, D. A. S. Silva, J. P. Silva, R. Silva, J. A. Singh, V. Y. Skryabin, A. A. Skryabina, A. E. Smith, S.

- Soshnikov, E. E. Spurlock, D. J. Stein, J. Sun, R. Tabarés-Seisdedos, B. Thakur, B. Timalina, M. R. Tovani-Palone, B. X. Tran, G. W. Tsegaye, S. Valadan Tahbaz, P. R. Valdez, N. Venketasubramanian, V. Vlassov, G. T. Vu, L. G. Vu, Y.-P. Wang, A. Wimo, A. S. Winkler, L. Yadav, S. H. Yahyazadeh Jabbari, K. Yamagishi, L. Yang, Y. Yano, N. Yonemoto, C. Yu, I. Yunusa, S. Zadey, M. S. Zastrozhin, A. Zastrozhina, Z.-J. Zhang, C. J. L. Murray, T. Vos, *Lancet Public Health* **7** (2022) e105–e125.
4. H. Hampel, M.-M. Mesulam, A. C. Cuello, M. R. Farlow, E. Giacobini, G. T. Grossberg, A. S. Khachaturian, A. Vergallo, E. Cavedo, P. J. Snyder, Z. S. Khachaturian, *Brain* **141** (2018) 1917–1933.
 5. P. Davies, A. J. Maloney, *The Lancet* **308** (1976) 1403.
 6. T. Guo, D. Zhang, Y. Zeng, T. Y. Huang, H. Xu, Y. Zhao, *Mol. Neurodegener.* **15** (2020) 40.
 7. Y. Li, Q. Jiao, H. Xu, X. Du, L. Shi, F. Jia, H. Jiang, *Front Mol Neurosci* **10** (2017) 339.
 8. W.-J. Huang, X. Zhang, W.-W. Chen, *Biomed Rep.* **4** (2016) 519–522.
 9. T. Behl, D. Kaur, A. Sehgal, S. Singh, N. Sharma, G. Zengin, F. L. Andronie-Cioara, M. M. Toma, S. Bungau, A. G. Bumbu, *Molecules* **26** (2021) 3724.
 10. J. Liu, L. Chang, Y. Song, H. Li, Y. Wu, *Front. Neurosci.* **13** (2019) 43.
 11. Medications for Memory, Cognition and Dementia-Related Behaviors, <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/treatments/medications-for-memory> (datum pristupa 14. 10. 2025.)
 12. J. Zhang, Y. Zhang, J. Wang, Y. Xia, J. Zhang, L. Chen, *Signal Transduct. Target. Ther.* **9** (2024) 211.
 13. L. Söderberg, M. Johannesson, P. Nygren, H. Laudon, F. Eriksson, G. Osswald, C. Möller, L. Lannfelt, *Neurotherapeutics* **20** (2023) 195–206.
 14. T. A. Bayer, *Mol. Psychiatry* **27** (2022) 1880–1885.
 15. F. Prati, A. Cavalli, M. L. Bolognesi, *Molecules* **21** (2016) 466.
 16. J. F. González, A. R. Alcántara, A. L. Doadrio, J. M. Sánchez-Montero, *Expert Opin Drug Discov.* **14** (2019) 879–891.
 17. S. Sinha, J. P. Anderson, R. Barbour, G. S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H. F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S. M. Suomensari, S. Wang, D. Walker, J. Zhao, L. McConlogue, V. John, *Nature* **402** (1999) 537–540.
 18. X. Lin, G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, J. Tang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** (2000) 1456–1460.
 19. I. Hussain, D. Powell, D. R. Howlett, D. G. Tew, T. D. Meek, C. Chapman, I. S. Gloger, K. E. Murphy, C. D. Southan, D. M. Ryan, T. S. Smith, D. L. Simmons, F. S. Walsh, C. Dingwall, G. Christie, *Mol. Cel. Neurosci.* **14** (1999) 419–427.

20. R. Yan, M. J. Bienkowski, M. E. Shuck, H. Miao, M. C. Tory, A. M. Pauley, J. R. Brashler, N. C. Stratman, W. R. Mathews, A. E. Buhl, D. B. Carter, A. G. Tomasselli, L. A. Parodi, R. L. Henrikson, M. E. Gurney, *Nature* **402** (1999) 533–537.
21. R. Vassar, B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M. A. Jarosinski, A. L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.-C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, M. Citron, *Science* **286** (1999) 735–741.
22. A. Matošević, A. Radman Kastelic, A. Mikelić, A. Zandona, M. Katalinić, I. Primožič, A. Bosak, T. Hrenar, *Pharmaceutics* **13** (2021) 420.
23. Alma Ramić, Dizajn i sinteza kvazienantiomernih derivata Cinchona alkaloida, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021.
24. Ana Matošević, Dizajn, sinteza i biološka evaluacija biskarbamata kao potencijalnih selektivnih inhibitora butirilkolinesteraze, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2023.
25. A. Matošević, A. Knežević, A. Zandona, N. Maraković, Z. Kovarik, A. Bosak, *Pharmaceutics* **15** (2022) 1220.
26. A. L. Sosa-Ortiz, I. Acosta-Castillo, M. J. Prince, *Arch. Med. Res.* **43** (2012) 600–608.
27. R. C. Barber, *Scientifica (Cairo)* **2012** (2012) 246210.
28. R. A. Sperling, P. S. Aisen, L. A. Beckett, D. A. Bennett, S. Craft, A. M. Fagan, T. Iwatsubo, C. R. Jack, J. Kaye, T. J. Montine, D. C. Park, E. M. Reiman, C. C. Rowe, E. Siemers, Y. Stern, K. Yaffe, M. C. Carrillo, B. Thies, M. Morrison-Bogorad, M. V. Wagster, C. H. Phelps, *Alzheimers Dement.* **7** (2011) 280–292.
29. R. de Flores, S. R. Das, L. Xie, L. E. M. Wisse, X. Lyu, P. Shah, P. A. Yushkevich, D. A. Wolk, *J. Neurosci.* **42** (2022) 2131–2141.
30. J. L. Whitwell, *Neurotox Res* **18** (2010) 339–346.
31. Education: Progression of Alzheimer's, <https://www.mccare.com/education/alzprogression.html> (datum pristupa 17. 10. 2025.)
32. S. T. DeKosky, S. W. Scheff, *Ann. Neurol.* **27** (1990) 457–464.
33. V. Senanarong, J. L. Cummings, L. Fairbanks, M. Mega, D. M. Masterman, S. M. O'Connor, T. L. Strickland, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **17** (2003) 14–20.
34. T. Nagata, S. Shinagawa, Y. Ochiai, H. Kada, H. Kasahara, K. Nukariya, K. Nakayama, *Int. Psychogeriatr.* **22** (2010) 463–469.
35. M. Targosz-Gajniak, J. Siuda, S. Ochudło, G. Opala, *J. Neurol. Sci.* **283** (2009) 79–82.
36. S. Holroyd, M. L. Shepherd, J. H. Downs, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **12** (2000) 25–28.
37. H. Braak, E. Braak, P. Kalus, *Acta Neuropathol.* **77** (1989) 494–506.

38. M. Mesulam, *J. Histochem. Cytochem.* **24** (1976) 1281–1285.
39. M.-M. Mesulam, G. W. Van Hoesen, *Brain Res.* **109** (1976) 152–157.
40. P. J. Whitehouse, D. L. Price, A. W. Clark, J. T. Coyle, M. R. DeLong, *Ann Neurol.* **10** (1981) 122–126.
41. D. A. Drachman, J. Leavitt, *Arch. Neurol.* **30** (1974) 113–121.
42. A. V. Zholos, T. B. Bolton, A. V. Dresvyannikov, M. V. Kustov, V. V. Tsvilovskii, M. F. Shuba, *Neurophysiology* **36** (2004) 398–406.
43. P. Taylor, Z. Radic, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34** (1994) 281–320.
44. V. P. Whittaker, *Chem. Biol. Interact.* **187** (2010) 23–26.
45. P. Taylor, S. Camp, Z. Radić, u L. R. Squire (ur.), *Encyclopedia of Neuroscience*, Vol. 1, Elsevier, San Diego, 2009, 5–7.
46. D. M. Quinn, *Chem. Rev.* **87** (1987) 955–979.
47. S. Darvesh, D. A. Hopkins, C. Geula, *Nat. Rev. Neurosci.* **4** (2003) 131–138.
48. O. Jbilo, C. F. Bartels, A. Chatonnet, J.-P. Toutant, O. Lockridge, *Toxicon.* **32** (1994) 1445–1457.
49. A. A. Lawson, R. D. Barr, *Am. J. Hematol.* **26** (1987) 101–112.
50. S. Brimijoin, P. Hammond, *J. Neurochem.* **51** (1988) 1227–1231.
51. H. Soreq, S. Seidman, *Nat. Rev. Neurosci.* **2** (2001) 294–302.
52. H. Ohbe, T. Jo, H. Matsui, K. Fushimi, H. Yasunaga, *J. Med. Toxicol.* **14** (2018) 237–241.
53. J. V. Peter, T. Sudarsan, J. Moran, *Indian J. Crit. Care Med.* **18** (2014) 735–745.
54. P. Masson, O. Lockridge, *Arch. Biochem. Biophys.* **494** (2010) 107–120.
55. M. Pohanka, *Bratisl. Med. J.* **114** (2013) 726–734.
56. A. Y. Salmon, Z. Goren, Y. Avissar, H. Soreq, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **26** (1999) 596–600.
57. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62** (2011) 175–190.
58. M. Gok, C. Cicek, E. Bodur, *J. Neurochem.* **168** (2024) 381–385.
59. L. E. Paraoanu, P. G. Layer, *FEBS J.* **275** (2008) 618–624.
60. E. Giacobini, *Drugs Aging.* **18** (2001) 891–898.
61. N. C. Inestrosa, J. P. Sagal, M. Colombres, u: J. R. Harris, F. Fahrenholz (ur.), *Alzheimer's Disease (Subcellular Biochemistry)*, Vol. 38, Springer, Boston, MA, 2005, 299–317.
62. S. Darvesh, M. K. Cash, G. A. Reid, E. Martin, A. Mitnitski, C. Geula, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **71** (2012) 2–14.
63. J. Wang, B. J. Gu, C. L. Masters, Y.-J. Wang, *Nat. Rev. Neurol.* **13** (2017) 612–623.
64. J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **297** (2002) 353–356.

65. H. Hampel, J. Hardy, K. Blennow, C. Chen, G. Perry, S. H. Kim, V. L. Villemagne, P. Aisen, M. Vendruscolo, T. Iwatsubo, C. L. Masters, M. Cho, L. Lannfelt, J. L. Cummings, A. Vergallo, *Mol. Psychiatry* **26** (2021) 5481–5503.
66. F. M. LaFerla, K. N. Green, S. Oddo, *Nat. Rev. Neurosci.* **8** (2007) 499–509.
67. R. Coronel, C. Palmer, A. Bernabeu-Zornoza, M. Monteagudo, A. Rosca, A. Zambrano, I. Liste, *Neural Regen. Res.* **14** (2019) 1661–1671.
68. M. Blurton-Jones, F. LaFerla, *Curr. Alzheimer Res.* **3** (2006) 437–448.
69. D. J. Selkoe, M. B. Podlisny, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **3** (2002) 67–99.
70. A. Asim, A. Kumar, S. Muthuswamy, S. Jain, S. Agarwal, *J. Biomed. Sci.* **22** (2015) 41.
71. G. G. Glenner, C. W. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120** (1984) 885–890.
72. G. G. Glenner, C. W. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122** (1984) 1131–1135.
73. A. Goate, M.-C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, R. Mant, P. Newton, K. Rooke, P. Roques, C. Talbot, M. Pericak-Vance, A. Roses, R. Williamson, M. Rossor, M. Owen, J. Hardy, *Nature* **349** (1991) 704–706.
74. E. Levy, M. D. Carman, I. J. Fernandez-Madrid, M. D. Power, I. Lieberburg, S. G. van Duinen, G. Th. A. M. Bots, W. Luyendijk, B. Frangione, *Science* **248** (1990) 1124–1126.
75. S. Cole, R. Vassar, *Curr. Alzheimer Res.* **5** (2008) 100–120.
76. S. Benjannet, A. Elagoz, L. Wickham, M. Mamarbachi, J. S. Munzer, A. Basak, C. Lazure, J. A. Cromlish, S. Sisodia, F. Checler, M. Chrétien, N. G. Seidah, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 10879–10887.
77. P. C. Kandalepas, K. R. Sadleir, W. A. Eimer, J. Zhao, D. A. Nicholson, R. Vassar, *Acta Neuropathol.* **126** (2013) 329–352.
78. B. M. Dunn, u W. J. Lennarz, M.D. Lane (ur.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 2013, 137–140.
79. L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A. K. Ghosh, X. C. Zhang, J. Tang, *Science* **290** (2000) 150–153.
80. R. T. Turner, L. Hong, G. Koelsch, A. K. Ghosh, J. Tang, *Biochemistry* **44** (2005) 105–112.
81. R. T. Turner, G. Koelsch, L. Hong, P. Castanheira, J. Ermolieff, A. K. Ghosh, J. Tang, *Biochemistry* **40** (2001) 10001–10006.
82. H.-K. Wong, T. Sakurai, F. Oyama, K. Kaneko, K. Wada, H. Miyazaki, M. Kurosawa, B. De Strooper, P. Saftig, N. Nukina, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 23009–23017.
83. A. V. Woodard-Grice, A. C. McBrayer, J. K. Wakefield, Y. Zhuo, S. L. Bellis, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 26364–26373.

84. M. Pigoni, J. Wanngren, P.-H. Kuhn, K. M. Munro, J. M. Gunnensen, H. Takeshima, R. Feederle, I. Voytyuk, B. De Strooper, M. D. Levasseur, B. J. Hrupka, S. A. Müller, S. F. Lichtenthaler, *Mol. Neurodegener.* **11** (2016) 67.
85. S. F. Lichtenthaler, D. Dominguez, G. G. Westmeyer, K. Reiss, C. Haass, P. Saftig, B. De Strooper, B. Seed, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 48713–48719.
86. W. He, J. Hu, Y. Xia, R. Yan, *J. Biol. Chem.* **289** (2014) 20630–20637.
87. P.-H. Kuhn, E. Marjaux, A. Imhof, B. De Strooper, C. Haass, S. F. Lichtenthaler, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 11982–11995.
88. S. A. Müller, M. D. Shmueli, X. Feng, J. Tüshaus, N. Schumacher, R. Clark, B. E. Smith, A. Chi, S. Rose-John, M. E. Kennedy, S. F. Lichtenthaler, *Mol. Neurodegener.* **18** (2023) 13.
89. L. Zhou, S. Barão, M. Laga, K. Bockstael, M. Borgers, H. Gijssen, W. Annaert, D. Moechars, M. Mercken, K. Gevaer, B. De Strooper, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 25927–25940.
90. X. Luo, M. Prior, W. He, X. Hu, X. Tang, W. Shen, S. Yadav, S. Kiryu-Seo, R. Miller, B. D. Trapp, R. Yan, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 23967–23974.
91. L. Coates, H.-F. Tuan, S. Tomanicek, A. Kovalevsky, M. Mustyakimov, P. Erskine, J. Cooper, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 7235–7237.
92. A. Barman, S. Schürer, R. Prabhakar, *Biochemistry* **50** (2011) 4337–4349.
93. M. Bartolić, A. Bosak, *Period. Biol.* **126** (2025) 117–131.
94. A. K. Ghosh, J. Tang, *ChemMedChem* **10** (2015) 1463–1466.
95. S. Sinha, I. Lieberburg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** (1999) 11049–11053.
96. F. H. Bazzari, A. H. Bazzari, *Molecules* **27** (2022) 8823.
97. E. McDade, I. Voytyuk, P. Aisen, R. J. Bateman, M. C. Carrillo, B. De Strooper, C. Haass, E. M. Reiman, R. Sperling, P. N. Tariot, R. Yan, C. L. Masters, R. Vassar, S. F. Lichtenthaler, *Nat. Rev. Neurol.* **17** (2021) 703–714.
98. H. Martiskainen, S. Herukka, A. Stančáková, J. Paananen, H. Soininen, J. Kuusisto, M. Laakso, M. Hiltunen, *Ann. Neurol.* **82** (2017) 128–132.
99. G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017** (2017) 8416763.
100. E. Tamagno, M. Guglielmotto, V. Vasciaveo, M. Tabaton, *Antioxidants* **10** (2021) 1479.
101. Z. Liu, T. Li, P. Li, N. Wei, Z. Zhao, H. Liang, X. Ji, W. Chen, M. Xue, J. Wei, *Oxid Med Cell Longev* **2015** (2015) 352723.
102. J. Everett, E. Céspedes, L. R. Shelford, C. Exley, J. F. Collingwood, J. Dobson, G. van der Laan, C. A. Jenkins, E. Arenholz, N. D. Telling, *J. R. Soc. Interface* **11** (2014) 20140165.
103. D. E. Edmondson, C. Binda, u J. R. Harris, E. J. Boekema (ur.), *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*, Vol. 87, Springer Nature, Singapore, 2018, 117–139.

104. T. Nagatsu, *Neurotoxicology* **25** (2004) 11–20.
105. H. Gaweska, P. F. Fitzpatrick, *Biomol. Concepts*. **2** (2011) 365–377.
106. S.-Y. Son, J. Ma, Y. Kondou, M. Yoshimura, E. Yamashita, T. Tsukihara, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** (2008) 5739–5744.
107. C. Binda, P. Newton-Vinson, F. Hubálek, D. E. Edmondson, A. Mattevi, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **9** (2002) 22–26.
108. C. Binda, M. Li, F. Hubálek, N. Restelli, D. E. Edmondson, A. Mattevi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** (2003) 9750–9755.
109. H. G. Brunner, M. Nelen, X. O. Breakefield, H. H. Ropers, B. A. van Oost, *Science* **262** (1993) 578–580.
110. A. Piton, H. Poquet, C. Redin, A. Masurel, J. Lauer, J. Muller, J. Thevenon, Y. Herenger, S. Chancenotte, M. Bonnet, J.-M. Pinoit, F. Huet, C. Thauvin-Robinet, A.-S. Jaeger, S. Le Gras, B. Jost, B. Gérard, K. Peoc'h, J.-M. Launay, L. Faivre, J.-L. Mandel, *Eur. J. Hum. Genet.* **22** (2014) 776–783.
111. J. H. Meyer, N. Ginovart, A. Boovariwala, S. Sagrati, D. Hussey, A. Garcia, T. Young, N. Praschak-Rieder, A. A. Wilson, S. Houle, *Arch. Gen. Psychiatry.* **63** (2006) 1209–1216.
112. Y.-Y. Tan, P. Jenner, S.-D. Chen, *J. Parkinsons Dis.* **12** (2022) 477–493.
113. M. O. Quartey, J. N. K. Nyarko, P. R. Pennington, R. M. Heistad, P. C. Klassen, G. B. Baker, D. D. Mousseau, *Front. Neurosci.* **12** (2018) 419.
114. A. U. Syed, C. Liang, K. K. Patel, R. Mondal, V. M. Kamalia, T. R. Moran, S. T. Ahmed, J. Mukherjee, *Int. J. Mol. Sci.* **24** (2023) 10808.
115. S. Schedin-Weiss, M. Inoue, L. Hromadkova, Y. Teranishi, N. G. Yamamoto, B. Wiehager, N. Bogdanovic, B. Winblad, A. Sandebring-Matton, S. Frykman, L. O. Tjernberg, *Alzheimer's Res. Ther.* **9** (2017) 57.
116. M. D. Gottwald, R. I. Rozanski, *Expert. Opin. Investig. Drugs* **8** (1999) 1673–1682.
117. Biogen to Realign Resources for Alzheimer's Disease Franchise, <https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/biogen-realign-resources-alzheimers-disease-franchise> (datum pristupa 16. 10. 2025.)
118. J. Zhou, X. Jiang, S. He, H. Jiang, F. Feng, W. Liu, W. Qu, H. Sun, *J. Med. Chem.* **62** (2019) 8881–8914.
119. C. Albertini, A. Salerno, P. de Sena Murteira Pinheiro, M. L. Bolognesi, *Med Res Rev* **41** (2021) 2606–2633.
120. C. A. Lipinski, *Drug Discov. Today Technol.* **1** (2004) 337–341.
121. M. L. Bolognesi, A. Cavalli, C. Melchiorre, *Neurotherapeutics*. **6** (2009) 152–162.
122. S. Jiang, Y. Wang, Q. Ma, A. Zhou, X. Zhang, Y. Zhang, *Neurosci. Lett.* **515** (2012) 125–130.

123. S. Macfarlane, T. Grimmer, K. Teo, T. J. O'Brien, M. Woodward, J. Grunfeld, A. Mander, A. Brodtmann, B. J. Brew, P. Morris, C. Short, S. Kurrle, R. Lai, S. Bharadwaj, P. Drysdale, J. Sturm, S. J. G. Lewis, D. Barton, C. Kalafatis, S. Sharif, R. Perry, N. Mannering, J. MacSweeney, S. Pearson, C. Evans, V. Krishna, A. Thompson, M. Munisamy, N. Bhatt, A. Asher, S. Connell, J. Lynch, S. M. Rutgers, P. L. Dautzenberg, N. Prins, P. Oschmann, L. Frölich, P. Tacik, O. Peters, J. Wiltfang, A. Henri-Bhargava, E. Smith, S. Pasternak, A. Frank, H. Chertkow, J. Ingram, G.-Y. R. Hsiung, R. Brittain, C. Tartaglia, S. Cohen, L. M. Villa, E. Gordon, T. Jubault, N. Guizard, A. Tucker, W. E. Kaufmann, K. Jin, W. R. Chezem, C. U. Missling, M. N. Sabbagh, *J. Prev. Alzheimer's Dis.* **12** (2025) 100016.
124. L.-K. Huang, S.-P. Chao, C.-J. Hu, *J Biomed Sci* **27** (2020) 18.
125. D. Plantone, T. Koudriavtseva, *Clin. Drug Investig.* **38** (2018) 653–671.
126. K. Komatović, A. Matošević, N. Terzić-Jovanović, S. Žunec, S. Šegan, M. Zlatović, N. Maraković, A. Bosak, D. M. Opsenica, *Pharmaceutics* **14** (2022) 1305.
127. Y. Cheng, T. C. Judd, M. D. Bartberger, J. Brown, K. Chen, R. T. Freneau, D. Hickman, S. A. Hitchcock, B. Jordan, V. Li, P. Lopez, S. W. Louie, Y. Luo, K. Michelsen, T. Nixey, T. S. Powers, C. Rattan, E. A. Sickmier, D. J. St. Jean, R. C. Wahl, P. H. Wen, S. Wood, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 5836–5857.
128. L. P. Navarrete, L. Guzmán, A. San Martín, L. Astudillo-Saavedra, R. B. Maccioni, *J. Alzheimer's Dis.* **29** (2012) 79–88.
129. H. M. T. Albuquerque, R. Nunes da Silva, M. Pereira, A. Maia, S. Guieu, A. R. Soares, C. M. M. Santos, S. I. Vieira, A. M. S. Silva, *ACS Med. Chem. Lett.* **13** (2022) 443–448.
130. Z. Wang, J. Hu, X. Yang, X. Feng, X. Li, L. Huang, A. S. C. Chan, *J. Med. Chem.* **61** (2018) 1871–1894.
131. W. Huang, M. Liang, Q. Li, X. Zheng, C. Zhang, Q. Wang, L. Tang, Z. Zhang, B. Wang, Z. Shen, *Eur. J. Med. Chem.* **177** (2019) 247–258.
132. N. D. Chaurasiya, H. Liu, R. J. Doerksen, N. P. D. Nanayakkara, L. A. Walker, B. L. Tekwani, *Pharmaceutics* **14** (2021) 398.
133. P. R. Dandawate, A. C. Vyas, S. B. Padhye, M. W. Singh, J. B. Baruah, *Mini-Rev. Med. Chem.* **10** (2010) 436–454.
134. V. K. Nuthakki, A. Sharma, A. Kumar, S. B. Bharate, *Drug Dev. Res.* **80** (2019) 655–665.
135. Y. Yi, K. Kim, H. Kim, M. H. Lim, *Chem. Sci.* **16** (2025) 6930–6942.
136. R. Scherzer-Attali, R. Pellarin, M. Convertino, A. Frydman-Marom, N. Egoz-Matia, S. Peled, M. Levy-Sakin, D. E. Shalev, A. Caflisch, E. Gazit, D. Segal, *PLoS One* **5** (2010) e11101.
137. A. Ortega, Á. Rincón, K. L. Jiménez-Aliaga, P. Bermejo-Bescós, S. Martín-Aragón, M. T. Molina, A. G. Csáky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 2183–2187.

138. S. Rollas, S. G. Küçükgülzel, *Molecules* **12** (2007) 1910–1939.
139. M. de Gracia Retamosa, E. Matador, D. Monge, J. M. Lassaletta, R. Fernández, *Chem. Eur. J.* **22** (2016) 13430–13445.
140. İ. Bozbey, Z. Özdemir, H. Uslu, A. B. Özçelik, F. S. Şenol, İ. E. Orhan, M. Uysal, *Mini-Rev. Med. Chem.* **20** (2020) 1042–1060.
141. M. Krátký, Š. Štěpánková, K. Konečná, K. Svrčková, J. Maixnerová, M. Švarcová, O. Jand'ourek, F. Trejtnar, J. Vinšová, *Pharmaceuticals* **14** (2021) 1229.
142. Ł. Popiołek, *Biomed. Pharmacother.* **141** (2021) 111851.
143. M. de Freitas Silva, E. Tardelli Lima, L. Pruccoli, N. Castro, M. Guimarães, F. da Silva, N. Fonseca Nadur, L. de Azevedo, A. Kümmerle, I. Guedes, L. Dardenne, V. Gontijo, A. Tarozzi, C. Viegas, *Molecules* **25** (2020) 3165.
144. B. Mathew, D. G. T. Parambi, G. E. Mathew, M. S. Uddin, S. T. Inasu, H. Kim, A. Marathakam, M. K. Unnikrishnan, S. Carradori, *Arch Pharm Chem Life Sci.* **352** (2019) 1900177.
145. U. A. Çevik, D. Osmaniye, B. N. Sağlık, B. K. Çavuşoğlu, S. Levent, A. B. Karaduman, S. Ilgin, A. Ç. Karaburun, Y. Özkay, Z. A. Kaplancikli, G. Turan, *Med. Chem. Res.* **29** (2020) 1000–1011.
146. Z. Haghighijoo, O. Firuzi, B. Hemmateenejad, S. Emami, N. Edraki, R. Miri, *Bioorg. Chem.* **74** (2017) 126–133.
147. D. S. Cukierman, E. Accardo, R. G. Gomes, A. De Falco, M. C. Miotto, M. C. R. Freitas, M. Lanznaster, C. O. Fernández, N. A. Rey, *J. Biol. Inorg. Chem.* **23** (2018) 1227–1241.
148. D. Palanimuthu, Z. Wu, P. J. Jansson, N. Braid, P. V. Bernhardt, D. R. Richardson, D. S. Kalinowski, *Dalton Trans.* **47** (2018) 7190–7205.
149. D. C. Santos, R. R. Henriques, M. A. de A. L. Junior, A. B. Farias, T. L. do C. Nogueira, J. V. F. Quimas, N. C. Romeiro, L. L. da Silva, A. L. F. de Souza, *Bioorg. Med. Chem.* **28** (2020) 115470.
150. M. Prinz, S. Parlar, G. Bayraktar, V. Alptüzün, E. Erciyas, A. Fallarero, D. Karlsson, P. Vuorela, M. Burek, C. Förster, E. Turunc, G. Armagan, A. Yalcin, C. Schiller, K. Leuner, M. Krug, C. A. Sotriffer, U. Holzgrabe, *Eur. J. Pharm. Sci.* **49** (2013) 603–613.
151. J. Dhuguru, E. Zviagin, R. Skouta, *Pharmaceuticals* **15** (2022) 66.
152. N. Chandran, K. Bose, A. C. Thekkantavida, R. R. Thomas, K. Anirudhan, S. Bindra, S. Sura, H. A. Hasan, S. Kumar, T. M. Rangarajan, A. G. Al-Sehemi, P. Gahtori, H. Kim, B. Mathew, *ChemistrySelect* **9** (2024) e202401726.
153. N. Maček Hrvat, Z. Kovarik, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **71** (2020) 266–284.
154. V. Sepsova, J. Karasova, J. Korabecny, R. Dolezal, F. Zemek, B. Bennion, K. Kuca, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 16882–16900.

155. J. M. Oh, T. M. Rangarajan, R. Chaudhary, R. P. Singh, M. Singh, R. P. Singh, A. R. Tondo, N. Gambacorta, O. Nicolotti, B. Mathew, H. Kim, *Molecules* **25** (2020) 2356.
156. G. T. Dolphin, O. Renaudet, M. Oubrai, P. Dumy, J. Garcia, J. Reymond, *ChemBioChem* **10** (2009) 1325–1329.
157. Y. S. Kim, S. hwa Jung, B.-G. Park, M. K. Ko, H.-S. Jang, K. Choi, J.-H. Baik, J. Lee, J. K. Lee, A. N. Pae, Y. S. Cho, S.-J. Min, *Eur. J. Med. Chem.* **62** (2013) 71–83.
158. B. Ren, C. Guo, R.-Z. Liu, Z.-Y. Bian, R.-C. Liu, L.-F. Huang, J.-J. Tang, *Eur. J. Med. Chem.* **228** (2022) 114031.
159. I. A. Schepetkin, M. B. Plotnikov, A. I. Khlebnikov, T. M. Plotnikova, M. T. Quinn, *Biomolecules* **11** (2021) 777.
160. A. Matošević, A. Bosak, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **71** (2020) 285–299.
161. J. Sterling, Y. Herzig, T. Goren, N. Finkelstein, D. Lerner, W. Goldenberg, I. Miskolczi, S. Molnar, F. Rantal, T. Tamas, G. Toth, A. Zagya, A. Zekany, G. Lavian, A. Gross, R. Friedman, M. Razin, W. Huang, B. Kraus, M. Chorev, M. B. Youdim, M. Weinstock, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 5260–5279.
162. T. Mazej, D. Knez, A. Meden, S. Gobec, M. Sova, *Molecules* **26** (2021) 4118.
163. M. J. Matos, S. Vilar, R. M. Gonzalez-Franco, E. Uriarte, L. Santana, C. Friedman, N. P. Tatonetti, D. Viña, J. A. Fontenla, *Eur. J. Med. Chem.* **63** (2013) 151–161.
164. U. Košak, N. Strašek, D. Knez, M. Jukič, S. Žakelj, A. Zahirović, A. Pišlar, X. Brazzolotto, F. Nachon, J. Kos, S. Gobec, *Eur. J. Med. Chem.* **197** (2020) 112282.
165. S. Brogi, S. Butini, S. Maramai, R. Colombo, L. Verga, C. Lanni, E. De Lorenzi, S. Lamponi, M. Andreassi, M. Bartolini, V. Andrisano, E. Novellino, G. Campiani, M. Brindisi, S. Gemma, *CNS Neurosci. Ther.* **20** (2014) 624–632.
166. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88–95.
167. F. Worek, P. Eyer, H. Thiermann, *Drug Test. Anal.* **4** (2012) 282–291.
168. β -Secretase (BACE1) Activity Detection Kit (Fluorescent), <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/cs0010#product-documentation> (datum pristupa 16. 10. 2025.)
169. V. Porcari, L. Magnoni, G. C. Terstappen, W. Fecke, *Assay Drug Dev. Technol.* **3** (2005) 287–297.
170. F. Yang, G. P. Lim, A. N. Begum, O. J. Ubeda, M. R. Simmons, S. S. Ambegaokar, P. P. Chen, R. Kaye, C. G. Glabe, S. A. Frautschy, G. M. Cole, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 5892–5901.
171. β Amyloid 1-42, a β , ultra pure, HFIP, recombinant human, <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/ag968> (datum pristupa 16. 10. 2025.)
172. C. Xue, T. Y. Lin, D. Chang, Z. Guo, *R. Soc. Open Sci.* **4** (2017) 160696.

173. M. Biancalana, S. Koide, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*. **1804** (2010) 1405–1412.
174. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, u L. Packer (ur.), *Methods in Enzymology*, Vol. 299, Academic Press, New York, 1999, 15–27.
175. L. Shi, W. Zhao, Z. Yang, V. Subbiah, H. A. R. Suleria, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **29** (2022) 81112–81129.
176. Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) Assay, <https://www.cellbiolabs.com/orac-oxygen-radical-antioxidant-capacity-assay> (datum pristupa 16. 10. 2025.)
177. S. C. Litescu, S. A. V. Eremia, A. Tache, I. Vasilescu, G.-L. Radu, u V. Preedy (ur.), *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, Elsevier, Amsterdam, 2014, 245–251.
178. Z. Kariminezhad, M. Rahimi, J. Fernandes, R. Maltais, J.-Y. Sanceau, D. Poirier, H. Fahmi, M. Benderdour, *Antioxidants*. **13** (2024) 386.
179. H. von der Eltz, H.-J. Guder, K. Muhlegger, *New Hydrolase Substrates*, U.S. Patent 4,900,822, 1990.
180. D. Knez, F. Wang, W.-X. Duan, M. Hrast Rambaher, S. Gobec, X.-Y. Cheng, X.-B. Wang, C.-J. Mao, C.-F. Liu, R. Frlan, *Bioorg. Chem.* **153** (2024) 107877.
181. I. Jodłowska, A. Twarda-Clapa, K. Szymczak, A. M. Białkowska, *Molecules* **26** (2021) 6237.
182. D. Dębski, R. Smulik, J. Zielonka, B. Michałowski, M. Jakubowska, K. Dębowska, J. Adamus, A. Marcinek, B. Kalyanaraman, A. Sikora, *Free Radic. Biol. Med.* **95** (2016) 323–332.
183. T. Pal, P. Patil, A. Sharma, *J. Mol. Struct.* **1223** (2021) 128837.
184. W. Strober, *Curr. Protoc. Immunol.* **111** (2015) A3.B1.-A3.B3.
185. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G3582#protocols (datum pristupa 16. 10. 2025.)
186. C. J. Goodwin, S. J. Holt, S. Downes, N. J. Marshall, *J. Immunol. Methods* **179** (1995) 95–103.
187. RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB), <https://www.rcsb.org> (datum pristupa 16. 10. 2025.)
188. J. Cheung, M. J. Rudolph, F. Burshteyn, M. S. Cassidy, E. N. Gary, J. Love, M. C. Franklin, J. J. Height, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 10282–10286.
189. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 41141–41147.
190. Chemicalize, <https://chemicalize.com> (datum pristupa 16. 10. 2025.)
191. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46** (2001) 3–26.

192. D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 2615–2623.
193. H. Pajouhesh, G. R. Lenz, *NeuroRX* **2** (2005) 541–553.
194. W. J. Egan, G. Lauri, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54** (2002) 273–289.
195. pKCSM – pharmacokinetics, <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/> (datum pristupa 16. 10. 2025.)
196. Theory – How to interpret pkCSM results, <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/theory> (datum pristupa 16. 10. 2025.)
197. D. E. V. Pires, T. L. Blundell, D. B. Ascher, *J. Med. Chem.* **58** (2015) 4066–4072.
198. A. Matošević, D. M. Opsenica, M. Spasić, N. Maraković, A. Zandona, S. Žunec, M. Bartolić, Z. Kovarik, A. Bosak, *Chem. Biol. Interact.* **382** (2023) 110620.
199. A. Bosak, D. M. Opsenica, G. Šinko, M. Zlatar, Z. Kovarik, *Chem. Biol. Interact.* **308** (2019) 101–109.
200. D. Barak, C. Kronman, A. Ordentlich, N. Ariel, A. Bromberg, D. Marcus, A. Lazar, B. Velan, A. Shafferman, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 6296–6305.
201. Y. Bourne, H. C. Kolb, Z. Radić, K. B. Sharpless, P. Taylor, P. Marchot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101** (2004) 1449–1454.
202. E. da C. Petronilho, M. do N. Rennó, N. G. Castro, F. M. R. da Silva, A. da C. Pinto, J. D. Figueroa-Villar, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31** (2016) 1069–1078.
203. M. T. Younas, S. Zaib, I. Khan, *ChemistrySelect* **8** (2023) e202303089.
204. V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, M. Škrinjarić-Š, B. Radić, A. Lucić, I. Primožič, S. Tomić, *Arch. Toxicol.* **72** (1998) 289–295.
205. A. Bosak, I. Primožič, M. Oršulić, S. Tomić, V. Simeon-Rudolf, *Croat. Chem. Acta* **78** (2005) 121–128.
206. A. Zandona, M. Katalinić, G. Šinko, A. Radman Kastelic, I. Primožič, Z. Kovarik, *Arch. Toxicol.* **94** (2020) 3157–3171.
207. S. Darvesh, K. V. Darvesh, R. S. McDonald, D. Mataija, R. Walsh, S. Mothana, O. Lockridge, E. Martin, *J. Med. Chem.* **51** (2008) 4200–4212.
208. A. Capell, L. Meyn, R. Fluhrer, D. B. Teplow, J. Walter, C. Haass, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 5637–5643.
209. E. Viayna, T. Gómez, C. Galdeano, L. Ramírez, M. Ratia, A. Badia, M. V. Clos, E. Verdaguer, F. Junyent, A. Camins, M. Pallàs, M. Bartolini, F. Mancini, V. Andrisano, M. P. Arce, M. I. Rodríguez-Franco, A. Bidon-Chanal, F. J. Luque, P. Camps, D. Muñoz-Torrero, *ChemMedChem* **5** (2010) 1855–1870.
210. Y. Zhao, A. Shakeri, A. A. Hefny, P. P. N. Rao, *Med. Chem. Res.* **33** (2024) 1229–1241.
211. T. Mohamed, J. C. K. Yeung, M. S. Vasefi, M. A. Beazely, P. P. N. Rao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22** (2012) 4707–4712.

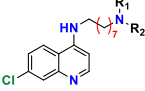
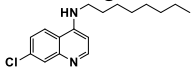
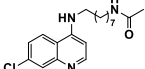
212. H. Kroth, A. Ansaloni, Y. Varisco, A. Jan, N. Sreenivasachary, N. Rezaei-Ghaleh, V. Giriens, S. Lohmann, M. P. López-Deber, O. Adolfsson, M. Pihlgren, P. Paganetti, W. Froestl, L. Nagel-Steger, D. Willbold, T. Schrader, M. Zweckstetter, A. Pfeifer, H. A. Lashuel, A. Muhs, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 34786–34800.
213. S. R. Chowdhury, F. Xie, J. Gu, L. Fu, *Pharm. Fronts* **1** (2019) e22–e32.
214. T. Härd, C. Lendel, *J. Mol. Biol.* **421** (2012) 441–465.
215. Z. Dhouafli, K. Cuanalo-Contreras, E. A. Hayouni, C. E. Mays, C. Soto, I. Moreno-Gonzalez, *Cell. Mol. Life Sci.* **75** (2018) 3521–3538.
216. M. Bartolić, A. Matošević, N. Maraković, I. Novaković, D. Sladić, S. Žunec, D. Opsenica, A. Bosak, *Biomolecules* **15** (2025) 1162.
217. S. Darvesh, R. Walsh, R. Kumar, A. Caines, S. Roberts, D. Magee, K. Rockwood, E. Martin, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **17** (2003) 117–126.
218. A. Matošević, D. M. Opsenica, M. Bartolić, N. Maraković, A. Stoilković, K. Komatović, A. Zandona, S. Žunec, A. Bosak, *Molecules* **29** (2024) 5357.
219. M. Bartolić, A. Matošević, N. Maraković, V. Bušić, S. Roca, D. Vikić-Topić, A. Sabljčić, A. Bosak, D. Gašo-Sokač, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **39** (2024) 2431832.

§ 9. DODATAK

9.1. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza

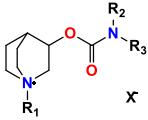
9.1.1. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza 4-aminokinolinima

Tablica D1. Inhibicija ljudskih AChE_{rec} i BChE 4-amino-7-klorkinolinima s *n*-oktilnom poveznicom.¹⁹⁸ K_i predstavlja disocijacijsku konstantu kompleksa enzim-ligand. Spojevi na kojima su provedena istraživanja u okviru ove doktorske disertacije označeni su sivom bojom.

	STRUKTURA ($R_1 = H$)	K_i (hAChE _{rec}) ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)	K_i (hBChE) ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)
CIAQ-1	$R_2 = H$	$0,61 \pm 0,03$ (n)	$6,1 \pm 0,9$
CIAQ-2	$R_2 = \text{metil}$	$0,092 \pm 0,007$ (n)	$0,30 \pm 0,05$
CIAQ-3	$R_2 = \text{izopropil}$	$0,073 \pm 0,003$ (n)	$0,14 \pm 0,01$
CIAQ-4	$R_2 = n\text{-butil}$	$0,057 \pm 0,002$ (n)	$0,11 \pm 0,01$
CIAQ-5	$R_2 = \text{cikloheksil}$	$0,040 \pm 0,02$ (n)	$0,064 \pm 0,003$
CIAQ-6	$R_2 = \text{fenil}$	$0,20 \pm 0,0$ (m)	$0,050 \pm 0,001$
CIAQ-7	$R_2 = \text{benzil}$	$0,0098 \pm 0,003$ (m)	$0,032 \pm 0,002$
CIAQ-8	$R_2 = 3\text{-fluorbenzil}$	$0,0032 \pm 0,0001$ (m)	$0,0084 \pm 0,0004$
CIAQ-9	$R_2 = 4\text{-fluorbenzil}$	$0,019 \pm 0,003$ (m)	$0,014 \pm 0,001$
CIAQ-10	$R_2 = 2\text{-klorbenzil}$	$0,0079 \pm 0,0004$ (n)	$0,072 \pm 0,003$
CIAQ-11	$R_2 = 3\text{-klorbenzil}$	$0,0051 \pm 0,0003$ (m)	$0,0069 \pm 0,0003$
CIAQ-12	$R_2 = 4\text{-klorbenzil}$	$0,085 \pm 0,006$ (n)	$0,027 \pm 0,002$
CIAQ-13	$R_2 = 4\text{-brombenzil}$	$0,13 \pm 0,00$ (n)	$0,016 \pm 0,001$
CIAQ-14	$R_2 = 4\text{-benzonitril}$	$0,11 \pm 0,01$ (n)	$0,13 \pm 0,01$
CIAQ-15	$R_2 = 4\text{-nitrobenzil}$	$0,13 \pm 0,01$ (n)	$0,036 \pm 0,002$
CIAQ-16	$R_2 = 4\text{-trifluormetilbenzil}$	$0,14 \pm 0,01$ (k)	$0,029 \pm 0,004$
CIAQ-17	$R_2 = 3\text{-metoksibenzil}$	$0,089 \pm 0,003$ (n)	$0,040 \pm 0,007$
CIAQ-18	$R_2 = 4\text{-metoksibenzil}$	$0,20 \pm 0,02$ (k)	$0,045 \pm 0,003$
CIAQ-19	$R_2 = 4\text{-tert-butilbenzil}$	$0,11 \pm 0,01$ (m)	$0,13 \pm 0,02$
CIAQ-20	$R_2 = 3\text{-metilpiridin}$	$0,025 \pm 0,001$ (m)	$0,32 \pm 0,03$
CIAQ-21	$R_2 = 4\text{-metilpiridin}$	$0,078 \pm 0,002$ (n)	$0,46 \pm 0,01$
CIAQ-22	$R_2 = 2\text{-metilimidazol}$	$0,14 \pm 0,00$ (n)	$0,18 \pm 0,02$
CIAQ-23	$R_2 = 2\text{-metilbenzofuran}$	$0,12 \pm 0,01$ (n)	$0,016 \pm 0,002$
CIAQ-24	$R_2 = 2\text{-metilbenzotiofen}$	$0,096 \pm 0,006$ (m)	$0,0078 \pm 0,0006$
CIAQ-25	$R_2 = 3\text{-metilbenzotiofen}$	$0,030 \pm 0,002$ (m)	$0,0023 \pm 0,0007$
CIAQ-26		/	$0,76 \pm 0,03$ (n)
CIAQ-27		/	$1,2 \pm 0,1$ (m)

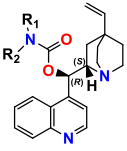
9.1.2. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza kinuklidinskim karbamatima

Tablica D2. Inhibicija ljudskih AChE i BChE kinuklidinskim karbamatima.²² k_i predstavlja sveukupnu konstantu brzine inhibicije. Spojevi na kojima su provedena istraživanja u okviru ove doktorske disertacije označeni su sivom bojom.

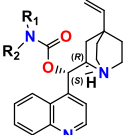
	STRUKTURA	$k_i \cdot 10^3$ (hAChE) (M ⁻¹ min ⁻¹)	$k_i \cdot 10^3$ (hBChE) (M ⁻¹ min ⁻¹)
DMK-1	R ₁ = /; R ₂ = R ₃ = metil; X = /	2,6 ± 0,6	3,1 ± 0,7
DMK-2	R ₁ = R ₂ = R ₃ = metil; X = I	5,5 ± 1,4	5,4 ± 1,5
DMK-3	R ₁ = benzil; R ₂ = R ₃ = metil; X = Br	3,4 ± 1,3	4,9 ± 0,7
DMK-4	R ₁ = <i>p</i> -nitrobenzil; R ₂ = R ₃ = metil; X = Br	5,9 ± 2,5	7,5 ± 1,9
DMK-5	R ₁ = <i>p</i> -klorbenzil; R ₂ = R ₃ = metil; X = Br	5,5 ± 1,4	3,6 ± 0,8
DEK-1	R ₁ = /; R ₂ = R ₃ = etil; X = /	2,9 ± 0,9	3,8 ± 0,9
DEK-2	R ₁ = metil; R ₂ = R ₃ = etil; X = I	3,5 ± 1,1	1,5 ± 0,0
DEK-3	R ₁ = benzil; R ₂ = R ₃ = etil; X = Br	15 ± 1	24 ± 6
DEK-4	R ₁ = <i>m</i> -brombenzil; R ₂ = R ₃ = etil; X = Br	6,8 ± 1,5	7,3 ± 2,1
DEK-5	R ₁ = <i>p</i> -klorbenzil; R ₂ = R ₃ = etil; X = Br	3,2 ± 0,7	3,4 ± 2,0
BnzK-1	R ₁ = /; R ₂ = H; R ₃ = fenil; X = /	1,0 ± 0,2	3,0 ± 0,9
BnzK-2	R ₁ = benzil; R ₂ = H; R ₃ = fenil; X = Br	3,7 ± 0,8	3,1 ± 1,1
BnzK-3	R ₁ = <i>m</i> -klorbenzil; R ₂ = H; R ₃ = fenil; X = Br	3,2 ± 0,5	3,1 ± 1,0
rivastigmin	/	4,54	333
fizostigmin	/	4900 ± 380	2800 ± 940

9.1.3. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza derivatima karbamata cinhonidina (CD) i cinhonina (CN)

Tablica D3. Inhibicija ljudskih AChE i BChE derivatima karbamata cinkonidina (CD).²³ k_i predstavlja sveukupnu konstantu brzine inhibicije. Spojevi na kojima su provedena istraživanja u okviru ove doktorske disertacije označeni su sivom bojom.

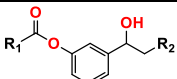
	STRUKTURA	$k_i \cdot 10^3$ (hAChE) (M ⁻¹ min ⁻¹)	$k_i \cdot 10^3$ (hBChE) (M ⁻¹ min ⁻¹)
CD-1	R ₁ = R ₂ = metil	0,74 ± 0,09	1,3 ± 0,12
CD-2	R ₁ = R ₂ = etil	1,46 ± 0,09	0,99 ± 0,10
CD-3	R ₁ = heksil; R ₂ = H	0,55 ± 0,07	0,78 ± 0,03
CD-4	R ₁ = fenil; R ₂ = H	1,15 ± 0,13	0,98 ± 0,19
CD-5	R ₁ = R ₂ = fenil	1,46 ± 0,11	2,34 ± 0,19
CD-6	R ₁ = etil; R ₂ = H	0,85 ± 0,13	1,01 ± 0,10

Tablica D4. Inhibicija ljudskih AChE i BChE derivatima karbamata cinkonina (CN).²³ k_i predstavlja sveukupnu konstantu brzine inhibicije. Spojevi na kojima su provedena istraživanja u okviru ove doktorske disertacije označeni su sivom bojom.

	STRUKTURA	$k_i \cdot 10^3$ (hAChE) (M ⁻¹ min ⁻¹)	$k_i \cdot 10^3$ (hBChE) (M ⁻¹ min ⁻¹)
CN-1	R ₁ = R ₂ = metil	1,47 ± 0,2	2,29 ± 0,19
CN-2	R ₁ = R ₂ = etil	1,78 ± 0,37	3,65 ± 0,34
CN-3	R ₁ = heksil; R ₂ = H	0,61 ± 0,05	1,42 ± 0,07
CN-4	R ₁ = fenil; R ₂ = H	0,92 ± 0,05	1,09 ± 0,12

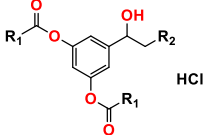
9.1.4. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza monokarbamatnim derivatima bambuterola

Tablica D5. Inhibicija ljudskih AChE i BChE monokarbamatnim derivatima bambuterola (A. Matošević, rukopis u pripremi). k_i predstavlja sveukupnu konstantu brzine inhibicije.

	STRUKTURA	$k_i \cdot 10^3$ (hAChE) (M ⁻¹ min ⁻¹)	$k_i \cdot 10^6$ (hBChE) (M ⁻¹ min ⁻¹)
1MDE	R ₁ = dietilamin; R ₂ = <i>tert</i> -butilamin	0,19 ± 0,08	0,0053 ± 0,0031
5MDE	R ₁ = dietilamin; R ₂ = 1-piperidin	3,5 ± 1,3	3,1 ± 0,1
7MDE	R ₁ = dietilamin; R ₂ = 1-adamantilamin	0,37 ± 0,04	0,010 ± 0,003
8MDE	R ₁ = dietilamin; R ₂ = 1-feniletilamin	3,7 ± 0,7	0,27 ± 0,04
9MDE	R ₁ = dietilamin; R ₂ = propargilamin	2,1 ± 1,0	0,48 ± 0,09
1MP	R ₁ = 1-priolidin; R ₂ = <i>tert</i> -butilamin	1,8 ± 0,0	3,7 ± 0,2
2MP	R ₁ = 1-priolidin; R ₂ = cikloheksilamin	0,89 ± 0,04	0,012 ± 0,001
5MP	R ₁ = 1-priolidin; R ₂ = 1-piperidin	0,96 ± 0,04	0,0044 ± 0,0021
6MP	R ₁ = 1-priolidin; R ₂ = <i>tert</i> -pentilamin	0,94 ± 0,03	0,011 ± 0,002
8MP	R ₁ = 1-priolidin; R ₂ = 1-feniletilamin	0,76 ± 0,18	2,5 ± 0,1
1MPI	R ₁ = 1-piperidin; R ₂ = <i>tert</i> -butilamin	0,21 ± 0,05	0,012 ± 0,005
2MPI	R ₁ = 1-piperidin; R ₂ = cikloheksilamin	1,1 ± 0,0	0,018 ± 0,003
5MPI	R ₁ = 1-piperidin; R ₂ = 1-piperidin	0,82 ± 0,04	4,8 ± 1,2
7MPI	R ₁ = 1-piperidin; R ₂ = 1-adamantilamin	2,6 ± 0,3	1,6 ± 0,6
bambuterol	/	0,22 ± 0,07	4,4 ± 0,2
rivastigmin	/	2,2 ± 0,5	0,055 ± 0,002

9.1.5. Konstante inhibicije ljudskih kolinesteraza biskarbamatnim derivatima bambuterola

Tablica D6. Inhibicija ljudskih AChE i BChE biskarbamatnim derivatima bambuterola.^{24,25} k_i predstavlja sveukupnu konstantu brzine inhibicije. Spojevi na kojima su provedena istraživanja u okviru ove doktorske disertacije označeni su sivom bojom.

	STRUKTURA	$k_i \cdot 10^6$ (hAChE) (M ⁻¹ min ⁻¹)	$k_i \cdot 10^6$ (hBChE) (M ⁻¹ min ⁻¹)
DMBK-1	R ₁ = dimetilamin; R ₂ = cikloheksilamin	0,0261 ± 0,0102	1,54 ± 0,40
DMBK-2	R ₁ = dimetilamin; R ₂ = <i>p</i> -toluilamin	0,00109 ± 0,00020	0,0202 ± 0,0023
DMBK-3	R ₁ = dimetilamin; R ₂ = 1-piperidin	0,0312 ± 0,0032	1,74 ± 0,48
DMBK-4	R ₁ = dimetilamin; R ₂ = 1-adamantilamin	0,0033 ± 0,0013	0,0192 ± 0,0021
DMBK-5	R ₁ = dimetilamin; R ₂ = 1-feniletilamin	0,0221 ± 0,0052	0,818 ± 0,034
DMBK-6	R ₁ = dimetilamin; R ₂ = 2-feniletilamin	/	/
EMBK-1	R ₁ = etilmetilamin; R ₂ = cikloheksilamin	1,73 ± 0,44	1,47 ± 0,193
EMBK-2	R ₁ = etilmetilamin; R ₂ = 1-anilin	0,0139 ± 0,0071	0,0101 ± 0,006
EMBK-3	R ₁ = etilmetilamin; R ₂ = 1-piperidin	0,252 ± 0,068	3,71 ± 0,84
EMBK-4	R ₁ = etilmetilamin; R ₂ = <i>tert</i> -pentilamin	0,0402 ± 0,0063	2,28 ± 0,42
EMBK-5	R ₁ = etilmetilamin; R ₂ = 1-adamantilamin	2,00 ± 0,70	3,68 ± 1,23
EMBK-6	R ₁ = etilmetilamin; R ₂ = 1-feniletilamin	0,014 ± 0,005	0,238 ± 0,119
EMBK-7	R ₁ = etilmetilamin; R ₂ = 2-feniletilamin	0,0310 ± 0,0132	0,205 ± 0,052
DEBK-1	R ₁ = dietilamin; R ₂ = cikloheksilamin	/	/
DEBK-2	R ₁ = dietilamin; R ₂ = 1-piperidin	0,0263 ± 0,0110	0,141 ± 0,051
DEBK-3	R ₁ = dietilamin; R ₂ = <i>tert</i> -pentilamin	4,56 ± 1,18	1,64 ± 0,37
DEBK-4	R ₁ = dietilamin; R ₂ = 1-adamantilamin	2,02 ± 0,65	2,18 ± 0,52
DEBK-5	R ₁ = dietilamin; R ₂ = 1-feniletilamin	0,00693 ± 0,00210	0,0145 ± 0,0049
DEBK-6	R ₁ = dietilamin; R ₂ = 2-feniletilamin	0,00679 ± 0,000217	0,0144 ± 0,0053
PBK-1	R ₁ = 1-pirolidin; R ₂ = cikloheksilamin	0,0193 ± 0,0096	1,05 ± 0,45
PBK-2	R ₁ = 1-pirolidin; R ₂ = <i>tert</i> -pentilamin	0,0036 ± 0,000303	4,51 ± 1,52
PBK-3	R ₁ = 1-pirolidin; R ₂ = 1-adamantilamin	0,00841 ± 0,00053	1,80 ± 0,37
PBK-4	R ₁ = 1-pirolidin; R ₂ = 1-feniletilamin	/	/
PBK-5	R ₁ = 1-pirolidin; R ₂ = 2-feniletilamin	0,021 ± 0,0043	0,191 ± 0,026
PIBK-1	R ₁ = 1-piperidin; R ₂ = cikloheksilamin	0,0136 ± 0,0050	2,62 ± 0,97
PIBK-2	R ₁ = 1-piperidin; R ₂ = 1-piperidin	0,0382 ± 0,0131	38,0 ± 6,7
PIBK-3	R ₁ = 1-piperidin; R ₂ = 1-adamantilamin	0,165 ± 0,074	1,89 ± 0,59
PIBK-4	R ₁ = 1-piperidin; R ₂ = 2-feniletilamin	/	/
MFBK-1	R ₁ = fenilmetilamin; R ₂ = cikloheksilamin	0,0182 ± 0,0063	1,63 ± 0,57
MFBK-2	R ₁ = fenilmetilamin; R ₂ = 1-piperidin	/	/
bambuterol	/	0,000220 ± 0,000070	4,4 ± 0,2
rivastigmin	/	0,00222 ± 0,00046	0,0551 ± 0,0022
fizostigmin	/	4,90 ± 0,380	2,80 ± 0,940

9.2. Procjena prolaznosti spojeva kroz krvno-moždanu barijeru

Tablica D7. logBB vrijednosti 4-amino-7-klorkinolina različitih duljina poveznice izračunate pomoću protokola *ADMET descriptors* unutar programa Biovia Discovery Studio Client v21.

SPOJ	logBB	SPOJ	logBB
CIAQn-1	0,246	CIAQn-13	0,961
CIAQn-2	0,528	CIAQn-14	-0,465
CIAQn-3	0,59	CIAQn-15	-0,183
CIAQn-4	0,872	CIAQn-16	0,099
CIAQn-5	0,523	CIAQn-17	0,285
CIAQn-6	0,805	CIAQn-18	0,567
CIAQn-7	0,204	CIAQn-19	0,849
CIAQn-8	0,486	CIAQn-20	0,198
CIAQn-9	0,768	CIAQn-21	0,48
CIAQn-10	0,744	CIAQn-22	0,762
CIAQn-11	0,397		
CIAQn-12	0,679		

Tablica D8. logBB vrijednosti *O*-tert-butiloksima izračunate pomoću protokola *ADMET descriptors* unutar programa Biovia Discovery Studio Client v21.

O-metiloksim	logBB	O-tert-butiloksim	logBB	O-benziloksim	logBB
MetOX-2	-0,185	tBuOX-1	/	BnzOX-1	-0,363
MetOX-3	-0,044	tBuOX-2	/	BnzOX-2	0,472
MetOX-5	-0,959	tBuOX-3	0,039	BnzOX-3	0,24
MetOX-6	-0,185	tBuOX-4	0,102	BnzOX-4	0,304
MetOX-7	-0,044	tBuOX-5	0,244	BnzOX-5	0,446
MetOX-8	-0,018	tBuOX-6	0,27	BnzOX-6	0,472
MetOX-9	-0,959	tBuOX-7	-0,671	BnzOX-7	0,532
		tBuOX-8	0,189	BnzOX-8	-0,47
		tBuOX-9	0,102	BnzOX-9	0,304
		tBuOX-10	0,244	BnzOX-10	0,446
		tBuOX-11	0,27	BnzOX-11	0,472
		tBuOX-12	-0,671	BnzOX-12	-0,47
		tBuOX-13	0,189	BnzOX-13	0,367
		tBuOX-14	0,166	BnzOX-14	0,651
		tBuOX-15	0,308	BnzOX-15	0,367
		tBuOX-16	0,472	BnzOX-16	0,509
		tBuOX-17	0,905	BnzOX-17	0,754
				BnzOX-18	0,673
				BnzOX-19	1,106

§ 10. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime:	Marija Bartolić
Datum rođenja:	8. 6. 1994.
e-mail:	mbartolic@imi.hr

RADNO ISKUSTVO

2021. – danas	Asistent doktorand, Zavod za toksikologiju, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, 10000 Zagreb
---------------	--

OBRAZOVANJE

2021. – danas	Doktorski studij kemija (smjer: biokemija) Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
2018. – 2021.	Sveučilišni diplomski studij kemija (smjer: analitička kemija i biokemija) Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
2013. – 2018.	Sveučilišni prijediplomski studij kemija Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

SUDJELOVANJE NA PROJEKTIMA

2021. – 2026.	Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti (HrZZDok-2021-02-4835) Voditelj projekta: dr. sc. Anita Bosak
2021. – 2025.	Razvoj bioaktivnih molekula za tretman neurodegenerativnih bolesti (BioMol4ND) (IP-2020-02-9343) Voditelj projekta: dr. sc. Anita Bosak
2022. – 2023.	Sinteza i biološka evaluacija karbamata kao potencijalnih inhibitora kolinesteraza utretmanu Alzheimerove bolesti (HAZU - 520) Voditelj projekta: dr. sc. Ana Matošević

ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

1. **M. Bartolić**, A. Bosak, Overview of BACE1 structure and effect of genetic polymorphisms and protein isoforms on enzyme activity, *Period. Biol.* **126** (3 – 4) (2024), 117 – 131. (Pregledni rad - znanstveni)
2. **M. Bartolić**, A. Matošević, N. Maraković, I. Novaković, D. Sladić, S. Žunec, D. Opsenica, A. Bosak, Assessment of Biological Activity of Low Molecular Weight 1,4-Benzoquinone Derivatives, *Biomolecules* **15**(8) (2025), 1162. (Izvorni znanstveni rad)
3. **M. Bartolić**, A. Matošević, N. Maraković, V. Bušić, S. Roca, D. Vikić-Topić, A. Sabljčić, A. Bosak, D. Gašo-Sokač, Evaluation of hydrazone and *N*-acylhydrazone derivatives of vitamin B6 and pyridine-4-carbaldehyde as potential drugs against Alzheimer's disease, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **39**(1) (2024), 2431832. (Izvorni znanstveni rad)
4. A. Matošević, D. M. Opsenica, **M. Bartolić**, N. Maraković, A. Stoilković, K. Komatović, A. Zandona, S. Žunec, A. Bosak, Derivatives of Amodiaquine as Potent Human Cholinesterases Inhibitors: Implication for Treatment of Alzheimer's Disease, *Molecules* **29**(22) (2024), 5357. (Izvorni znanstveni rad)
5. A. Matošević, **M. Bartolić**, N. Maraković, A. Zandona, R. Petrić, D. Opsenica, A. Bosak, Synthesis and biological evaluation of novel aminoquinolines with an *n*-octyl linker: Impact of halogen substituents on C(7) or a terminal amino group on anticholinesterase and BACE1 activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **112** (2024), 129928. (Izvorni znanstveni rad)
6. A. Matošević, D. Opsenica, M. Spasić, N. Maraković, A. Zandona, S. Žunec, **M. Bartolić**, Z. Kovarik, A. Bosak, Evaluation of 4-aminoquinoline derivatives with an *n*-octylamino spacer as potential multi-targeting ligands for the treatment of Alzheimer's disease, *Chem. Biol. Interact.* **382** (2023), 110620. (Izvorni znanstveni rad)

SUDJELOVANJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA (USMENA PRIOPĆENJA)

1. **M. Bartolić**, D. Knez, S. Gobec, A. Stoilković, K. Bogojević, D. Opsenica, A. Bosak, Aminoquinoline Derivatives as Dual AChE-MAO Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease, 9th Faculty of Science PhD Student Symposium, Zagreb, Hrvatska, 2025.
2. **M. Bartolić**, A. Bosak, Multi-target approach to the treatment of Alzheimer's disease: revival of amyloid theory, Mini-symposium "Multidisciplinarity in drug development", Zagreb, Hrvatska, 2025.
3. **M. Bartolić**, A. Bosak, Prospect for Development of Alzheimer's Disease Drugs Based on 4-aminoquinoline Scaffold, 11th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium, Rim, Italija, 2024.
4. **M. Bartolić**, A. Bosak, Multiple Problems, One Solution: Multi-Target Directed Ligands as the Future Treatment for Alzheimer's Disease. 7th Mini Symposium for Young Scientists of Section of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, Zagreb, Hrvatska, 2023.

SUDJELOVANJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA (POSTER)

1. **M. Bartolić**, A. Stoilković, K. Bogojević, D. Opsenica, A. Bosak, Novel aminoquinoline derivatives with potent anticholinesterase activity as potential symptomatic treatment for Alzheimer's disease. The 24th FEBS Young Scientists' Forum (YSF 2025) & The 49th FEBS Congress, Sapanca i Istanbul, Turska, 2025.

2. **M. Bartolić**, D. Gašo Sokač, V. Bušić, A. Ramić, I. Primožič, A. Bosak, Comparison of Structurally Different Ligands' Ability to Prevent Amyloid Formation in Alzheimer's Disease, FEBS3+ Meeting: Exploring Molecular Frontiers, Pula, Hrvatska, 2024.
3. **M. Bartolić**, A. Bosak, Prospect for Development of Alzheimer's Disease Drugs Based on 4-aminoquinoline Scaffold. The XXVIII EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, Rim, Italija, 2024.
4. **M. Bartolić**, A. Ramić, I. Primožič, A. Bosak, Quinuclidinium oximes as cholinesterases' and amyloid formation inhibitors. EMBO Workshop: Molecular Neurobiology, Heraklion, Grčka, 2024.
5. **M. Bartolić**, D. Gašo-Sokač, V. Bušić, A. Ramić, I. Primožič, A. Bosak, Amyloid-Targeting Approach For Treatment of Alzheimer's Disease: Biological Evaluation of Different Structural Scaffolds. 8th Faculty of Science PhD Student Symposium, Zagreb, Hrvatska, 2024.
6. **M. Bartolić**, A. Bosak, Small Molecules, Big Dreams: In Search of Multi-Target Directed Ligands for the Treatment of Alzheimer's Disease. 9th Conference of Young Chemists of Serbia, Novi Sad, Srbija, 2023.
7. **M. Bartolić**, P. Šušak, M. Arežina, M. Laučan, A. Ramić, T. Hrenar, I. Primožič, A. Bosak, Quinuclidinium Based O-Alkyl Oximes as Potential Anticholinesterase Agents in Symptomatic Treatment of Alzheimer's Disease. IX EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry & 10th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium, Zagreb, Hrvatska, 2023.
8. **M. Bartolić**, A. Matošević, M. Spasić, D. Opsenica, A. Bosak, Evaluation of 4-aminoquinolines as potential MTDL ligands for the treatment of Alzheimer's disease. Joint IUBMB/FEBS Advanced Lecture Course "Molecular targets for anti-aging interventions", Spetses, Grčka, 2022.
9. **M. Bartolić**, A. Matošević, V. Bušić, D. Gašo Sokač, A. Bosak, Evaluation of hydrazone-based compounds as potential drugs for treatment of Alzheimer's disease. European School of Medicinal Chemistry – 41st Advanced Course of Medicinal Chemistry and "E. Duranti" Seminar for PhD Students, Urbino, Italija, 2022.
10. **M. Bartolić**, A. Matošević, V. Bušić, D. Gašo-Sokač, A. Bosak, Hydrazone-based compounds evaluated as inhibitors of human cholinesterases. 17th International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM2022), Dubrovnik, Hrvatska, 2022.

SUDJELOVANJA NA ZNANSTVENIM RADIONICAMA I ŠKOLAMA

1. ERSMUS+ ToxLearn4EU Summer School, Hasselt, Belgija, 2024.
2. EMBO Workshop: Molecular Neurobiology, Heraklion, Grčka, 2024.
3. Shimadzu training for Nexera LC-40 with PDA Detector – Theory, LabSolution software, maintenance, troubleshooting, IMI, Zagreb, Hrvatska, 2023.
4. 1st Workshop in Mass Spectrometry in Life Sciences, Zagreb, Hrvatska, 2023.
5. European School of Medicinal Chemistry – 41st Advanced Course of Medicinal Chemistry and "E. Duranti" Seminar for PhD Students, Urbino, Italija, 2022.
6. Praktična radionica "Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa", BioCentar, Zagreb, Hrvatska, 2021.

7. Workshop on Education “Better skills for better jobs: Education and training for successful research careers”, HDBMB & FEBS, 2021 (online).
8. Radionica „Uvod u molekulsko modeliranje“, Hrvatsko društvo za istraživanje raka, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 2021.

STUDIJSKI BORAVCI U INOZEMSTVU

1. Boravak na Fakultetu za farmaciju, Univerza v Ljubljani, u laboratoriju pod vodstvom prof. dr. sc. Stanislava Gobeca, 3. – 7. 2. 2025.
2. Boravak na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu, u laboratoriju pod vodstvom prof. dr. sc. Dejana Opsenice, 16.10. – 14. 11. 2023.

NAGRADE I STIPENDIJE

1. Nagrada za Mladog medicinskog i farmaceutskog kemičara 2023. godine dodijeljena od strane Selvita d.o.o. i HKD-a.
2. FEBS-YSF stipendija za sudjelovanje na *Young Scientist's Forum*-u (YSF 2025) održanom 2. – 5. 7. 2025. u Sapanci, Turska, i 49. FEBS kongresu održanom 5. – 9. 7. 2025. u Istanbulu, Turska.
3. Stipendija dodijeljena od strane HKD-a za sudjelovanje na *The XXVIII EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry* održanom 1. – 5. 9. 2024. U Rimu, Italija.
4. EMBO travel grant stipendija za sudjelovanje na radionici *EMBO Workshop: Molecular Neurobiology* održanoj 13. – 17. 5. 2024. u Heraklionu, Grčka.

ORGANIZACIJA ZNANSTVENIH SKUPOVA

1. Mini simpozij „Multidisciplinarity in drug development“ povodom završetka HrZZ projekta „BioMol4ND – Razvoj bioaktivnih molekula za tretman neurodegenerativnih bolesti (9343)“, Zagreb, Hrvatska, 2025.
2. 8th Mini Symposium for Young Scientists of Section of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, Zagreb, Hrvatska, 2024.

NASTAVNO-OBRAZOVNE AKTIVNOSTI

Neposredno voditeljstvo izrade diplomskog rada Petre Šušak, mag. chem., pod naslovom “Inhibicija humanih kolinesteraza O-alkiloksimima” (Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu).