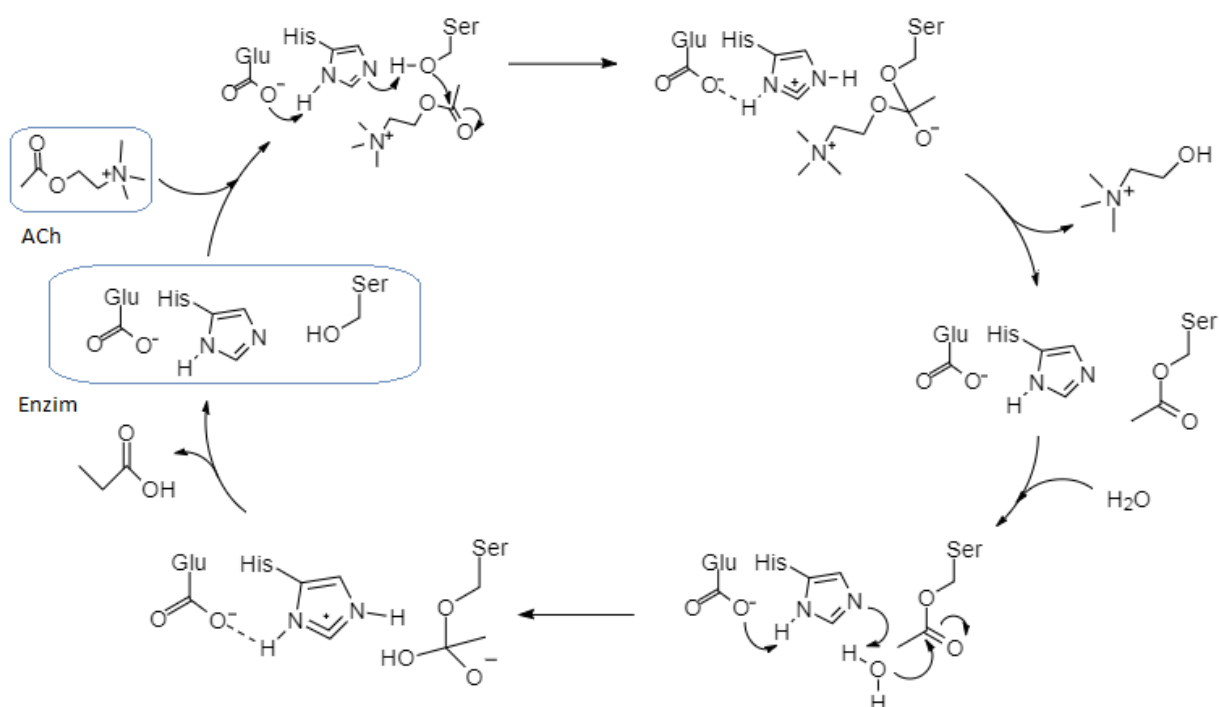


katalitičku trijadu – glutaminska kiselina, histidin i serin.¹³ Deprotonirani serinski bočni ogranak nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom acetilkolina te nastaje tetraedarsko prijelazno stanje čijim raspadom nastaje kolin. Zaostali acil-enzim intermedijer raspada se preko prijelaznog tetraedarskog stanja koje nastaje uslijed nukleofilnog napada vode što rezultira nastankom molekule octene kiseline i regeneracijom enzima koji je sada spreman na novi katalitički krug.



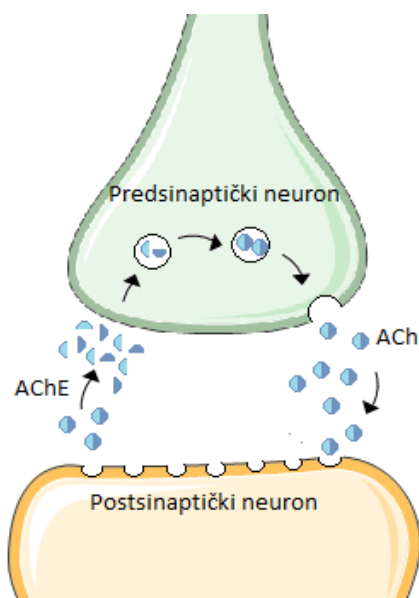
Slika 3. Mehanizam hidrolize acetilkolina (ACh) u aktivnom mjestu kolinesteraza. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 8)

2.1.1. Acetilkinesteraza

Acetilkinesteraza je enzim od esencijalne važnosti u svim organizmima. Prisutna je u živčanim stanicama, mišićima, mozgu i u krvi gdje je vezana na eritrocite.¹

Fiziološki supstrat joj je već spomenuti acetilkolin koji sudjeluje u prijenosu živčanog impulsa u kolinergičnoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava. Većina acetilkolina

u završecima aksona nalazi se u vezikulama, a mali dio je slobodan u citosolu.⁴ Tijekom prijenosa signala, acetilkolin se iz vezikula ispušta u sinaptičku pukotinu gdje se veže na nikotinske i muskarinske receptore koji su vezani na postsinaptičku membranu ili na mišićne stanice.^{4,16} Vežanje acetilkolina na navedene receptore uzrokuje depolarizaciju postsinaptičke membrane i daljnji prijenos signala.¹⁷ Kako bi se nakon prijenosa signala membrana mogla vratiti u početno stanje, potrebna je brza razgradnja ACh koju obavlja AChE prethodno opisanim mehanizmom. Shematski prikaz prijenosa signala dan je na slici 4. AChE iznimno je brz i efikasan enzim s obrtnim brojem od $400\,000\text{ min}^{-1}$, a brzinu katalize ograničava samo brzina difuzije supstrata u aktivno mjesto.¹⁸



Slika 4. Shematski prikaz prijenosa signala. Plavi kružići predstavljaju acetilkolin koji se nakon oslobađanja iz vezikule veže na receptore postsinaptičkog neurona. Po završetku prijenosa signala AChE razgrađuje ACh na kolin i octenu kiselinu čime omogućuje prestanak signala i ponovnu polarizaciju membrane neurona (ili mišićne stanice).^{4,16}

Ljudska AChE sastoji se od oko 550 aminokiselina, a gen koji ju kodira je očuvan uz mogućnost pojave polimorfizama pojedinačnog nukleotida.¹⁹ Enzimi nastali ekspresijom gena s izmijenjenim nukleotidom nemaju izmijenjene karakteristike već samo pokazuju pojačanu osjetljivost prema nekim inhibitorima te je moguće da će drugačije ostvarivati interakcije s drugim proteinima.¹⁹ Svaka veća promjena koja bi kao posljedicu imala promjenu aktivnog

mjesta i katalitičke funkcije enzima dovela bi do smrti organizma.¹⁹ Također, alternativnim prekrajanjem na 3' kraju mogu nastati tri izoforme enzima s različitim stupnjem oligomerizacije, ali jednakom katalitičkom aktivnošću.^{1,20} Jedna od mogućih izoformi je AChE-S tj. sinaptička AChE - tetramer kojem su dvije podjedinice vezane disulfidnim mostovima i takva dva dimera hidrofobnim interakcijama tvore cjeloviti enzim.^{20,21} AChE-E ili eritrocitna AChE dolazi u obliku dimera te je vezana glikofosfaditilinozitolnim sidrom za membrane eritrocita i pločastih krvnih stanica.^{20,21} Posljednja izoforma proteina je AChE-R (engl. *Read-through*) koja nema elemente za oligomerizaciju i prisutna je u obliku monomera u krvi i sinaptičkoj pukotini.^{20,21,22}

2.1.2. Butirilkolinesteraza

Butirilkolinesteraza je otkrivena nedugo nakon acetilkolinesteraze, a budući da je pokazivala drugačija svojstva od prvotno otkrivene AChE, nazvana je nespecifična ili pseudokolinesteraza.¹⁰ Prisutna je u centralnom i perifernom živčanom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini, crijevima, plućima, gušterači i jetri, a u ljudskom organizmu je prisutna u deset puta većoj količini nego AChE.^{1,23}

Karakterizira ju veći volumen aktivnog mjesta u koje se mogu smjestiti nefiziološki supstrati poput butirilkolina (BCh) po kojem je dobila i ime.²⁴ BChE može hidrolizirati acetilkolin, no to nije njezina primarna uloga. Naime, fiziološki supstrat BChE još nije pronađen te stoga nije poznata njezina fiziološka uloga u organizmu.^{2,3} Bez obzira na navedeno, BChE ima važnu ulogu u organizmu i u određenim uvjetima može zamijeniti AChE. Poznato je da katalizira reakcije u metabolizmu lipida i proteina, diferencijaciji i rastu živčanog tkiva.^{3,23} Također, BChE sudjeluje u reakcijama aktivacije ili deaktivacije ksenobiotika poput bambuterola, heroína, sukcinildikolina, aspirina, kokaina i amitriptilina.^{3,23}

Kristalna struktura BChE određena je kasnije od kristalne strukture AChE zbog velikog udjela ugljikohidrata vezanih na enzim što je otežavalo sam postupak kristalizacije.²⁵

Uvid u strukturu pokazao je da je aktivno mjesto BChE volumenom puno veće od aktivnog mjesta AChE zbog toga što umjesto 14 aromatskih aminokiselina aktivno mjesto BChE određuje samo njih osam dok je ostalih šest zamijenjeno alifatskim.^{1,3,11,23} Veći

volumen aktivnog mjesta za posljedicu ima manju selektivnost BChE prema supstratima i inhibitorima.¹

BChE je enzim koji se sastoji od oko 570 aminokiselina te isto kao i AChE može doći u više oligomernih oblika iako u ovom slučaju nije otkriveno alternativno prekranje predglasničke RNA.^{1,3,23} Međutim, moguće su insercije i delecije većeg broja nukleotida pa čak i promjena jednog nukleotida što je uzrok nastanka oko 40 različitih inačica BChE.^{26,27} Neke od njih prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Neke prirodne inačice BChE (preuzeto i prilagođeno prema ref. 8)

BChE inačica	Oznaka	Promjena u proteinu	Karakteristike
uobičajena	U	-	-
atipična inačica	A	Asp70 → Gly	slaba inhibicija dibukainom i fluoridnim ionom
fluoridna-1	F	Thr243 → Met	slaba inhibicija fluoridnim ionom
fluoridna-2	F	Gly390 → Val	slaba inhibicija fluoridnim ionom
Kalow-inačica	K	Ala539 → Thr	30 % manja koncentracija proteina u odnosu na U
James-inačica	J	Glu497 → Val Ala539 → Thr	30 % manja koncentracija proteina u odnosu na U
Hammersmith-inačica	H	Val142 → Met	90 % manja koncentracija proteina u odnosu na U
tiha-1	S	Gly117 → pomak okvira čitanja	aktivnost manja od 10 % aktivnosti U
tiha-2	S	Ile6 → pomak okvira čitanja	
tiha-3	S	Tyr500 → stop	
Cynthia		nepoznata	180-300 % veća aktivnost od U
Johannesburg		nije u kodirajućoj regiji	180 % veća aktivnost od U
C5+		nepoznata	dotatna vrpca u poliakrilamidnom gelu s 25 % većom aktivnošću od U

Zbog manje konzerviranosti gena za BChE smatra se da ona ne može imati esencijalnu fiziološku ulogu²⁶ što objašnjava nemogućnost definiranja njenog pravog fiziološkog supstrata.

2.2. Inhibitori kolinesteraza

Kao što je već rečeno, AChE ima iznimno važnu ulogu u održavanju homeostaze organizma jer hidrolizira ACh nakon prijenosa živčanog impulsa²⁸ te na taj način omogućuje normalan

prijenos impulsa u živčanim i živčano-mišićnim sinapsama.²⁸ Ukoliko je ta aktivnost AChE ugrožena zbog prisutnosti inhibitora, ACh se počinje gomilati što predstavlja veliku opasnost za organizam. Gomilanje ACh uzrokuje desenzibilizaciju receptora što za krajnji ishod ima mučnine, salivaciju, paralizu dišnog sustava i posljedično smrt organizma.²⁹ Inhibicija BChE nema bitnijih posljedica za organizam, no pokazano je da u slučajevima inhibicije AChE, BChE može u nekoj mjeri zamijeniti njezinu ulogu. Stoga se BChE navodi kao prirodno čistilo inhibitora AChE jer ju štiti vezujući inhibitor u svoje aktivno mjesto.^{30,31}

Inhibitori u aktivnom mjestu enzima mogu ostvarivati reverzibilne interakcije ili može doći do formiranja kovalentne veze sa serinom katalitičke trijade, stoga ih dijelimo na reverzibilne i ireverzibilne.³²

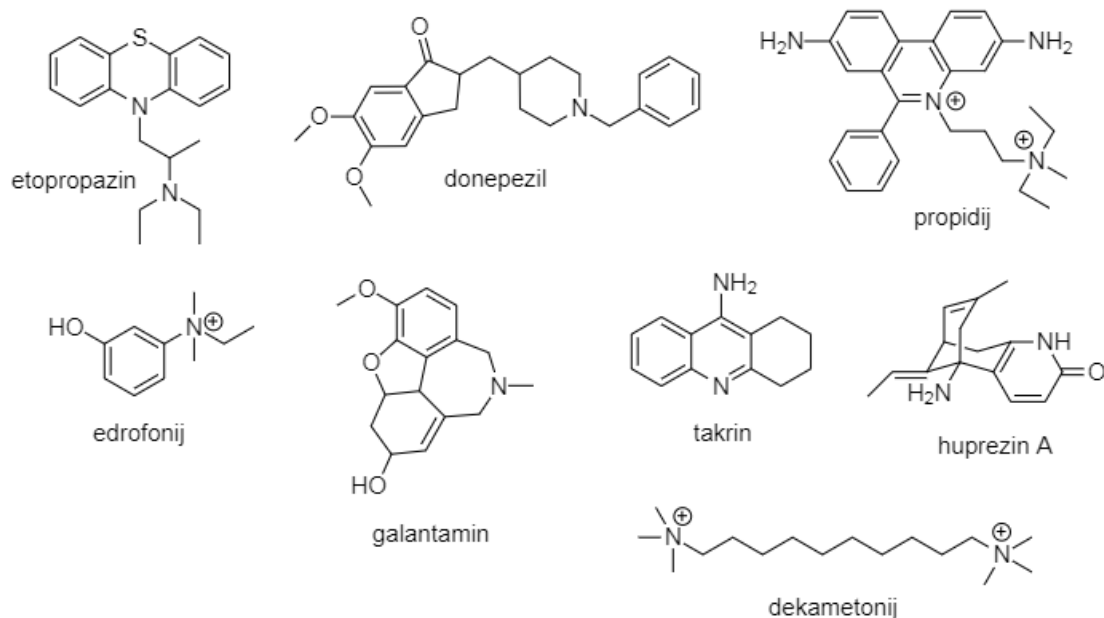
U reverzibilne inhibitore ChE ubrajaju se spojevi s različitim funkcionalnim skupinama (spojevi s kvaternim i tercijarnim amino skupinama), a koriste se u tretmanima bolesti poput miastenije gravis, Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, distenzije mokraćnog mjehura, glaukoma i kao protuotrov antikolinergičnom trovanju.^{4,32}

Ireverzibilni inhibitori AChE (npr. karbamati) također imaju primjenu u medicini koja je vrlo slična primjeni reverzibilnih inhibitora. Rabe se u terapiji miastenije gravis, Alzheimerove bolesti i astme.³² Uz navedeno, spomenuti ireverzibilni inhibitori AChE najveću primjenu nalaze u poljoprivredi kao pesticidi, dok se neki inhibitori iz skupine organofosfornih spojeva od 30-ih godina prošloga stoljeća razvijaju kao kemijsko oružje tj. kao živčani bojni otrovi (npr. soman, sarin, VX, tabun, ciklosarin).³³ Zanimljivo, danas se reverzibilni inhibitori ChE razvijaju i kao predtretman mogućoj izloženosti organofosfornim spojevima. Naime, budući da se isti mogu smjestiti u aktivno mjesto ChE i na taj način spriječiti vezanje organofosfornog spoja, mogu se koristiti kao predtretman trovanju što je veoma važno za zanimanja poput vojske i medicinskog osoblja.³⁴

2.2.1. Reverzibilni inhibitori kolinesteraza

Prvi reverzibilni inhibitor korišten u tretmanu neurodegenerativnih bolesti bio je takrin.³⁵ Na tržištu se pojavio 1993. godine kada je predstavljen kao prvi lijek za ublažavanje simptoma Alzheimerove bolesti, ali je ubrzo povučen radi hepatotoksičnosti.^{36,37} Njegovi analozi su i danas predmet istraživanja.³⁵ Tri godine kasnije pojavio se donezepil (Aricept) koji je vrlo selektivan za AChE, dolazi u enantiomernom obliku, a oba imaju identična farmakološka

djelovanja.³⁵ U reverzibilne inhibitore prirodnog porijekla spadaju galantamin i huprezin A.³⁵ Strukture nekih reverzibilnih inhibitora ChE prikazane su na slici 5.



Slika 5. Strukture nekih reverzibilnih inhibitora kolinesteraza. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 8)

Reverzibilni inhibitori ChE dijele se na kompetitivne i nekompetitivne ovisno o mjestu vezanja na enzim. Mnogi od njih su prirodni spojevi kao što su alkaloidi (npr. huprezin A, solanidin, solanin) i flavonoidi (galangin). Poznavajući strukture prirodnih spojeva, uz intenzivna istraživanja AChE razvijeni su i sintetski inhibitori s terapijskom, ali i dijagnostičkom primjenom.³² Oni se također koriste u istraživanju mehanizama interakcije kolinesteraza sa supstratima.¹²

Svi reverzibilni inhibitori ChE imaju slična strukturna obilježja – prisutnost aromatskih ili hidrofobnih skupina uz prisutnost pozitivnog naboja⁸ (slika 5). Strukture nekih reverzibilnih inhibitora ChE prikazani su na slici 5. Takva struktura potpomaže ulazak i smještanje u aktivno mjesto.⁸ Dakle, reverzibilni inhibitori mogu se vezati u aktivno mjesto, periferno mjesto ili istovremeno na oba mjesta enzima. Rezultat vezanja inhibitora može biti konformacijska promjena enzima ili steričke i elektrostatske smetnje ulasku supstrata u aktivno mjesto.³⁸

Konačni učinak djelovanja reverzibilnog inhibitora na kolinesterazu ovisit će o afinitetu enzima za vezanje spoja, a određuje se konstantom inhibicije K_i . Zanimljivo, uspostavljanje ravnoteže između vezanja i otpuštanja spoja s enzima može trajati od nekoliko minuta za inhibitore s niskim afinitetom vezanja do nekoliko dana za inhibitore s visokim afinitetom vezanja.³⁹

2.2.1.1. *Reverzibilni inhibitori kolinesteraza u tretmanu neurodegenerativnih bolesti*

Neurodegenerativne bolesti su skupina neizlječivih, progresivnih bolesti te obuhvaćaju niz stanja koja primarno djeluju na živčane stanice, a zahvaćaju većinom stariju populaciju.⁴⁰ Broj oboljelih od neurodegenerativnih bolesti 2013. godine prema UN-ovim podacima iznosio je 841 milijuna, a do 2050. iznosit će preko 2 milijarde.⁴⁰ Iako oboljeli od neurodegenerativnih bolesti pate od niza različitih simptoma, patologije ovih bolesti imaju zajedničkih značajki.⁴¹ Uglavnom se ubrajaju u proteinopatije koje karakterizira nakupljanje krivo smotanih i oštećenih proteina u netopljive agregate.⁴²

Alzheimerova (AD) i Parkinsonova (PD) bolest najčešći su neurodegenerativni poremećaji.⁴³ Alzheimerova bolest je progresivan neurološki poremećaj kojeg karakterizira gubitak pamćenja, narušena sposobnost rasuđivanja, poremećaj govora, poremećaj ponašanja, teškoće u učenju te vremenskoj i prostornoj orijentaciji.⁴⁴ Navedeni poremećaji toliko su ozbiljni da ugrožavaju život pojedinca na dnevnoj bazi.^{4,45} Točan uzrok AD danas nije poznat, ali povezuje se sa smrću živčanih stanica uslijed smanjene funkcije određenih proteina koji tvore plakove i čvorove te ometaju staničnu komunikaciju i transport.⁴⁶ Također, primijećeno je da dolazi do deficijencije ACh zbog čega je otežan prijenos signala.⁴⁵

Parkinsonova bolest je kronična i progresivna bolest živčanog sustava.⁴⁷ Prate ju degenerativne promjene sive tvari mozga što za posljedicu ima simptome poput tremora, rigidnosti u pokretu (bradikinezija), ukočenosti te abnormalnosti u držanju tijela.⁴⁸ Do 80 % oboljelih od Parkinsonove bolesti pate od neke vrste poremećaja pamćenja koji se također povezuje s deficitom ACh.⁴⁷

Glavna strategija u tretmanu navedenih bolesti u vidu ublažavanja simptoma je inhibirati AChE kako bi se očuvala veća količina prijenosnika signala.⁴ U tu svrhu se koriste inhibitori kolinesteraza – spojevi sa različitim funkcionalnim skupinama kao što su karbamati i kvaterni ili terciarni amini.⁴ Za tretman pacijenata s Alzheimerovom i Parkinsonovom bolešću danas se od inhibitora AChE koriste donepezil, rivastigmin i galantamin.^{4,5} Donepezil

je reverzibilni inhibitor i veže se na periferno anionsko mjesto te uz smanjenje simptoma bolesti, smanjuje i nastanak amiloidnih naslaga na neuronima (plakova).⁴ Rivastigmin je karbamatni inhibitor i kovalentno se veže za serin u aktivnom mjestu te uz AChE inhibira i BChE. Galantamin je, za razliku od oba prethodno navedena, biljnog porijekla, a reverzibilno se veže i na nikotinske receptore.⁴ Iako u širokoj uporabi, ovi lijekovi imaju nedostataka poput raznih nuspojava te se stoga danas intenzivno provode istraživanja i testiranja novih spojeva kako bi se unaprijedio tretman pacijenata oboljelih od navedenih bolesti.^{49,50}

2.2.2. Nikotinamid i njegovi derivati

Nikotinamid je vrlo važan spoj u metabolizmu te je uz nikotinsku kiselinu oblik vitamina B3.^{51,52} Struktura nikotinamida sastoji se od piridinskog prstena koji na položaju 3 u prstenu ima amidnu skupinu. Inhibira NAD(+)-ADP-riboziltransferazu, histon-deacetilazu te ima antioksidativno, antinflatorno i neuroprotektivno djelovanje.⁵² Upravo to široko područje djelovanja uzrok je ispitivanja djelovanja derivata nikotinamida kao lijekova za razne bolesti uključujući i Alzheimerovu bolest.⁵³ Stoga je u ovom radu ispitano devet derivata nikotinamida kao reverzibilnih inhibitora kolinesteraza te je ispitana njihova citotoksičnost kao prvi stupanj procjene mogućnosti uporabe nekog lijeka u živom organizmu.

2.3. Ispitivanja i razvoj novog lijeka

Razvoj novih lijekova izuzetno je dug, mukotrpan i skup proces, a počinje fazom istraživanja i razvoja. Istraživači nove lijekove najčešće otkriju pomoću novih spoznaja o mehanizmima bolesti koje omogućuju dizajn spojeva koji bi mogli biti potencijalni lijekovi ili testiranjem niza molekula kako bi se otkrili pozitivni učinci protiv neke bolesti.⁵⁴ Spoj koji će se razviti u potencijalni lijek mora ispuniti niz kriterija da bude pogodan za određenu metu te se nakon karakterizacije i skupljanja dodatnih informacija mora utvrditi da potencijalni lijek nije štetan.⁵⁵ Faza u kojoj se ispituje štetnost tj. toksičnost potencijalnog lijeka naziva se prekliničkom fazom, a dijeli se na *in vivo* i *in vitro* ispitivanja.⁵⁶ Cilj ovih istraživanja je dobiti detaljnije informacije o toksičnosti i doziranju potencijalnog lijeka. U svrhu dobivanja informacija o toksičnosti derivata nikotinamida kao potencijalnih lijekova u tretmanu neurodegenerativnih bolesti ispitana je njihova citotoksičnost na dvije stanične linije.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aktivnost kolinesteraza

3.1.1. Priprema pufera, supstrata i reagensa

Fosfatni pufer koncentracije $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ pripremljen je miješanjem vodenih otopina natrijeva hidrogenfosfata (Kemika, Zagreb) i natrijeva dihidrogenfosfata (Kemika, Zagreb) do pH koji iznosi 7,4. Za umjeravanje korišten je pH metar SevenEasy pH s InLab[®] 413 elektrodom (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska) koji je baždaren standardnim otopinama pufera pH $4,01 \pm 0,02$, pH $7,00 \pm 0,02$ i pH $9,21 \pm 0,02$ (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska).

U pokusima je kao supstrat kolinesteraza korišten acetiltiokolin jodid (ATCh; Sigma-Aldrich, SAD) te je pripremljena otopina ishodne koncentracije 20 mmol dm^{-3} , u vodi, neposredno prije pokusa. Navedena otopina razrjeđivana je destiliranom vodom za potrebe pokusa, kako je opisano kasnije u tekstu.

Za detekciju produkta nastalog enzimskom hidrolizom ATCh korištena je 5,5'-ditiobis-2-nitro benzojeva kiselina (DTNB) (Sigma-Aldrich, SAD). Ishodna otopina navedenog reagensa pripremana je otapanjem u fosfatnom puferu tako da je koncentracija iznosila 6 mmol dm^{-3} , a konačna koncentracija DTNB-a u pokusima bila je $0,3 \text{ mmol dm}^{-3}$. Otopina je čuvana u hladnjaku na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.2. Enzimski preparati

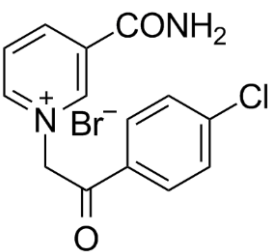
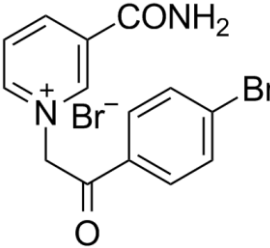
U pokusima su kao izvor humane AChE korišteni ljudski eritrociti pripremljeni izolacijom iz heparinizirane krvi. Krv je dobivena od zdravih dobrovoljaca na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb u skladu s etičkim propisima. Uzorci krvi centrifugirani su 20 minuta na 2 500 okretaja u minuti te je nakon toga izdvojen supernatant – plazma. Eritrociti su zatim nekoliko puta isprani fiziološkom otopinom koja je nakon ispiranja bačena, a uzorci su nadopunjeni fosfatnim puferom do početnog volumena pune krvi. Plazma izolirana nakon centrifugiranja heparinizirane krvi korištena je kao izvor humane BChE.

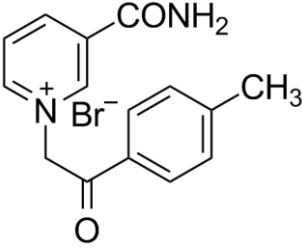
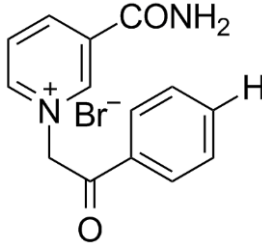
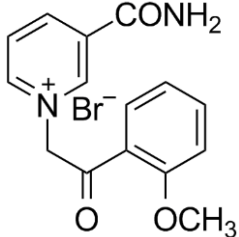
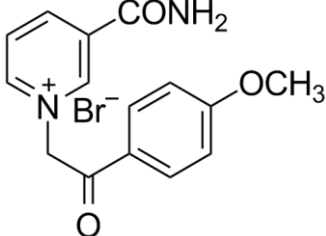
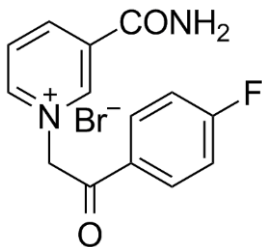
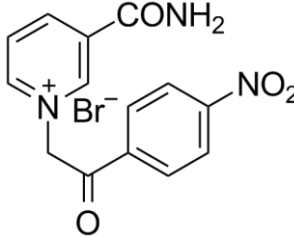
BChE je fenotipizirana u Jedinici za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada prema standardnom protokolu i utvrđen je standardni fenotip (UU).⁵⁷ Dobiveni eritrociti i plazma zamrznuti su do korištenja. AChE je za potrebe pokusa razrjeđivana 400 puta, a BChE 200 puta.

3.1.3. Derivati nikotinamida

Ispitan je učinak sljedećih derivata nikotinamida na ChE: 3-karbamoil-1-(4'-klorfenacil)piridinijev bromid, 1-(4'-bromfenacil)-3-karbamoilpiridinijev bromid, 1-fenacil-3-karbamoilpiridinijev bromid, 3-karbamoil-1-(4'-metilfenacil)piridinijev bromid, 1-(4'-fluorfenacil)-3-karbamoilpiridinijev bromid, 1-(4'-fenilfenacil)-3-karbamoilpiridinijev bromid, 3-karbamoil-1-(4'-metoksifenacil)piridinijev bromid, 3-karbamoil-1-(2'-metoksifenacil)piridinijev bromid, 3-karbamoil-1-(4'-nitrofenacil)piridinijev bromid. IUPAC nazivi, struktura, molarna masa (M_r) te oznaka korištena dalje u tekstu svakog ispitanog derivata nikotinamida prikazana je u tablici 2.

Tablica 2. Struktura, oznaka, molarna masa (M_r) i IUPAC nazivi svih derivata nikotinamida čije je djelovanje na kolinesteraze ispitano u ovom radu

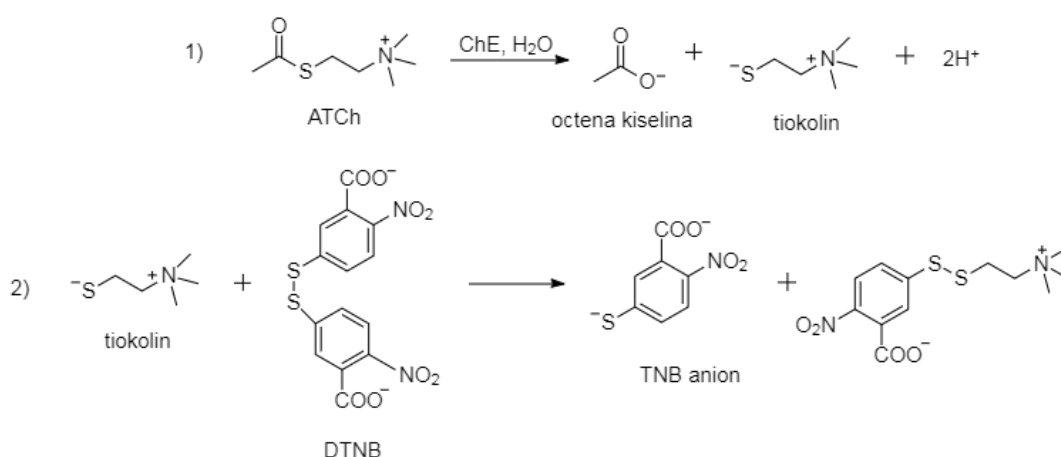
	STRUKTURA	OZNAKA SPOJA	IUPAC NAZIV	$M_r / \text{g mol}^{-1}$
1		NA4-Cl-FB	3-karbamoil-1-(4'-klorfenacil)piridinijev bromid	355,62
2		NA4-Br-FB	1-(4'-bromfenacil)-3-karbamoilpiridinijev bromid	400,07

3		NA4-CH ₃ -FB	3-karbamoil-1-(4'-metilfenacil) piridinijev bromid	335,20
4		NA4-H-FB	1-fenacil-3-karbamoil piridinijev bromid	321,17
5		NA2-OCH ₃ -FB	3-karbamoil-1-(2'-metoksifenacil) piridinijev bromid	351,20
6		NA4-OCH ₃ -FB	3-karbamoil-1-(4'-metoksifenacil) piridinijev bromid	351,20
7		NA4-F-FB	1-(4'-fluorfenacil)-3-karbamoil piridinijev bromid	339,16
8		NA4-NO ₂ -FB	3-karbamoil-1-(4'-nitrofenacil) piridinijev bromid	366,17

9		NA4-Ph-FB	1-(4'-fenilfenacil)-3-karbamoil piridinijev bromid	397,27
---	--	-----------	-------------------------------------------------------	--------

3.1.4. Aktivnost kolinesteraza

Aktivnost kolinesteraza praćena je metodom po Ellmanu⁵⁸ koja uključuje indirektno praćenje enzimske aktivnosti. Indirektno praćenje enzimske aktivnosti podrazumijeva praćenje porasta koncentracije produkta enzimske reakcije. Dakle, umjesto fiziološkog supstrata korišten je supstrat acetiltiokolin (ATCh) čija se struktura od acetilkolina razlikuje u jednom atomu tj. jedan kisikov atom acetilne skupine zamijenjen je atomom sumpora. Takav modificirani supstrat u enzimskoj reakciji hidrolizira te pritom nastaje tiokolin i očetna kiselina. Nastali tiokolin reagira s tiolnim reagensom DTNB-om te nastaje produkt žute boje čija se kolićina prati spektrofotometrijski. Kemijska vrsta koja je odgovorna za obojenje je anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB anion). Opisane reakcije prikazane su na slici 6.



Slika 6. Prikaz reakcija Ellmanove metode: modificirani supstrat, ATCh, u enzimskoj reakciji hidrolizira se na octenu kiselinu i tiokilin (1) koji potom reagira s reagensom DTNB-om i daje žuto obojeni TNB anion čija se koncentracija prati spektrofotometrijski (2).

Promjena apsorbancije praćena je na 412 nm za reakcije BChE, a za reakcije AChE praćena je na 436 nm zbog prisutnosti hemoglobina a kako bi se umanjila početna vrijednost apsorbance. Mjerenja su izvođena na uređaju CARY 300 (*Varian Inc.* Australija) s termostatiranim kućištem pri 25 °C. Korištene su kivete s optičkim putem od 1 cm.

Aktivnost kolinesteraza u prisutnosti derivata nikotinamida izračunata je pomoću Lambert-Beerove jednadžbe i zakonitosti:

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \nu = \frac{\Delta A / \text{min} \cdot R}{\varepsilon \cdot d} \quad (1)$$

gdje je $\Delta A / \text{min}$ promjena apsorbancije u jedinici vremena, R je konačno razrjeđenje enzima (koje iznosi 400 puta za eritrocite tj. AChE i 200 puta za plazmu tj. BChE), ε je ekstinkcijski molarni koeficijent koji iznosi $14\,220 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pri 412 nm i $11\,000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kod 436 nm, a d se odnosi na duljinu optičkog puta. Promjena aktivnosti ChE u vremenu mjerenja bila je linearna.

3.1.5. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza derivatima nikotinamidima

Reverzibilna inhibicija kolinesteraza praćena je mjerenjem promjene aktivnosti enzima u prisutnosti inhibitora – derivata nikotinamida. Promjena aktivnosti kolinesteraza tj. promjena brzine hidrolize supstrata mjerena je Ellmanovom metodom koja uključuje indirektno praćenje tj. indirektnu kvantifikaciju i praćenje enzimske aktivnosti kako je opisano u prethodnom poglavlju. Prilikom mjerenja reverzibilne inhibicije kolinesteraza odabrane su najmanje četiri koncentracije supstrata, a pri svakoj koncentraciji supstrata mjerena je inhibicija s najmanje tri različite koncentracije inhibitora, odabranih na način da se postotak inhibicije nalazi u rasponu od 20 % do 80 %.

Pokusi su provedeni na mikrotitarskim ploćicama s 96 jaćica reakcijskog volumena $300 \mu\text{L}$, a reakcijska smjesa se sastojala od DTNB-a koncentracije $0,3 \text{ mmol dm}^{-3}$, fosfatnog pufera, enzima razrijeđenog 400 puta ako se radilo o AChE tj. 200 puta ako se radilo o BChE te testiranog spoja i supstrata u koncentracijskom rasponu. Mjerenje aktivnosti započeto je dodatkom supstrata, a promjena aktivnosti praćena je dvije minute. Enzimska reakcija bez dodanog inhibitora korištena je kao kontrolna. Također, mjerena je reakcija samog supstrata

(ATCh) i derivata nikotinamida kao neenzimska reakcija u vremenskom trajanju od dvadeset minuta.

Iz dobivenih eksperimentalnih rezultata određeni su sljedeći kinetički parametri – prividna konstanta inhibicije ($K_{i,app}$) i konstanta inhibicije (K_i). Vrijednosti navedenih parametara određene su pomoću Hunter-Downsovog prikaza:

$$K_{i,app} = \frac{v_i \cdot [spoj]}{v_0 - v_i} \quad (2)$$

gdje je v_i aktivnost enzima u prisutnosti derivata nikotinamida, v_0 aktivnost enzima u odsutnosti derivata nikotinamida, a $K_{i,app}$ predstavlja prividnu konstantu disocijacije kompleksa enzim-inhibitor zbog toga što je aktivnost enzima mjerena u prisutnosti supstrata, [spoj] označava korištenu koncentraciju inhibitora. Pomoću jednadžbe koja opisuje utjecaj supstrata na vezanje inhibitora na enzim, izračunate su stvarne konstante disocijacije kompleksa enzim-inhibitor:

$$K_{i,app} = K_i + \frac{K_i}{K_s} \cdot [S] \quad (3)$$

K_s u ovoj jednadžbi predstavlja konstantu disocijacije kompleksa enzim-supstrat, a K_i konstantu disocijacije kompleksa enzim-inhibitor, [S] označava korištenu koncentraciju supstrata.

Mjerenjem aktivnosti enzima pri različitim koncentracijama derivata nikotinamida dobivene su prividne konstante disocijacije kompleksa enzim-inhibitor koje su zatim korištene za konstruiranje pravca prema navedenoj jednadžbi te su na taj način grafičkom analizom dobivene prave konstante disocijacije kompleksa enzim-inhibitor.

Iz nagiba pravca u Hunter-Downs prikazu određen je tip inhibicije. Naime, ako $K_{i,app}$ proporcionalno ovisi o koncentraciji supstrata riječ je o kompetitivnoj inhibiciji, dok nekompetitivni tip inhibicije karakterizira izostanak ovisnosti $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata što rezultira pravcem paralelnim s x-osi.

3.2. Ispitivanje citotoksičnosti spojeva

Za ispitivanje citotoksičnosti testiranih spojeva odabrane su živčane stanice SH-SY5Y (ECACC 94030304) jer su ciljno mjesto djelovanja inhibitora AChE i vrlo je bitno saznati postoji li negativan učinak testiranih derivata nikotinamida na razini stanice. Također, citotoksičnost je ispitana i na bubrežnim stanicama HEK 293 (ECACC 85120602) čija je primarna zadaća uklanjanje spojeva iz organizma.

3.2.1. Priprema medija za i uzgoj stanica

Medij za živčane stanice SH-SY5Y pripremljen je u sterilnim uvjetima miješanjem DMEM F12 medija (Sigma-Aldrich, Njemačka) (83 % u ukupnoj smjesi) u koji je prethodno dodan glutamin (konačna koncentracija 2 mmol dm^{-3}), fetalnog telećeg seruma (Sigma-Aldrich, Njemačka) (15 % u ukupnoj smjesi, engl. FBS), neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich, Njemačka) (1 % u ukupnoj smjesi) i otopine antibiotika penicilin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Njemačka) (1 % u ukupnoj smjesi). Glutamin je sterilno filtriran prije upotrebe.

Medij za bubrežne stanice HEK 293 pripremljen je miješanjem MEM medija (Sigma-Aldrich, Njemačka) (88 % u ukupnoj smjesi) u koji je prethodno dodan glutamin (konačna koncentracija 2 mmol dm^{-3}), fetalnog telećeg seruma (Sigma-Aldrich, Njemačka) (10 % u ukupnoj smjesi), neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich, Njemačka) (1 % u ukupnoj smjesi) i otopine antibiotika penicilin/streptomycin otopina (Sigma-Aldrich, Njemačka) (1 % u ukupnoj smjesi). Glutamin je sterilno filtriran prije upotrebe. Svi mediji pripremljeni su neposredno prije uzgoja tj. izvođenja pokusa.

3.2.2. Odmrzavanje i uzgoj stanica

Viala sa zamrznutim stanicama je iz spremnika s tekućim dušikom stavljena u vodenu kupelj na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ na 1-3 minute da se stanice odmrznu. Potom su tehnikom kap po kap prepipetirane u posudu za uzgoj stanica (engl. *T-flask*, Thermo Fischer Scientific Denmark) volumena 75 mL zajedno sa prethodno pripremljenim i ugrijanim medijem (grijan u kupelji na $37 \text{ }^\circ\text{C}$) te su

stavljene u inkubator na 37 °C uz 5 % CO₂. Rast stanica praćen je svakodnevno, a medij zamijenjen svaka dva dana. Obje stanične linije rastu kao adherirane na podlozi.

3.2.3. Određivanje broja stanica

Nakon što su stanice dosegle ~80 % konfluentnosti, medij je uklonjen aspiratorom, a stanice su jednom isprane PBS-om (1x). PBS pufer je pripremljen otapanjem 0,26 grama KH₂PO₄, 42,7 g Na₂HPO₄·7H₂O i 8,71 g NaCl u destiliranoj vodi, a nakon toga mu je pH podešen na 7,4. Kako bi se stanice odvojile od dna posude za uzgoj, stanicama je dodana 0,25 %-tna otopina tripsin/ EDTA (Sigma-Aldrich, USA), te je sve zajedno stavljeno u inkubator na 37 °C na 2-3 minute. Nakon odvajanja stanica dodan im je odgovarajući kompletni medij kako bi se inaktiviralo djelovanje tripsina. U plastičnu mikroeprijetu na 20 µL suspenzije stanica dodano je 20 µL otopine tripan plavo. 10 µL smjese je otpipetirano na plastičnu pločicu za brojanje TC10/20 te je ista umetnuta u uređaj TC20™ Automated Cell Counter (BioRad, SAD), nakon čega uređaj automatski broji stanice i rezultat prikazuje kao broj stanica po mililitru, kao i postotak živih stanica. Stanice su zatim u željenoj koncentraciji (1×10⁵ mol dm⁻³) nasađene na mikrotitarske pločice za pokus.

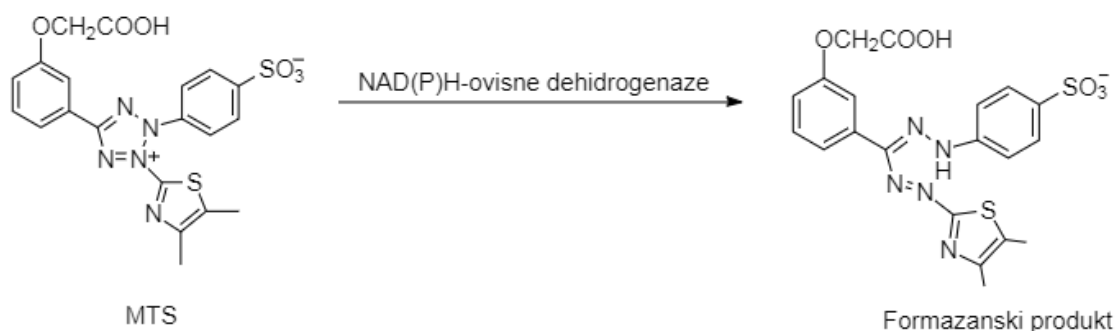
3.2.4. Izloženost stanica derivatima nikotinamida

Svi testirani spojevi otopljeni su u dimetil sulfoksidu (DMSO), a ishodna koncentracija svakog od njih iznosila je 100 mmol dm⁻³. Spojevi su dalje otapani u staničnom mediju te su pripremljene zasebne mikrotitarske pločice s 96 jažica odgovarajućih testnih koncentracija. Testirano je osam koncentracija svakog spoja u rasponu od 6,25 - 800 µmol dm⁻³. U prvi vodoravni red jažica pipetirano je po 260 µL spoja u mediju tako da je finalna koncentracija spoja 800 µmol dm⁻³. U ostale jažice pipetirano je po 130 µL medija te su rađena serijska razrjeđenja 1:2 višekanalnom pipetom do finalnih koncentracija. Tako pripremljenih otopina prepipetirano je 120 µL na pripremljenu pločicu sa stanicama (kojima je prethodno maknut medij u kojem su rastle). Netretirane stanice su korištene kao kontrola. Djelovanje derivata

nikotinamida na živčane i bubrežne stanice ispitano je nakon izloženosti od 24 sata, na 37 °C uz 5 % CO₂.

3.2.5. Kvantifikacija učinka testiranih spojeva na stanice

Djelovanje testiranih spojeva na stanice određeno je praćenjem promjene vijabilnosti u prisutnosti spojeva u rasponu koncentracija od 800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ do 6,25 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Vijabilnost stanica određena je pomoću tzv. kolorimetrijskog MTS testa koji se temelji na sposobnosti metabolički aktivnih stanica da NAD(P)-H ovisnim dehidrogenazama reduciraju MTS reagens ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) do formazanskog produkta (slika 7). Nastali produkt moguće je detektirati spektrofotometrijski na valnoj duljini od 490 nm pri čemu je apsorbancija proporcionalna broju živih stanica.



Slika 7. Shematski prikaz reakcije na kojoj se temelji MTS-test: metabolički aktivne stanice pomoću NAD(P)H-ovisnih dehidrogenaza reduciraju MTS do formazanskog produkta koji se detektira spektrofotometrijski.

Nakon izloženosti stanica spojevima 24 sata, sa stanica je maknut medij te su jednom isprane sa 150 μL PBS-a. Zatim im je dodano 100 μL odgovarajućeg medija i 20 μL otopine MTS reagensa. Za test je korišten MTS reagens kupljen od tvrtke Promega Ltd. koji je za pokus pripremljen prema protokolu proizvođača. Naime, MTS reagens je pripremljen otapanjem u PBS-u, te mu je pH podešen na 6,48 pomoću otopine klorovodične kiseline te je sterilno profiltriran (0,2 μm) u sterilnu bočicu kako bi bio pogodan za rad sa stanicama. Za

umjeravanje pH korišten je pH metar SevenEasy pH s InLab[®] 413 elektrodom (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska). Prije tretiranja stanica dodan mu je fenazinmetasulfat (PMS) u odgovarajućem omjeru ((V(MTS):V(PMS)=20:1).

Nakon što je stanicama dodan čisti medij i MTS reagens, mikrotitarska pločica sa stanicama je inkubirana na 37 °C uz 5 % CO₂ od 1 do 4 sata, ovisno o razvoju boje. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica Infinite M200PRO (Tecan Austria, Austrija).

Pokus u duplikatu je ponovljen tri puta za svaki spoj i svaku liniju stanica. Prema dobivenim vrijednostima nacrtana je logaritamska ovisnost koncentracije spoja i postotka inhibicije rasta stanica. Grafičkom analizom pomoću definiranih jednadžbi programom GraphPad Prism, rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrijednosti odnosno koncentracija spoja kod koje je rast stanica inhibiran 50 %.

$$y = y_{min} + \frac{(y_{max} - y_{min})}{1 + 10^{((\text{Log}IC_{50} - x) * \text{HillSlope})}} \quad (4)$$

Gdje su y_{min} i y_{max} minimalni i maksimalni određen postotak inhibicije, x je logaritamska vrijednost korištene koncentracije testiranog spoja, a „HillSlope“ je parametar koji opisuje strmost krivulje i za izračun je korištena njegova vrijednost 1,0.

3.3. Analiza rezultata i statistika

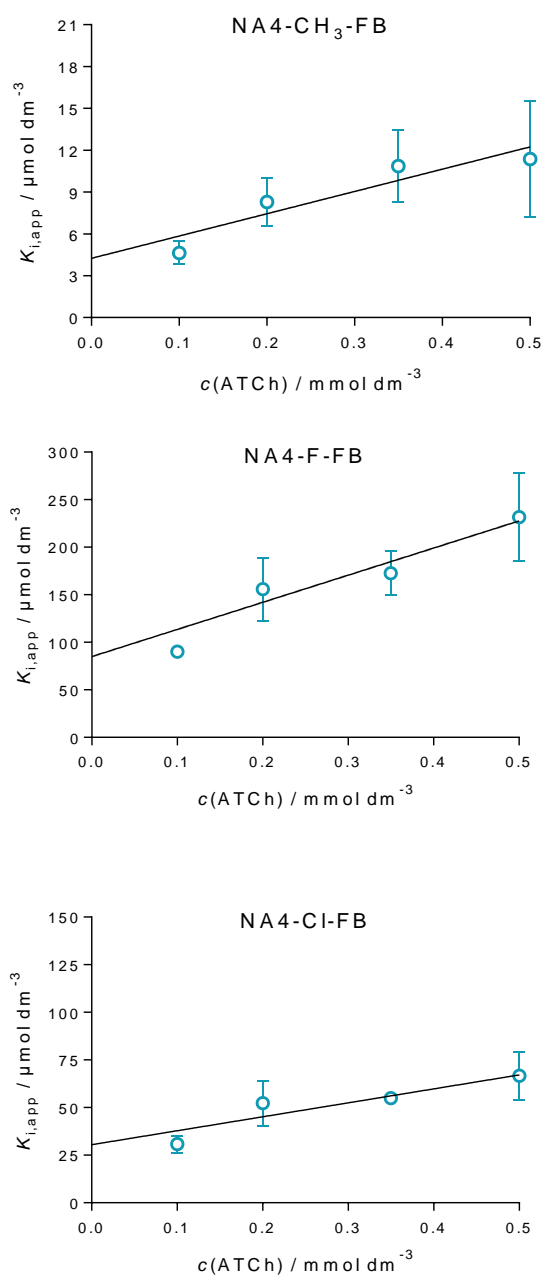
Obrada rezultata, srednje vrijednosti (\pm standardne devijacije (SD) ili standardne pogreške (SE)), računi i grafovi izrađeni su pomoću odgovarajućih statističkih paketa Microsoft Excel i GraphPad Prism programa (verzija 6.01).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

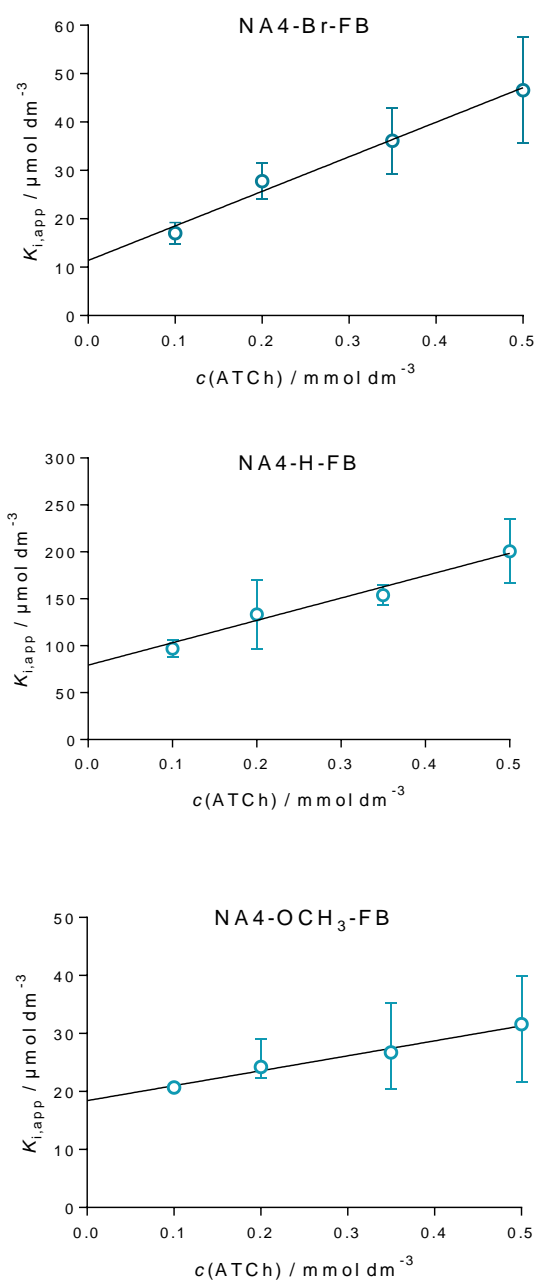
U svrhu ispitivanja utjecaja derivata nikotinamida na aktivnost acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze određene su konstante inhibicije spomenutih enzima, a s ciljem procjene njihovog potencijala da se istražuju kao lijekovi u terapiji neurodegenerativnih bolesti. Uz to je ispitana i njihova toksičnost na dvije stanične linije – živčane stanice SH-SY5Y i bubrežne stanice – HEK 239.

4.1. Reverzibilna inhibicija ljudske acetilkolinesteraze

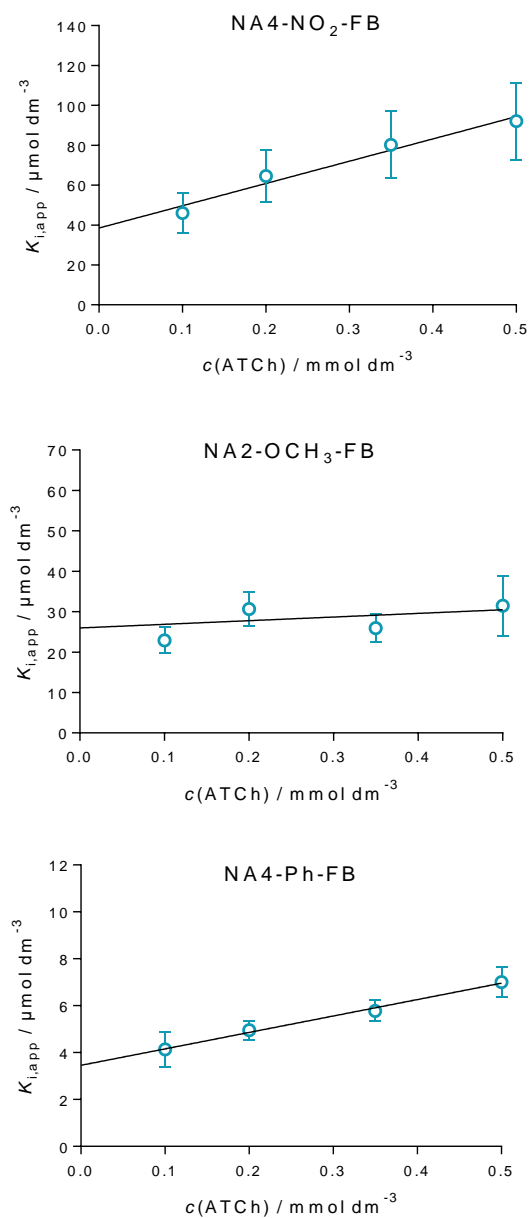
Mjerenjem promjene aktivnosti acetilkolinesteraze u prisutnosti derivata nikotinamida određen je njihov potencijal da se koriste kao inhibitori ovog enzima. Na slikama 8.-10. nalaze se Hunter-Downs prikazi reverzibilne inhibicije za testirane spojeve NA4-CH₃-FB, NA4-F-FB, NA4-Cl-FB, NA4-Br-FB, NA4-H-FB, NA4-OCH₃-FB, NA4-NO₂-FB, NA2-OCH₃-FB i NA4-Ph-FB, dobiveni iz eksperimentalnih podataka, a prikazani kao srednja vrijednost iz najmanje tri neovisna eksperimenta. Testirani spojevi predstavljaju strukturno povezanu seriju koja se razlikuje samo u strukturi bočnog ogranka. Iz grafa ovisnosti prividne konstante inhibicije o različitim koncentracijama supstrata određene su vrijednosti konstante disocijacije kompleksa enzim-inhibitor K_i (koja se očitava kao sjecište pravca sa y-osi) i K_s vrijednosti odnosno konstante disocijacije kompleksa enzim-supstrat (koja se očitava kao sjecište pravca s x-osi). Vrijednosti navedenih konstanti sumirane su u tablici 3. uz koje je naznačen i korišten raspon koncentracija derivata nikotinamida i supstrata u pokusima.



Slika 8. Ovisnost prividne konstante inhibicije AChE, $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata ATCh za spojeve NA4-CH₃-FB, NA4-F-FB i NA4-Cl-FB. Točke prikazuju srednje vrijednosti dobivene iz najmanje 3 pokusa (\pm SD). Konstante inhibicije K_i i K_s izračunate su grafički kao odsječci pravca na y- odnosno x-osi prema jednadžbi (3).



Slika 9. Ovisnost prividne konstante inhibicije AChE, $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata ATCh za spojeve NA4-Br-FB, NA4-H-FB i NA4-OCH₃-FB. Točke prikazuju srednje vrijednosti dobivene iz najmanje 3 pokusa (\pm SD). Konstante inhibicije K_i i K_s izračunate su grafički kao odsječci pravca na y- odnosno x-osi prema jednadžbi (3).



Slika 10. Ovisnost prividne konstante inhibicije AChE, $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata ATCh za spojeve NA4-NO₂-FB, NA2-OCH₃-FB i NA4-Ph-FB. Točke prikazuju srednje vrijednosti dobivene iz najmanje 3 pokusa (\pm SD). Konstante inhibicije K_i i K_s izračunate su grafički kao odsječci pravca na y- odnosno x-osi prema jednadžbi (3).

Tablica 3. Određene vrijednosti konstanti inhibicije K_i i konstanti disocijacije AChE-supstrat kompleksa K_s uz naznačene raspone koncentracija derivata nikotinamida i supstrata ATCh korištenih u pokusima.

Spoj	$c(\text{spoj}) / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$c(\text{ATCh}) / \text{mmol dm}^{-3}$	$K_i (\pm \text{SD}) / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$K_s / \text{mmol dm}^{-3}$
NA4-CH ₃ -FB	10-80	0,1-0,5	4,25 ± 1,23	0,27
NA4-Br-FB	30-100	0,1-0,5	11,4 ± 2,57	0,16
NA4-NO ₂ -FB	50-130	0,1-0,5	38,5 ± 4,70	0,35
NA4-F-FB	100-170	0,1-0,5	85,0 ± 15,2	0,3
NA4-H-FB	100-170	0,1-0,5	79,3 ± 11,4	0,33
NA4-OCH ₃ -FB	70-150	0,1-0,5	18,4 ± 2,09	0,87
NA4-Cl-FB	70-150	0,1-0,5	32,8 ± 4,89	0,49
NA4-Ph-FB	5-80	0,1-0,5	3,46 ± 0,22	0,49
NA2-OCH ₃ -FB	30-130	0,1-0,5	26,4 ± 3,51	3,33

Svi testirani derivati nikotinamida reverzibilno su inhibirali acetilkolinesterazu, međutim jačina učinka bila je različita ovisno o prisutnom supstituentu na bočnom prstenu, te je varirala od 3,46 – 85 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Iz slika 9.-11., te prema određenoj vrijednosti K_s , tip inhibicije acetilkolinesteraze za dane derivate nikotinamida može se generalno opisati kao mješoviti tip inhibicije s time da spojevi NA4-OCH₃-FB i NA2-OCH₃-FB više naginju nekompetitivnoj inhibiciji zbog vrlo malog koeficijenta smjera prema Hunter-Downs prikazu. To znači da se testirani spojevi mogu smjestiti u aktivno mjesto enzima neovisno o tome da li je supstrat već prisutan ili ne, ili se u slučaju nekompetitivne inhibicije vežu na neko drugo mjesto na enzimu. Ovakav mješoviti tip inhibicije uobičajen je zbog specifične građe aktivnog mjesta kolinesteraza.^{11-13,38}

Kao najjači inhibitor može se izdvojiti NA4-Ph-FB s konstantom inhibicije od 3,46 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ što upućuje da on u aktivnom mjestu enzima uspostavlja najjače interakcije s aminokiselinskim ostacima. Sličan, ali nešto slabiji učinak pokazuje i NA4-CH₃-FB koji umjesto fenilnog supstituenta na položaju 4 u molekuli ima metilnu skupinu. Ovakav rezultat ukazuje kako dodatni prsten sigurno doprinosi, ali nije presudan za dizajn učinkovitog inhibitora AChE. Kao najslabiji inhibitori pokazali su se spojevi NA4-F-FB i NA4-H-FB s brojčano najvećim konstantama inhibicije.

Nadalje, uspoređujući konstante inhibicije spojeva s atomom fluora-F, klora-Cl i broma-Br na položaju 4 bočnog prstena vidljivo je da postoji trend koji slijedi položaj tih atoma u skupini periodnog sustava elemenata. Povećanjem veličine atoma u skupini, afinitet

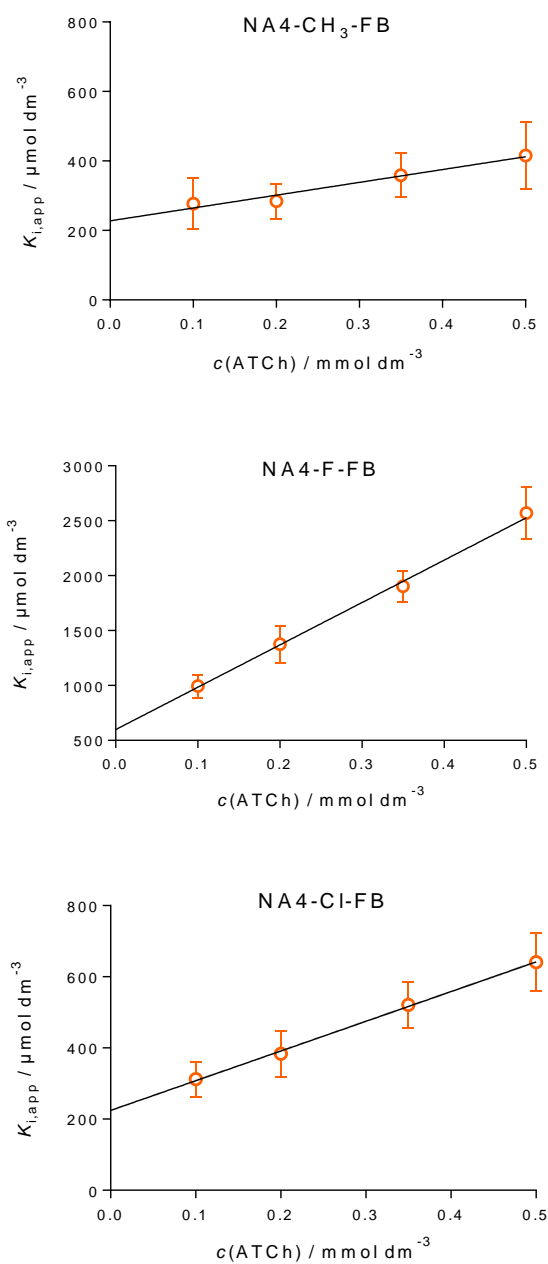
acetilkolinesteraze za spoj ($1/K_i$) raste. Tako, prema spoju NA4-Br-FB acetilkolinesteraza pokazuje najveći afinitet te je njegova konstanta inhibicije za 2,9 puta manja od one za spoj NA4-Cl-FB koji pak ima za 2,6 puta manju konstantu inhibicije od spoja NA4-F-FB. Sličan učinak pokazali su u prethodnom istraživanju i derivati piridoksal-oksima slične strukture ovdje testiranim spojevima i s jednakim funkcionalnim skupinama.⁵⁹ No, iako derivati piridoksal-oksima slijede isti trend, derivati nikotinamida bez oksimske skupine pokazali su se ovdje kao bolji inhibitori AChE.

Promjena položaja metoksi skupine s položaja 4 na položaj 2 na benzenskom prstenu uzrokovala je povećanje konstante inhibicije za 0,7 puta i smanjenje afiniteta enzima za inhibitor. Zamjena metilne skupine na položaju 4 unutar molekule sa elektronima bogatijom nitro skupinom također je uzrokovala porast konstante inhibicije i smanjenje afiniteta enzima. Jednak učinak ovome pokazali su i derivati piridoksal-oksima⁵⁹, međutim i u ovom slučaju oni slabije inhibiraju AChE.

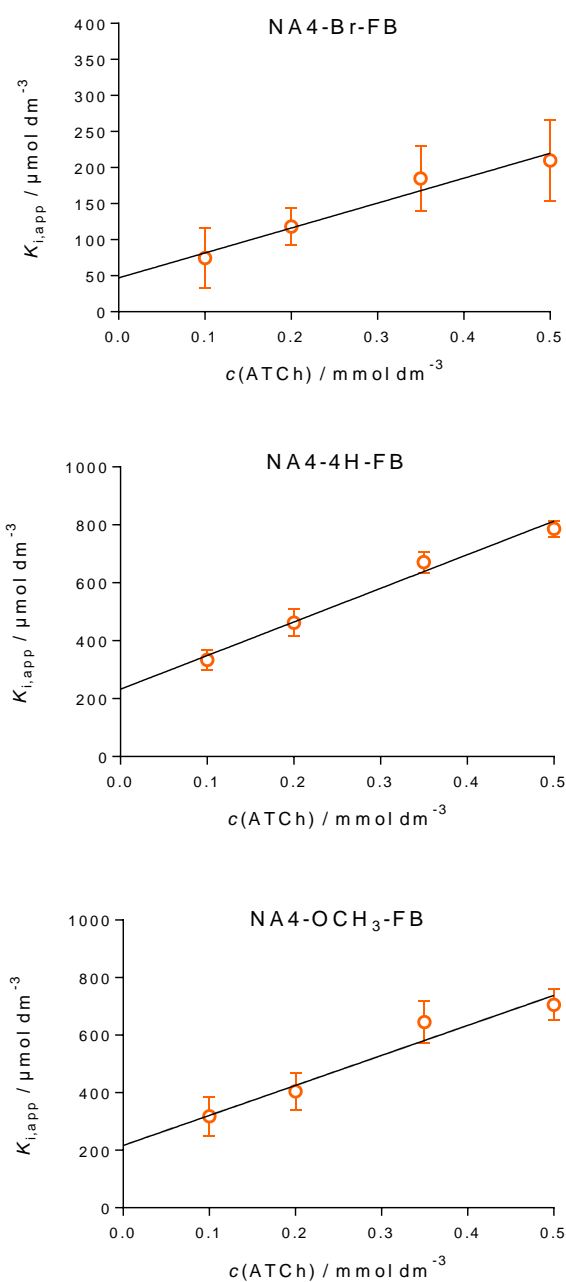
Uzevši sve u obzir može se zaključiti kako dobiveni rezultati predstavljaju dobru osnovu za daljnji razvoj inhibitora acetilkolinesteraze baziranih na nikotinamidu budući da određene konstante inhibicije svrstavaju ove spojeve unutar područja dosadašnjih istraživanja novih lijekova koji se koriste u otklanjanju simptoma neurodegenerativnih bolesti.^{49,56,61} Međutim, valja napomenuti kako danas odobreni lijek donepezil ima K_i vrijednosti od 0,0043 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ što ga čini 1000 puta jačim inhibitorom od npr. ovdje testiranog NA4-Ph-FB.⁵⁹

4.2. Reverzibilna inhibicija ljudske butirilkolinesteraze

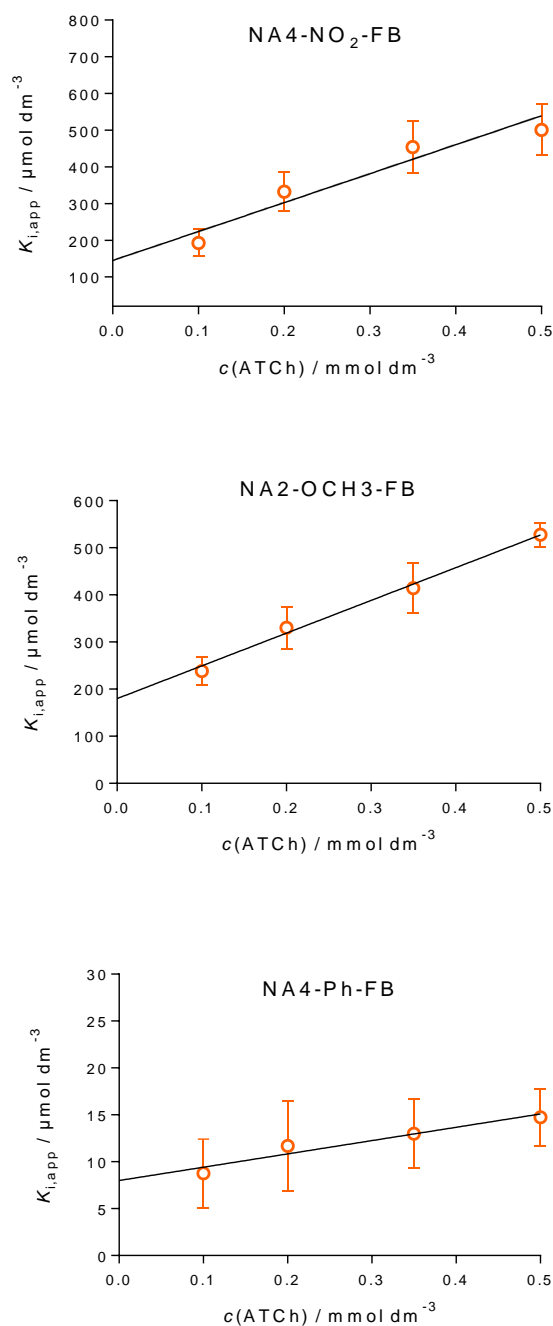
Rezultati eksperimenata reverzibilne inhibicije butirilkolinesteraze derivatima nikotinamida prikazani su na slikama 11.-13. i to na slici 11. nalaze se Hunter-Downs prikazi reverzibilne inhibicije za spojeve NA4-CH₃-FB, NA4-F-FB i NA4-Cl-FB, na slici 12. su prikazi reverzibilne inhibicije za spojeve NA4-Br-FB, NA4-H-FB i NA4-OCH₃-FB, a na slici 13. prikazi reverzibilne inhibicije za spojeve NA4-NO₂-FB, NA2-OCH₃-FB i NA4-Ph-FB. Iz grafa ovisnosti prividne konstante inhibicije o različitim koncentracijama supstrata određene su konstante inhibicije K_i i konstante disocijacije enzim-supstrat kompleksa K_s te su iste sumirane u tablici 4. gdje su navedeni i rasponi koncentracija enzima i derivata nikotinamida korištenih u ovim eksperimentima.



Slika 11. Ovisnost prividne konstante inhibicije BChE, $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata ATCh za spojeve NA4-CH₃-FB, NA4-F-FB i NA4-Cl-FB. Točke prikazuju srednje vrijednosti dobivene iz najmanje 3 pokusa (\pm SD). Konstante inhibicije K_i i K_s izračunate su grafički kao odsječci pravca na y- odnosno x-osi prema jednadžbi (3).



Slika 12. Ovisnost prividne konstante inhibicije BChE, $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata ATCh za spojeve NA4-Br-FB, NA4-H-FB i NA4-OCH₃-FB. Točke prikazuju srednje vrijednosti dobivene iz najmanje 3 pokusa (\pm SD). Konstante inhibicije K_i i K_s izračunate su grafički kao odsječci pravca na y- odnosno x-osi prema jednadžbi (3).



Slika 13. Ovisnost prividne konstante inhibicije BChE, $K_{i,app}$ o koncentraciji supstrata ATCh za spojeve NA4-NO₂-FB, NA2-OCH₃-FB i NA4-Ph-FB. Točke prikazuju srednje vrijednosti dobivene iz najmanje 3 pokusa (\pm SD). Konstante inhibicije K_i i K_s izračunate su grafički kao odsjeci pravca na y- odnosno x-osi prema jednadžbi (3).

Tablica 4. Određene vrijednosti konstanti inhibicije K_i i konstanti disocijacije BChE-supstrat kompleksa K_s uz naznačene raspone koncentracija derivata nikotinamida i supstrata ATCh korištenih u pokusima.

Spoj	$c(\text{spoj}) / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$c(\text{ATCh}) / \text{mmol dm}^{-3}$	$K_i (\pm \text{SD}) / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$K_s / \text{mmol dm}^{-3}$
NA4-CH ₃ -FB	30-400	0,1-0,5	228 ± 27,0	0,62
NA4-Br-FB	30-130	0,1-0,5	47,0 ± 15,1	0,14
NA4-NO ₂ -FB	70-400	0,1-0,5	145 ± 23,8	0,18
NA4-F-FB	100-1000	0,1-0,5	595 ± 72,7	0,15
NA4-H-FB	100-700	0,1-0,5	230 ± 19,6	0,20
NA4-OCH ₃ -FB	70-400	0,1-0,5	216 ± 30,8	0,21
NA4-Cl-FB	50-600	0,1-0,5	224 ± 23,0	0,27
NA4-Ph-FB	5-15	0,1-0,5	7,97 ± 1,42	0,52
NA2-OCH ₃ -FB	30-400	0,1-0,5	180 ± 17,9	0,26

Svi testirani derivati nikotinamida reverzibilno su inhibirali butirilkolinesterazu u koncentracijskom rasponu od 7,97 do 594,9 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Jednako kao i kod acetilkolinesteraze inhibicija je ovisila o supstituentu na bočnom prstenu te se i u ovom slučaju prema određenim K_s vrijednostima pokazala kao inhibicija mješovitog tipa. Kao najjači inhibitor butirilkolinesteraze pokazao se kao i za acetilkolinesterazu spoj NA4-Ph-FB dok je spoj NA4-F-FB s najvećom konstantom inhibicije najslabiji inhibitor butirilkolinesteraze iz ove grupe spojeva.

Nadalje, ukoliko se i ovdje usporede konstante inhibicije spojeva s atomom fluora-F, klora-Cl i broma-Br na položaju 4 unutar molekula, vidljivo je da se konstante inhibicije smanjuju tj. spoj postaje učinkovitiji inhibitor što je atom veći. Spoj NA4-F-FB ima 2,65 puta veću konstantu inhibicije od spoja NA4-Cl-FB, a njegov ekvivalent s atomom broma ima čak 4,8 puta jaču konstantu inhibicije. Ovakvo povećanje afiniteta upućuje da veći atom broma uspješnije ostvaruje interakcije u aktivnom mjestu. Derivati sličnih piridoksal-oksima s halogenim atomima na istim položajima u molekuli, slijede i za butirilkolinesterazu isti trend⁵⁹, no povećanje afiniteta uslijed povećanja radijusa halogenog atoma izraženije je kod analoga bez oksimske skupine.

Uspoređujući konstante inhibicije spojeva NA4-OCH₃-FB i NA2-OCH₃-FB uočljivo je da promjena položaja metoksi skupine s položaja 4 na položaj 2 u molekuli uzrokuje povećanje afiniteta za spoj i smanjenje konstante inhibicije za 1,2 puta. Zamjena metilne skupine u spoju NA4-CH₃-FB s elektronima bogatijom nitro-skupinom rezultira povećanjem

konstante inhibicije za 1,6 puta što upućuje da elektronima bogata nitro-skupina efektivnije ostvaruje interakcije s aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu čime se postiže bolja inhibicija butirilkolinesteraze. Obje navedene promjene u afinitetu uzrokovane promjenom funkcionalne skupine primijećene su i kod derivata piridoksal-oksima.⁵⁹

Međutim, iako su svi testirani derivati nikotinamida inhibirali butirilkolinesterazu iz tablice 4. vidljivo je da su konstante inhibicije butirilkolinesteraze brojčano znatno veće od konstanti inhibicije acetilkolinesteraze uz izuzetak spojeva NA4-F-FB i NA4-Ph-FB. Omjer konstanti inhibicije acetyl- i butirilkolinesteraze dan je u tablici 5. Prema rezultatima je vidljivo da su testirani spojevi selektivniji za acetilkolinesterazu.

Ukoliko se promotri učinak koji promjena strukture ima na inhibiciju acetilkolinesteraze u odnosu na butirilkolinesterazu vidljivo je da zamjena metilne skupine nitro-skupinom ima drugačiji efekt kod acetilkolinesteraze nego kod butirilkolinesteraze što bi moglo značiti da se uspostavljaju drugačije interakcije u aktivnom mjestu tih enzima. Time se potvrđuje i razlika u samoj građi aktivnih mjesta.

Iako lijekovi koji se koriste u tretmanu neurodegenerativnih bolesti poput etopropazina, donepezila, takrina i galantamina isto kao i kod AChE obuhvaćaju široko područje konstanti inhibicije^{60,63}, dobivene vrijednosti u slučaju derivata nikotinamida ne ističu potencijal ovih spojeva za daljnji razvoj specifičnih inhibitora butirilkolinesteraze izuzev spoja NA4-Ph-FB.

Tablica 5. Selektivnost kolinesteraza prema derivatima nikotinamida izražena u obliku omjera konstanti inhibicije K_i za AChE i BChE.

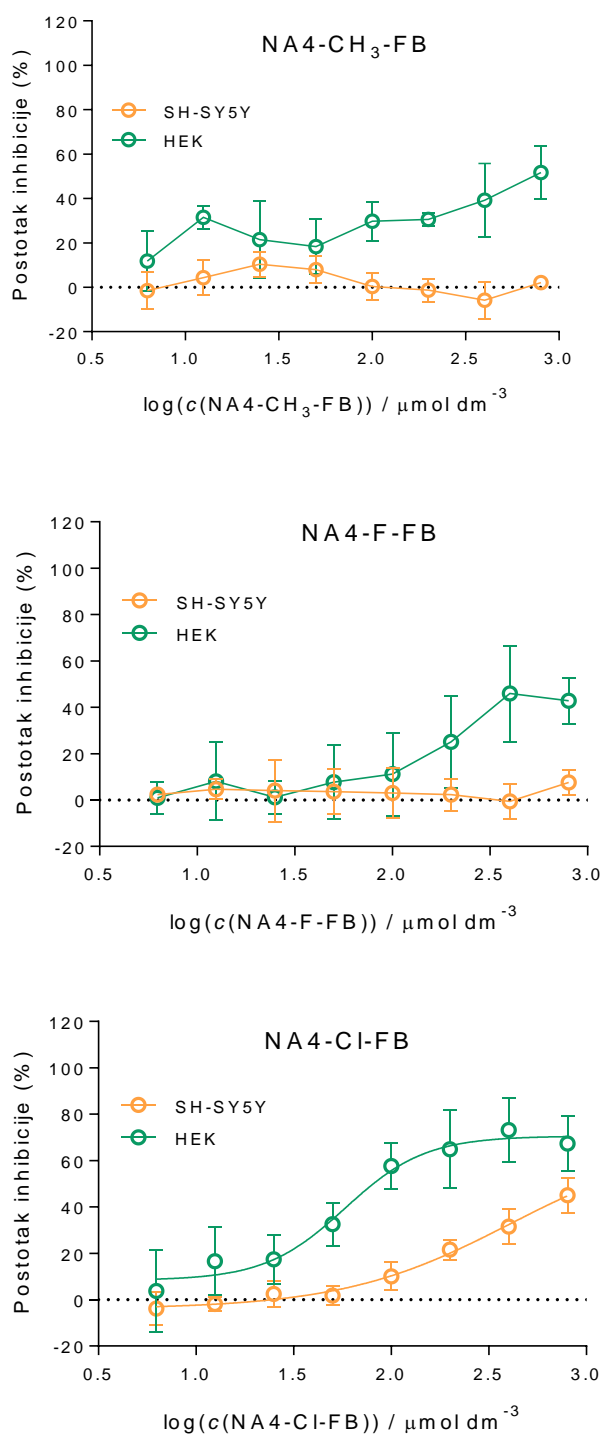
Spoj	K_i (BChE)/ K_i (AChE)
NA4-CH ₃ -FB	53,6
NA4-Br-FB	4,12
NA4-NO ₂ -FB	3,76
NA4-F-FB	7,00
NA4-H-FB	2,90
NA4-OCH ₃ -FB	11,7
NA4-Cl-FB	6,83
NA4-Ph-FB	2,30
NA2-OCH ₃ -FB	6,81

4.3. Ispitivanje citotoksičnosti na odabranim staničnim linijama

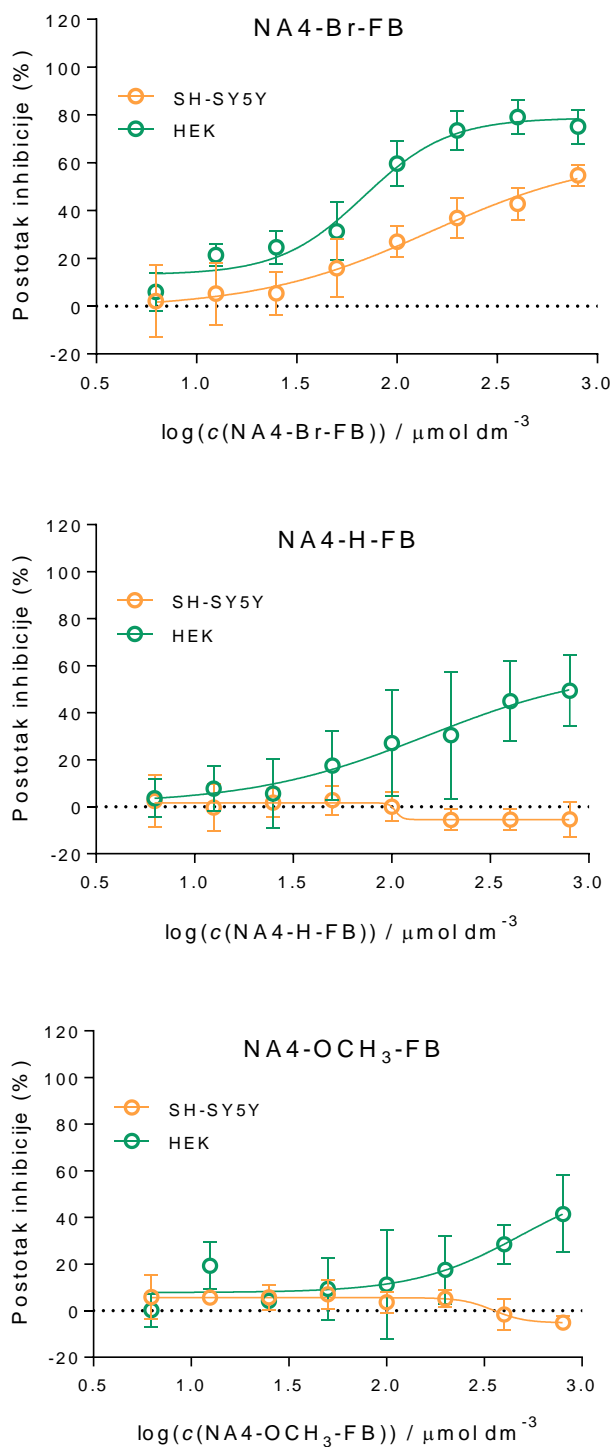
Rezultati ispitivanja citotoksičnosti na dvije stanične linije SH-SY5Y (živčane stanice) i HEK 239 (bubrežne stanice) prikazani su na slikama 14., 15. i 16. Iz dobivenih krivulja logaritamske ovisnosti koncentracije testiranih spojeva i postotaka inhibicije određene su IC_{50} vrijednosti sumirane u tablici 6.

Od svih testiranih derivata nikotinamida na staničnoj liniji SH-SY5Y samo su spojevi NA4-Br-FB, NA4-NO₂-FB i NA4-Ph-FB pokazali toksičnost u testiranom koncentracijskom rasponu do 800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, dok ostali spojevi u testiranom koncentracijskom području nisu toksični. Najtoksičniji testirani spoj na SY-SY5Y stanicama bio je NA4-NO₂-FB čija IC_{50} vrijednost iznosi $210,2 \pm 4,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Od testiranih spojeva s halogenim atomima vezanim za benzenski prsten samo je spoj s bromom na položaju 4 pokazao toksičnost. Dodatak metilne skupine na benzenski prsten (NA4-CH₃-FB) nije imao utjecaja na toksičnost, a također niti različiti položaji metoksi skupine. Međutim, dodatkom fenila na benzenski prsten spoj postaje toksičan za živčane stanice s IC_{50} vrijednosti od $276,2 \pm 1,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ kao i spoj NA4-NO₂-FB. Stanice bubrega HEK 293 pokazale su se osjetljivije na derivate nikotinamida. Na ovoj staničnoj liniji, uz spojeve koji su se pokazali toksičnima na živčanim stanicama, još je i spoj NA-Cl-FB pokazao toksičnost. U istom koncentracijskom rasponu kao i na živčanim stanicama, spojevi NA4-Cl-FB i NA4-Br-FB imali su IC_{50} vrijednost od $79,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ što je oko 6 puta jača toksičnost za ove stanice. Nadalje, dodatak metilne skupine na benzenski prsten nije utjecao na toksičnost, ali dodatak fenila na isti položaj izaziva toksičnost kao što je bio slučaj i sa živčanim stanicama. Promjena položaja metoksi skupine te zamjena metilne skupine siromašne elektronima s nitro-skupinom imala je isti učinak kao i na živčanim stanicama, ali je u ovom slučaju zamjena metilne s nitro-skupinom rezultirala većom toksičnošću.

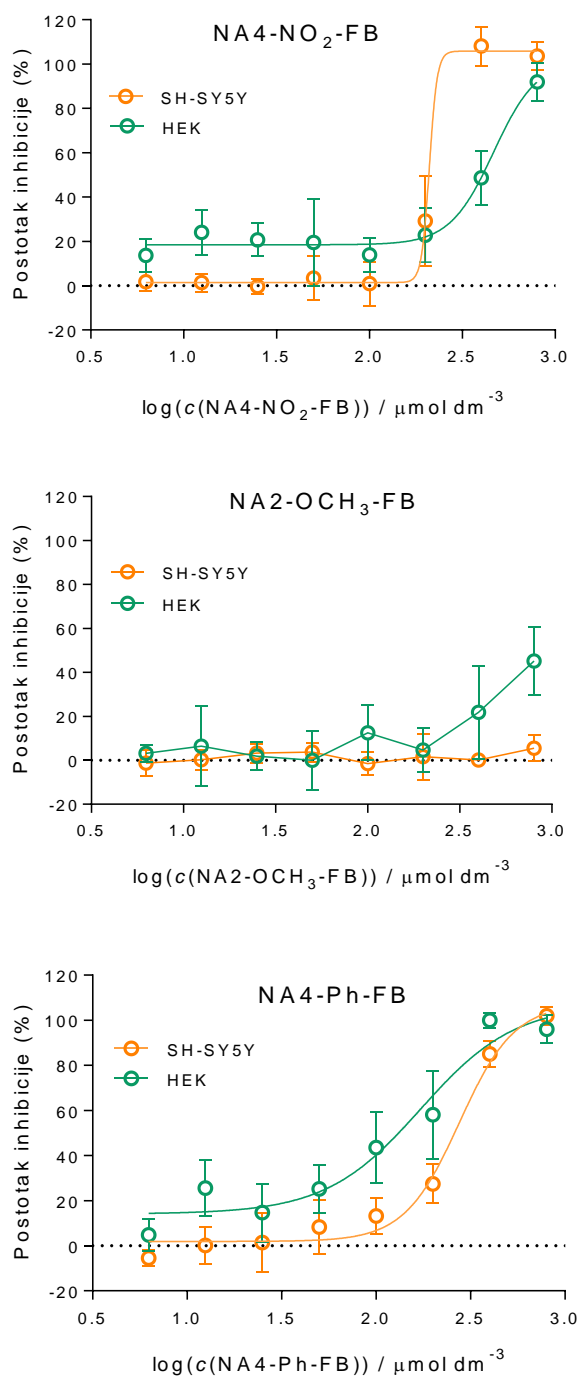
Iako su neki od testiranih derivata nikotinamida pokazali toksičnost, mehanizam kojim utječu na stanicu nije poznat i trebao bi biti dodatno razjašnjen u daljnjim istraživanjima. Valja napomenuti kako određene IC_{50} vrijednosti ne svrstavaju ove spojeve u visokotoksične te ista nije prepreka za daljnji razvoj ovih spojeva kao potencijalnih lijekova.⁶⁴ Također, koncentracija kod koje je vidljiva toksičnost NA4-Ph-FB kao najučinkovitijeg inhibitora obje kolinesteraze znatno je viša od one potrebne za inhibiciju enzima prema određenoj K_i vrijednosti.



Slika 14. Ovisnosti koncentracije i citotoksičnosti (izražene kao postotak inhibicije rasta živčanih SH-SY5Y i bubrežnih HEK 293 stanica) iz kojih su određene IC_{50} vrijednosti za spojeve NA4-CH₃-FB, NA4-F-FB i NA4-Cl-FB. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost tri nezavisna pokusa (\pm SD).



Slika 15. Ovisnosti koncentracije i citotoksičnosti (izražene kao postotak inhibicije rasta živčanih SH-SY5Y i bubrežnih HEK 293 stanica) iz kojih su određene IC₅₀ vrijednosti za spojeve NA4-Br-FB, NA4-H-FB i NA4-OCH₃-FB. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost tri nezavisna pokusa (± SD).



Slika 16. Ovisnosti koncentracije i citotoksičnosti (izražene kao postotak inhibicije rasta živčanih SH-SY5Y i bubrežnih HEK 293 stanica) iz kojih su određene IC_{50} vrijednosti za spojeve NA4-NO₂-FB, NA2-OCH₃-FB i NA4-Ph-FB. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost tri nezavisna pokusa (\pm SD).

Tablica 6. IC₅₀ vrijednosti izračunate iz krivulja logaritamskih ovisnosti koncentracije testiranih spojeva i postotaka inhibicije.

Spoj	SH-SY5Y IC ₅₀ ± SE (μmol dm ⁻³)	HEK 293 IC ₅₀ ± SE (μmol dm ⁻³)
NA4-H-FB	≥ 800	≤ 800
NA4-F-FB	≥ 800	≥ 800
NA4-Cl-FB	≤ 800	79,4 ± 1,2
NA4-Br-FB	501,2 ± 1,8	79,4 ± 1,1
NA4-NO ₂ -FB	210,2 ± 4,5	465,7 ± 1,3
NA4-CH ₃ -FB	≥ 800	≤ 800
NA4-OCH ₃ -FB	≥ 800	≥ 800
NA4-Ph-FB	276,2 ± 1,1	172,1 ± 1,3
NA2-OCH ₃ -FB	≥ 800	≥ 800

§ 5. ZAKLJUČAK

Svi testirani derivati nikotinamida reverzibilno su inhibirali obje kolinesteraze u mikromolarnom području, a jačina učinka ovisila je o prisutnom supstituentu na bočnom prstenu molekule. Međutim, prema omjeru konstanti inhibicije K_i može se zaključiti kako su derivati nikotinamida selektivniji inhibitori za AChE.

Najizraženiji utjecaj na konstantu inhibicije kod obje kolinesteraze imala je promjena supstituenta na položaju 4 bočnog prstena molekule u nizu -F, -Cl, -Br ili dodatak fenilnog prstena. Povećanjem veličine supstituenta u ovoj skupini, afinitet kolinesteraza za spoj ($1/K_i$) značajno raste.

Kao najjači inhibitor obje kolinesteraze izdvojen je spoj NA4-Ph-FB s konstantom inhibicije od $3,46 \mu\text{mol dm}^{-3}$ za AChE odnosno $7,97 \mu\text{mol dm}^{-3}$ za BChE. Ovakav rezultat ukazuje na specifičnosti aktivnih mjesta i kako dodatni aromatski prsten u strukturi inhibitora značajno doprinosi vezanju te ova struktura predstavlja početnicu za daljnji dizajn učinkovitih inhibitora.

Tri testirana derivata nikotinamida, NA4-Br-FB, NA4-NO₂-FB i NA4-Ph-FB, pokazala su citotoksični učinak na obje stanične linije u testiranom koncentracijskom rasponu do $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$, međutim određena IC₅₀ vrijednost posebice u slučaju najučinkovitijeg inhibitora kolinesteraza ($170\text{-}270 \mu\text{mol dm}^{-3}$) ne svrstava ove spojeve u visokotoksične.

Uzevši sve u obzir može se zaključiti kako dobiveni rezultati predstavljaju dobru osnovu za daljnji razvoj inhibitora baziranih na nikotinamidu s naglaskom na AChE, budući da određene konstante inhibicije svrstavaju ove spojeve unutar područja dosadašnjih istraživanja novih lijekova koji se koriste u otklanjanju simptoma neurodegenerativnih bolesti.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. P. Taylor, Z. Radić, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34** (1994) 281–320.
2. M.-M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E.G. Duysen, O. Lockridge, *Neuroscience* **110** (2002) 627–639.
3. A.N. Çokuğraş, *Turk Biyokim. Derg.* **28** (2003) str. 442–448.
4. M.B. Čolović, D.Z. Krstić, T.D. Lazarević-Pašti, A.M. Bondžić, V.M. Vasić, *Curr. Neuropharmacol.* **11** (2013) 315–335.
5. R. Dodel, I. Csoti, G. Ebersbach, G. Fuchs, M Hahne, W. Kuhn, M. Oechsner, W. Jost, H. Reichmann, J.B. Schulz, *J. Neurol.* **255** (2008) 39–47.
6. *Pathology of Neurodegenerative Diseases*, 7. siječnja 2017., *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28062563>, datum pristupa 17. lipnja 2019.)
7. R. Khoury, J.R. Rajamanickam, G.T. Grossberg, *Ther. Adv. Drug Saf.* **9** (2018) 171–178.
8. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62** (2011) 175–190.
9. V. Simeon-Rudolf, R.T. Evans, *Acta Pharm.* **51** (2001) 289–296.
10. V.P. Whittaker, *Chem. Biol. Interact.* **178** (2010) 23–26.
11. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J.C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, *J. Biol. Chem.* **287** (2003) 41141–41147.
12. E. Giacobini (ur.), *Cholinesterase and Cholinesterase inhibitors*. Matrin Dunitz Ltd, London, 2000, str. 9–25.
13. P. Taylor, Z. Radić, N.A. Hosea, S. Camp, P. Marchot, H.A. Berman, *Toxicol. Lett.* **82/83** (1995) 453–458.
14. T.L. Rosenberry, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **72** (1975) 3834–3838.
15. P. Masson, F. Nachon, C. Bartels, M. Froment, F. Ribes, C. Matthews, O. Lockridge,, *Eur. J. Biochem.* **270** (2003) 315–324.
16. J.M. Berg, J.L. Tymoczeko, L. Stryer, *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2006, str. 370.
17. J.M. Berg, J.L. Tymoczeko, L. Stryer, *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2006, str. 373.
18. D. Kaplan, A. Ordentlich, D. Barak, N. Ariel, C. Kronman, B. Velan, A. Shafferman, *Biochemistry* **40** (2001) 7433–7445.

19. R. Hussain, H. Zubair, S. Pursell, M. Shahab, *Brain Sci.* **8** (2018) 177.
20. E. Meshorer, H. Soreq, *Trends. Neurosci.* **29** (2006) 216–224.
21. K. Grennari, J. Bruner, U. Brodbeck, *J. Neurochem.* **49** (1987) 12–8.
22. D. Grisaru, M. Sternfeld, A. Eldor, D. Glick, H. Soreq, *Eur. J. Biochem.* **264** (1999) 672–686.
23. S. Darvesh, D. Hopkins, C. Geula, *Nat. Rev. Neurosci.* **4** (2003) 131–138.
24. A. Saxena, A. M. G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B. P. Doctor, *Biochemistry* **36** (1997) 14642–14651.
25. F. Nachon, Y. Nicolet, N. Viguié, P. Masson, J.C. Fontecilla-Camps, O. Lockridge, *Eur. J. Biochem.* **269** (2002) 630–637.
26. F.S. Jensen, M. Schwartz, J. Viby-Mogensen, *Acta. Anaesthesiol.* **39** (1995) 142–149.
27. B.N. La Du, C.F. Bartels, C.P. Nogueira, A. Hajra, H. Lightstone, A. Van der Spek, O. Lockridge, *Clin. Biochem* **23** (1990) 423–431.
28. A. Bosak, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **57** (2006) 445–457.
29. M. Jakanović, M.P. Stojiljković, *Eur. J. Pharmacol.* **553** (2006) 10–17.
30. P. Taylor, Z. Kovarik, E. Reiner, Z. Radić, *Toxicology* **233** (2007) 70–78.
31. D.E. Lenz, D. Yeung, J.R. Smith, R.E. Sweeney, L.A. Lumley, D.M. Cerasoli, *Toxicology* **233** (2007) 31–39.
32. E. Giacobini (ur.), *Cholinesterase and Cholinesterase inhibitors*. Matrin Dunitz Ltd, London, 2000, str. 181–226.
33. S.W. Wiener, R.S. Hoffman, *J. Intensive Care Med.* **19** (2004) 22–37.
34. J. Bajgar, *Adv. Clin. Chem.* **38** (2004) 151–216.
35. E. Giacobini (ur.), *Cholinesterase and Cholinesterase inhibitors*. Matrin Dunitz Ltd, London, 2000, str. 27–46.
36. E. Zeiger, G. Erexson, K. Mortelmans, A. Thilagar, *Mutat. Res.* **393** (1997) 189–197.
37. B. Svobodova, E. Mezeiova, V. Hepnarova, M. Hrabinoва, L. Muckova, T. Kobrlova, D. Jun, O. Soukup, M.L. Jimeno, J. Marco-Contelles, J. Korabecny, *Biomolecules* **9** (2019) 379.
38. E. Giacobini (ur.), *Cholinesterase and Cholinesterase inhibitors*. Matrin Dunitz Ltd, London, 2000, str. 103–121.
39. P. Marchot, C.N. Prowse, J. Kanter, et al., *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 3502–3510.
40. I.P. Johnson, *Front. Aging Neurosci.* **7** (2015) 168.
41. A.P. Marsh, *Neurol. Res. Pract.* **1** (2019) 35.

42. D.M. Smith, *J. Exp. Neurosci.* **12** (2018) 1–5.
43. H. Checkoway, J.I. Lundin, S.N. Kelada, *IARC Sci Publ.* **163** (2011) 407–419.
44. V. Folnegović-Šmalc, S. Uzun, O. Kozumplik, P. Folnegović-Grošić, N. Henigsberg, G. Makarić, M. Mihanović, N. Mimica, *Medicus* **11** (2002) 217–222.
45. R.C. Brown, A.H. Lockwood, B.R. Sonawane, *Environ. Health Perspect.* **113** (2005) 1250–1256.
46. S. Oddo, A. Caccamo, J.D. Shepherd, M.P. Murphy, T.E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M.P. Mattson, Y. Akbari, F.M. LaFerla, *Neuron* **39** (2003) 409–421.
47. S. Lalli, A. Albanese, *Expert Rev. Neurother.* **8** (2008) 1181–1108.
48. G.C. Brown, D.G. Nicholls, C.E. Cooper, S.J. Tabrizi, A.H.V. Schapira, *Biochem. Soc. Symp.* **66** (1999) 99–110.
49. A. Bosak, D.M. Opsenica, G. Šinko, M. Zlatar, Z. Kovarik, *Chem. Biol. Interact.* **308** (2019) 101–109.
50. L. Pisani, M. Catto, F. Leonetti, O. Nicolotti, A. Stefanachi, F. Campagna, A. Carotti, *Curr. Med. Chem.* **18** (2011) 4568–4587.
51. D. Mackay, J. Hathcock, E. Guarneri, *Nutr. Rev.* **70** (2012) 357–366.
52. A.A. Sauve, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324** (2008) 883–893.
53. A.S. Girgis, H.M. Hosni, F.F. Barsoum, *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006) 4466–4476.
54. <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-1-discovery-and-development> (datum pristupa 31. siječnja 2020.)
55. <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-2-preclinical-research> (datum pristupa 31. siječnja 2020.)
56. <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-2-preclinical-research> (datum pristupa 31. siječnja 2020.)
57. V. Simeon-Rudolf, R.T. Evans, *Acta Pharm.* **51** (2001) 289–296.
58. G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Jr. Andres, R.M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88–95.
59. V. Bušić, M. Katalinić, G. Šinko, Z. Kovarik, D. Gašo-Sokač, *Toxicol. Lett.* **262** (2016) 114–122.
60. A. Bosak, A. Ramić, T. Šmidlehner, T. Hrenar, I. Primožič, Z. Kovarik, *PLoS ONE*, **13** (2018) e0205193.

61. A. Bosak, D.M. Opsenica, G. Šinko, M. Zlatar, Z. Kovarik, *Chem. Biol. Interact.* **308** (2019) 101–109.
62. D.S. Woodruff-Pak, C. Lander, H. Geerts H., *CNS Drug Rev.* **8** (2002) 405–426.
63. M. Ahmed, J.B. Rocha, M. Corrêa, C.M. Mazzanti, R.F. Zanin, A.L. Morsch, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, *Chem. Biol. Interact.* **162** (2006) 165–171.
64. M. Katalinić, G. Rusak, J. Domaćinović Barović, G. Šinko, D. Jelić, R. Antolović, Z. Kovarik, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 186–192.

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Gabriela Lihtar

Datum rođenja: 26. veljače 1995.

Mjesto rođenja: Zabok

Obrazovanje

2001.–2009. Osnovna škola Mače, Mače

2009.–2013. Srednja škola Zlatar, Zlatar

2013.–2020. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (smjer: istraživački)

2017.–danas Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (smjer: istraživački; grane: biokemija i analitička kemija)

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013.–2019. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2017. Čarolije u kemiji

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. G. Lihtar, A. Zandona, D. Gašo Sokač, V. Bušić, M. Katalinić, *Utjecaj promjene strukture derivata nikotinamida na inhibiciju kolinesteraza i citotoksičnost*, Book of abstract of the HDBMB2019 "Crossroads in Life Sciences", Lovran, 2019, str. 133-133.