

INHIBICIJSKO DJELOVANJE 1,2,3-TRIAZOLNIH SOLI NA KOLINESTERAZE

Ilijana Odak^a, Stanislava Talić^a, Irena Škorić^b, Milena Mlakić^b

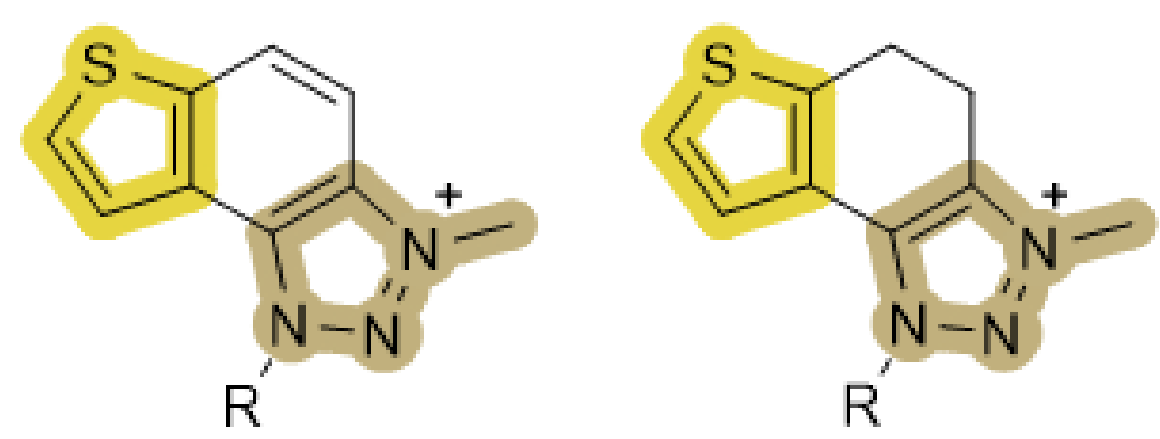
^aSveučilište u Mostaru, Fakultet prirodoalovno-matematičkih i odgojnih znanosti, Matice hrvatske bb, 88 000 Mostar, Bosna i Hercegovina

^bSveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Trg Marka Marulića 19, 10 000 Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Enzimi kolinesteraze, prije svega acetilkolinesteraza (AChE) te u nekoj mjeri i butirilkolinesteraza (BChE), čine trenutno ciljane mete u tretmanu Alzheimerove bolesti. U dizajnu novih struktura, koje djeluju kao inhibitori enzima AChE i BChE, zanimljiv osnovni kostur predstavlja 1,2,3-triazol koji je sastavni dio u strukturama raznih lijekova.¹ U ovom istraživanju, ispitana su inhibicijska svojstva serije 1,2,3-triazolnih soli na enzime AChE i BChE.² Kinetička ispitivanja su provedena kako bi se opisale interakcije odabranog inhibitora i enzima, a tip inhibicije procijenjen je iz Lineweaver-Burk dijagrama.

UVOD



Slika 1. Osnovni kostur ispitivanih triazolnih derivata

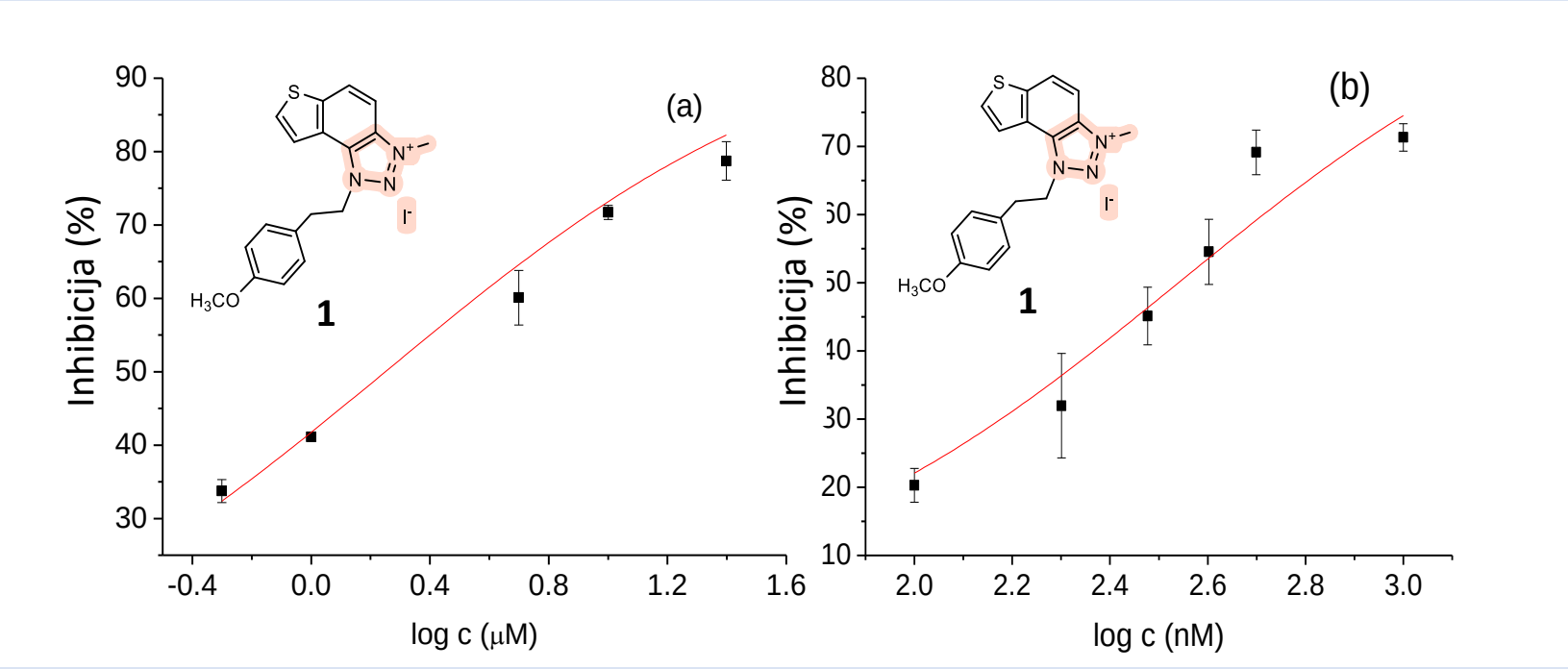
1,2,3-triazolni prsten čini središnju heterocikličku komponentu u brojnim lijekovima zbog čega ovaj prsten predstavlja zanimljivu okosnicu u dizajnu novih molekula s potencijalno značajnom biološkom aktivnosti. Ranije smo proveli ispitivanje biološke aktivnosti cijelog niza nafto- i tienobenzo-triazolnih derivata kao inhibitora enzima kolinesteraza gdje su se pojedini derivati istaknuli kao izvrsni inhibitori a neki i selektivni inhibitori prema BChE.^{3,4,5} Pozitivno nabijene 1,2,3-triazolne soli također čine zanimljivu klasu biološki aktivnih spojeva sa specifičnim prednostima u odnosu na nenabijene analoge. Osim širokog spektra potencijalne primjene, posjeduju i karakteristična kemijska svojstva kao što je visoka stabilnost. Uzimajući sve navedeno u obzir, priredili smo niz nabijenih tienobenzo-triazonijevih soli kako bi ih usporedili s analogima bez naboja (aromatski i nearomatski) te kako bi se ispitao utjecaj supstituenta na inhibicijsku aktivnost.

REZULTATI

Tablica 1. Izračunate IC₅₀ vrijednosti 1,2,3-triazolnih soli

Spoj	1	2	3	4	5	6	7	8	Galantamin
AChE IC ₅₀ /μM	1.8	4.3	6.9	15.3	167.6	6.7	29.3	20.3	0.15
BChE IC ₅₀ /μM	0.3	9.2	1.8	9.8	37.2	9.4	29.7	17.5	7.9

Oba enzima, AChE i BChE, učinkovito su inhibirana ispitivanim derivatima 1,2,3-triazolnih soli. Vodeći spoj je derivat **1** s rezultatom inhibicije BChE boljom nego sa standardom galantaminom, te nešto manjom za AChE od galantamina. S obzirom na vrstu središnjeg prstena, aromatski ili nearomatski, **3** ima bolje IC₅₀ vrijednosti od nearomatiziranog analoga **7**, dok **4** i njegov nearomatizirani analog **8** imaju gotovo iste afinitete za oba enzima. Nešto slabije vrijednosti inhibicije postignute su s **5**, pa se od svih supstituenata 4-hidroksibutilni derivat pokazao kao onaj koji smanjuje aktivnost.



Slika 2. Doza – odgovor krivulje za inhibiciju AChE (a) i BChE (b)

Kako su ranije ispitani isti tienobenzo-triazoli bez naboja, moguća je usporedba dobivenih rezultata.³ Tako je analog spoja **1**, najučinkovitijeg inhibitora iz ove grupe, bio izvrstan inhibitor ali selektivan samo za BChE. Slično opažamo i za nenabijeni analog spoja **2**: prevođenje u oblik soli zadržava vrlo učinkovitu inhibiciju BChE ali se aktivnost prema AChE drastično povećava. Kod soli **3** i **6** povećana je aktivnost prema oba enzima u usporedbi s nenabijenim analogima.

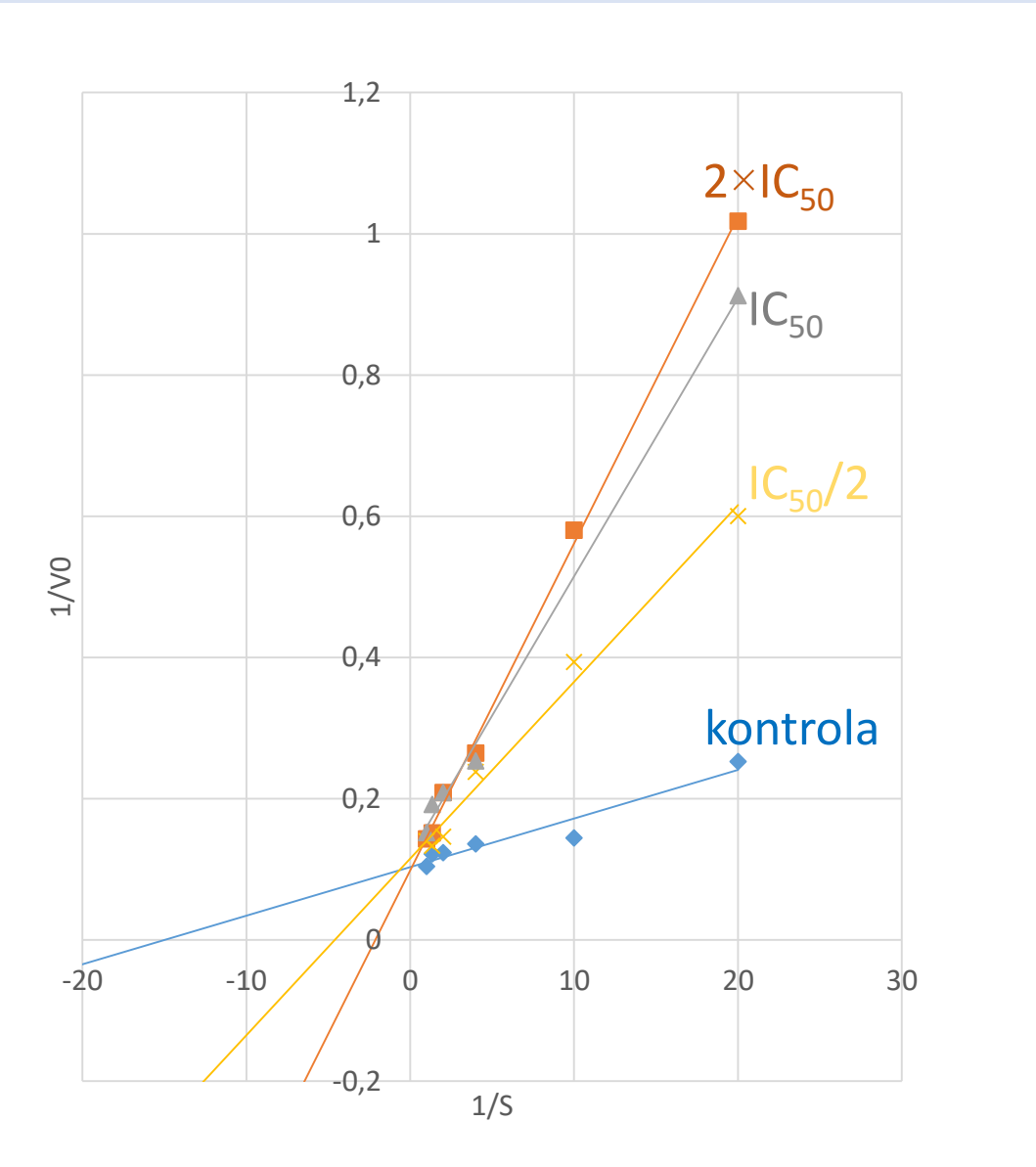
Tablica 2. K_m i v_{max} vrijednosti za spoj **8**

Uzorak	K _m μM	v _{max} μM/min
kontrola	0,07	9,69
IC ₅₀ /2	0,29	9,83
IC ₅₀	0,47	10,13
2×IC ₅₀	1,00	11,86

Za mjerenje početne brzine odabrane su različite koncentracije supstrata za BChE, te je provedeno kontrolno mjerenje bez inhibitora i tri mjerenja s inhibitorom **8** različitih koncentracija: IC₅₀, IC₅₀/2 te 2×IC₅₀.

Iz jednadžbi L-B pravaca izračunate su vrijednosti v_{max} i K_m za kontrolno mjerenje i za sve tri koncentracije (Tablica 2).

Prema rezultatima iz L-B dijagrama spoj **8** je kompetitivni inhibitor enzima. Vrijednosti v_{max} su gotovo iste i u kontrolnom mjerenju i u prisutnosti inhibitora, zbog čega su odsjeći na y osi isti kod kompetitivnog inhibitora i bez njega. Vrijednosti K_m se povećavaju, odnosno afinitet enzima za supstrat se smanjuje u prisutnosti inhibitora.



Slika 3. Lineweaver – Burck dijagram za spoj **8**

METODE

Ciljne molekule pripravljene su sljedećim sintetskim nizom: sinteza odgovarajućeg stilbenskog derivata Wittigovom reakcijom, fotociklizacija dobivenih stilbena te reakcija metiliranja za prevođenje u derivate s nabojem.²

Postupak za mjerenje inhibicije enzima osniva se na kolorimetrijskoj Ellman metodi.⁶ Temelji se na reakciji između tiokolina, koji nastaje enzimatskom hidrolizom sintetskog supstrata ATChI/BTChI i DTNB-a ili Ellmanovog reagensa. Stvaranje žutog produkta ove reakcije, 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB), mjeri se praćenjem apsorbancije na 412 nm. Ista metoda se koristi i za kinetička mjerenja. Razlika je što se u kinetičkom postupku prati promjena apsorbancije u vremenu, za razliku od metode određivanja inhibicije gdje se prati promjena apsorbancije u ovisnosti o koncentraciji spoja.

ZAKLJUČAK

Triazolne soli **1** – **3** pokazale su izvrsnu inhibiciju enzima AChE i BChE, dok su **4** i **6** vrlo dobri inhibitori oba enzima. Iste strukture bez naboja selektivno inhibiraju BChE i to u umjerenom rangu inhibicijske aktivnosti. Bolji rezultati ostvareni su s aromatiziranim derivatima, a i među susptituentima na triazolnom prstenu, inhibiciji enzima najviše pogoduje benzenski prsten s metoksi-supstituentom u *para*-položaju (struktura **1**). Odabrani derivat **8** je reverzibilni, kompetitivni inhibitor butirilkolinestaze.

LITERATURA

1. A. Kashyap, O. Silakari, *Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **2018**, str. 323-342.
2. M. Mlakić, D. Barić, A. Ratković, I. Šagud, I. Čipor, I. Piantanida, I. Odak, I. Škorić, *Molecules* **2024**, *29*, 1622.
3. M. Mlakić, I. Faraho, I. Odak, B. Kovačević, A. Raspudić, I. Šagud, M. Bosnar, I. Škorić, D. Barić, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14676.
4. M. Mlakić, I. Odak, I. Faraho, S. Talić, M. Bosnar, K. Lasić, D. Barić, I. Škorić, *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *24*, 114616.
5. M. Mlakić, I. Selec, I. Čaleta, I. Odak, D. Barić, A. Ratković, K. Molčanov, I. Škorić, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5879.
6. G.L. Ellman, K.D. Courtne, V. Andres, R.M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.