

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНО ВЕЋЕ

Предмет: Образложење предлога теме докторске дисертације

Молим Наставно-научно веће Универзитета у Београду – Хемијског факултета да одобри израду докторске дисертације под насловом:

„Рационални развој хибрида аминокхолина и адамантана као лиганата усмерених *in vitro* ка више мета од значаја за терапију Алцхајмерове болести”

1. Научна област: Органска хемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је рационални развој нових хибрида аминокхолина и адамантана и испитивање њихове *in vitro* инхибиторне активности према више идентификованих мета у симптоматској терапији Алцхајмерове болести. Истраживање у оквиру ове тезе чиниће две целине.

Први део истраживања ће обухватити дизајн и синтезу нових 4-аминокхолинских деривата који садрже адамантанску структуру. Аминокхолинско језгро, које представља познату фармакофору, биће повезано са адамантил-групом преко бочног низа. Развој једињења биће остварен променом структуре бочног низа, структуре хинолинског и адамантил дела молекула, у складу са резултатима молекулског моделовања интеракција ензим–супстрат („molecular docking”) и биолошке активности.

У оквиру другог дела истраживања биће извршено *in vitro* тестирање синтетисаних једињења. Пре свега, биће испитана *in vitro* инхибиторна активност према ацетилхолин- (AChE) и бутирилхолин-естеразама (BChE). Осим тога биће испитана *in vitro* антиоксидативна активност и способност хелатације Zn^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{2+} јона.

3. Основне хипотезе

Алцхајмерова болест је сложен неуродегенеративни поремећај и сматра се најчешћим узроком деменције, којом је према подацима Светске здравствене организације погођено 55,2 милиона људи, са порастом броја смртних случајева за 188% од 2000. године.¹ Алцхајмерова болест је прогресивно и фатално обољење, које одликује оштећење или смрт нервних ћелија. Последице су промене у мозданом ткиву и симптоми као што су губитак памћења, губитак говора, депресија, поремећаји у понашању и друго.^{2,3} Тачан

узрок појаве ове болести до данас није поуздано утврђен, и не постоји терапија која лечи узроке обољења или доводи до потпуног излечења пацијента. Лекови који се премењују у лечењу Алцхајмерове болести ограничени су на ублажавање симптома и побољшање стања пацијента.² Најважнија патолошка обележја Алцхајмерове болести су: формирање β -амилоидних (А β) плакова, смањење концентрације неуротрансмитера ацетилхолина, хиперфосфорилација и акумулација тау-протеина, нарушавање хомеостазе биометала и оксидативни стрес.³ Од четири одобрена лека, три представљају инхибиторе ацетилхолин-естеразе, ензима одговорног за хидролизу ацетилхолина, и овај ензим представља фаворизовану мету у третману Алцхајмерове болести.³ Активно место ацетилхолин-естеразе састоји се из каталитичког активног места („catalytic active site”, CAS) и периферног анијонског места („peripheral anionic site”, PAS). Осим основне улоге хидролизе ацетилхолина, овај ензим доприноси и настанку А β -плакова, преко PAS.³ Бутирилхолин-естераза је друга холинестераза присутна код људи, чија физиолошка улога још увек није у потпуности разјашњена. Утврђен је повишен ниво овог ензима у можданом плаку код пацијента у одмаклој фази болести, као и бржи пораст концентрације у односу на ацетилхолин-естеразу током прогресије болести, што га чини новом метом за развој лекова.³ Код пацијента оболелих од Алцхајмерове болести уочене су повећане концентрације јона Cu^{2+} , Zn^{2+} и Fe^{2+} и утврђена је повезаност са формирањем А β -плакова који служе као њихов депо. Такође, јони метала су редокс-активне врсте, и у присуству А β -плакова генеришу кисеоничне радикале који су одговорни за оксидативни стрес.⁴ Због сложене етиологије болести, јавља се потреба за развојем лекова који би били усмерени према више мета деловања („multy-target directed ligand”, MTDL).⁵ Такви лекови би требало да инхибирају активност холинестераза, да буду способни да се истовремено вежу за CAS и PAS ацетилхолин-естеразе, да изврше хелатацију јона метала укључених у хомеостазу и да имају антиоксидативну активност.

Више од два века, хинолинско језгро је модел за дизајн и развој лекова. Деривати аминокхолина су до данас показали широк спектар биолошке активности: антимаљаријску, антибактеријску, антивирусну и антифунгалну.⁶ У литератури је забележена инхибиторна активност 4-аминокхолина према ацетилхолин-естерази, што представља перспективни структурни мотив за развој нових активних инхибитора.^{7,8}

4. Циљеви истраживања и очекивани резултати

Циљеви овог истраживања су:

1) *Синтеза нових аминокхолинских деривата адамантана*, која подразумева примену реакција познатих у литератури и оптимизацију синтетског пута.

2) *Испитивање биолошке активности синтетисаних једињења*, које обухвата одређивање *in vitro* инхибиторне активности према ацетилхолин-естерази и бутирилхолин-естерази, мерење *in vitro* антиоксидативне активности и испитивање способности хелатације биометала.

3) *Анализа физичко-хемијских особина синтетисаних деривата*, одређених *in silico* методама, које указују на потенцијал примене као лека и пролазак крвно-мождане баријере.

4) *Молекулски докинг синтетисаних лиганата у структуру ензима*, што омогућава рационализацију експерименталних резултата инхибиторне активности и анализу односа структура–активност.

5. Методе истраживања

Током истраживања користиће се стандардне лабораторијске технике и методе органске синтезе. Између осталог, примениће се реакције трансформације функционалних група, међу којима су редукције, оксидације и друге, затим реакције стварања везе угљеник–хетероатом, као и реакције супституције на хетероцикличном језгру. Зависно од природе супстрата и реакционих услова, по потреби ће се вршити заштита функционалних група.

Добијени производи биће пречишћени стандардним лабораторијским методама и њихова структура ће бити окарактерисана применом 1D и 2D метода нуклеарне магнетне резонанције (NMR ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC), инфрацрвене спектроскопије (FTIR) и масене спектрометрије високе резолуције (HRMS). Пре *in vitro* тестова, чистоћа једињења ће бити испитана анализом течном хроматографијом високих перформанси (HPLC).

Инхибиторна активност синтетисаних деривата према рекомбинантној хуманој ацетилхолин-естерази и хуманој бутирилхолин-естерази, одредиће се у *in vitro* условима користећи Ellman-ову методу. За одређивање *in vitro* антиоксидативне активности користиће се FRAP („ferric reducing antioxidant power”) тест. Способност хелатације биометала (Fe^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+}) биће испитана Job-овом методом поређењем одговарајућих UV-Vis спектра. Мерење липофилности синтетисаних једињења вршиће се танкослојном хроматографијом у реверснофазним условима. *In silico* методама одредиће се вредности pK_a , затим физичко-хемијске особине и структурни дескриптори важни за предвиђање колико су синтетисана једињења слична лековима („druglikeness”), као и за предвиђање проласка кроз крвно–мождану баријеру.

За молекулске докинг студије, структуре ензима ће бити припремљене полазећи од кристалних структура ацетилхолин-естеразе и бутирилхолин-естеразе доступних на платформи Protein Data Bank (PDB). Структуре једињења ће бити доковане у ензим према флексибилном протоколу.

6. Литература

1. A blueprint for dementia research. Geneva: World Health Organization; **2022**, ISBN 978-92-4-005824-8.
2. Alzheimer’s Association Report. 2021 Alzheimer’s Disease Facts and Figures, *Alzheimer’s Dementia.*, **2021**, 17, 327–406.
3. Sharma, P., Srivastava, P., Seth, A., Tripathi, P.N., Banerjee, A.G., Shrivastava, S.K. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer’s disease and potential therapeutic strategies, *Prog. Neurobiol.*, **2019**, 174, 53–89.

4. Huang, X., Moir, R. D., Tanzi, R. E., Bush, A. I., Rogers, J. T. Redox-Active Metals, Oxidative Stress, and Alzheimer's Disease Pathology, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2004**, *1012*, 153–163.
5. Martins, M. M., Branco, P. S., Ferreira, L. M. Enhancing the Therapeutic Effect in Alzheimer's Disease Drugs: The role of Polypharmacology and Cholinesterase Inhibitors, *ChemistrySelect*, **2023**, *8*, e202300461.
6. Senerovic, L., Opsenica, D., Moric, I., Aleksic, I., Spasić, M., Vasiljevic, B. Quinolines and Quinolones as Antibacterial, Antifungal, Anti-virulence, Antiviral and Anti-parasitic Agents. In: Donelli, G. (eds) *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health. Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2019**, vol 1282. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/5584_2019_428
7. Chen, Y., Bian, Y., Sun, Y., Kang, C., Yu, S., Fu, T., Li, W., Pei, Y., Sun H. Identification of 4-aminoquinoline core for the design of new cholinesterase inhibitors, *Peer J.*, **2016**, *4*, e2140.
8. Bosak, A., Opsenica, D. M., Šinko, G., Zlatar, M., Kovarik, Z. Structural aspects of 4-aminoquinolines as reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Chem.-Biol. Interact.*, **2019**, *308*, 101–109.