

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Karla Bulava, Karla Karadža

**Inhibicija enzima kolinesteraza tienobenzona/naftotriazolima -
Fotokemijska sinteza, genotoksičnost i molekularno modeliranje**

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Irene Škorić te na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Grupi za računalne bioznanosti pod komentorstvom dr. sc. Danijele Barić te je predan na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

A β – amiloid β -peptid

AC – adenilat-ciklaza

ACh – eng. *Acetylcholine* - acetilkolin

AChE – eng. *Acetylcholinesterase* - acetilkolinesteraza

ACTH – adrenokortikotropni hormon

AD – eng. *Alzheimer's disease* - Alzheimerova bolest

AI – eng. *acceptable daily intake* - prihvatljiv dnevni unos

AMPA – receptor α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline

API – eng. *active pharmaceutical ingredient* - aktivni farmaceutski sastojak

APOE – apolipoprotein E

APP – amiloidni prekursorski protein

ATP – adenzin-trifosfat

B3LYP – eng. *Becke Three Parameter Hybrid Functionals* - Beckeovi troparametarski hibridni funkcionali

BChE – eng. *Butyrylcholinesterase* - butirilkolinesteraza

CDCl₃ – deuterirani kloroform

ChAT – eng. *Choline Acetyltransferase* - kolin-acetiltransferaza

CI – skupina metoda konfiguracijske interakcije

CNS – eng. *central nervous system* - centralni živčani sustav

CRF – kortikotropin-oslobađajući faktor

CSF – eng. *cerebrospinal fluid* - cerebrospinalna tekućina

DCM – diklormetan

DFT – eng. *Density Functional Theory* - teorija funkcionala (elektronske) gustoće

E – dietileter

ER – endoplazmatski retikulum

ETC – eng. *electron transport chain* - elektron-transportni lanac

EtOAc – etil-acetat

GSH-Px – glutation-peroksidaza

H₂O₂ – vodikov peroksid

HF – Hartree-Fock

HPA – hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda

HRMS – eng. *high resolution mass spectrometry* - masena spektrometrija visoke rezolucije

iGluR – ionotropni receptori

IL – interleukin

InP3R – inozitol-1,4,5-trifosfatni receptori

MAO – monoamin-oksidaza

MAPs – eng. *microtubule-associated proteins* - skupina proteina povezanih s mikrotubulima

MDD – eng. *maximum daily dose* - maksimalna dnevna doza

mGluR – metabotropni receptori

MMP – matrične metaloproteinaze

MP – Møller-Plessetova skupina metoda

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

MRI – eng. *magnetic resonance imaging* - magnetska rezonancija

MWCNT – eng. *multi-walled carbon nanotubes* - višeslojne ugljikove nanocjevčice

NaOEt – natrijev etoksid

NH₃ – amonijak

NMDAR – *N*-metil-D-aspartatni receptori

NMR – eng. *Nuclear Magnetic Resonance* - nuklearna magnetska rezonancija

OXPHOS – eng. *oxidative phosphorylation* - oksidativna fosforilacija

PCM – model polarizabilnog kontinuuma

PE – petroleter

PEA – 2-feniletilamin

PES – eng. *Potential Energy Surface* - ploha potencijalne energije

PET – pozitronska emisijska topografija

PLC – fosfolipaza C

PSEN – presenilin

ROS – eng. *reactive oxygen species* - reaktivne kisikove vrste

RyR – Rijanodinski receptori

SAR – eng. *structure activity relationship* - odnos strukture i aktivnosti

SERCA – sarko/endoplazmatski retikulum-kalcij-ATPaza

SPECT – eng. *Single-photon emission computed tomography* - jednofotonska emisijska računalna topografija

STM – eng. *Scanning tunneling microscope* - pretražni tunelirajući mikroskop

TMS – tetrametilsilan

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Uloga kolinesteraza u Alzheimerovoj bolesti.....	2
2. OPĆI DIO.....	4
2.1. Alzheimerova bolest	5
2.2. Razvoj bolesti.....	6
2.3. Patogeneza – mehanizam bolesti.....	6
2.3.1. Genetski faktori.....	7
2.3.2. Kolinergička hipoteza.....	7
2.3.3. Amiloidna hipoteza.....	9
2.3.4. Tau-hipoteza.....	10
2.3.5. Hipoteza o monoamin-oksidazama	10
2.3.6. Hipoteza o kalciju.....	11
2.3.7. Ekscitotoksičnost glutamata.....	12
2.3.8. Mitohondrijska disfunkcija i reaktivne kisikove vrste (ROS)	13
2.4. Etiologija-uzroci bolesti.....	14
2.5. Detekcija bolesti	16
2.5.1. Amiloid-PET	16
2.5.2. Kolorimetrijski imunosenzor za A β ₁₋₄₂	17
2.6. 1,2,3-triazolni derivati kao potencijalni lijekovi	19
2.6.1. 1,2,3-triazolni derivati temeljeni na postojećim lijekovima	20
2.6.2. Prirodni spojevi	23
2.7. Računalno modeliranje	24
2.7.1. Teorija funkcionala (elektronske) gustoće.....	26
2.7.2. Opis otapala - model polarizabilnog kontinuuma	27
2.7.3. Optimizacija geometrije molekula	28

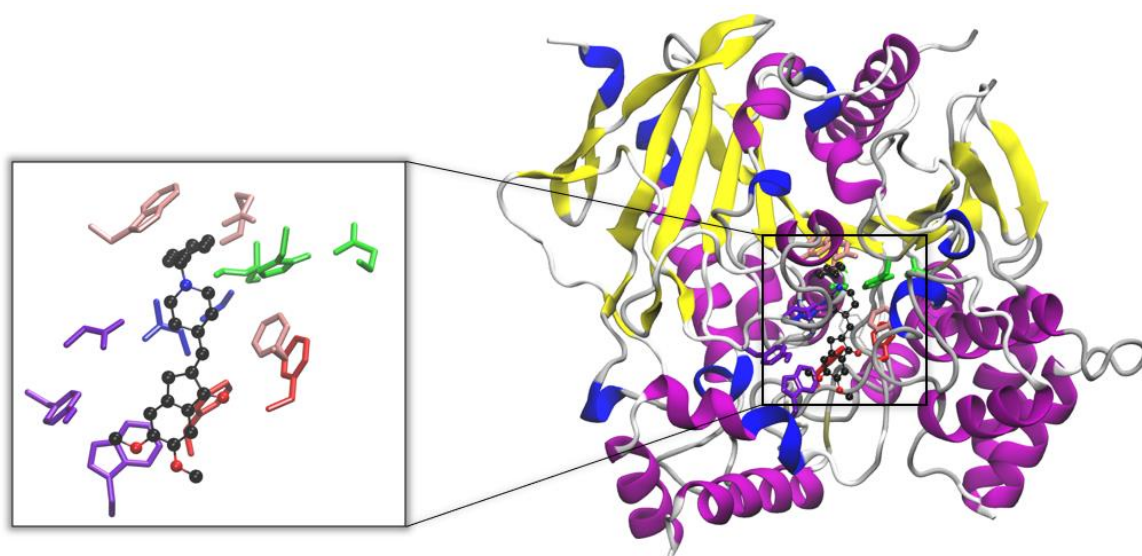
2.7.4. Molekulska pristajanje	29
3. REZULTATI I RASPRAVA	31
3.1. Pregled sintetiziranih spojeva.....	33
3.1.1. Sinteza i karakterizacija triazolnih aldehida 1-6	36
3.1.2. Sinteza i karakterizacija triazolostilbena 7-14 dobivenih Wittigovom reakcijom .	38
3.1.3. Fotokemijska sinteza i karakterizacija tienobenzo/naftotriazola 15-22	41
3.2. Biološka aktivnost sintetiziranih tienobenzo/naftotriazola 15-22	45
3.2.1. Inhibicija enzima kolinesteraza.....	45
3.4. Genotoksičnost	53
4. EKSPERIMENTALNI DIO	55
4.1. Opće napomene	56
4.2. Sinteza triazolnih aldehida 1-6	57
4.3. Sinteza triazolostilbena 7-14 Wittigovom reakcijom.....	60
4.4. Fotokemijska sinteza tienobenzo/naftotriazola 15-22	63
5. ZAKLJUČAK	68
6. ZAHVALE	71
7. LITERATURA	73
SAŽETAK	83
SUMMARY	84
ŽIVOTOPISI	85
PRILOZI.....	86

1. UVOD

1.1. Uloga kolinesteraza u Alzheimerovoj bolesti

Alzheimerova bolest (AD) je neurodegenerativni poremećaj karakteriziran progresivnom degeneracijom i gubitkom neurona u mozgu. Glavni je uzrok demencije i utječe na kvalitetu života pojedinca. Smatra se da su pojava i progresija bolesti povezani s oštećenjem mitohondrija, oksidativnim stresom, angiogenim promjenama i smanjenim kolinergičkim prijenosom [1].

Enzimi kolinesteraze rasprostranjeni su u biljnom i životinjskom svijetu, a klasificirani su kao hidrolaze α/β -strukture jer su građene od α -uzvojnica i β -nabranih ploča. Postoje dvije vrste kolinesteraza: acetilkolinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (BChE, EC 3.1.1.8) [2]. AChE (Slika 1) ima važnu ulogu jer kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičkim sinapsama središnjeg i perifernog živčanog sustava hidrolizom neurotransmitera acetilkolina [3].



Slika 1. Kristalna struktura enzima AChE s donepezilom u aktivnom mjestu.

BChE (Slika 2) služi kao koregulator kolinergičke neurotransmisije i sposoban je katalizirati hidrolizu acetilkolina. Visoke razine BChE povezane su s moždanim plakovima i neurofibrilarnim čvorovima, glavnim neuropatološkim obilježjima u AD [4]. AChE i BChE dijele oko 54 % svoje aminokiselinske sekvence, a njihova je glavna razlika u strukturi

aktivnog mjesta. Aktivno mjesto AChE sadrži 14 aromatskih aminokiselinskih ostataka, dok se u aktivnom mjestu BChE nalazi osam aromatskih i šest alifatskih ostataka [5].



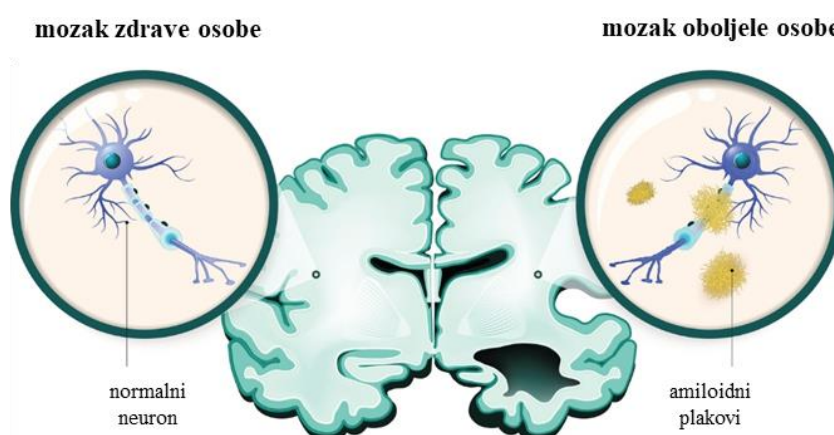
Slika 2. Kristalna struktura enzima BChE (monomer bez liganda).

Ciljani fotociklizacijski produkti u ovome radu bit će uključeni u ispitivanja inhibicije kolinesteraza i analizu molekuskog pristajanja (*dockinga*).

2. OPĆI DIO

2.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (eng. *Alzheimer's disease*, AD) je progresivna, neurodegenerativna bolest koja se obično povezuje s nedostatkom pamćenja i smanjenom kognitivnom funkcijom [6]. Alois Alzheimer prvi je opisao ovu bolest 1906. godine kao 'neobičnu bolest moždane kore'. Osim gubitka pamćenja, bolest je uzrokovala dezorijentaciju i halucinacije te dovela čak i do smrti [7]. Alzheimerova bolest najčešći je uzrok demencije na globalnoj razini, a za patološku dijagnozu potrebni su amiloidni plakovi i neurofibrilarni čvorovi. Spomenute lezije nakupljaju se u malim količinama u mozgu tijekom normalnog starenja, dok se kod Alzheimerove bolesti stvaraju u većim količinama [6]. Na slici 3 vidljivo je kako izgleda mozak zdrave osobe i osobe oboljele od Alzheimerove bolesti. U slučaju bolesti dolazi do nakupljanja amiloidnih plakova koji blokiraju normalnu funkciju neurona.



Slika 3. Prikaz mozga zdrave i oboljele osobe [8].

Mehanizam bolesti iznimno je složen te za istu još uvijek nema lijeka. Predviđa se da će broj oboljelih od Alzheimerove bolesti do 2050. godine doseći 153 milijuna. Upravo iz tog razloga mnogi su znanstvenici počeli razvijati nove spojeve koji mogu djelovati na različite molekularne mete povezane s patologijom ove bolesti [9]. Trenutno dostupni lijekovi za liječenje Alzheimerove bolesti pružaju samo simptomatsko olakšanje i usporavaju napredovanje bolesti [10].

2.2. Razvoj bolesti

Za bolje razumijevanje Alzheimerove bolesti, postoje dvije vrste klasifikacije. Prva klasifikacija temelji se na dobnoj kategorizaciji pri čemu se Alzheimerova bolest dijeli u dvije skupine, obiteljsku i sporadičnu. Obiteljska Alzheimerova bolest razvija se prije 65. godine života te je često povezana sa starenjem i genetskim mutacijama [11]. Suprotno tome, sporadična Alzheimerova bolest javlja se nakon 65. godine života, a povezana je s medicinskim čimbenicima (kardiovaskularne bolesti i dijabetes) i načinom života (pušenje, nezdrava prehrana, loš san) [12].

Druga klasifikacija Alzheimerove bolesti temelji se na napredovanju bolesti i učincima na pacijenta, a podijeljena je u četiri kategorije: pretklinička faza, faza blagog kognitivnog oštećenja, faza umjerenog kognitivnog oštećenja i teška faza. U pretkliničkoj fazi pacijent ne razvija nikakve simptome povezane s Alzheimerovom bolešću, ali se mogu zapaziti preliminarne mjerljive promjene u krvi, mozgu i cerebrospinalnoj tekućini zajedno s mutacijama u genima za amiloidni prekursorski protein, presenilin 1 i 2 [13]. Fazu blagog kognitivnog oštećenja, koja je još poznata kao rana faza Alzheimerove bolesti, karakteriziraju blagi simptomi poput zaboravljanja riječi i položaja svakodnevnih predmeta, no ona nema utjecaja na svakodnevne aktivnosti i društveni život [14]. U fazi umjerenog kognitivnog oštećenja (srednja faza) pacijent se suočava s poteškoćama u svakodnevnim zadacima i komunikaciji te se javljaju uznemirenost i promjene u ponašanju. Unatoč tome, pacijent i dalje može sudjelovati u svakodnevnim aktivnostima uz odgovarajuću pomoć [15]. Teška faza (kasna faza) Alzheimerove bolesti praćena je ozbiljnim nedostatkom komunikacije, nekontroliranim pokretima i gubitkom pamćenja. Pacijent postaje vezan za krevet što posljedično dovodi do krvnih ugrušaka, infekcija kože, sepse, upale i zatajenja organa [16].

2.3. Patogeneza – mehanizam bolesti

Mnogo je čimbenika, puteva i hipoteza povezano s Alzheimerovom bolešću pa se nove mete djelovanja brzo pojavljuju („multitargeting disease“). Dobro utvrđena hipoteza za Alzheimerovu bolest uključuje genetske faktore, kolinergički put, amiloidni put, tau-

hiperfosforilaciju, monoamin-oksidade, kalcijevu disregulaciju, ekscitotoksičnost glutamata, disfunkciju mitohondrija i reaktivne kisikove vrste [17].

2.3.1. Genetski faktori

Vrlo mali postotak slučajeva (0,1 %) Alzheimerove bolesti potječe od genetskog nasljeđivanja što je poznato pod nazivom obiteljska Alzheimerova bolest koja je prethodno spomenuta. Ovaj tip bolesti povezan je s autosomnom dominacijom jednog od tri gena koji kodiraju amiloidni prekursorski protein (APP), presenilin 1 i presenilin 2. Mutacija u bilo kojem od ova tri gena uzrokuje nepravilno cijepanje APP-a što dovodi do stvaranja $A\beta_{42}$ (amiloidni β -peptid koji sadrži 42 ostatka) umjesto $A\beta_{40}$. Agregacija $A\beta_{42}$ dovodi do stvaranja senilnih plakova koji se smatraju istaknutim uzrokom Alzheimerove bolesti. ABCA7 i SORL1 su također autosomno dominantni geni odgovorni za nasljednu Alzheimerovu bolest. Za TREM2 gen smatra se da povećava rizik od Alzheimerove bolesti. Poznato je da prisutnost $\epsilon 4$ alela apolipoproteina E (APOE $\epsilon 4$) povećava rizik od Alzheimerove bolesti za 3 % u heterozigotima te za 15 % u homozigotima. Osim spomenutih, postoje još neki geni uvršteni na popis od 19 gena koji utječu na rizik od Alzheimerove bolesti [18].

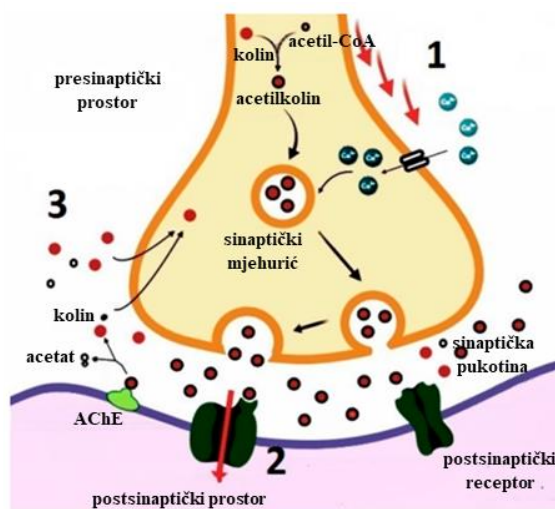
2.3.2. Kolinergička hipoteza

Kolinergički neuroni imaju široku distribuciju u ljudskom mozgu i igraju veliku ulogu u procesima spoznaje i stjecanja znanja. Kolinergički prijenos signala povezan s pamćenjem i učenjem ovisi o acetilkolinu (ACh) [19]. Osim što je učinkovit neurotransmiter, ACh je nužan uvjet za potpuno izražavanje neurovaskularnih odgovora izazvanih osjećajima [20]. Sintetizira ga enzim kolin-acetiltransferaza (ChAT), a za njegovu katalitičku aktivnost potrebni su kolin, acetil-koenzim A (acetil-CoA) i adenozin-trifosfat (ATP) [21].

Davies i Maloney otkrili su 1976. godine da kod bolesnika s Alzheimerovom bolešću dolazi do selektivnog gubitka komponenti kolinergičkog sustava [22]. Kolinergička hipoteza sugerira nedostatak neurotransmitera ACh u mozgu koji je povezan s povišenom razinom aktivnosti acetilkolinesteraze [23]. Enzim acetilkolinesteraza (AChE) odgovoran je za brzu hidrolizu

acetilkolina u sinapsi te služi kao neuromuskularni spoj koji rezultira završetkom živčanog impulsa. Druga vrsta enzima kolinesteraze je butirilkolinesteraza (BChE) koja također hidrolizira acetilkolin, ali se od AChE razlikuje po specifičnostima supstrata i osjetljivosti prema inhibitorima [24].

Kolinergička neurotransmisija temelji se na proteinima uključenim u sintezu, skladištenje, transport i razgradnju ACh [23]. U citoplazmi kolinergičkih neurona prvo dolazi do esterifikacije kolina i acetil-CoA pri čemu nastaje ACh [25]. Oslobađanje ACh posljedica je priljeva kalcijevih iona do kojeg dolazi otvaranjem kanala u presinaptičkoj membrani uslijed depolarizacije (korak 1 na slici 4). Zatim dolazi do egzocitoze („izbacivanja“) ACh pomoću sinaptičkih mjehurića koji se stapaju s presinaptičkom membranom i eliminiraju sadržaj neurotransmitera u sinaptičku pukotinu [26]. Eliminirani ACh veže se na postsinaptičke receptore koji pokreću stupnjevitu depolarizaciju u postsinaptičkom prostoru (korak 2 na slici 4). AChE katalizira razgradnju ACh te dolazi do reapsorpcije molekula kolina u presinaptički neuron (korak 3 na slici 4) [27].

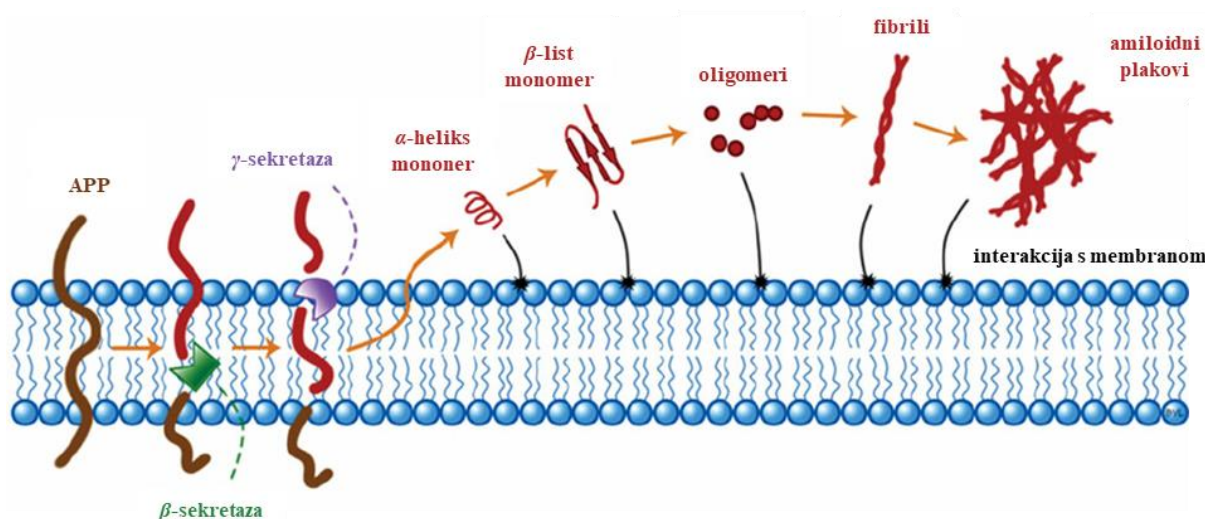


Slika 4. Shematski prikaz kolinergičke neurotransmisije [27].

Smanjena kolinergička neurotransmisija izravno je povezana s gubitkom intelektualnih sposobnosti. Stoga, hipoteza naglašava da će povećanje kolinergičkog prijenosa poboljšati kognitivnu funkciju kod Alzheimerove bolesti. Inhibicija AChE postala je važna meta u razvoju lijekova za Alzheimerovu bolest što je dovelo do otkrića inhibitora kolinesteraze kao što su takrin, donepezil i rivastigmin [28].

2.3.3. Amiloidna hipoteza

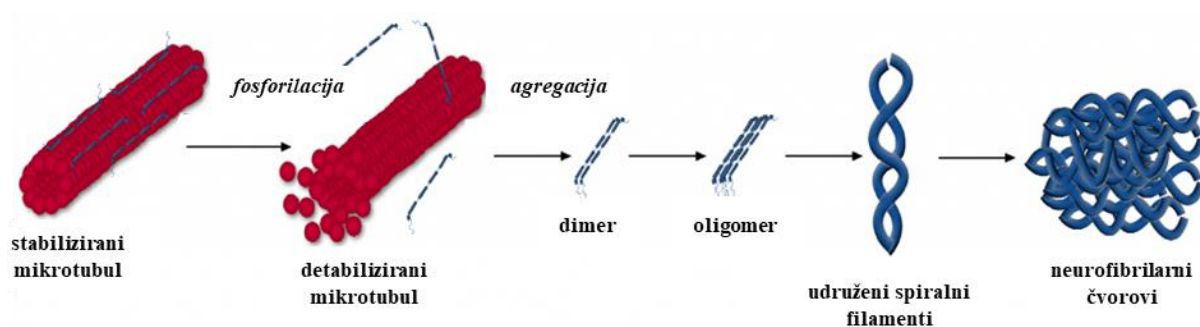
Amiloidna hipoteza (hipoteza amiloidne kaskade ili $A\beta$ -hipoteza) glavno je objašnjenje patogeneze Alzheimerove bolesti već više od 25 godina. U normalnim uvjetima amiloidni β -peptid ($A\beta$) nastaje kao produkt metabolizma APP-a djelovanjem enzima β - i γ -sekretaze te se oslobađa izvan stanice gdje se brzo razgrađuje ili uklanja. Međutim, kod starijih osoba ili u patološkim uvjetima smanjuje se sposobnost razgradnje amiloidnog β -peptida i dolazi do njegove akumulacije [29]. Mutacija gena za APP na kromosomu 21 rezultira nastajanjem $A\beta_{42}$ umjesto $A\beta_{40}$ [30]. Topljivi oligomeri $A\beta_{40}$ nastaju kada na APP djeluju α - i γ -sekretaza, dok $A\beta_{42}$ nastaju kada se APP cijepa djelovanjem β - i γ -sekretaze [31]. Pogrešno presavijeni oligomer $A\beta_{42}$ tvori netopljive proteinske agregate koji dalje stvaraju senilne (amiloidne) plakove (Slika 5) što dovodi do toksičnosti i prekida prijenosa živčanog impulsa [32]. Općenito, APOE razgrađuje formirani $A\beta$, ali njegov izoformni oblik APOE $\varepsilon 4$ ne razgrađuje te se agregacija nastavlja [33]. S obzirom da ometaju sposobnost komunikacije između neurona, amiloidni plakovi uzrokuju smrt neuronskih stanica i pad kognitivnih sposobnosti [34].



Slika 5. Shematski prikaz stvaranja amiloidnih plakova [35].

2.3.4. Tau-hipoteza

Tau-protein pripada skupini proteina povezanih s mikrotubulima (*microtubule-associated proteins*, MAPs), a potreban je za sastavljanje i stabilizaciju mikrotubula [36]. Uslijed hiperfosforilacije tau-protein gubi sposobnost vezivanja s mikrotubulima što dovodi do njihove destabilizacije. Posljedično dolazi do agregiranja tau-proteina u oligomere, udružene spiralne filamente i na kraju nastaju neurofibrilarni čvorovi (Slika 6) [37]. Tau-hipoteza pretpostavlja da patologija tau-čvorova prethodi stvaranju amiloidnih plakova te da su tau-fosforilacija i agregacija primarni uzrok neurodegeneracije u Alzheimerovoj bolesti [38].



Slika 6. Shematski prikaz stvaranja neurofibrilarnih čvorova [38].

2.3.5. Hipoteza o monoamin-oksidadama

Monoamin-oksidadza (MAO) vrsta je flavoenzima vezana za mitohondrije, a najviše je rasprostranjena u neuronskim i gastrointestinalnim tkivima. Nalazi se u dvije izoforme, MAO A i MAO B [39], koje se razlikuju prema distribuciji u tkivima te mjestima za prepoznavanje supstrata i inhibitora [40]. MAO A se u mozgu uglavnom javlja u kateholaminergičkim neuronskim stanicama, dok je MAO B smješten u gliji i serotoninergičkim neuronima. MAO inducira oksidativno deaminiranje analoga monoamina uz neurotransmitere, kao što su adrenalin, noradrenalin, dopamin, 2-feniletilamin (PEA), tiramin te egzogeni amini, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) i serotonin (5-HT). Oni procesom oksidativnog deaminiranja stvaraju neurotoksične metaboličke proizvode poput H_2O_2 , NH_3 i aldehida [41]. Spomenuti metaboliti uzrokuju oksidativni stres, koji je povezan s disfunkcijom neurotransmitera u kolinergičkom sustavu, kao i noradrenalina, hormona izravno uključenog u

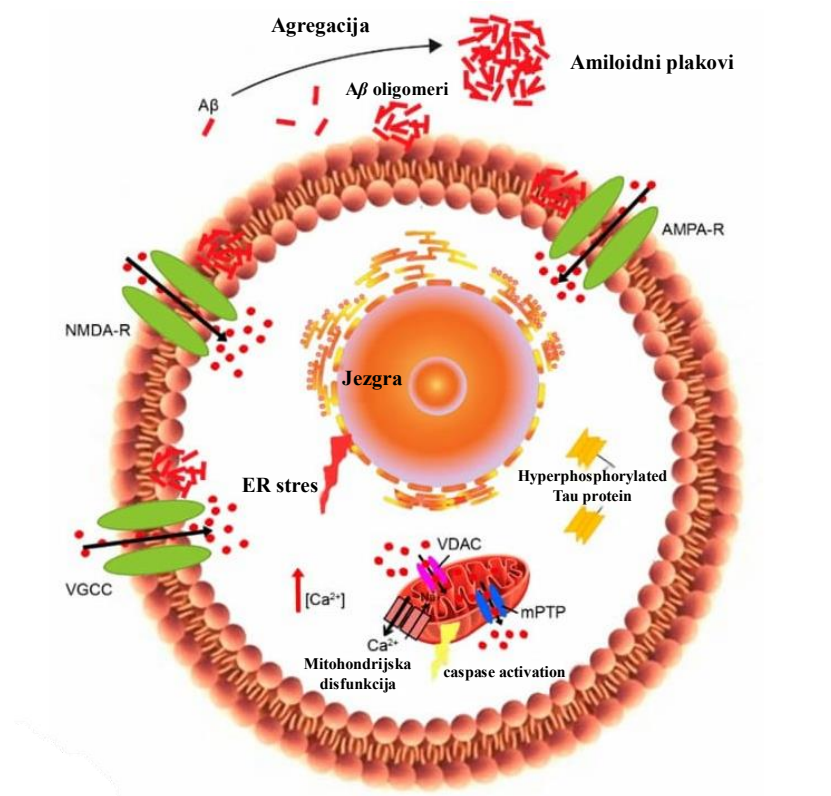
nastanak kognitivnih oštećenja [42]. Promjena moždane razine neurotransmitera uzrokuje stanje kognitivne disfunkcije i dovodi do razvoja neuroloških poremećaja [41]. Također, oksidativni stres povećava aktivnost izoenzima MAO B, koji uzrokuje agregaciju $A\beta$ i stvaranje plakova [43] te je glavni pokazatelj napredovanja AD-a [44].

2.3.6. Hipoteza o kalciju

Kalcijevi ioni, Ca^{2+} , sudjeluju u regulaciji funkcija raznih proteina i enzima, a poznati su kao sekundarni glasnici u signalnim putevima, poput preživljavanja stanica, proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Isto tako, uključeni su u regulaciju višestrukih neuronskih i astrocitnih funkcija, kao što su oslobađanje neurotransmitera, ekscitabilnost membrane i transkripcija gena. U stanju mirovanja, koncentracija Ca^{2+} u citoplazmi iznosi oko 100 nM, u endoplazmatskom retikulumu (ER) od 100 do 800 μ M, a u izvanstaničnom mediju od 1 do 2 mM. Za regulaciju navedenih koncentracija zaslužni su razni receptori te kalijevi i kalcijevi kanali [45]. Kalcijevi se kanali nalaze u različitim staničnim organelama, uključujući ER, mitohondrij, plazmatsku membranu i lizosom [46]. Nepoželjne promjene u koncentraciji Ca^{2+} iona uočene su kod pacijenata koji boluju od AD-a. Naime, disregulacija koncentracije Ca^{2+} iona povezana je s razvojem $A\beta$ -plakova i neurofibrilarnih čvorova [40]. Povećane razine Ca^{2+} u citosolu potiču proizvodnju $A\beta$ i njegovo neurotoksično djelovanje, a nakupljanje $A\beta$ rezultira stimulacijom neuronske kalcijeve signalizacije [47]. U otprilike 90 % slučajeva obiteljskog tipa AD-a uočava se poremećaj kalcijeve homeostaze [40].

Hipotezu o kalciju postavio je Khachaturian 1989. godine. Istraživao je na koji način aktivacija amiloidogenog puta može preoblikovati signalne puteve Ca^{2+} odgovorne za spoznaju. Istraživanja su pokazala da, osim što disfunkcija kalcijeve homeostaze utječe na proizvodnju $A\beta$, utječe i na hiperfosforilaciju Tau-proteina (Slika 7). $A\beta$ -oligomeri, nastali u izvanstaničnom prostoru, stvaraju interakciju s plazmatskom membranom, uzrokujući hiperaktivaciju kalcijevih kanala (NMDAR, AMPAR i VGCC). S druge strane, unutarstanični hiperfosforilirani Tau-protein uzorkuje disfunkciju homeostaze Ca^{2+} , što dovodi do mitohondrijske disfunkcije i ER stresa [45]. Također, sarko/endoplazmatski retikulum kalcij ATPaza (SERCA), koja se nalazi na membrani ER, održava razliku u koncentraciji Ca^{2+} između ER i citoplazme pomoću kalretinina i kalsekvestrina, proteina koji vežu kalcij. Za mobilnost

Ca^{2+} između ER i citoplazme odgovorni su Rijanodinski receptori (RyR) te inozitol 1,4,5-trifosfatni receptori (InP3R), unutarstanični oslobađajući kalcijevi kanali [40].



Slika 7. Učinci $\text{A}\beta$ i hiperfosforilirajućeg Tau-proteina na disregulaciju Ca^{2+} i neuronsku disfunkciju u patogenezi AD [45].

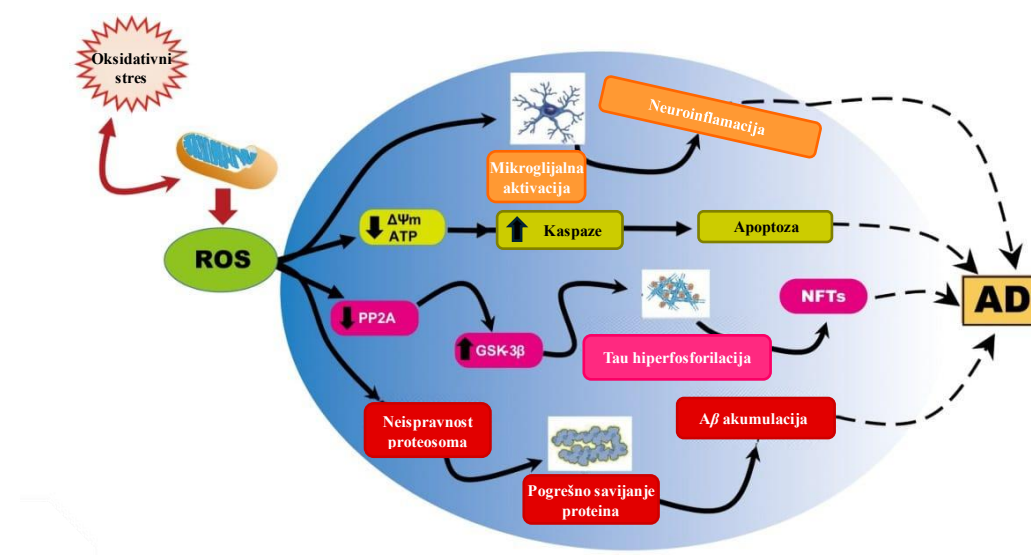
2.3.7. Ekscitotoksičnost glutamata

Glutamat predstavlja glavni ekscitacijski neurotransmiter, koji je osnova mnogih neuroloških funkcija u mozgu, primjerice spoznaje i pamćenja. U procesima neurotransmisije, unutar glutamatergičke sinapse, ima ulogu posrednika, i to kroz tri dijela: presinaptičke neurone, postsinaptičke neurone i astrocite. Glutamatna sinapsa sastoji se od nekoliko vrsta sinaptičkih komponenti, uključujući dva tipa glutamatnih receptora, ionotropni i metabotropni receptori. U ionotropne receptore (iGluR) spadaju *N*-metil-D-aspartatni receptori (NMDAR), receptor α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (AMPA-R) i skupine kainatnih receptora. S druge strane, metabotropni receptori (mGluR) podijeljeni su u tri funkcijske skupine; skupina I povezana je s fosfolipazom C (PLC), a čine ju mGluR1 i mGluR5, dok su skupina II (mGluR2 i mGluR3) te skupina III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 i

mGluR8) povezane s adenilat-ciklazom (AC) [48]. Jedna iGluR podskupina selektivno je zatvorena NMDAR antagonistom, koji djeluje pomoću naponske aktivacije uklanjanjem blokade Mg^{2+} iona. NMDAR sadrži veliku propusnost Ca^{2+} iona te igra ključnu ulogu u sinaptičkom prijenosu i plastičnosti. Pretjerana stimulacija glutamatergičke signalizacije uzorkuje ekscitotoksičnost. Ekscitotoksičnost se nalazi u osnovi nekoliko neurodegenerativnih poremećaja, uključujući AD [40], a zbiva se kada sinaptičko otpuštanje glutamata premaši astrocitni mehanizam čišćenja, što uzrokuje preveliku količinu glutamata u izvanstaničnoj domeni i prekomjernu aktivaciju ekstrasinaptičkih NMDA receptora. Prekomjerne količine glutamata povećavaju nakupljanje unutarstaničnog Ca^{2+} kroz NMDAR. Također, poznato je da $A\beta$ -oligomeri mogu oštetiti glutamatergički sustav izravnim povećanjem rekombinantne Ca^{2+} struje (P/Q tip) [48], tako što stupaju u interakciju s NMDA receptorima izravno ili putem sinaptičkih proteina (PSD95) [40]. Smatra se da glutamat/ Ca^{2+} signalizacija, u patogenezi AD-a, kontrolira nepravilne molekularne puteve u neuronima hipokampusa, poput sastavljanja citoskeleta, vezikularnog prijenosa, stvaranja ekscitabilnosti membrane, oslobađanja neurotransmitera i izazivanja apoptotskih signala [48].

2.3.8. Mitohondrijska disfunkcija i reaktivne kisikove vrste (ROS)

Mitohondriji su organele koje proizvode staničnu energiju u obliku adenozin-trifosfata (ATP), uključeni su u mnoge procese koji su važni za život i smrt stanice [49] te su glavni izvor za stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), bitnog čimbenika u patogenezi AD-a [50]. Stoga, mitohondrijska disfunkcija doprinosi smanjenoj proizvodnji ATP-a, dishomeostazi Ca^{2+} iona i generaciji ROS-a [51]. Nekoliko funkcija mitohondrija, poput morfologije, proizvodnje ROS-a, oksidativne fosforilacije, ER kao kontaktnog mjesta i puferiranja Ca^{2+} , utječu na razvoj AD-a [40]. Osim toga, agregacija $A\beta$ u dvosloju potiče razvoj ROS-a, što dovodi do lipidne peroksidacije membrana, uz oksidaciju unutarstaničnog proteina i nukleinske kiseline. Važno je napomenuti da je oksidativni stres povezan s funkcijom mitohondrija, ne samo zbog stvaranja ROS-a, već i zbog činjenice da ROS može dovesti do pogoršanja funkcije mitohondrija (Slika 8) [51].



Slika 8. Prikaz ROS-induciranih mitohondrijskih abnormalnosti kod AD-a [51].

Mitohondrijski ATP proizvodi se procesom oksidativne fosforilacije (OXPHOS). Njihov se elektron transportni lanac (ETC) sastoji od pet enzimskih kompleksa, koji se nalaze u unutarnjoj membrani mitohondrija, gdje dolazi do stvaranja naboja, što uzrokuje sintezu ATP-a iz ADP-a i anorganskog fosfata pomoću ATP sintaze. Budući da u središnjem živčanom sustavu (CNS) ne postoji rezerva energije, moždane stanice kontinuirano stvaraju ATP kako bi se održala neuronska funkcija. Mitohondrijska disfunkcija u AD-u očituje se u smanjenoj razini neuronskog ATP-a, prekomjernoj proizvodnji ROS-a i povećanom oksidativnom stresu, što na kraju dovodi do stanične smrti [51].

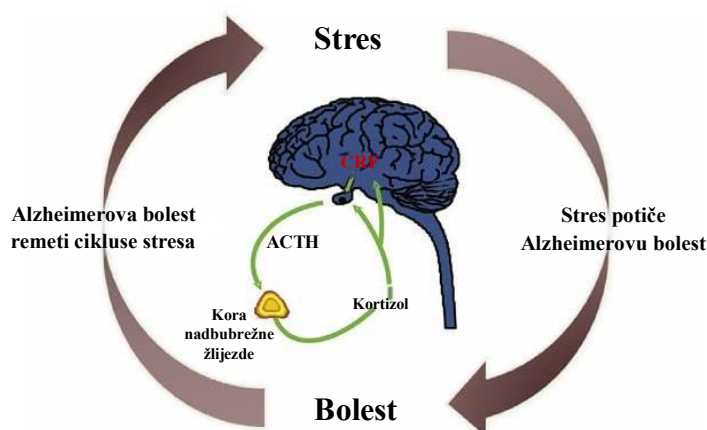
2.4. Etiologija-uzroci bolesti

Mehanizam nastanka Alzheimerove bolesti vrlo je složen proces, a uključuje mnogo okolišnih i genetskih čimbenika koji su uključeni u razvoj bolesti. Vjerojatnost da osoba u dobi od 65 godina boluje od AD-a je svega 3 %, dok se u dobi od 85 godina ta vjerojatnost povećava na 30 % [52]. Prvi gen za koji se pokazalo da uzrokuje AD je $A\beta$ -prekursorski protein (APP) [53], o kojemu je bilo više riječi u poglavlju o mehanizmu bolesti. Uz APP, vrlo značajan genetski uzročnik ranog oblika AD-a je presenilin, koji dolazi u dva oblika, presenilin 1 (PSEN1) i presenilin 2 (PSEN2). Ti su proteini ključne komponente γ -sekretaza, koje APP cijepaju u $A\beta$ -fragmente. Mutacija u PSEN1 i PSEN2 smanjuje proteolitičku aktivnost γ -

sekretaza, što dovodi do disbalansa $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ fragmenata [54]. Također, potrebno je istaknuti APOE i TREM2. Apolipoprotein E (APOE) uključen je u metabolizam masti, a njegov $\epsilon 4$ alel predstavlja najčešći genetski čimbenik rizika za AD. S druge strane, receptor TREM2 nalazi se na više vrsta imunoloških stanica i povezan je s upalom koja se javlja kod AD-a [53].

U novije se vrijeme došlo do spoznaje o ulozi matriksnih metaloproteinaza u razvoju AD-a. Matriksne metaloproteinaze (MMP) multigenska su obitelj proteinaza, koja se može podijeliti u pet kategorija: želatinaze (MMP-2 i -9), stromelizini (MMP-3 i -10), kolagenaze (MMP-1, -8 i -13), MMP membranskog tipa (MMP-14, -15, -16, -17, -24 i -25) i ostale MMP [55]. Unutarstanične MMP nalaze se u različitim dijelovima stanice uključujući citosol, sarkomeru, mitohondrije i jezgru te pridonose patogenezi različitih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, respiracijske bolesti i maligni tumori [56]. MMP reguliraju funkcije velikog broja signalnih molekula uključenih u neurološku upalu, sinaptičku disfunkciju i smrt neurona [57]. Kad je riječ o AD-u, MMP sudjeluju u razgradnji izvanstaničnih proteina, što znači da mogu izravno razgraditi $A\beta$, a to rezultira smanjenjem naslaga $A\beta$. Isto tako, uključeni su u regulaciju upalnih procesa i regulaciju propusnosti krvno-moždane barijere te u amiloidogeni put APP-a [55].

U današnje vrijeme, jedan od glavnih okolišnih čimbenika koji je uključen u razvoj i napredovanje mnogih bolesti je stres. On uzrokuje pogoršanje bolesti, velikim dijelom kroz aktivaciju osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA), koja podiže razine cirkulirajućih kortikosteroida. Taj se oblik stresa naziva „opći adaptacijski sindrom“. Odnos između stresa i bolesti naziva se „Začarani krug stresa“, prikazan na slici 9 [58].



Slika 9. Začarani krug stresa [58].

Desni luk kruga prikazuje kako povišena razina stresa pogoršava stanje AD-a, uzrokujući brži razvoj bolesti i gubitak kognitivnih funkcija. Lijevi luk kruga prikazuje kako AD utječe na živčane sklopove koji reagiraju na stres, što dovodi do razvoja depresije, anksioznosti i agresivnog ponašanja. HPA osovina ima središnju ulogu u oba egzacerbacija AD-a, na način da kortikotropin-oslobađajući faktor (CRF) hipotalamusa aktivira oslobađanje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) iz hipofize i naknadno otpuštanje kortizola iz nadbubrežne žlijezde [58].

2.5. Detekcija bolesti

U posljednjih je nekoliko desetljeća došlo do značajnog dijagnostičkog napretka u otkrivanju Alzheimerove bolesti, iako medicina i dalje nema dovoljno precizne metode i alate za ranu detekciju AD-a. Najpoznatije tehnike na kojima se zasnivaju uređaji u nuklearnoj medicini su pozitronska emisijska topografija (PET), jednofotonska emisijska kompjutorizirana topografija (SPECT) i magnetska rezonancija (MRI) [59]. Isto tako, dijagnosticiranje AD-a moguće je i mjerenjem razine biomarkera koji se nalaze u cerebrospinalnoj tekućini (CSF). Potrebno je istaknuti $A\beta$ - i Tau-biomarkere [60], a osim njih vrlo su važni i APOE4, APP, ADDLs, AAT, BACE1 te AD7c-NTP [61].

U ovom će radu biti istaknuta dva primjera detekcije Alzheimerove bolesti.

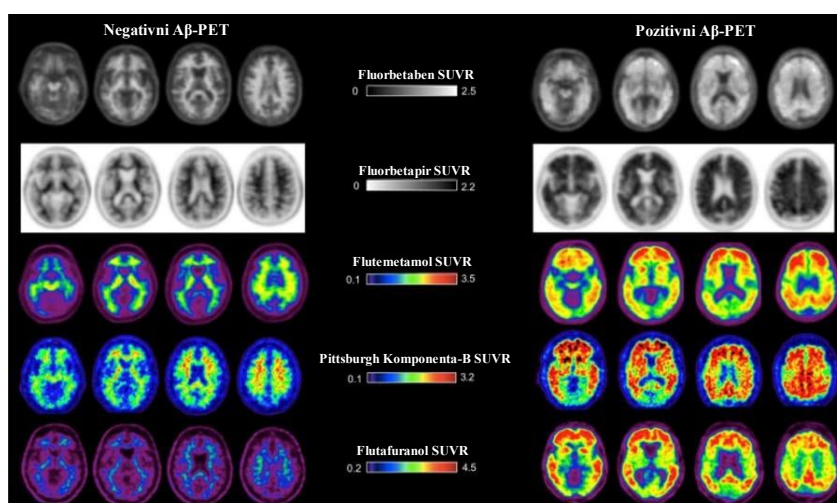
2.5.1. Amiloid-PET

Amiloid-PET tehnika je neuroimaginga koja koristi standardizirane postupke vizualnog očitavanja pomoću specifičnih tragača. Omogućuje neinvazivnu, *in vivo* detekciju amiloidnih plakova, glavnih neuropatoloških obilježja Alzheimerove bolesti. Metoda ima visoku osjetljivost (96 %, 95 % CI 80–100) i specifičnost (100 %, 78–100) kod bolesnika s dijagnozom AD-a. Ono što se smatra nedostatkom ove metode je neselektivnost, odnosno nemogućnost razlikovanja različitih vrsta poremećaja kod kojih je karakteristično taloženje amiloida.

Tijekom godina razvijeno je nekoliko specifičnih obilježivača, koji su klinički odobreni i komercijalno dostupni. Istaknuli su se sljedeći obilježivači: ^{18}F -fluorbetapir, ^{18}F -fluorbetaben i

^{18}F -flutemetamol. U kliničkoj su se praksi pokazali ekvivalentnima pa je omogućena njihova izravna kvantitativna usporedba [62].

Osim toga, amiloid-PET može se protumačiti kao pozitivan ili negativan, odnosno kao povišen ili nepovišen amiloid (Slika 10). Na negativnoj je snimci vidljivo da je vezanje ograničeno na bijelu tvar, ističući očuvan kontrast sive tvari u odnosu na bijelu tvar. S druge strane, u pozitivnoj je snimci vidljivo vezanje kortikalne sive tvari, u jednakoj ili većoj mjeri u odnosu na vezanje bijele tvari. Također, ističe se naknadni gubitak kontrasta sive tvari u odnosu na bijelu tvar [63].



Slika 10. Primjeri negativnih i pozitivnih amiloid-PET nalaza korištenjem različitih obilježivača [63].

Amiloid-PET pokazao se kao vrlo koristan dijagnostički alat. U budućnosti, njegova bi glavna svrha trebala biti rana diferencijalna dijagnoza u kliničkim uvjetima, ali i mogućnost odabira pacijenata prikladnih za specifičnu terapiju [63].

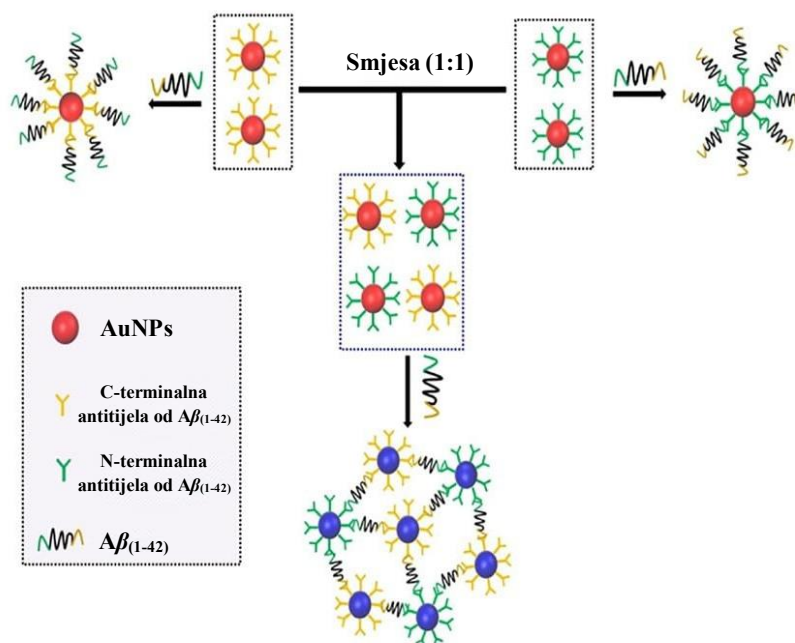
2.5.2. Kolorimetrijski imunosenzor za $\text{A}\beta_{1-42}$

Imunosenzori predstavljaju biosenzorske alate temeljene na afinitetnom ligandu, u kojima je imunokemijska reakcija povezana s pretvaračem. Najpoznatije vrste imunosenzora su elektrokemijski i optički senzori. Princip rada temelji se na interakciji receptora i liganda [64], a pravilna imobilizacija receptora na površinu sonde igra ključnu ulogu u osjetljivosti samog

biosenzora. Vrlo je važno razviti dobre strategije pojačavanja signala kako bi granica detekcije bila što niža. U tu se svrhu najčešće koriste nanomaterijali, redoks-medijatori i enzimi. Nanočestice, zbog svoje veličine (od 1 do 100 nm) i jedinstvenih svojstava, mogu se koristiti za detekciju raznih kemijskih markera i biomarkera. Kao primjer treba istaknuti AuNP nanočestice, o kojima će biti više riječi u nastavku, a uz njih ističu se i višeslojne ugljikove nanocjevčice (MWCNT) te grafen [61].

Hu i sur. konstruirali su imunosenzor za detekciju $A\beta_{1-42}$. Koristili su kolorimetrijski *sandwich* imunosenzor, koji se temelji na nanočesticama zlata modificiranim dvostrukim antitijelima (Slika 11). U eksperimentu su korištena C-terminalna i N-terminalna antitijela, koja pokazuju izvrsnu specifičnost za $A\beta_{1-42}$. Konjugacijom C-terminalnih i N-terminalnih antitijela na površinu AuNP nanočestice dolazi do agregacije nanočestica zlata, prilikom čega dolazi do promjene boje nanočestica iz crvene u plavu. Rezultati su pokazali dobru linearnost u rasponu od 7,5 nM do 350 nM i izvrsnu granicu detekcije od 2,3 nM [65].

Razvoj tehnologije imunotestova značajan je u području medicine i kliničkoj primjeni [64], jer se preciznijim i pouzdanijim otkrivanjem biomarkera u tjelesnim tekućinama omogućuje točnija dijagnoza te prognoza bolesti [61].

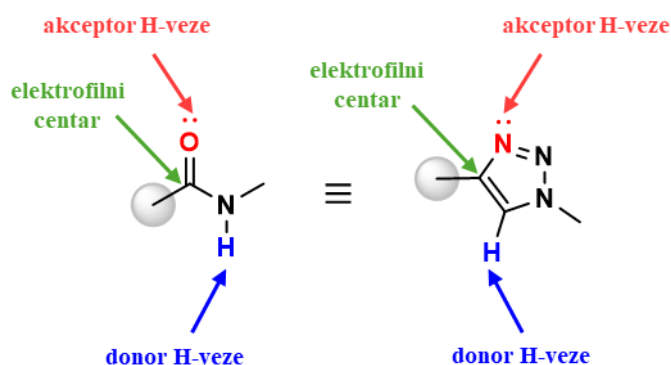


Slika 11. Prikaz kolorimetrijskog *sandwich* imunosenzora za $A\beta_{1-42}$ [64].

2.6. 1,2,3-triazolni derivati kao potencijalni lijekovi

Triazol je svestrana jezgra u medicinskoj kemiji i sastavni dio brojnih lijekova koji se koriste u kliničkoj praksi. Općenito, 1,2,3-triazol je heterociklički spoj koji sadrži pet atoma u prstenu od čega su dva ugljikova atoma i tri dušikova atoma kao dio aromatskog prstena. Intenzivno je razvijen pristupom klik-kemije te je često prvi izbor za razvoj multifunkcionalnih hibrida putem molekulske hibridizacije. Posjeduje veliku bioraspodivnost, nisku toksičnost i veliku stabilnost u kiselim i baznim uvjetima [66]. Jezgra 1,2,3-triazola zapravo je bioizoster amida i izvrstan primjer mimikrije peptida. 1,4-disupstituirani triazol oponaša peptidnu vezu ili funkciju amida u *trans*-konfiguraciji što ga čini važnom jezgrom u strategijama razvoja lijekova [67].

Slobodan elektronski par na dušikovom atomu triazola oponaša karbonilni kisik amidne skupine (akceptor H-veze), dok karbonilni ugljik amidne skupine pokazuje sličnost s C4 atomom triazola (elektrofilni centar). Osim toga, C5-H veza triazola oponaša N-H vezu amida pri čemu obje imaju sposobnost donirati H-vezu (Slika 12). Treba napomenuti da je akceptorska/donorska snaga H-veze triazola veća nego kod amidne skupine jer triazol ima veći dipolni moment [68].



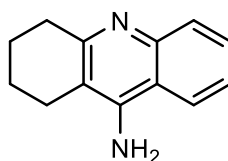
Slika 12. Jezgra 1,2,3-triazola kao bioizoster amida.

Molekule koje u svojoj strukturi sadrže 1,2,3-triazol imaju široki raspon farmakoloških svojstava, uključujući inhibiciju enzima kolinesteraza, protuupalno djelovanje i antidepresivno djelovanje [66]. Triazolna jezgra može stvarati vodikove veze s katalitičkim mjestima ostataka acetilkolinesteraze što je čini važnom u razvoju lijekova za Alzheimerovu bolest [69]. Brojni

sintetizirani derivati koji sadrže 1,2,3-triazolnu jezgru pokazali su se kao potencijalna sredstva protiv Alzheimerove bolesti u prekliničkim studijama.

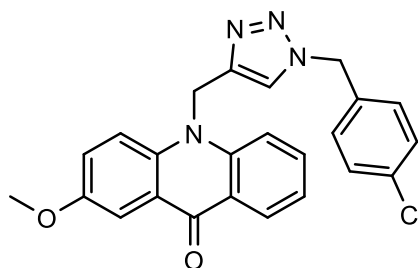
2.6.1. 1,2,3-triazolni derivati temeljeni na postojećim lijekovima

Takrin (Slika 13), kao derivat tetrahidroakridina, prvi je odobreni inhibitor AChE koji je poslužio za razvoj drugih derivata s boljom učinkovitošću i manje nuspojava.



Slika 13. Struktura takrina.

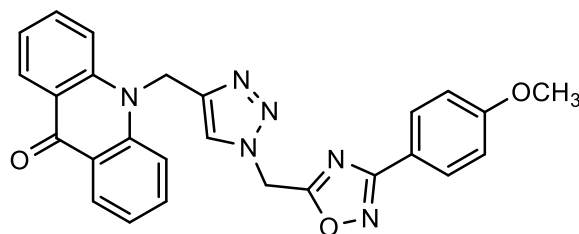
Akridoni su prirodni derivati koji posjeduju AChE inhibicijska svojstva. Inspirirani takrinom i akridonima, Mohammadi-Khanaposhtani i sur. dizajnirali su i sintetizirali niz derivata akridona povezanih s triazolima te procijenili inhibicijsku aktivnost prema AChE. Od sintetiziranih spojeva najaktivniji je bio spoj prikazan na slici 14 s IC_{50} vrijednošću od 7,31 μ M. Odnos strukture i aktivnosti (eng. *structure activity relationship*, SAR) pokazao je da zamjenom vodika klorom u *para*-položaju benzilnog prstena dolazi do poboljšanja inhibicijske aktivnosti prema AChE [70].



Slika 14. Derivat akridona povezan s triazolom.

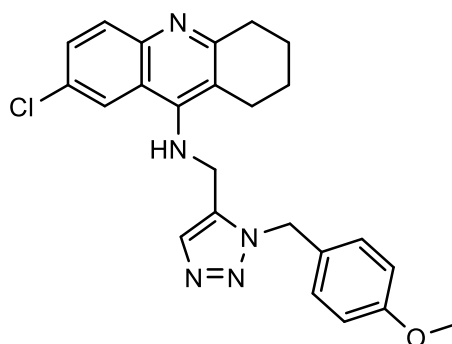
Inspirirani raznolikim biološkim potencijalom 1,2,4-oksadiazola i 1,2,3-triazola, Mohammadi-Khanaposhtani i sur. sintetizirali su i niz derivata akridon-1,2,4-oksadiazol-1,2,3-

triazola. Među njima je najbolji bio spoj prikazan na slici 15 s IC_{50} vrijednošću od 11,5 μM . Odnos strukture i aktivnosti pokazao je da metoksi-skupina u *para*-položaju fenila ima najbolju inhibicijsku aktivnost prema AChE, dok klor, brom i metilna skupina smanjuju aktivnost spoja [71].



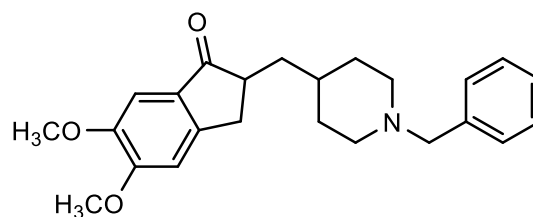
Slika 15. Derivat akridon-1,2,4-oksadiazol-1,2,3-triazola.

Slično tome, Najafi i sur. sintetizirali su niz takrin-1,2,3-triazolnih hibrida i odredili njihovu inhibiciju enzima kolinesteraza. Među sintetiziranim hibridima najbolji je bio spoj prikazan na slici 16 s IC_{50} vrijednostima od 0,0521 μM za AChE i 1,853 μM za BChE. Odnos strukture i aktivnosti pokazao je da metoksi skupina u *para*-položaju benzilnog prstena ima najbolju inhibitornu aktivnost, a klor, fluor, metil i nesupstituirani benzilni prsten smanjuju aktivnost. Ovaj spoj pokazao je i mogućnost obnove pamćenja kod štakora s amnezijom izazvanom skopolaminom [72].



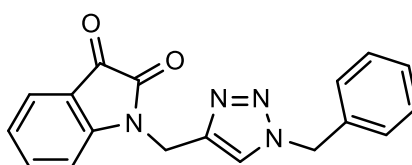
Slika 16. Takrin-1,2,3-triazolni hibrid.

Donepezil je AChE inhibitor i koristi se za liječenje Alzheimerove bolesti. Struktura donepezila prikazana je na slici 17 [73].



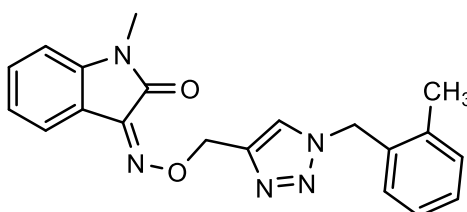
Slika 17. Struktura donepezila.

Lan i sur. na temelju donepezila dizajnirali su niz derivata indolin-2-ona s 1-benzil-1*H*-1,2,3-triazolima. Spoj prikazan na slici 18 pokazao se kao snažni inhibitor AChE (51 % inhibicije pri koncentraciji od 100 μ M) [74].



Slika 18. Derivat indolin-2-ona s 1-benzil-1*H*-1,2,3-triazolom.

S obzirom da posjeduje veliki dipolni moment i može stvarati vodikove veze s aktivnim stranama, benzil-1,2,3-triazol korišten je i za molekulsku hibridizaciju s metilindolinonom. Sintetizirani spoj (Slika 19) pokazao je dobru do umjerenu aktivnosti prema BChE, ali slabu inhibiciju AChE. Vrijednost IC_{50} za BChE iznosila je 4,78 μ M što je bolje nego u slučaju donepezila (5,19 μ M) [75].

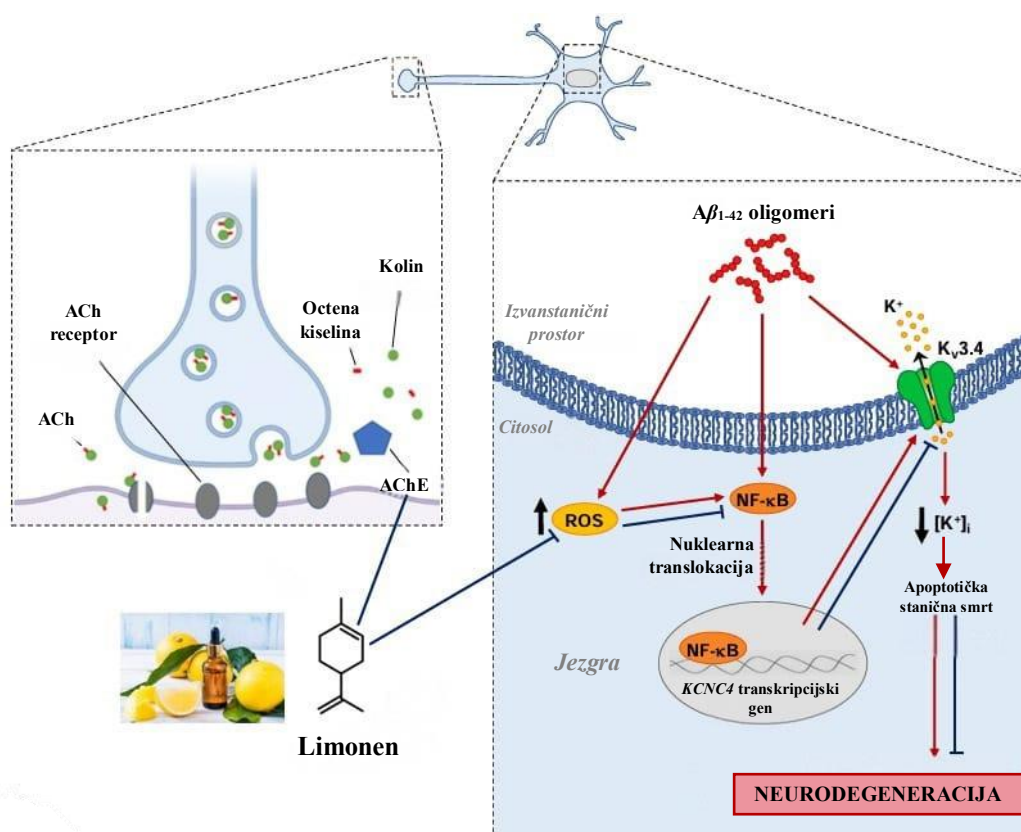


Slika 19. Hibrid metilindolinona i benzil-1,2,3-triazola.

2.6.2. Prirodni spojevi

Odavno je poznato da su biljke nepresušan izvor ljekovitih sastojaka, koji se koriste u liječenju raznih bolesti i infekcija. Dokazano je da boravak u prirodi, posebice u šumskom krajoliku, značajno smanjuje interleukin-6 (IL-6), podiže razinu glutation-peroksidaze (GSH-Px) [76] i smanjuje razine malondialdehida [77], faktora koji sudjeluju u obrani od patogena i smanjuju oksidativni stres [78]. Mnoga su klinička ispitivanja, u kojima su sudjelovali pacijenti koji boluju od Alzheimerove bolesti, pokazala da eterična ulja pomažu u liječenju neurodegenerativnih bolesti [79]. Eterična ulja sadrže terpenoide, hlapljive, niskomolekularne, lipofilne spojeve, koji mogu prolaziti kroz razne biološke membrane, uključujući krvno-moždanu barijeru [80]. Osim toga, terpenoidi djeluju kao antioksidansi i inhibitori acetilkolinesteraze [81]. Njihova se antioksidativna aktivnost očituje u nekoliko mehanizama djelovanja, uključujući uklanjanje širokog spektra ROS-a i keliranje metalnih iona [82]. Također, mogu smanjiti katalitičku aktivnost enzima koji omogućuju nastanak ROS-a [83].

Provedena su *in vitro* i *in vivo* istraživanja koja su pokazala antioksidativno djelovanje brojnih terpena i terpenoida. Jedan od značajnijih koji se istaknuo je limonen. U opisanom su *in vitro* istraživanju kao model korišteni primarni kortikalni neuroni izloženi $A\beta_{1-42}$ oligomerima (Slika 20) [84]. Limonen je monoterpen i glavna je komponenta aktivnog kompleksa iz roda *Citrus* [85]. Smatra se da limonen djeluje na središnji živčani sustav, na način da utječe na ekspresiju adenilat-ciklaze 1 (AC1), koja regulira razine cAMP-a. S druge strane, antioksidativno i protuupalno djelovanje limonena pokazalo se ključnim u zaštiti od oštećenja stanica izazvanim oligomerima $A\beta_{1-42}$, koji omogućuju prizvodnju ROS-a [86]. Studije su pokazale da je neuravnotežena koncentracija K^+ iona povezana s nepravilnom funkcijom kalijevih kanala, koji se nalaze u živčanim i glijalnim stanicama uključenima u razvoj Alzheimerove bolesti. Smanjenje citoplazmatske koncentracije K^+ iona aktivira kaspaze i nukleaze, enzime uključene u apoptozu živčanih stanica [87]. Također, brze, inaktivirajuće struje K^+ iona prolaze kroz naponom reguliran kalijev kanal $K_v3.4$, koji utječe na neuronsku i astrocitnu ekscitabilnost. Upravo $A\beta_{1-42}$ peptidi igraju ključnu ulogu u regulaciji $K_v3.4$ kanala, odnosno dovode do selektivnog poboljšanja $K_v3.4$ struja, na način da aktiviraju transkripcijski faktor NF- κ B [84].



Slika 20. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja limonena u kortikalnim neuronima pod utjecajem $A\beta_{1-42}$ oligomera [84].

Limonen je pokazao specifičnu aktivnost protiv acetilkolinesteraze. Isto tako, pokazao se vrlo uspješnim u sprječavanju smanjenja aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze izazvane $A\beta_{1-42}$ oligomerom i sprječavanju povećane proizvodnje ROS-a. Time je dokazan neuroprotektivni učinak limonena na primarne kortikalne neurone [84].

2.7. Računalno modeliranje

Računalna kemija je grana kemije koja koristi računalno modeliranje i simulacije, što uključuje *ab initio* pristupe temeljene na kvantnoj mehanici, kao i metode zasnovane na klasičnoj mehanici. Međutim, u svrhu proučavanja struktura i svojstava molekula i materijala, u računalnu kemiju ulaze i metode koje su razvijene upotrebom empirijskih podataka [88]. Zbog tehnološkog napretka i razvoja novih programskih paketa, u današnje vrijeme sve

više znanstvenika koristi računalno modeliranje [89]. Prednost računalnih kemijskih programa je to što, pri istraživanju tijeka kemijskih reakcija i određivanju svojstava molekula, omogućuju proučavanje i simulaciju kemijskih fenomena bez provedbe laboratorijskih istraživanja. Treba napomenuti da rezultati dobiveni metodama računalne kemije nisu uvijek egzaktna rješenja za realne molekulske sustave, ali su obično dovoljno točni i primjenjivi.

Primjena računalnih metoda zaista je široka. One mogu poslužiti za provedbu vrlo kompleksnih računa pri optimizaciji geometrije molekula, za analizu konformacijskog prostora molekulskih sustava te kao potvrda eksperimentalno dobivenih opisa molekula određenih svojstava i strukturnih obilježja. Također mogu poslužiti i za predviđanje svojstava molekula koje još nisu eksperimentalno priređene. Osim navedenog, računalne metode mogu se koristiti i za modeliranje kratkoživućih, nestabilnih intermedijera i prijelaznih stanja, čije se strukture ne mogu opaziti eksperimentalno [90]. Vrlo bitna veličina u računalnoj kemiji je energija sustava koja se definira kao opis stabilnosti sustava. Najstabilniji sustav je onaj koji ima najmanji sadržaj energije. Energijskom analizom molekula (reaktanata, prijelaznih stanja, međuprodukata i produkata) može se predvidjeti koji će se kemijski procesi odvijati i s kojom vjerojatnošću. S obzirom da termodinamika dobro definira entropiju i slobodnu energiju, računalna kemija oslanja se na termodinamičke opise stanja kemijskog sustava. Za ubrzavanje izračuna uvedene su atomske jedinice te su na taj način pojednostavljene kompleksne matematičke jednadžbe.

Kvantna mehanika predstavlja temelj za opisivanje i utvrđivanje točne elektronske strukture molekula. Zasniva se na osnovnim zakonima fizike ili njihovim aproksimacijama kao što su Schrödingerova jednadžba, varijacijski teorem, Born-Oppenheimerova aproksimacija i sl. Osnovni koncept kvantne mehanike, koja se koristi za opisivanje subatomske strukture, razvijen je zahvaljujući dvojici znanstvenika, Erwinu Schrödingeru i Werneru Heisenbergu. Sva svojstva izvedena iz energije mogu se izračunati rješavanjem Schrödingerove jednadžbe. Budući da se ona egzaktno može riješiti samo za jednoelektronske sustave, za detaljniji uvid u mehanička svojstva i strukturu molekula potrebno je uzeti u obzir dodatne parametre.

Ab initio ("od početka") metode zasnovane na rješavanju vremenski neovisne Schrödingerove jednadžbe su Hartree-Fock (HF) metoda, Møller-Plesset (MP) skupina metoda i skupina metoda konfiguracijske interakcije (CI). Spomenuti pristupi ne koriste eksperimentalne podatke u svojim izračunima, oslanjaju se isključivo na zakone kvantne mehanike i koriste osnovne fizikalne konstante (Planckova konstanta, brzina svjetlosti, masa,

naboj). Hartree-Fock metoda rastavlja višeelektronsku Schrödingerovu jednadžbu na jednostavnije jednelektronske jednadžbe. One se potom rješavaju kako bi se dobila valna funkcija jednog elektrona. Metoda je ograničena jer u računu, umjesto pojedinačnih međusobnih odbijanja elektrona, uzima u obzir prosječno odbijanje svih elektrona istovrsnog naboja. Na temelju udaljenosti elektrona i jezgre odnosno njihovog privlačenja, određuje se vjerojatnost pronalaska elektrona na nekom položaju u prostoru. Međuelektronska odbijanja procjenjuju se kao interakcija svakog pojedinog elektrona i prosječnog naboja koji čine svi ostali elektroni u sustavu. To znači da se ne uzima u obzir međusobna korelacija elektrona. Upravo iz tog razloga veliki broj metoda započinje HF izračunom nakon čega slijede određene korekcije jer je, zbog točnijih predviđanja molekulske strukture i energije, važno uračunati i koreliranje elektrona. Za to se koriste post Hartree-Fock metode (Møller-Plesset skupina metoda i skupina metoda konfiguracijske interakcije) [89]. *Ab initio* pristup za kvantno-kemijski opis višeelektronskih sustava računalno je zahtjevan, pa su razvijene metode zasnovane na teoriji funkcionala gustoće koje su manje zahtjevne i omogućavaju približno jednako točne karakterizacije proučavanih sustava [91].

2.7.1. Teorija funkcionala (elektronske) gustoće

Središnja veličina u teoriji funkcionala (elektronske) gustoće (eng. *Density Functional Theory*, DFT) je elektronska gustoća. Navedena teorija temelji se na pretpostavci da je za određivanje energije molekule, umjesto računanja valnih funkcija, dovoljna elektronska gustoća. Glavna prednost DFT-a (u odnosu na metode temeljene na valnoj funkciji) je to što je elektronska gustoća funkcija samo triju prostornih varijabli. Valna funkcija ovisi o položaju svih elektrona u sustavu te je zato puno zahtjevnija u izračunu. Elektronska gustoća manje je apstraktan pojam od valne funkcije elektrona jer ju je moguće eksperimentalno vidjeti (npr. pretražnim tunelirajućim mikroskopom, STM).

Po svojoj preciznosti i točnosti, DFT metode mogu se usporediti s *ab initio* metodama [92]. Temelje se na Kohn-Sham teoriji prema kojoj energija osnovnog stanja kemijskog sustava izravno ovisi o elektronskoj gustoći u molekulskom sustavu. U usporedbi s HF metodama, DFT metode uključuju efekt elektronske korelacije. Dakle, one uzimaju u obzir činjenicu da elektroni u molekulskom sustavu reagiraju na kretanje drugih elektrona pri čemu omogućavaju ravnotežu između privlačnih i odbojnih sila unutar molekule [91].

Godine 1927. Thomas i Fermi razvili su prvu teoriju funkcionala gustoće, a svoj izvod zasnivali su na modelu homogenog elektronskog plina. Na temelju provedenih istraživanja zaključili su da je energiju osnovnog stanja elektronskog plina moguće odrediti poznajući samo njegovu elektronsku gustoću (uz određena ograničenja i aproksimacije). U početku se Thomas-Femijev model nije često primjenjivao u praksi, ali danas predstavlja osnovu za teoriju funkcionala gustoće. Za razliku od valne funkcije koja predstavlja matematički konstrukt, DFT pristup temelji se na stvarnoj elektronskoj gustoći odnosno svojstvu koje postoji u molekulama.

Najpoznatiji i najčešće korišten funkcional B3LYP (eng. *Becke Three Parameter Hybrid Functionals*). Sastoji se od Becke funkcionala izmjene (B), korekcijskog funkcionala (LYP) kojeg su razvili Lee, Yang i Paar te određenog udjela HF funkcionala u elektronskoj izmjeni. Spomenuti funkcional je, stoga, kombinacija triju parametara. Osim B3LYP, često se koriste i sljedeći funkcionali: BP86, PW91, PBE1PBE, M06-2X, wB97XD, OLYP i BMK. DFT metoda postala je najčešće korištena kvantno-kemijska metoda upravo zbog svoje popularnosti, prednosti u brzini nad *ab initio* metodama i usporedive preciznosti s naprednim *ab initio* metodama [92] [93].

2.7.2. Opis otapala - model polarizabilnog kontinuuma

Kada se proučavaju reakcije koje se odvijaju u otopini, u proračun se mora uključiti i utjecaj otapala na elektronsku strukturu molekula koje sudjeluju u reakciji. Relativno jednostavan model koji se primjenjuje je model polarizabilnog kontinuuma (PCM). U tom je modelu otapalo modelirano kao dielektrični, kontinuirani medij u kojemu je otopljena tvar polarizirana. Ujedno je i on sam polarizabilan te uslijed promjena u elektronskoj strukturi otopljenih molekula dinamički usklađuje svoj odziv. Reakcijsko polje otapala kao homogen polarizabilan kontinuum ima svojstva sadržana u skalarnoj veličini dielektrične konstante (ϵ) koja se još naziva i relativna permitivnost. Uz aproksimaciju da su orijentacija i raspodjela molekula otapala oko otopljenih tvari konstantno u ravnoteži s njihovom geometrijom i elektronskom gustoćom, u obzir se uzima samo statički iznos dielektrične konstante. Model pretpostavlja da je molekula smještena u šupljinu unutar homogenog, kontinuiranog medija otapala pri čemu je šupljina ispunjena vakuumom. Unutar šupljine ϵ iznosi 1 u vakuumu, a izvan je jednak dielektričnoj konstanti otapala.

Problem PCM-a je to što su dva otapala istih ε opisana na identičan način, neovisno o tome što postoje razlike fizikalnih/kemijskih svojstava poput viskoznosti, polarnosti ili sposobnosti stvaranja vodikovih veza. Ipak, podešavanjem određenih faktora u izračunu (prvenstveno svojstava šupljine), u većini slučajeva dobiveni su valjani rezultati za slobodne energije solvatacije. Postoje i napredniji modeli koji su prošireni eksplicitnim molekulama otapala. Takvi modeli daju znatno bolje rezultate, ali povećava se kompleksnost danog sustava [93].

2.7.3. Optimizacija geometrije molekula

Geometrijska optimizacija definira se kao iterativni proces izračunavanja strukturnih parametara molekula u određenom koordinatnom sustavu, koji opisuje položaj jezgara. Metoda kvantne kemije omogućuje optimizaciju predviđene strukture molekule do oblika s najnižom energijom, odnosno do termodinamički najstabilnijeg oblika. Energijski najpovoljnije konformacije određene su na M06-2X/6-31+G(d) razini teorije. Drugim riječima, korišten je Truhlarov funkcional M06-2X [94] uz Popleov skup osnovnih funkcija 6-31G(d) za matematički opis molekulskih orbitala. Izračuni su provedeni u programskom paketu Gaussian 16 [95].

Pri malim strukturnim promjenama dolazi do promjene u energiji molekule, a povezanost tih dviju promjena prikazana je plohom potencijalne energije (eng. *Potential Energy Surface*, PES). Točke minimuma nazivaju se jame potencijala i odgovaraju strukturama s najnižom energijom. S druge strane, točke maksimuma odgovaraju prijelaznim stanjima koji su smješteni između dva minimuma na plohi. Proces geometrijske optimizacije započinje početnim razmještajem atoma u molekuli u koordinatnom sustavu. Najprije se izračunava energija i gradijent energije u toj točki, a zatim se, s obzirom na promjenu sile i energije u različitim smjerovima, određuje promjena geometrije za sljedeći korak optimizacije u smjeru točke minimuma PES-a [89] [93]. U trenutku kada određena geometrija molekule u dva uzastopna koraka rezultira jednakom vrijednošću energije, ostvarena je samousklađenost (eng. *self-consistency*). Upravo se ta geometrija molekule smatra rješenjem za korištenu razinu teorije.

Molekule koje sadrže veći broj jednostrukih i dvostrukih veza u strukturi imaju mogućnost zauzimanja većeg broja konformacija, od kojih se svaka razlikuje u termodinamičkoj stabilnosti. Različite početne konformacije određene molekule završavaju u vlastitim

minimumima energije pa je svaki konformer potrebno zasebno optimizirati. Na taj se način dobiva mogućnost procjene najstabilnijeg konformera, tj. konformera koji je najzastupljeniji u realnom sustavu.

2.7.4. Molekulsko pristajanje

Molekulsko pristajanje (eng. *Molecular docking*) znanstvena je disciplina koja opisuje interakcije dviju ili više molekula [96]. Njegova je primjena započela ranih 80-ih godina 20. stoljeća kao metoda za računalno modeliranje lijekova. Glavni je cilj molekulskog pristajanja predvidjeti interakcije između makromolekule (proteina) i ciljane male molekule (liganda), tj. predvidjeti vrstu i afinitet vezanja. U posljednjem se desetljeću javlja sve veći interes za predviđanje interakcija protein-protein, nukleinska kiselina-ligand i nukleinska kiselina-protein-ligand [97]. Od spomenutih metoda najjednostavnija je metoda molekulskog pristajanja između proteina i liganda, koja je korištena u ovom radu.

Molekulsko pristajanje izvodi se postavljanjem rigidnih molekula ili njihovih fragmenata u aktivno mjesto proteina, za što se koriste različiti pristupi, poput pretraživanja klika, geometrijskog raspršivanja ili grupiranja poza. Samo izvođenje ovisi o algoritmu pretraživanja [98]. Molekulsko pristajanje uključuje dva osnovna koraka. U prvom se koraku predviđa konformacija liganda te njegov položaj i orijentacija unutar aktivnog mjesta proteina, a u drugom se koraku funkcijom bodovanja procjenjuje kvaliteta orijentacije liganda [97].

Za provođenje metode molekulskog pristajanja potrebno je poznavati strukturu proteina, tj. molekule koje se nalaze u aktivnom mjestu. Strukturu je moguće odrediti raznim eksperimentalnim tehnikama, poput kristalografije rendgenskim zrakama ili nuklearne magnetske rezonancije. Također, za određivanje kvalitete strukture proteina vrlo je važno poznavati Debye-Wallerov faktor ili *B*-faktor, koji opisuje slabljenje raspršenja rendgenskih zraka ili raspršenje koherentnog neutrona uslijed toplinskog gibanja. *B*-faktor pruža uvid u vibracije različitih dijelova proteinske strukture. Mali iznos *B*-faktora ukazuje na kompaktnu i uređeno složenu proteinsku strukturu, a veliki iznos ukazuje na fleksibilnu strukturu proteina. Mjesta u proteinskoj strukturi s malim iznosom *B*-faktora predstavljaju optimalna mjesta za smještanje liganda [90].

Postoji nekoliko vrsta molekuskog pristajanja između proteina i liganda, a to su pristajanje rigidnih struktura, gdje se i protein i ligand tretiraju kao rigidne molekule, slijedi fleksibilno pristajanje liganda, gdje se protein drži rigidnim, a ligand se tretira kao fleksibilan te fleksibilno pristajanje kao treća vrsta, gdje se i protein i ligand tretiraju kao fleksibilne molekule. Najčešće se koristi fleksibilno pristajanje liganda [99]. Za određivanje preciznosti molekuskog pristajanja između proteina i liganda koristi se funkcija bodovanja (ocjenjivanja), čiji su glavni parametri brzina i preciznost pristajanja. Još uvijek ne postoji idealna funkcija bodovanja, ali ono što se zahtjeva od takve funkcije je da istovremeno bude računalno efikasna i dosljedna [100].

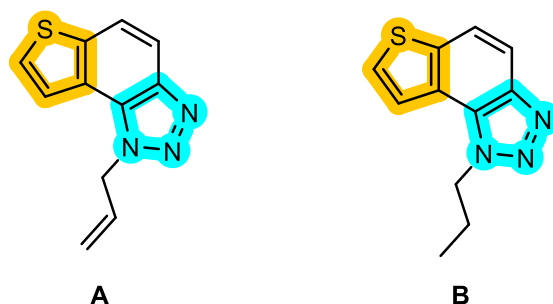
Veliki izazov kod metode molekuskog pristajanja predstavljaju molekule vode u proteinima, koje igraju ključnu ulogu u interakcijama između proteina i liganda. Ukoliko se tijekom provođenja molekuskog pristajanja zanemare reakcije posredovane vodom, može doći do odstupanja od predviđenih energija interakcije određene konformacije liganda. Pored toga, aktivno mjesto proteina često sadrži polarne aminokiselinske ogranke, s kojima se mogu vezati molekule vode. Stoga, navedene interakcije onemogućavaju vezanje određenog liganda u aktivno mjesto proteina. Također, znanstvenicima često stvaraju problem razna tautomerna i protomerna stanja koja mogu zauzeti molekule liganda [101]. Ipak, najveći problem predstavljaju proteini s fleksibilnom strukturom, koji imaju mogućnost zauzimanja nekoliko različitih konformacija, ovisno o ligandu [102].

Zaključno, poznavanje strukture proteina i njegovih interakcija s različitim ligandima na molekulskoj razini omogućuje primjenu metode molekuskog pristajanja u racionalnom dizajniranju lijekova [103]. Osim toga, može poslužiti kao strategija za pronalazak potencijalnih meta u svrhu identifikacije različitih bolesti [104].

3. REZULTATI I RASPRAVA

Uvod

U našem laboratoriju Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu sintetizirani su brojni triazolni derivati, tienobenzo-triazoli, koji su pokazali protuupalno djelovanje i inhibiciju kolinesteraza. Višegodišnja istraživanja dovela su do zaključka da prisutnost tiofenske jezgre doprinosi boljoj inhibiciji kolinesteraza u odnosu na metiliranu tiofensku jezgru. Derivati koji su se istaknuli prikazani su na slici 21. Derivat **A** pokazao je inhibicijsko djelovanje prema obje kolinesteraze, s većim afinitetom prema BChE (IC_{50} 3,8 μ M). U usporedbi s IC_{50} vrijednošću standarda galantamina (IC_{50} 7,9 μ M), derivat **A** ističe se boljom inhibicijom prema BChE. S druge strane, za derivat **B** karakteristična je isključivo inhibicija prema BChE (IC_{50} 48,8 μ M).

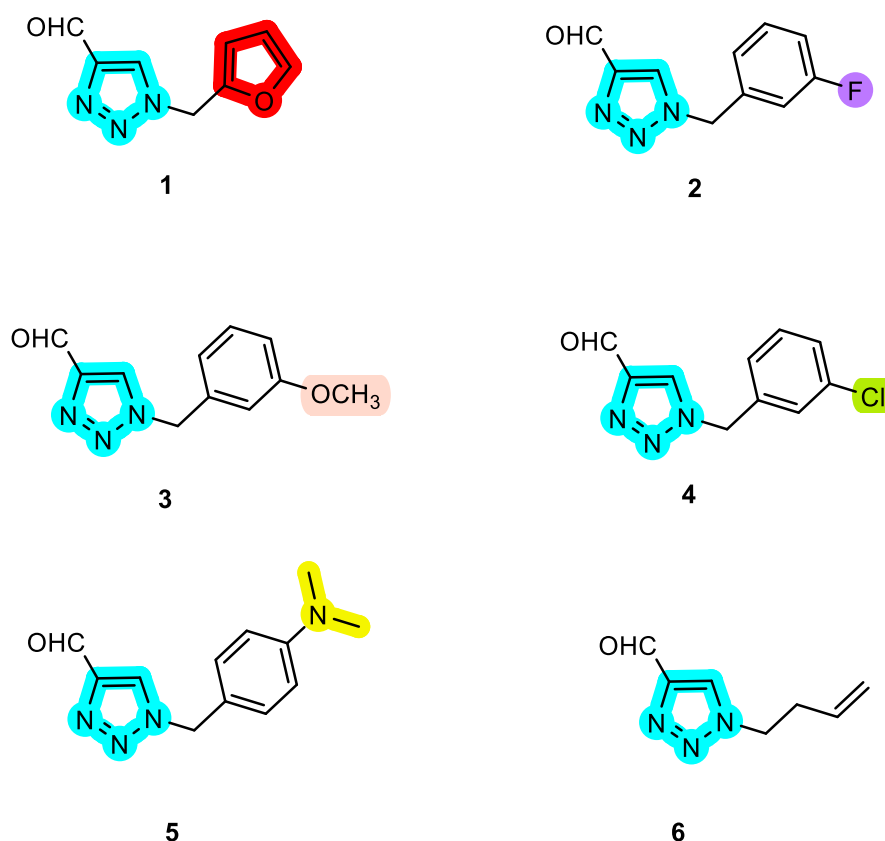


Slika 21. Sintetizirani triazolni derivati (**A** i **B**) s istaknutim inhibicijskim djelovanjem.

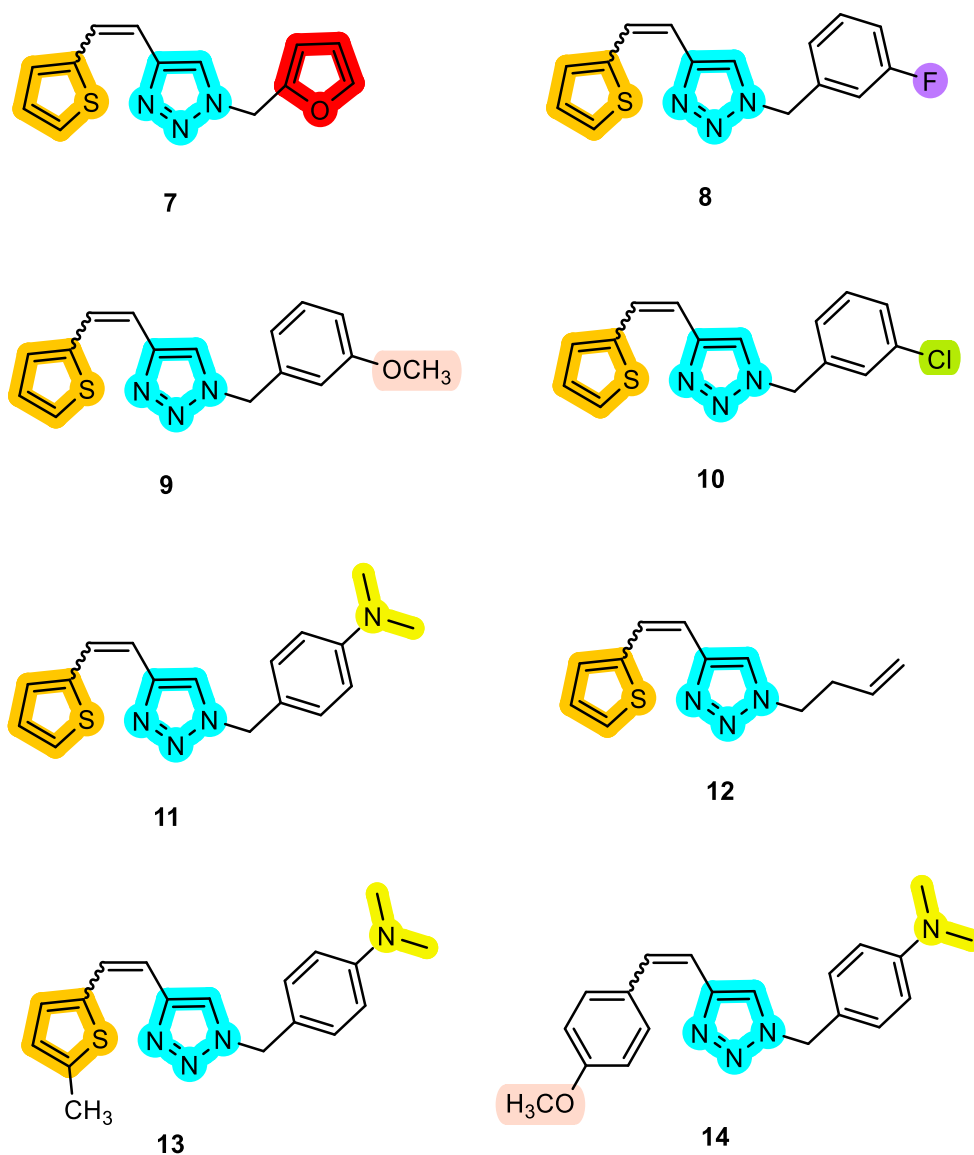
Nastavno na to, u ovome znanstvenom radu cilj je bio sintetizirati nove tienobenzo/naftotriazole te utvrditi pokazuju li oni bolju inhibicijsku aktivnost od prijašnjih. Također, za one ciljane produkte koji su pokazali potencijal inhibicije enzima kolinesteraza predviđene su računalne analize i ispitivanja molekuskog pristajanja. Dodatno, ispitivanja mutagenog potencijala sintetiziranih tienobenzo/naftotriazola također su uzeta u obzir kod evaluacije ukupnih rezultata rada.

3.1. Pregled sintetiziranih spojeva

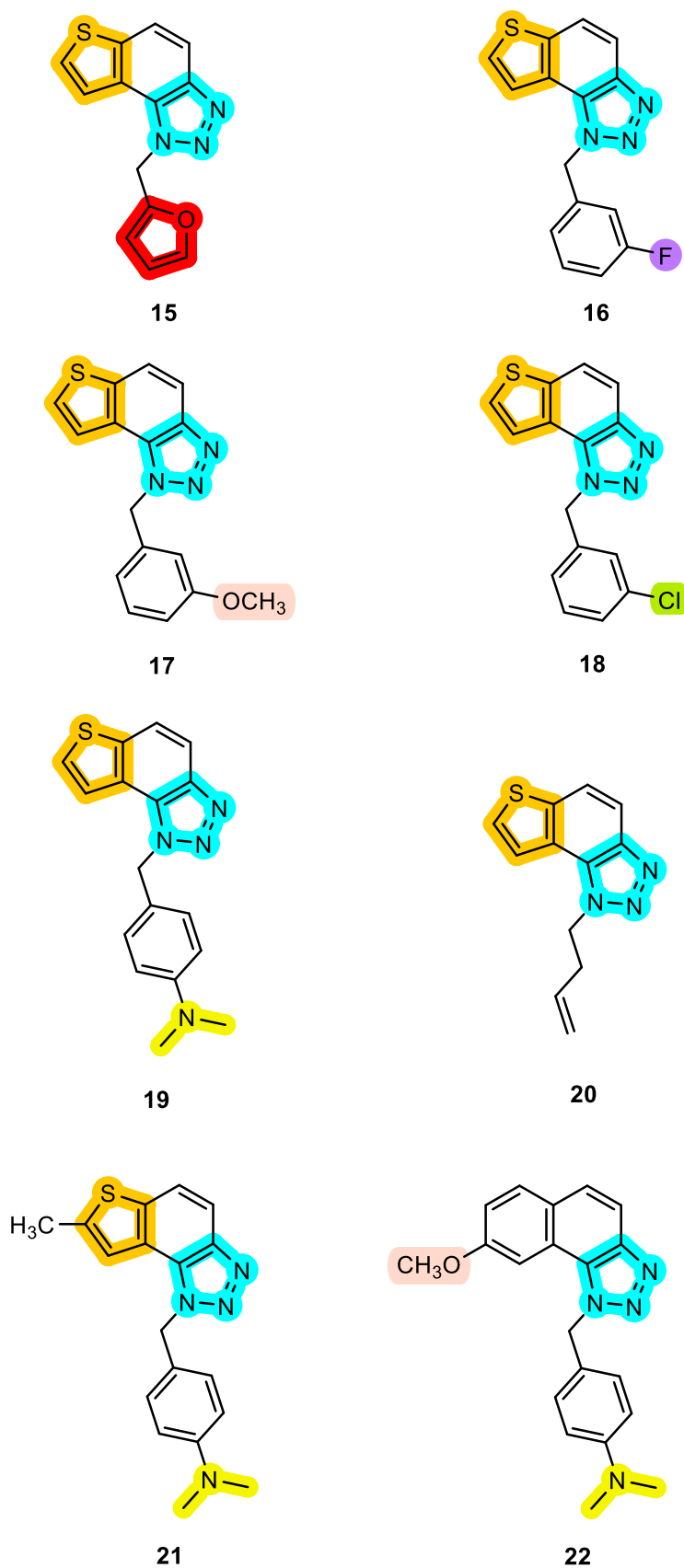
Ciljani produkti ovog rada su 1,2,3-triazolostilbeni koji su sintetizirani Wittigovom reakcijom trifenilfosfonijeve soli s različitim 1-supstituiranim 1,2,3-triazol-4-karbaldehidima **1-6** (Slika 22). Navedeni spojevi dobiveni su kao smjese izomera. Općenito, u Wittigovoj reakciji aldehidi ili ketoni reagiraju s fosforovim ilidima dajući alkene. Prije same sinteze 1,2,3-triazolostilbena **7-14** (Slika 23), bilo je potrebno pripremiti odgovarajuće triazolne aldehide **1-6**. Potrebni aldehidi dobiveni su reakcijom 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (priređenog ranije u našem laboratoriju) i odgovarajućeg amina. S obzirom da im struktura predstavlja konjugirani heterostilbenski skelet, sintetizirani 1,2,3-triazolostilbeni **7-14** podvrgnuti su fotokemijskim reakcijama. Osvjetljavanjem smjese izomera ovih spojeva došlo je do ciklizacije odnosno zatvaranja šesteročlanog prstena. Tako dobiveni spojevi su tienobenzo/naftotriazoli **15-22** (Slika 24) i oni su ti koji pokazuju potencijalnu inhibiciju enzima kolinesteraza i potencijalno protuupalno djelovanje.



Slika 22. Strukture triazolnih aldehida **1-6** sintetiziranih u ovom radu.



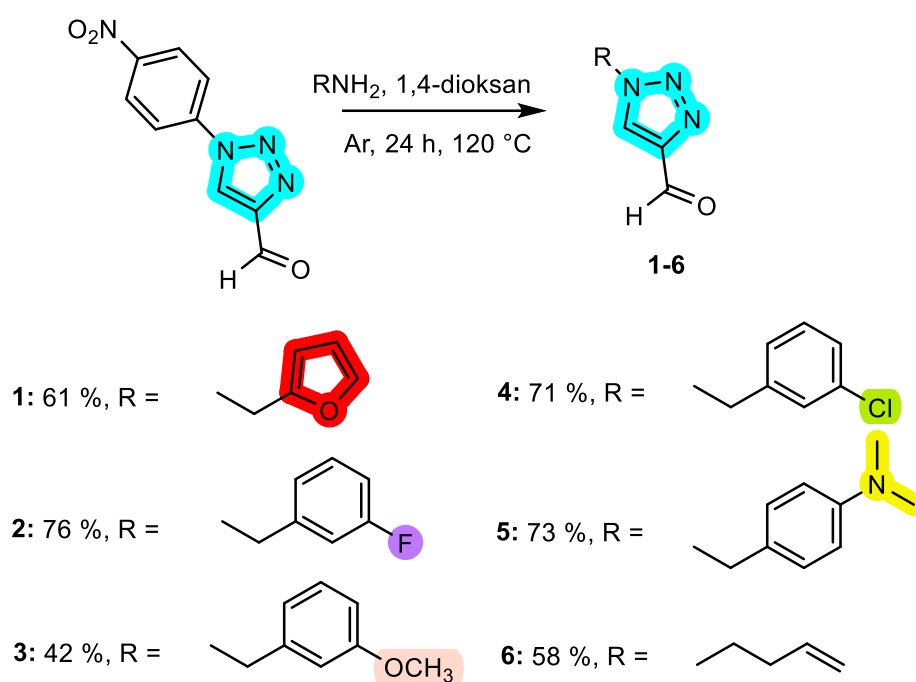
Slika 23. Strukture triazolostilbena 7-14 sintetiziranih u ovom radu.



Slika 24. Strukture tienobenzo/naftotriazola 15-22 sintetiziranih u ovom radu.

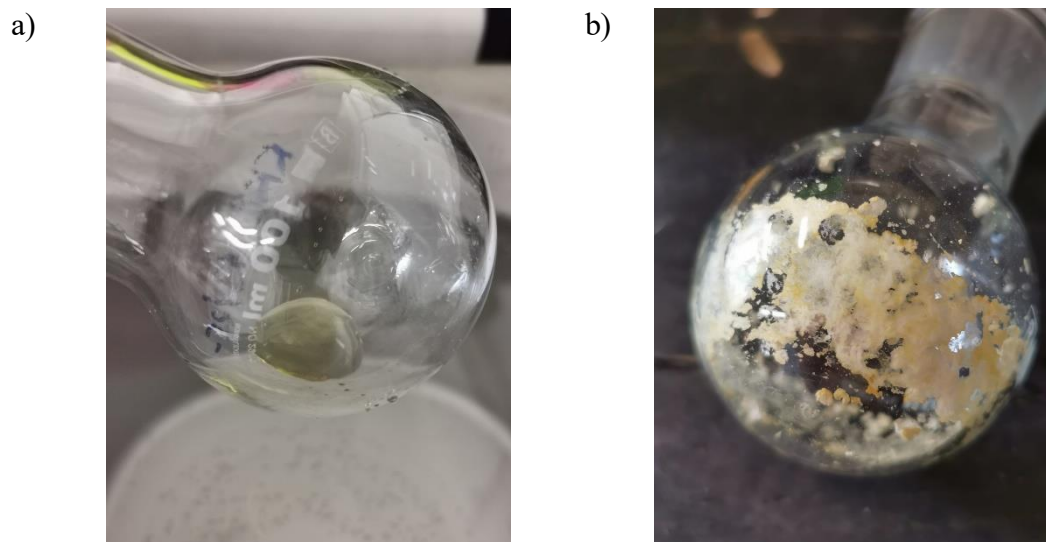
3.1.1. Sinteza i karakterizacija triazolnih aldehida 1-6

Triazolni aldehidi **1-6** sintetizirani su reakcijom 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida i odgovarajućeg amina (Shema 1). Dobiveni produkti pročišćeni su kolonskom kromatografijom s određenim sustavom otapala. Kao nepokretna faza korišten je silika-gel. Reakcijom nastaje i međuprodukt *p*-nitroanilin koji prvi eluira. Isti sustav otapala korišten je i za tankoslojnu kromatografiju.



Shema 1. Sinteza triazolnih aldehida **1-6**.

Posebno se zanimljivim pokazao spoj **5** (Slika 25). Naime, tijekom uklanjanja otapala korištenih u kolonskoj kromatografiji, pomoću rotacijskog vakuumskog uparivača uočen je karakterističan izgled samog produkta. Na početku postupka uparavanja spoj **5** bio je žuto ulje, a postepenim uklanjanjem otapala dolazi do promjene izgleda produkta, točnije produkt postaje blijedožuti prašak koji se istaložio na stijenku okrugle tikvice.

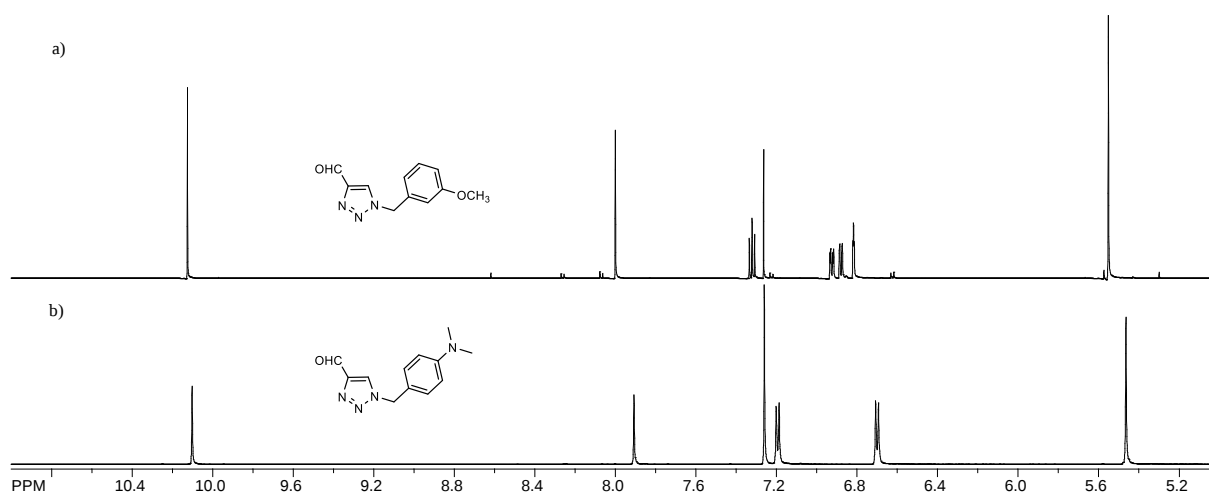


Slika 25. Spoj 5 u formi a) žutog ulja i b) blijedožutog praška.

Tablica 1. Dobivene čistoće sintetiziranih aldehida 1-6 prema ^1H NMR analizi.

OZNAKA TRIAZOLNOG ALDEHIDA		ČISTOĆA
1		čisti aldehyd
2	10 % <i>p</i> -nitroanilina i malo početnog nitroaldehida	
3	aldehid s tragovima <i>p</i> -nitroanilina	
4	10 % početnog nitroaldehida i malo <i>p</i> -nitroanilina	
5		čisti aldehyd
6	aldehid s tragovima <i>p</i> -nitroanilina i amina	

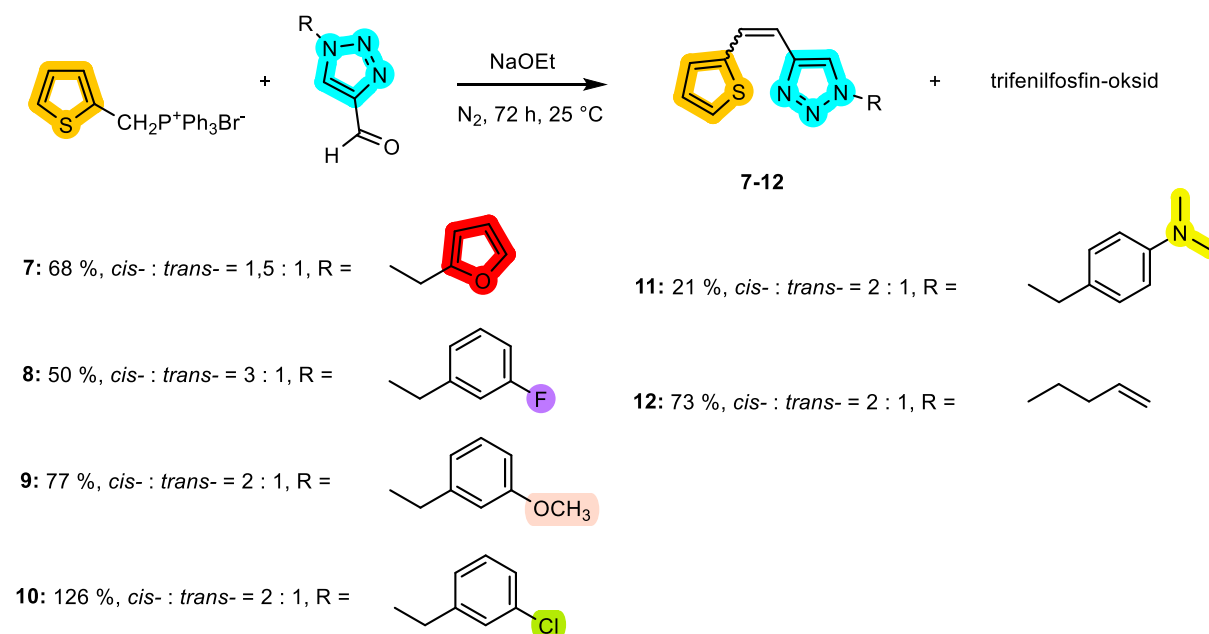
Na slici 26 prikazani su ^1H NMR spektri spojeva **3** (Slika 26 a) i **5** (Slika 26 b) u području kemijskog pomaka 5,2 – 10,6 ppm. Najodsjenjeniji signali karakteristični su singleti aldehidnih protona intenziteta 1H i nalaze se na približno jednakim kemijskim pomacima. U aromatskom području spoj **3** sadrži dva dubleta, triplet i singlet (svi intenziteta 1H), što upućuje na *meta*-supstituciju benzenskog prstena. S druge strane, u spektru spoja **5** uočavaju se signali *para*-supstitucije benzenskog prstena na 6,70 i 7,19 ppm (dva dubleta intenziteta po 2H).



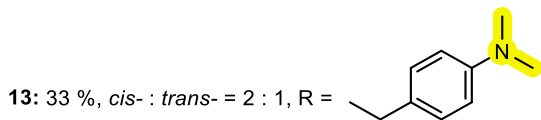
Slika 26. Dijelovi ^1H NMR spektara spojeva **3** (a) i **5** (b).

3.1.2. Sinteza i karakterizacija triazolostilbena 7-14 dobivenih Wittigovom reakcijom

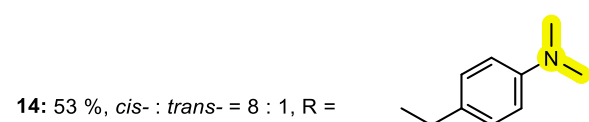
Triazolostilbeni **7-14** sintetizirani su Wittigovom reakcijom prethodno opisanih triazolnih aldehida **1-6** i odgovarajuće trifenilfosfonijeve soli (Sheme 2-4, Slika 27). U svakoj reakciji nastaju dva konfiguracijska izomera različitih spektroskopskih karakteristika. Dobivena izolirana iskorištenja nalaze se u rasponu 21-126 %.



Shema 2. Sinteza triazolostilbena **7-12** Wittigovom reakcijom.



Shema 3. Sinteza triazolostilbena **13** Wittigovom reakcijom.



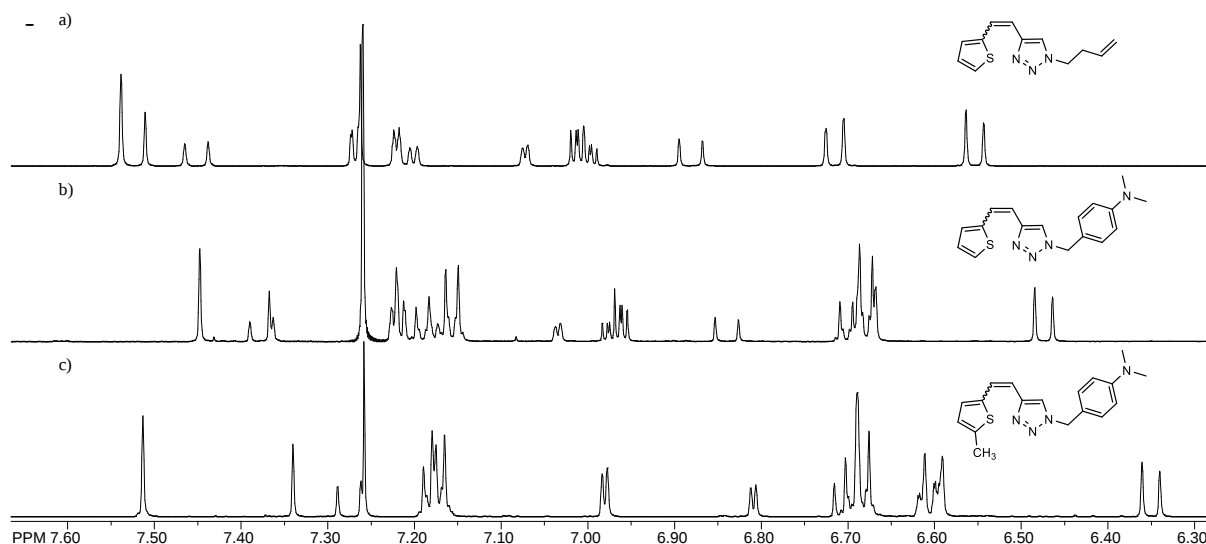
Shema 4. Sinteza triazolostilbena **14** Wittigovom reakcijom.



Slika 27. Aparatura za Wittigove reakcije.

Dobiveni produkti pročišćeni su postupkom ekstrakcije i kolonske kromatografije. Kao pokretna faza korišten je sustav otapala petroleter/eter promjenjiva omjera, dok nepokretnu fazu predstavlja silika-gel. U nastaloj smjesi izomera *cis*-izomer eluira prvi, a *trans*-izomer putuje gotovo jednakom brzinom kao početni aldehid. Zaostali *p*-nitroanilin uspješno je odvojen. Isti sustav otapala korišten je i kod tankoslojne kromatografije.

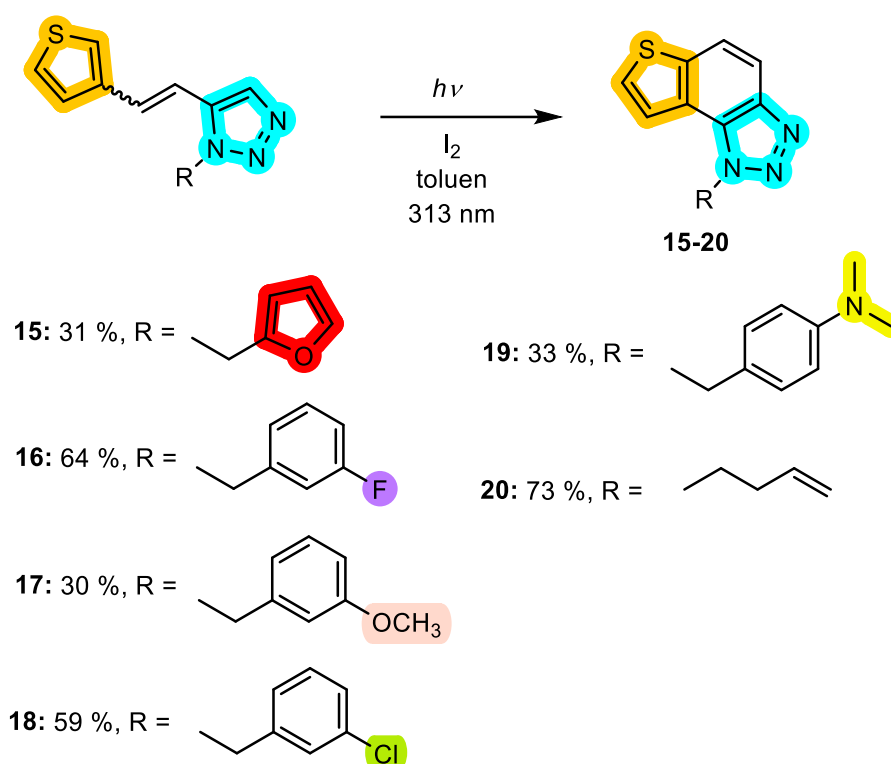
Na slici 28 prikazani su ^1H NMR spektri spojeva **12** (Slika 28 a), **11** (Slika 28 b) i **13** (Slika 28 c) u području kemijskog pomaka 6,3 – 7,6 ppm. U sva tri spektra uočavaju se signali za etenske protone *cis*- i *trans*-izomera, što znači da se radi o izomernoj smjesi. Karakteristični signali za etenske protone dubleti su intenziteta po 1H. Spektar spoja **12** sadrži četiri karakteristična dubleta intenziteta po 1H. Dva dubleta u području 6,5 – 6,8 ppm odgovaraju *cis*-konfiguraciji i njihova konstanta sprege iznosi 12,4 Hz. Dva dubleta *trans*-konfiguracije nalaze se na većim kemijskim pomacima i imaju veće vrijednosti konstanti sprege ($J = 16,2$ Hz), ali su međusobno vrlo udaljeni. Razlog tomu zasigurno proizlazi iz steričkih smetnji a time i veće razlike u kemijskoj okolini između etenskog protona i butirilnog supstituenta na triazolnoj jezgri. Spektri spojeva **11** i **13** također sadrže dublete *cis*-izomera na manjem kemijskom pomaku u odnosu na dublete *trans*-izomera sa svojstvenim vrijednostima konstanti sprege.



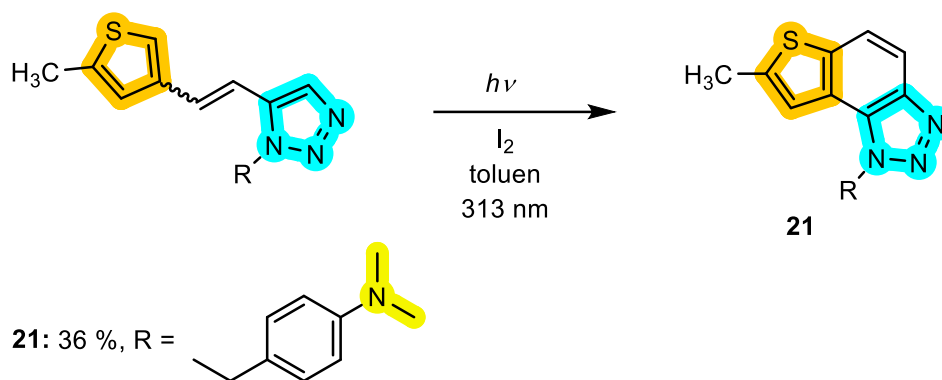
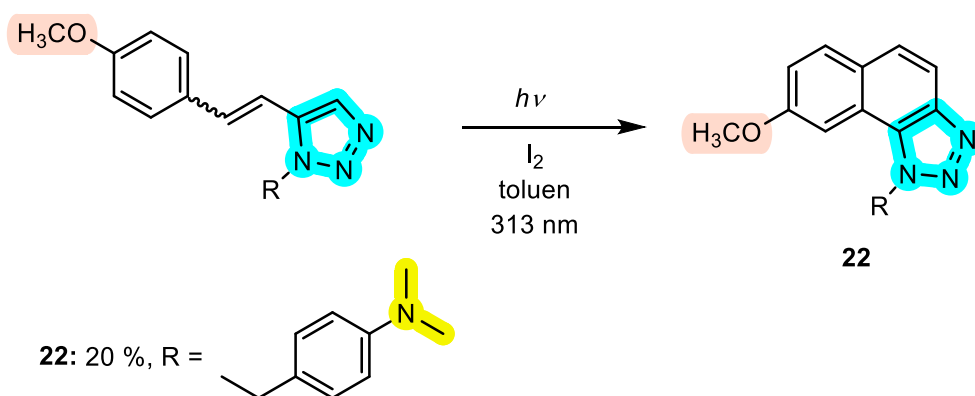
Slika 28. Dijelovi ^1H NMR spektara spojeva **12** (a), **11** (b) i **13** (c).

3.1.3. Fotokemijska sinteza i karakterizacija tienobenzo/naftotriazola 15-22

Tienobenzo/naftotriazoli **15-22** sintetizirani su fotokemijskim reakcijama triazolostilbena **7-14** (Sheme 5-7). Odgovarajući triazolostilbeni **7-14** otopljeni su u toluenu te preneseni u kvarcnu kivetu. Smjesi je dodan jod koji služi kao oksidacijsko sredstvo. Reakcijske smjese su se zatim osvjetljavale svjetlošću valne duljine od 313 nm. Tijek reakcije pratio se pomoću tankoslojne kromatografije u sustavu otapala PE/E. Dobivena izolirana iskorištenja nalaze se u rasponu 20-73 %.



Shema 5. Fotokemijska sinteza tienobenzo-triazola **15-20**.

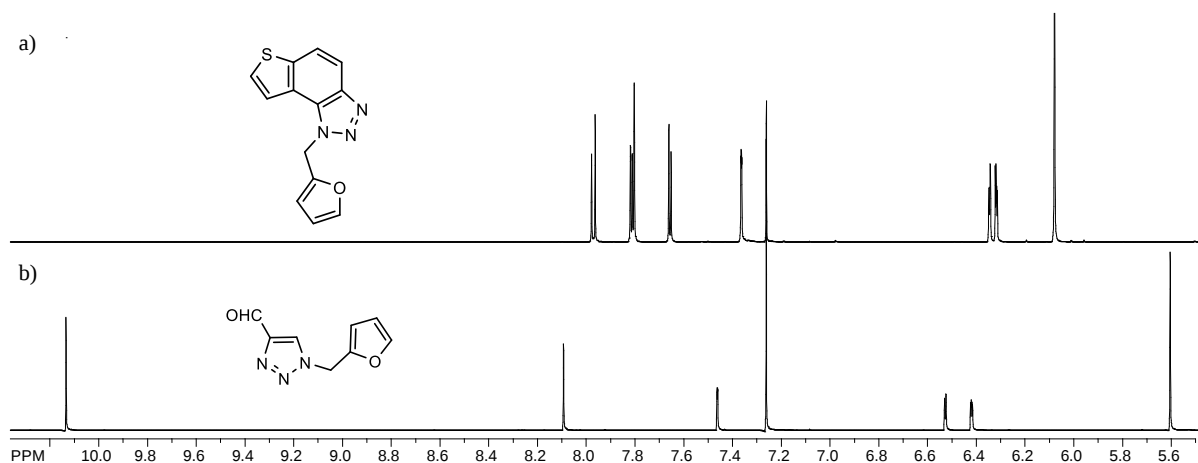
Shema 6. Fotokemijska sinteza tienobenzo-triazola **21**.Shema 7. Fotokemijska sinteza naftotriazola **22**.

Na slici 29 prikazan je fotokemijski reaktor Rayonet opremljen UV lampama koji je korišten za provođenje fotokemijskih reakcija.

Slika 29. Fotokemijski reaktor Rayonet korišten za sintezu tienobenzo/naftotriazola **15-22**.

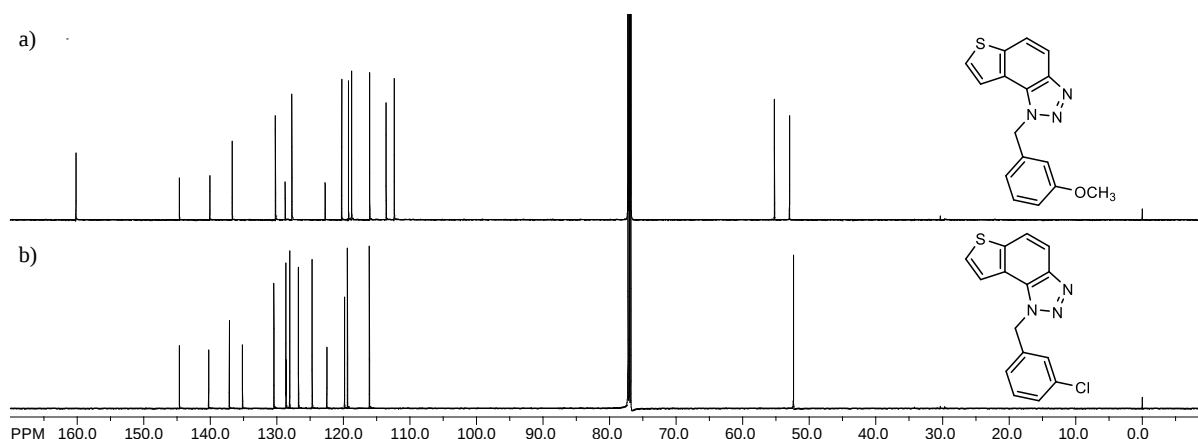
Strukture tienobenzo/naftotriazola **15-22** potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom te masenom spektrometrijom visoke rezolucije (HRMS). Neki od spektara izdvojeni su u nastavku.

Na slici 30 prikazani su ^1H NMR spektri spojeva **15** (Slika 30 a) i **1** (Slika 30 b) u području kemijskog pomaka 5,6 – 10,2 ppm. Spoj **1** polazni je aldehid za sintezu spoja **15**, pa je tako u spektru spoja **1** vidljiv signal za aldehidni proton na 10,13 ppm. Suprotno tome, spektar spoja **15** ne sadrži spomenuti signal što znači da je polazni aldehid u potpunosti izreagirao te je nastao ciljani produkt. U oba spektra jasno se uočavaju signali furanske jezgre u području 6,3 – 7,5 ppm (dublet-dubleta i dva dubleta od kojih je svaki intenziteta 1H). Konačno dobiveni naftotriazol **15** ima veći broj signala u aromatskom dijelu spektra.



Slika 30. Dijelovi ^1H NMR spektara spojeva **15** (a) i **1** (b).

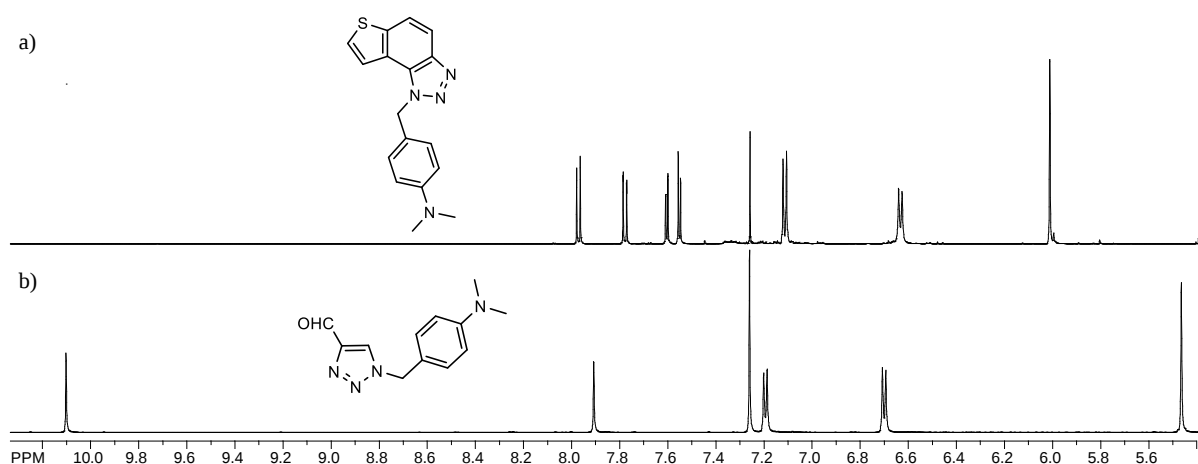
Na slici 31 usporedno su prikazani ^{13}C NMR spektri spojeva **17** (Slika 31 a) i **18** (Slika 31 b). Ukupan broj signala u spektrima odgovara strukturi spojeva.



Slika 31. ^{13}C NMR spektri spojeva **17** (a) i **18** (b).

Vidljivo je da spoj **17** ima jedan ugljikov atom više u strukturi od spoja **18**, pa tako uočavamo dodatni signal u alifatskom području spektra koji se odnosi na ugljik metoksi-skupine. Nadalje, u alifatskom području spektara oba spoja vidljiv je signal za metilenske ugljike koji su okruženi triazolnom i benzenskom jezgrom. Kod spoja **17** prisutan je signal na oko 160 ppm, a odnosi se na ugljik benzenske jezgre koji je vezan uz kisik. Preostali signali nalaze se u aromatskom području spektra.

Na slici 32 prikazani su paralelno ^1H NMR spektri spojeva **19** (Slika 32 a) i **5** (Slika 32 b) u području kemijskog pomaka 5,4 – 10,2 ppm. Spoj **5** polazni je aldehid za sintezu spoja **19**, pa je tako u spektru spoja **5** vidljiv signal za aldehidni proton na 10,10 ppm. Za razliku od toga, spektar spoja **19** ne sadrži spomenuti signal što znači da je polazni aldehid u potpunosti izreagirao te je nastao ciljani produkt. U oba spektra jasno se uočavaju signali *para*-supstitucije benzenskog prstena u području 6,6 – 7,2 ppm (dva dubleta od kojih je svaki intenziteta 2H). Konačno dobiveni tienobenzo-triazol **19** ima veći broj signala u aromatskom dijelu spektra.



Slika 32. Dijelovi ^1H NMR spektara spojeva **19** (a) i **5** (b).

3.2. Biološka aktivnost sintetiziranih tienobenzo/naftotriazola 15-22

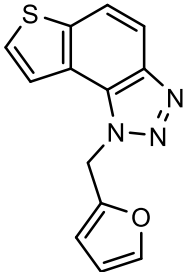
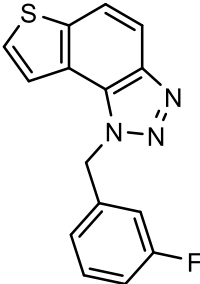
Kao što je u teorijskom dijelu spomenuto, triazolni derivati posjeduju široki spektar bioloških aktivnosti uključujući protuupalno djelovanje, inhibiciju enzima kolinesteraza, antimikrobno djelovanje, i sl. Sintetizirani tienobenzo/naftotriazoli **15-22** pripremljeni su u svrhu ispitivanja njihove potencijalne biološke aktivnosti. U ovom radu provedena su ispitivanja inhibicije enzima kolinesteraza u suradnji sa suradnicima s vanjskih ustanova s kojima postoji dugogodišnja kontinuirana suradnja. Ispitani su svi sintetizirani spojevi, a ovisno o strukturnim karakteristikama pokazali su različite biološke aktivnosti. Na odnos strukture i aktivnosti utječu vrsta heterocikla, geometrija molekula te vrsta, broj i položaj supstituenata.

3.2.1. Inhibicija enzima kolinesteraza

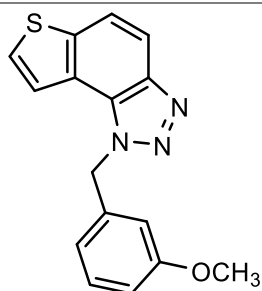
U okviru ovog rada provedena su ispitivanja inhibicije AChE i BChE s naglaskom na inhibiciji BChE zbog prijašnjih rezultata koji su pokazali da ovakvi spojevi imaju veću sklonost inhibicijskoj aktivnosti prema BChE. U tablici 2 prikazani su rezultati ispitivanja za svaki sintetizirani tienobenzo/naftotriazol **15-22**. Kao standard za usporedbu aktivnosti poslužio je

galantamin, poznati reverzibilni inhibitor (IC_{50} 7.9 μ M za BChE i 0.15 μ M za AChE). Rezultati su izraženi u obliku potrebne koncentracije spoja za postizanje inhibicije 50 % djelovanja BChE (IC_{50}). Vrlo dobra inhibicijska aktivnost prema BChE uočena je za spojeve **16**, **17**, **18** i **19**. Vrijednost IC_{50} za AChE zabilježena je jedino kod derivata **16** koji sadrži fluor u *meta*-položaju benzilnog supstituenta. Derivat **17** s metoksi-skupinom u *meta*-položaju pokazao je podjednaku inhibiciju prema BChE kao i derivat s istom skupinom u *para*-položaju što je poznato od ranije. Iz toga se može zaključiti da položaj supstituenta na aromatskom prstenu ne mijenja značajno inhibicijsku aktivnost. Isto vrijedi i za derivat **18**. Uvođenje 4-dimetilaminobenzilnog supstituenta kod derivata **19**, dovelo je do vrlo dobre inhibicije BChE. U usporedbi s derivatom **21** koji sadrži metilnu skupinu na tiofenskom prstenu, utvrđeno je da bolju aktivnost pokazuje analog bez metilne skupine.

Tablica 2. Rezultati ispitivanja inhibicijske aktivnosti sintetiziranih spojeva **15-22** prema BChE.

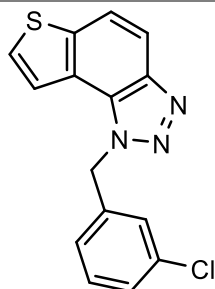
OZNAKA SPOJA	STRUKTURA SPOJA	BChE IC_{50} / μ M
15		69,5
16		37,4

17



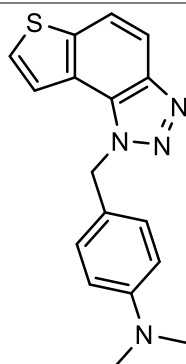
27,2

18



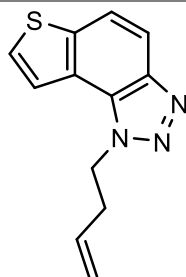
20,6

19



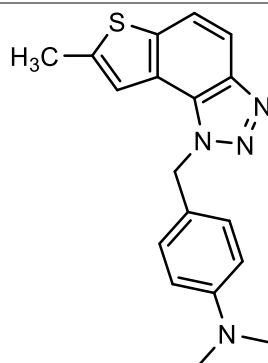
32,1

20



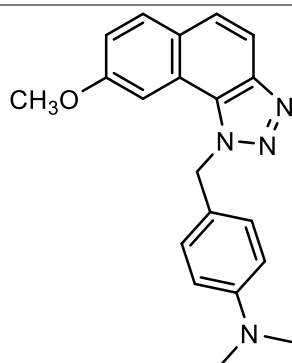
78,9

21



91,6

22

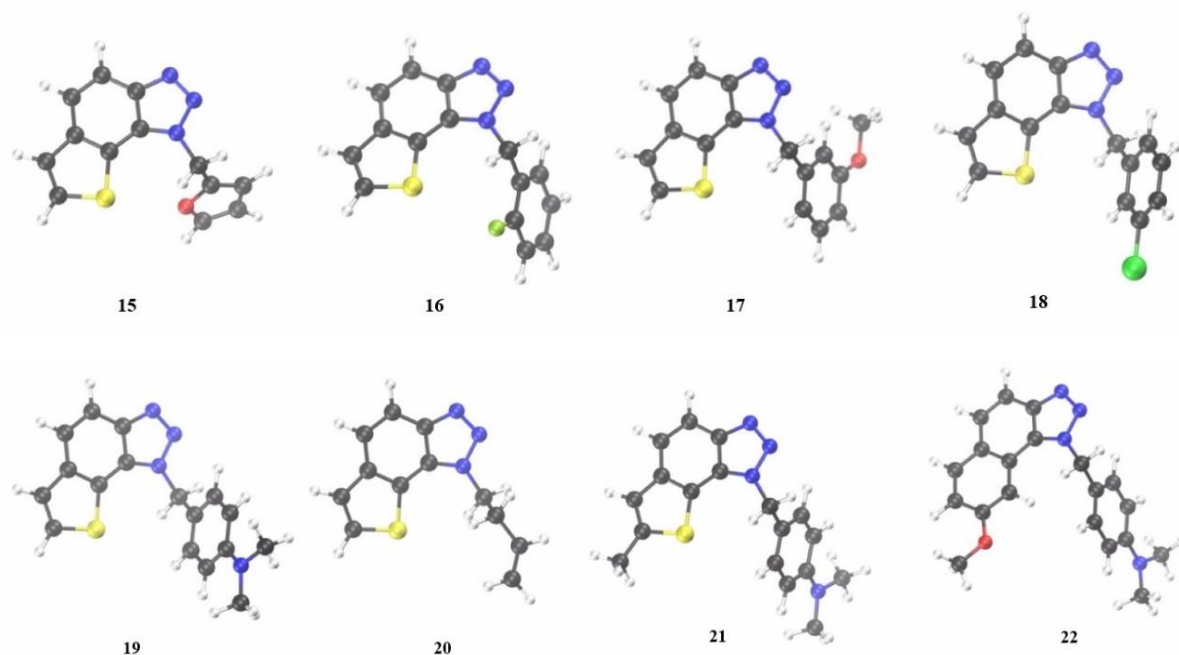


S obzirom da su pokazali najbolju inhibicijsku aktivnost prema BChE, derivati **16**, **17**, **18** i **19** proučavani su metodom molekulskog pristajanja kako bi se utvrdilo koji od navedenih spojeva najbolje pristaje u aktivno mjesto enzima BChE.

U međuvremenu su iz nenabijenih analoga pripremljeni nabijeni tienbenzo/naftotriazoli reakcijom metiliranja s metil-jodidom. Takvi spojevi pokazali su puno bolju inhibiciju prema AChE i BChE u odnosu na nenabijene analoge. Treba naglasiti da oni nisu selektivni samo prema BChE, već jako dobro inhibiraju obje kolinesteraze.

3.3. Računalni rezultati

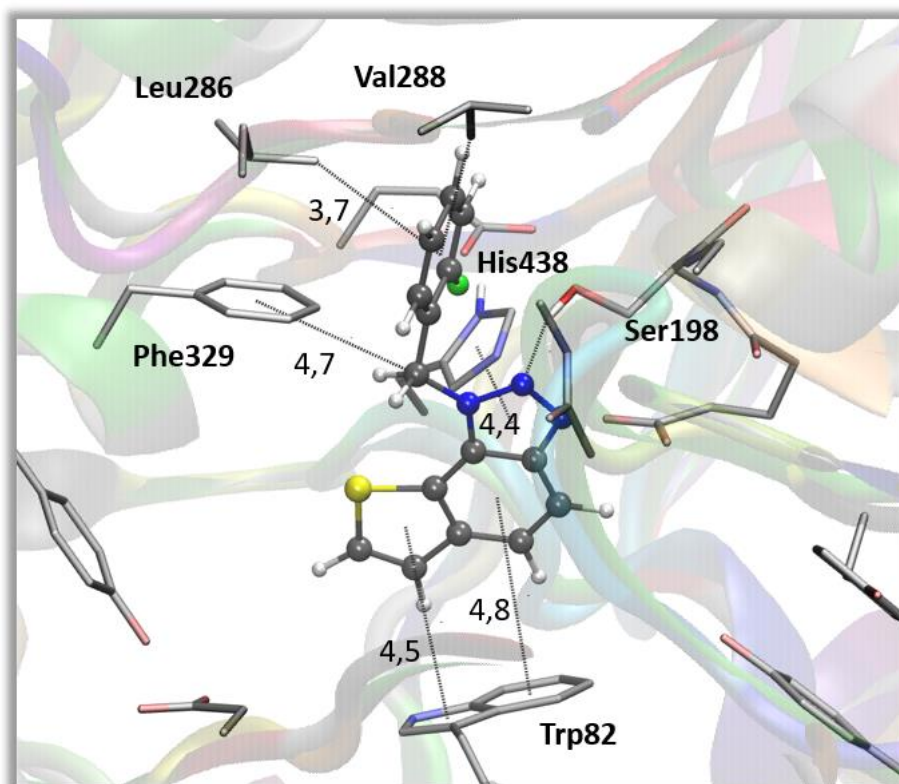
Konformacije novih tienbenzo/naftotriazola **15-22** ispitane su na razini teorije B3LYP/6-31G(d). Metodom geometrijske optimizacije dobiveni su najstabilniji konformeri izomera prikazani na slici 33.



Slika 33. Najstabilniji konformeri tienobenzo/naftotriazola **15-22**.

Molekulsko pristajanje provedeno je pomoću programskog paketa Autodock [105], a kristalnoj strukturi BChE pristupilo se iz Banke podataka o proteinima.

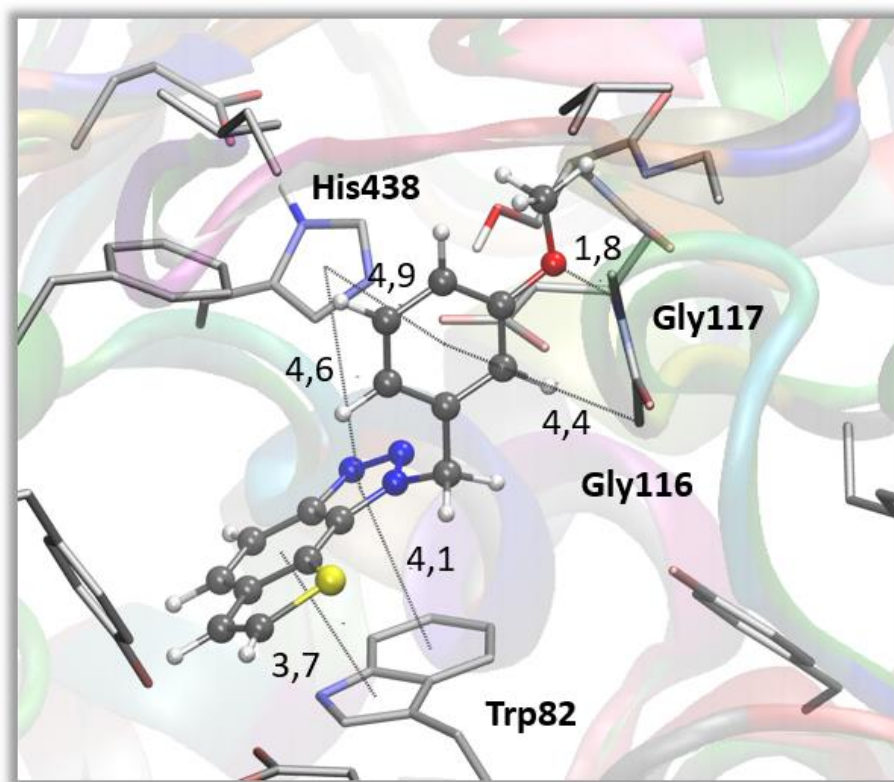
Molekula **16** kao ligand stvara stabilan nekovalentni kompleks s aktivnim mjestom BChE. Stabilizirajuća međudjelovanja između liganda i aminokiselina koje čine aktivno mjesto enzima prikazana su na slici 34. Aminokiselina triptofan (Trp82) stupa u π - π slaganje (eng. π - π *stacking*) s tiofenom (4,5 Å) i fenilom koji je dio tricikličke jezgre (4,8 Å). Također, prisutno je π - π slaganje između aminokiseline histidina (His438) i triazola (4,4 Å). Dolazi i do formiranja vodikove veze između aminokiseline serina (Ser198) i atoma dušika u triazolnom prstenu (2,0 Å). Nadalje, u strukturi kompleksa prisutno je nekoliko alkil- π interakcija. Aminokiseline valin (Val288) i leucin (Leu286) stupaju u interakciju s fenilnim prstenom koji je dio supstituenta na dušikovom atomu triazola (3,7 Å). Između CH₂ skupine supstituenta na dušikovom atomu triazola i aminokiseline fenilalanina (Phe329) prisutna je još jedna alkil- π interakcija (4,7 Å).



Slika 34. Struktura aktivnog mjesta BChE u kompleksu s molekulom 1-(3-fluorbenzil)-1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazola (**16**), dobivena metodom molekuskog pristajanja.

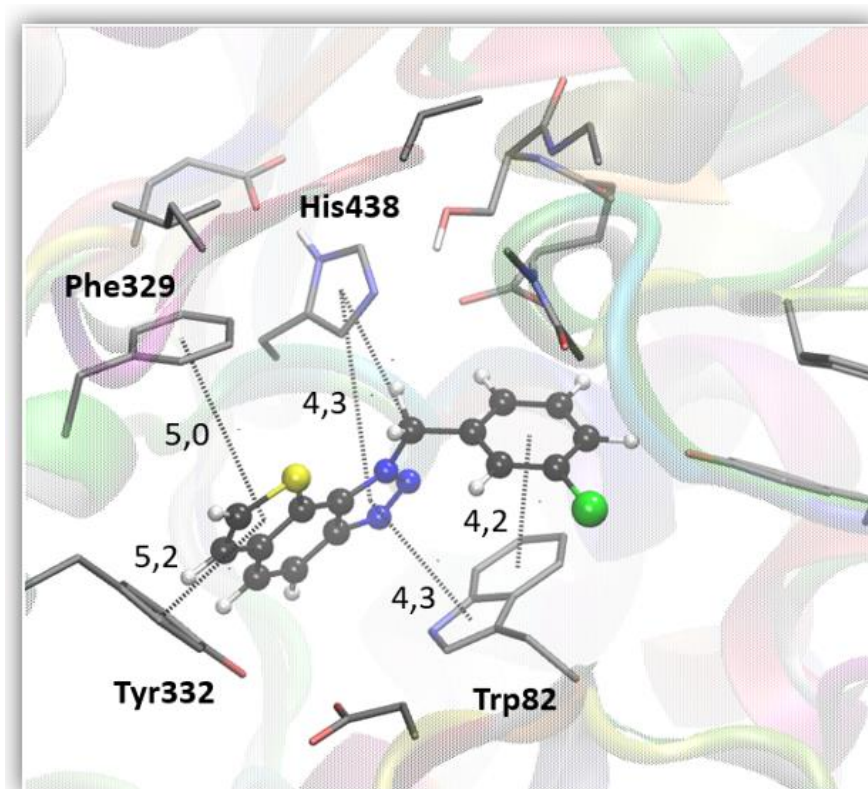
Atomi vodika aminokiselina nisu prikazani radi preglednosti. Udaljenosti su izražene u angströmima, Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$, odnosno 100 pm).

Molekula **17** kao ligand stvara stabilan nekovalentni kompleks s aktivnim mjestom BChE. Stabilizirajuća međudjelovanja između liganda i aminokiselina koje čine aktivno mjesto enzima prikazana su na slici 35. Aminokiselina triptofan (Trp82) stupa u π - π slaganje s fenilom koji je dio tricikličke jezgre (3,7 Å) i triazolom (4,1 Å). Također, prisutna su još dva π - π slaganja kod aminokiseline histidin (His438), jedno s triazolom (4,6 Å), a drugo s fenilom (4,9 Å) koji je dio supstituenta na dušikovom atomu triazola. Aminokiselina glicin (Gly116) sa spomenutim fenilom stvara alkil- π interakciju (4,4 Å), dok se između aminokiseline glicin (Gly117) i kisika metoksidne skupine formira vodikova veza (1,8 Å).



Slika 35. Struktura aktivnog mjesta BChE u kompleksu s molekulom 1-(3-metoksibenzil)-1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (**17**), dobivena metodom molekulskog pristajanja. Atomi vodika aminokiselina nisu prikazani radi preglednosti. Udaljenosti su izražene u angströmima, Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$, odnosno 100 pm).

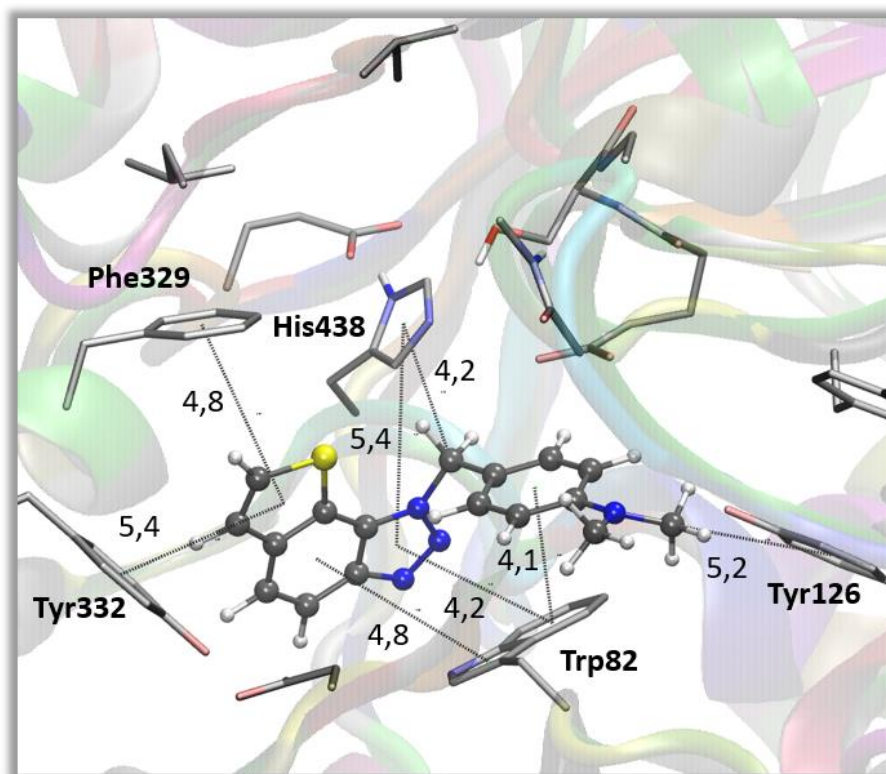
Molekula **18** kao ligand stvara stabilan nekovalentni kompleks s aktivnim mjestom BChE. Stabilizirajuća međudjelovanja između liganda i aminokiselina koje čine aktivno mjesto enzima prikazana su na slici 36. Aminokiselina triptofan (Trp82) stupa u π - π slaganje s triazolom (4,3 Å) i fenilom (4,2 Å) koji je dio supstituenta na dušikovom atomu triazola. Između aminokiseline tirozina (Tyr332) i tiofenskog prstena prisutno je π - π slaganje (5,2 Å). Aminokiselina fenilalanin (Phe329) također stupa u π - π slaganje s tiofenskim prstenom (5,0 Å). Osim toga, π - π slaganje prisutno je između aminokiseline histidina (His438) i triazola (4,3 Å). Prethodno spomenuta aminokiselina His438 stupa u još jednu interakciju, a to je π -alkil interakcija s CH_2 skupinom supstituenta na dušikovom atomu triazola. U ovom slučaju vodikove veze nisu zapažene.



Slika 36. Struktura aktivnog mjesta BChE u kompleksu s molekulom 1-(3-klorbenzil)-1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazola (**18**), dobivena metodom molekuskog pristajanja.

Atomi vodika aminokiselina nisu prikazani radi preglednosti. Udaljenosti su izražene u angströmima, Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$, odnosno 100 pm).

Molekula **19** kao ligand stvara stabilan nekovalentni kompleks s aktivnim mjestom BChE. Stabilizirajuća međudjelovanja između liganda i aminokiselina koje čine aktivno mjesto enzima prikazana su na slici 37. Aminokiselina fenilalanin (Phe329) stupa u π - π interakciju s tiofenom (4,8 Å). Aminokiselina tirozin (Tyr332) također stupa u π - π interakciju s tiofenom (5,4 Å). Zanimljivo je da aminokiselina triptofan (Trp82) stvara čak tri π - π interakcije, jednu s fenilom (4,8 Å) koji je dio tricikličke jezgre, drugu s triazolom (4,2 Å), a treću s fenilom (4,1 Å) koji je dio supstituenta na dušikovom atomu triazola. Između CH_2 skupine supstituenta na dušikovom atomu triazola i aminokiseline histidin (His438) prisutna je alkil- π interakcija (4,2 Å). Osim toga, spomenuta aminokiselina His438 stvara i π - π interakciju s triazolom (5,4 Å). Aminokiselina tirozin (Tyr126) stupa u alkil- π interakciju (5,2 Å) s metilnom skupinom koja je dio dimetilamino skupine supstituenta na dušikovom atomu triazola.



Slika 37. Struktura aktivnog mjesta BChE u kompleksu s molekulom 4-((1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)metil)-*N,N*-dimetilanilin (**19**), dobivena metodom molekulskog pristajanja. Atomi vodika aminokiselina nisu prikazani radi preglednosti. Udaljenosti su izražene u angströmima, Å (1 Å = 10⁻¹⁰ m, odnosno 100 pm).

3.4. Genotoksičnost

Nečistoće koje mogu biti prisutne u aktivnom farmaceutskom sastojku (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) ili u gotovom lijeku ne mogu se u potpunosti izbjeći pa je daljnje istraživanje takvih spojeva ključan dio razvoja lijeka i od velike je važnosti za sigurnost istih. Osim u aktivnoj tvari, nečistoće mogu biti zastupljene i u svakom intermedijeru tijekom proizvodnog procesa te je potrebno procijeniti ih s obzirom na genotoksična svojstva. Spojevi s dokazanim ili potencijalnim genotoksičnim svojstvima strože su regulirani i moraju se kontrolirati na vrlo niskim razinama, znatno nižim od ostalih nečistoća (ICH M7 smjernica). Razine koje smiju biti prisutne u lijeku izračunaju se na temelju eksperimentalno prihvatljivog dnevnog unosa (AI) i maksimalne dnevne doze (MDD) lijeka. Kod novih spojeva AI obično još nije određen toksikološkim studijama na životinjama. Procjene se prvenstveno provode

upotrebom *in silico* Q(SAR) alata. Prilikom razvoja novih aktivnih tvari i gotovih oblika lijekova, nečistoće će biti novi spojevi za koje obično nema dostupnih eksperimentalnih podataka. U takvim je slučajevima Q(SAR) pristup od velike važnosti jer Q(SAR) modeli predviđaju biološku aktivnost na temelju strukturnih komponenti. Spomenuti pristup značajan je tijekom ranih faza traženja potencijalno aktivnih tvari, a uklanjanje spojeva koji su potencijalno mutageni štedi mnogo novca i vremena. Softverski paket Lhasa (Nexus v.2.5.2, Derek Nexus v.6.2.1. i Sarah Nexus v.3.2.1) najčešće je korišteni softver jer ima dva komplementarna modela pri čemu se jedan temelji na pravilima, a drugi na statistici. Vrlo je važno da sva predviđanja prouči i pregleda stručnjak za toksikologiju.

U tablici 3 prikazani su rezultati ispitivanja mutagenog potencijala sintetiziranih tienobenzo/naftotriazola **15-22**. Za spojeve **16-19**, **21** i **22** Sara test predviđa mutagenost, dok Derek test pretpostavlja da isti spojevi nisu mutageni. Predviđanja za spoj **15** su neuvjerljiva, a za spoj **20** Sara i Derek testovi daju negativne rezultate.

Tablica 3. Mutageni potencijal sintetiziranih tienobenzo/naftotriazola **15-22** prema procjeni Lhasa M7

Structure	ICH M7 Class	Derek Prediction	Sarah Prediction	Similarity to API	Overall In Silico
15	Inconclusive	■ ■ ■ ■ □	□ □ □ □	No Derek Alerts found	Negative
16	Class 3	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	No Derek Alerts found	Positive
17	Class 3	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	No Derek Alerts found	Positive
18	Class 3	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	No Derek Alerts found	Positive
19	Class 3	■ ■ ■ ■ □	■ ■ □ □	No Derek Alerts found	Positive
20	Class 5	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	No Derek Alerts found	Negative
21	Class 3	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	No Derek Alerts found	Positive
22	Class 3	■ ■ ■ ■ □	■ ■ □ □	No Derek Alerts found	Positive

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

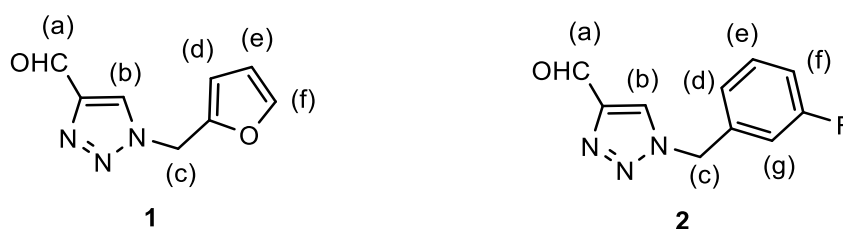
Sva otapala korištena u ovom radu pročišćena su destilacijom i lako su dostupna na tržištu. Korištene fosfonijeve soli sintetizirane su prethodno u našem laboratoriju. Nakon svake Wittigove reakcije provedena je ekstrakcija tri puta, pri čemu su razdvojeni organski i vodeni sloj. Organski sloj sušio se iznad bezvodnog magnezijevog sulfata. Tankoslojna kromatografija provedena je na pločicama presvučenim silika-gelom (0,2 mm, 60/Kieselguhr F₂₅₄) uronjenim u 10 mL sustava otapala. Kolonska kromatografija provedena je u staklenim kolonama različitih promjera. Kolone su punjene stupcima silika-gela (60 Å, tehnička čistoća) različitih visina. Za snimanje ¹H i ¹³C NMR spektara korišten je spektrometar Bruker Avance 600 i 300 MHz. Spojevi analizirani NMR tehnikama otopljeni su u deuteriranom kloroformu, CDCl₃. Kao standard korišten je tetrametilsilan (TMS) koji je pogodan za navedene tehnike jer pokazuje samo jedan signal. Kemijski pomaci izraženi su u ppm jedinicama (*engl.* parts per million). Sljedeći signali u ¹H NMR spektrima su specifični i ne odgovaraju spojevima: signal za vodu u kloroformu na 1,50 ppm, signal za nedeuterirani kloroform na 7,24 ppm, signal za diklormetan u kloroformu na 5,26 ppm i signal za aceton u kloroformu na 2,17 ppm. Svaki ¹³C NMR spektar sadrži jedan specifičan signal (grupa od tri linije pikova) na 77 ppm koji odgovara korištenom otapalu – deuteriranom kloroformu. Fotokemijske reakcije provodile su se u 50,0 mL otopine u kvarcnim kivetama koje propuštaju svjetlost. U tu svrhu korišten je fotokemijski reaktor Rayonet opremljen UV lampama (10) valne duljine od 313 nm.

Kratice korištene u eksperimentalnom dijelu rada su: ACN – acetonitril, DCM – diklormetan, E – dietileter, EtOAc – etil acetat, PE – petroleter, NMR – nuklearna magnetska rezonancija, UV – ultraljubičasta spektroskopija, NaOEt – natrijev etoksid, s – singlet, d – dublet, t – triplet, m – multiplet, dd – dublet dubleta, q – kvartet.

4.2. Sinteza triazolnih aldehida 1-6

Općeniti postupak

Triazolni aldehidi sintetizirani su u malim staklenim bočicama iz 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (prethodno sintetiziranog u našem laboratoriju) otopljenog u suhom 1,4-dioksanu. Reakcijskoj smjesi se zatim dodao odgovarajući amin te se smjesa kratko propuhala argonom (inertni plin). Ovisno o primijenjenom aminu, reakcija se odvijala određeno vrijeme (najčešće oko 24 sata). Treba paziti na vrijeme reakcije kako ne bi došlo do polimerizacije amina. Tijek reakcije pratio se tankoslojnom kromatografijom. Po završetku reakcije otapalo se uklonilo uparavanjem na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Kruti produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom uz odgovarajući sustav otapala.



1-(furan-2-ilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (1)

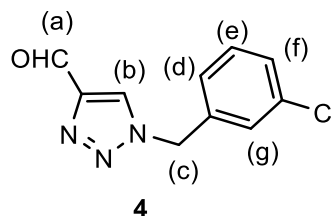
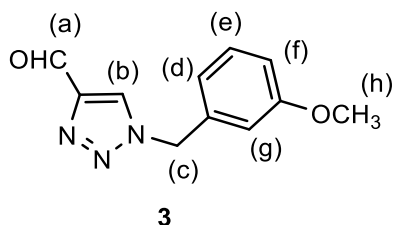
Spoj **1** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 2-furfurilamina (106,2 mg odnosno 97,2 μ L, 1,10 mmol) i 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (200,0 mg, 0,92 mmol) otopljenog u 2 mL 1,4-dioksana. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom (ϕ = 3 cm; h = 13 cm; sustav PE/DCM i DCM/EtOAc (2 %)).

99,6 mg, 61 % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (DCM (100 %)) = 0,23; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 10,13 (s, 1H) (a), 8,10 (s, 1H) (b), 7,46 (d, J = 1,9 Hz, 1H) (f), 6,53 (d, J = 3,3 Hz, 1H) (d), 6,42 (dd, J = 3,3, 1,9 Hz, 1H) (e), 5,61 (s, 2H) (c).

1-(3-fluorbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (2)

Spoj **2** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 3-fluorbenzilamina (137,8 mg odnosno 125,3 μ L, 1,10 mmol) i 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (200,0 mg, 0,92 mmol) otopljenog u 2 mL 1,4-dioksana. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 20 cm; sustav PE/DCM i čisti DCM).

143,6 mg, 76 % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (DCM (100 %)) = 0,22; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 10,14 (s, 1H) (a), 8,03 (s, 1H) (b), 7,41 – 7,34 (m, 1H) (e), 7,11 – 7,07 (m, 2H) (d)/(f), 7,00 (d, J = 9,1 Hz, 1H) (g), 5,59 (s, 2H) (c).

**1-(3-metoksibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (3)**

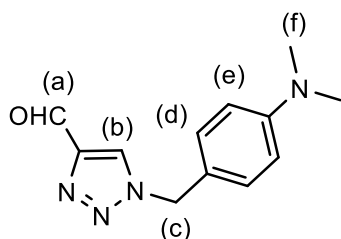
Spoj **3** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 3-metoksibenzilamina (151,0 mg odnosno 141,1 μ L, 1,10 mmol) i 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (200,0 mg, 0,92 mmol) otopljenog u 2 mL 1,4-dioksana. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 16,5 cm; sustav PE/DCM i DCM/EtOAc (2 %)).

83,0 mg, 42 % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (DCM (100 %)) = 0,19; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 10,13 (s, 1H) (a), 8,00 (s, 1H) (b), 7,32 (t, J = 8,1 Hz, 1H) (e), 6,92 (d, J = 8,5 Hz, 1H) (d)/(f), 6,88 (d, J = 7,8 Hz, 1H) (d)/(f), 6,82 (s, 1H) (g), 5,55 (s, 2H) (c), 3,80 (s, 1H) (h).

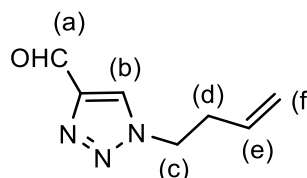
1-(3-klorbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (4)

Spoj **4** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 3-klorbenzilamina (155,9 mg odnosno 129,9 μ L, 1,10 mmol) i 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (200,0 mg, 0,92 mmol) otopljenog u 2 mL 1,4-dioksana. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom (ϕ = 2 cm; h = 14 cm; sustav PE/DCM i čisti DCM).

145,1 mg, 71 % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (DCM (100 %)) = 0,16; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 10,14 (s, 1H) (a), 8,04 (s, 1H) (b), 7,38 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H) (d)/(f), 7,35 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H) (e), 7,30 (s, 1H) (g), 7,19 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H) (d)/(f), 5,57 (s, 2H) (c).



5



6

1-(4-(dimetilamino)benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (5)

Spoj **5** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 4-(aminometil)-*N,N*-dimetilanilina (148,8 mg odnosno 114,0 μL , 0,99 mmol) i 1-(4-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (180, mg, 0,83 mmol) otopljenog u 2 mL 1,4-dioksana. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 3$ cm; $h = 13$ cm; sustav PE/DCM i DCM/EtOAc (2 %)).

139,4 mg, 73 % izoliranog spoja; blijedožuti prašak; R_f (DCM (100 %)) = 0,11; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 10,10 (s, 1H) (a), 7,91 (s, 1H) (b), 7,19 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H) (d)/(e), 6,70 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H) (d)/(e), 5,46 (s, 2H) (c), 2,97 (s, 6H) (f).

1-(but-3-en-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (6)

Spoj **6** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 3-buten-1-amina (70,5 mg odnosno 90,7 μL , 0,99 mmol) i 1-(4-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (180, mg, 0,83 mmol) otopljenog u 2 mL 1,4-dioksana. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 2$ cm; $h = 17$ cm; sustav PE/DCM i DCM/EtOAc (2 %)).

72,5 mg, 58 % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (DCM (100 %)) = 0,35; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 10,15 (s, 1H) (a), 8,07 (s, 1H) (b), 5,76 – 5,73 (m, 1H) (e), 5,11 – 5,07 (m, 2H) (f), 4,52 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H) (c), 2,73 – 2,71 (m, 2H) (d).

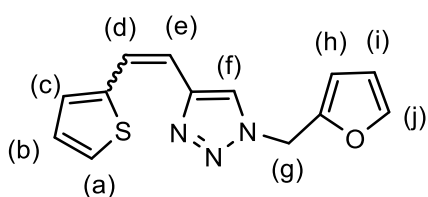
4.3. Sinteza triazolostilbena 7-14 Wittigovom reakcijom

Općeniti postupak

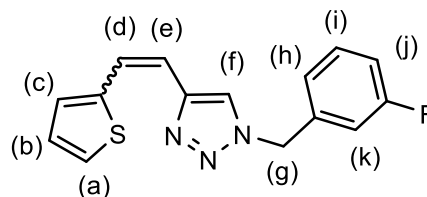
Aparatura, koju čini trogrla tikvica, lijevak za dokapavanje, klor-kalcijska cijev i balon napunjen dušikom, propuhana je dušikom 15 minuta. U tikvicu se stavio magnet, a lijevak za dokapavanje je zatvoren i uliveno je 30 ili 40 mL apsolutnog etanola (ovisno o količini polaznih reaktanata). Dio apsolutnog etanola (10 ili 20 mL) ispušten je u tikvicu, te je dodana potrebna količina trifenilfosfonijeve soli. U preostalu količinu apsolutnog etanola dodan je natrij prethodno izvagan u PE na analitičkoj vagi s preciznošću 0,0001 g. Nakon što je sav natrij izreagirao u etanolu uz razvijanje vodika, dokapano je malo NaOEt u tikvicu. Aldehid se otopio u etanolu i prenio u tikvicu, a zatim se, kap po kap, dodao ostatak NaOEt iz lijevka. Tikvica je zatvorena staklenim čepom, a reakcijska se smjesa ostavila miješati na magnetskoj mješalici sljedećih 72 sata na sobnoj temperaturi.



Slika 38. Aparatura za provođenje Wittigove reakcije.



7



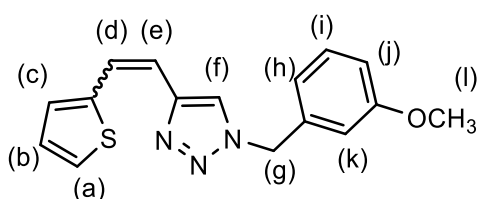
8

1-(furan-2-ilmetil)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol (7)

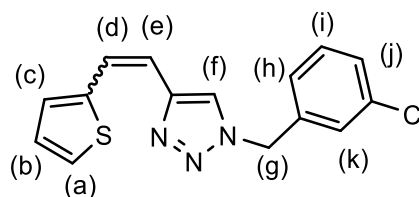
Spoj 7 sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(furan-2-ilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (**1**) (99,6 mg, 0,56 mmol) i trifenilfosfonijeve soli (246,8 mg, 0,56 mmol) uz natrij u 10 %-tnom suvišku (14,2 mg) i 40 mL NaOEt. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 3$ cm; $h = 17$ cm; sustav PE/E (50 %)). 67,4 mg, 68 % izolirane smjese izomera; žuto ulje; R_f (PE/E (20 %)) = 0,51.

1-(3-fluorbenzil)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol (8)

Spoj 8 sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(3-fluorbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (**2**) (143,6 mg, 0,62 mmol) i trifenilfosfonijeve soli (270,4 mg, 0,62 mmol) uz natrij u 10 %-tnom suvišku (15,6 mg) i 40 mL NaOEt. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 3$ cm; $h = 18,5$ cm; sustav PE/E (50 %)). 88,3 mg, 50% izolirane smjese izomera; žuto ulje; R_f (PE/E (20 %)) = 0,53.



9



10

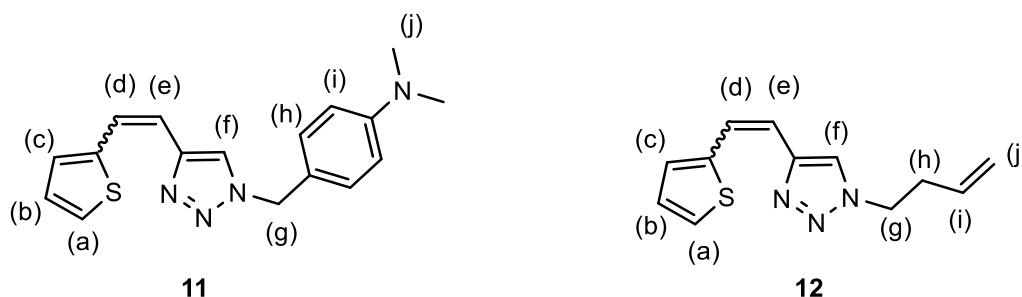
1-(3-metoksibenzil)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol (9)

Spoj 9 sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(3-metoksibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (**3**) (83,0 mg, 0,28 mmol) i trifenilfosfonijeve soli (122,5 mg, 0,28 mmol) uz natrij u 10 %-tnom suvišku (7,1 mg) i 30 mL NaOEt. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom

kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 14$ cm; sustav PE/E (50 %)). 63,6 mg, 77% izolirane smjese izomera; žuto ulje; R_f (PE/E (20 %)) = 0,45.

1-(3-klorbenzil)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol (10)

Spoj **10** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(3-klorbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (**4**) (72,6 mg, 0,29 mmol) i trifenilfosfonijeve soli (127,3 mg, 0,29 mmol) uz natrij u 10 %-tnom suvišku (7,3 mg) i 30 mL NaOEt. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 3$ cm; $h = 18,5$ cm; sustav PE/E (50 %)). 109,8 mg, 126 % izolirane smjese izomera; žuto ulje; R_f (PE/E (20 %)) = 0,49.

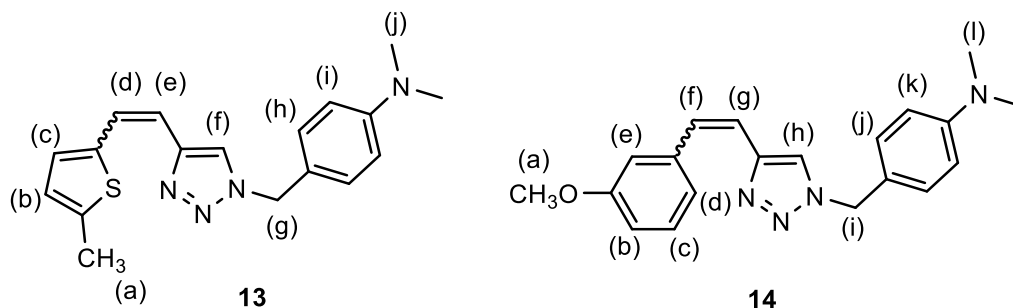


N,N-dimetil-4-((4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)anilin (**11**)

Spoj **11** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(4-(dimetilamino)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (**5**) (69,7 mg, 0,30 mmol) i trifenilfosfonijeve soli (132,9 mg, 0,30 mmol) uz natrij u 10 %-tnom suvišku (7,6 mg) i 40 mL NaOEt. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 10$ cm; sustav PE/E (%)). 19,7 mg, 21 % izolirane smjese izomera; žuto ulje; R_f (PE/E (90 %)) = 0,49.

1-(but-3-en-1-il)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol (**12**)

Spoj **12** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(but-3-en-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (**6**) (72,5mg, 0,48 mmol) i trifenilfosfonijeve soli (210,5 mg, 0,48 mmol) uz natrij u 10 %-tnom suvišku (12,1 mg) i 40 mL NaOEt. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 2$ cm; $h = 10$ cm; sustav PE/E (80 %)). 80,7 mg, 73 % izolirane smjese izomera; žuto ulje; R_f (PE/E (90 %)) = 0,25.



***N,N*-dimetil-4-((4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)anilin (13)**

Spoj **13** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(4-(dimetilamino)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (**5**) (69,7 mg, 0,30 mmol) i trifenilfosfonijeve soli (140,2 mg, 0,30 mmol) uz natrij u 10 %-tnom suvišku (7,6 mg) i 40 mL NaOEt. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 10$ cm; sustav PE/E (%)). 46,0 mg, 33 % izolirane smjese izomera; žuto ulje; R_f (PE/E (70 %)) = 0,12.

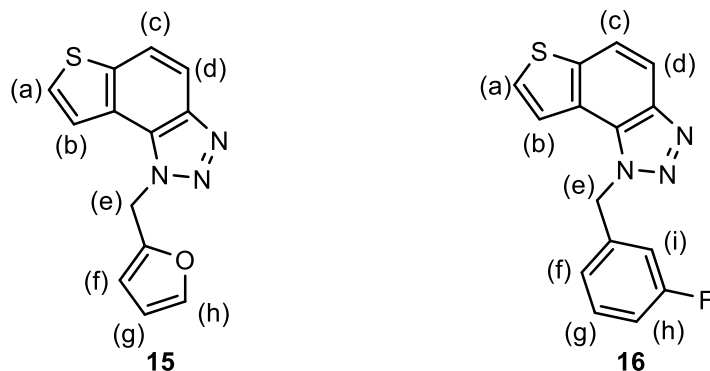
4-((4-(3-metoksistiril)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)-*N,N*-dimetilanilin (14)

Spoj **14** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(4-(dimetilamino)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida (**5**) (69,7 mg, 0,30 mmol) i trifenilfosfonijeve soli (140,2 mg, 0,30 mmol) uz natrij u 10 %-tnom suvišku (7,6 mg) i 40 mL NaOEt. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 2$ cm; $h = 10$ cm; sustav PE/E (80 %)). 53,6 mg, 53 % izolirane smjese izomera; žuto ulje; R_f (PE/E (90 %)) = 0,40.

4.4. Fotokemijska sinteza tienobenzo/naftotriazola 15-22

Općeniti postupak

Određena količina odgovarajućih 1,2,3-triazolostilbena **7-14** otopljena je u 1 do 3 mL toluena. Smjese su potom prebačene u epruvete od kvarca (propuštaju svjetlost), dodan je ostatak toluena i malo joda na vrhu špatule (katalitička količina, oksidacijsko sredstvo). Reakcije su se osvjetljavale 2 sata pomoću 10 lampi valne duljine 313 nm u fotokemijskom reaktoru Rayonet.



1-(furan-2-ilmetil)-1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (**15**)

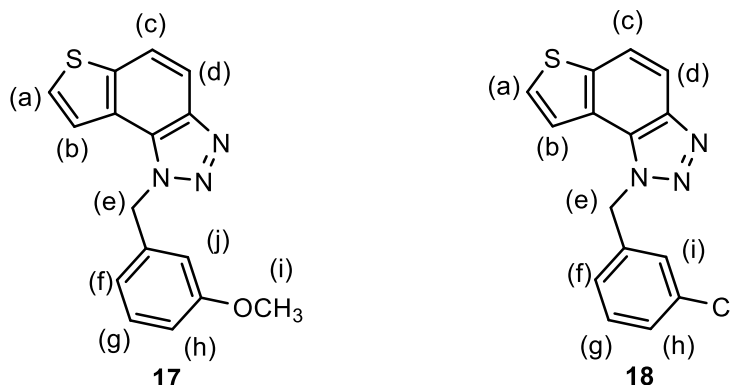
Spoj **15** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(furan-2-ilmetil)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazola (**7**) (33,7 mg, 0,13 mmol) otopljenog u 50 mL toluena. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 3$ cm; $h = 12$ cm; sustav PE/E (40 %)).

10,3 mg, 31% izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (PE/E (30 %)) = 0,54; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,97 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,82 – 7,80 (m, 2H), 7,66 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 7,36 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H) (f)/(h), 6,34 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H) (f)/(h), 6,32 (dd, $J_1 = 3,3$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, 1H) (g), 6,08 (s, 2H) (e); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 148,2, 144,6, 143,2, 140,2, 128,7, 127,8, 122,8, 120,5, 119,4, 116,1, 111,0, 109,3, 46,5. HRMS (m/z) za $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{OS}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{rač}} = 255.0466$, i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{eksp}} = 255.0463$.

1-(3-fluorbenzil)-1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (**16**)

Spoj **16** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(3-fluorbenzil)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazola (**8**) (44,2 mg, 0,16 mmol) otopljenog u 50 mL toluena. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 2$ cm; $h = 16$ cm; sustav PE/E (30 %)).

28,2 mg, 64 % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (PE/E (30 %)) = 0,51; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 8,00 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,82 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,56 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 7,46 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 7,33-7,27 (m, 1H) (f)/(h), 7,02-6,93 (m, 2H) (g)/(i), 6,86 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H) (f)/(h), 6,10 (s, 2H) (e); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 144,7, 140,3, 137,7, 130,8, 128,0, 122,5, 122,1, 119,9, 119,4, 116,1, 115,6, 115,3, 113,9, 113,6, 52,5. HRMS (m/z) za $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FN}_3\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{rač}} = 283.0579$, i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{eksp}} = 283.0581$.



1-(3-metoksibenzil)-1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (17)

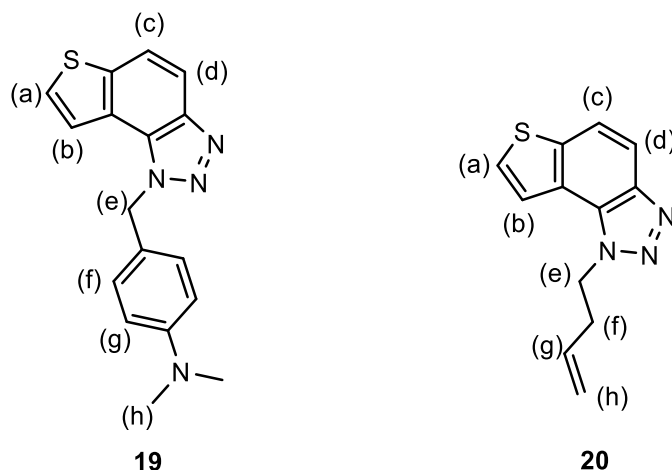
Spoj **17** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(3-metoksibenzil)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazola (**9**) (31,8 mg, 0,11 mmol) otopljenog u 50 mL toluena. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 12,5$ cm; sustav PE/E (40 %)).

9,5 mg, 30% izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (PE/E (30 %)) = 0,45; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,99 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,80 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,54 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 7,50 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 7,23 (t, 1H) (g), 6,81 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H) (f)/(h), 6,78 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H) (f)/(h), 6,71 (s, 1H) (j), 6,08 (s, 2H) (e), 3,70 (s, 3H) (i); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 160,2, 144,7, 140,1, 136,7, 130,2, 128,7, 127,8, 122,8, 120,3, 119,3, 118,8, 116,1, 113,4, 112,4, 55,2, 53,0.

1-(3-klorbenzil)-1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (18)

Spoj **18** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(3-klorbenzil)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazola (**10**) (36,6 mg, 0,12 mmol) otopljenog u 50 mL toluena. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 2$ cm; $h = 15,5$ cm; sustav PE/E (40 %)).

21,7 mg, 59 % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (PE/E (30 %)) = 0,42; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8,00 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,82 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,58 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 7,47 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 7,26-7,25 (m, 1H) (f)/(h), 7,24 (t, 1H) (g), 7,21 (s, 1H) (i), 7,03 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H) (f)/(h), 6,08 (s, 2H) (e); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 144,7, 140,3, 137,1, 135,2, 130,5, 128,7, 128,6, 128,1, 126,7, 124,7, 122,5, 119,8, 119,4, 116,1, 52,4. HRMS (m/z) za $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_3\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{rač}} = 299.0284$, i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{eksp}} = 299.0288$.



4-((1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)metil)-*N,N*-dimetilanilin (19)

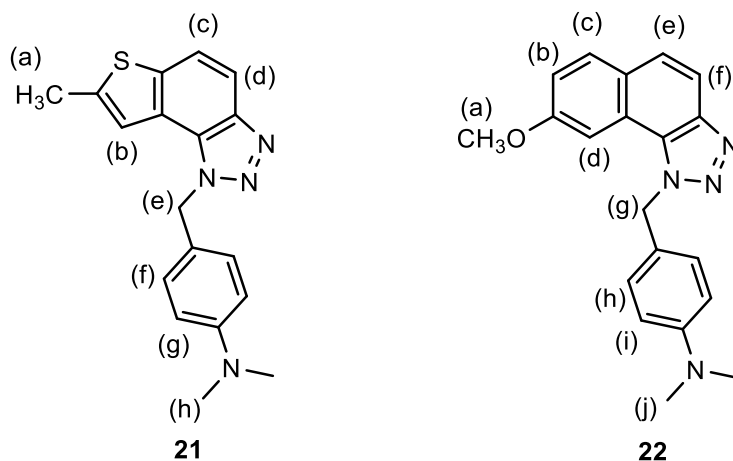
Spoj **19** sintetiziran je prema općenitom postupku iz *N,N*-dimetil-4-((4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)anilina (**11**) (mg, mmol) otopljenog u 50 mL toluena. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 10$ cm; sustav E/PE (70 %)).

6,4 mg, 33 % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (PE/E (%)) = 0,24; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,97 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,78 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,60 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 7,56 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 7,11 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) (f)/(g), 6,64 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H) (f)/(g), 6,01 (s, 2H) (e), 2,88 (s, 3H) (h); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 150,4, 144,7, 139,9, 129,4, 128,6, 127,8, 127,5, 126,6, 122,9, 122,5, 120,6, 119,0, 116,0, 112,6, 52,9, 40,4. HRMS (m/z) za $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{rač}} = 308.1096$, i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{eksp}} = 308.1100$.

1-(but-3-en-1-il)-1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (20)

Spoj **20** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 1-(but-3-en-1-il)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazola (**12**) (mg, mmol) otopljenog u 50 mL toluena. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 10$ cm; sustav E/PE (70 %)).

mg, % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (PE/E (%)) = 0,48; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,96 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,80 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,74 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 7,70 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H) (a)/(b), 5,90-5,83 (m, 1H) (g), 5,15-5,08 (m, 2H) (h), 4,96 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H) (e), 2,85-2,80 (q, $J_1 = 14,5$ Hz, $J_2 = 7,2$ Hz, 2H) (f); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 144,4, 139,9, 133,1, 128,5, 128,0, 122,6, 119,6, 119,0, 118,4, 116,2, 49,0, 34,3. HRMS (m/z) za $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{rač}} = 229.0674$, i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{eksp}} = 229.0676$.



***N,N*-dimetil-4-((7-metil-1*H*-tieno[2',3':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)metil)anilin (**21**)**

Spoj **21** sintetiziran je prema općenitom postupku iz *N,N*-dimetil-4-((4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)anilina (**13**) (mg, mmol) otopljenog u 50 mL toluena. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 10$ cm; sustav E/PE (70 %)).

12,6 mg, 36 % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (PE/E (%)) = 0,29; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,88 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,64 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H) (c)/(d), 7,27 (s, 1H) (b), 7,11 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) (f)/(g), 6,64 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H) (f)/(g), 5,96 (s, 2H) (e), 2,88 (s, 3H) (h), 2,61 (s, 3H) (a); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 150,4, 144,7, 142,4, 139,1, 129,4, 128,2, 127,8, 123,2, 118,7, 118,4, 115,0, 112,6, 52,7, 40,4, 16,3.

4-((8-metoksi-1*H*-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)metil)-*N,N*-dimetilanilin (22**)**

Spoj **22** sintetiziran je prema općenitom postupku iz 4-((4-(3-metoksistiril)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)-*N,N*-dimetilanilina (**14**) (mg, mmol) otopljenog u 50 mL toluena. Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 10$ cm; sustav E/PE (70 %)).

7,2 mg, 20 % izoliranog spoja; žuto ulje; R_f (PE/E (%)) = 0,35; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,88-7,82 (m, 2H) (e)/(f), 7,62 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H) (b)/(c), 7,50 (s, 1H) (d), 7,17 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H) (b)/(c), 7,06 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H) (h)/(i), 6,64 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H) (h)/(i), 6,16 (s, 2H) (g), 3,79 (s, 3H) (a), 2,89 (s, 3H) (j); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 158,5, 150,4, 145,3, 130,5, 129,2, 128,9, 127,7, 127,3, 126,0, 121,0, 117,7, 115,5, 112,8, 103,7, 55,6, 53,9, 40,5. HRMS (m/z) za $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{rač}} = 332.1637$, i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{eksp}} = 332.1635$.

5. ZAKLJUČAK

Cilj rada bila je sinteza novih 1,2,3-triazolnih stilbena i njihovih fotokemijskih produkata kao potencijalnih biološki aktivnih spojeva. Triazoli su heterociklički spojevi koji u svojoj strukturi sadrže tri atoma dušika i kao takvi posjeduju široki spektar bioloških aktivnosti, uključujući protuupalno djelovanje, antitumorsko djelovanje, inhibiciju enzima kolinesteraza i sl. Istraživanje je bilo usmjereno ka 1,2,3-triazolima, jednim od dvaju izomera triazola.

Fotokemijskoj sintezi prethodila su dva važna koraka. U prvom je koraku bilo potrebno pripremiti triazolne aldehide **1-6**. U tu su svrhu korišteni 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid i odgovarajući amini. Dobiveni triazolni aldehidi **1-6** sadrže 1,2,3-triazolnu jezgru koja na položaju 1 sadrži supstituent, koji se mijenja u ovisnosti o aminu koji je korišten u reakciji. U drugom su koraku triazolni aldehidi **1-6** s odgovarajućim trifenilfosfonijevim solima Wittigovom reakcijom prevedeni u smjese *cis*- i *trans*-izomera novih triazolostilbena **7-14**. Sintetizirani triazolostilbeni **7-14** u svojoj strukturi sadrže 1-supstituiranu 1,2,3-triazolnu jezgru koja je na položaju 4 povezana dvostrukom ugljik-ugljik vezom s arilnom skupinom, poput tiofenske i 5-metil-tiofenske skupine. Zanimljivo je kako u svim izomernim smjesama prevladava *cis*-izomer. Ta činjenica nije predstavljala značajan podatak budući da se u fotokemijskoj sintezi koristila smjesa izomera. Smjese triazolostilbena **7-14** podvrgnute su fotokemijskim reakcijama, prilikom kojih dolazi do elektrociklizacije i aromatizacije u tienobenzo/naftotriazole **15-22**. Novi tienobenzo/naftotriazoli **15-22** uspješno su pripremljeni uz visoka izolirana iskorištenja. Svi su spojevi spektroskopski okarakterizirani ¹H i ¹³C NMR tehnikama te HRMS analizom, čime je potvrđena njihova struktura i čistoća.

Sintetizirani tienobenzo/naftotriazoli **15-22** uključeni su u biološka ispitivanja u cilju ispitivanja potencijalne inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze. Derivati **16**, **17**, **18** i **19** postigli su zadovoljavajuće IC₅₀ vrijednosti, odnosno vrlo dobru inhibicijsku aktivnost. Od spomenutih spojeva, najbolji je rezultat ostvario derivat **18** koji na *meta*-položaju sadrži klor. Stoga se istaknuti tienobenzo/naftotriazoli mogu uključiti u daljnja istraživanja.

Osim bioloških ispitivanja, provedene su računalne analize i ispitivanja molekuskog pristajanja. Metodom geometrijske optimizacije dobiveni su najstabilniji konformeri novih tienobenzo/naftotriazola **15-22**. Na taj se način pruža uvid u prostorni raspored jezgara, zbog čega se omogućuje predviđanje termodinamički najstabilnijeg oblika molekule. Rezultati računalnog modeliranja su zatim poslužili za simulaciju potencijalnog inhibicijskog djelovanja sintetiziranih spojeva. Provedeno je računalno istraživanje molekuskog pristajanja sintetiziranog spoja u aktivno mjesto butirilkolinesteraze. Tienobenzo/naftotriazoli koji su

uključeni u spomenuta računalna istraživanja pokazali su u biološkim ispitivanjima zavidne IC_{50} vrijednosti, a to su, već ranije spomenuti, derivati **16**, **17**, **18** i **19**.

Pripravljeni tienobenzo/naftotriazoli **15-22** uključeni su i u ispitivanja mutagenog potencijala. U tu se svrhu koristio softver Lhasa M7. Sara test predividio je mutagenost spojeva **16-19**, **21** i **22**, dok Derek test ne pretpostavlja mutagenost navedenih spojeva, tako da su ukupni rezultati u prihvatljivim granicama.

6. ZAHVALE

Zahvaljujemo se mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na pruženoj prilici, hvalevrijednim savjetima i izvrsnom stručnom vodstvu. Hvala joj što nam je svojim znanjem i iskustvom pomogla pri izradi rada i rješavanju problema.

Posebno se zahvaljujemo dr. sc. Mileni Mlakić na pomoći i suradnji prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada te na prenesenom znanju, strpljenju i podršci kroz cijelo vrijeme.

Veliko hvala dr. sc. Danijeli Barić za prenošenje znanja iz područja računalne kemije, vrijednim savjetima o razumijevanju strukture aktivnog mjesta enzima i kreativno izrađenim slikama.

Zahvaljujemo svim članovima Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu na ugodnoj radnoj atmosferi i susretljivosti.

7. LITERATURA

- [1] T. Belwal, S.M. Nabavi, S.F. Nabavi, A.R. Dehpour, S. Shirooie, *Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease*, Academic Press, London, UK, 2020.
- [2] M. Zenčić, *Određivanje antioksidacijske aktivnosti i inhibicijskog djelovanja vodenog ekstrakta gorke naranče (citrus aurantium l.) na aktivnost acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2017.
- [3] C. Pienica, H. Soreq, *MicroRNA regulators of cholinergic signaling link neuromuscular, cardiac and metabolic systems*, Periodicum Biologorum, 118 (4) (2016) 373-379.
- [4] S. Darvesh, R. Walsh, R. Kumar, A. Caines, S. Roberts, D. Magee, K. Rockwood, E. Martin, *Inhibition of Human Cholinesterases by Drugs Used to Treat Alzheimer Disease*, Alzheimer Disease & Associated Disorders 17 (2003) 117-126.
- [5] D.R. DeBay, S. Darvesh, *Butyrylcholinesterase as a biomarker in Alzheimer's disease*, Diagnosis and Management in Dementia, 1 (2020) 263-280.
- [6] M.A. DeTure, D.W. Dickson, *The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease*, Molecular Neurodegeneration, 14 (2019) 1-18.
- [7] <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/types-of-dementia/alzheimers-disease/alois-alzheimer/> (pristup 10. lipnja 2024.)
- [8] <https://m1imagingcenter.com/introducing-neuroquant/alzheimers-disease-neurons-and-brain/> (pristup 10. lipnja 2024.)
- [9] M.S. Uddin, A. Al Mamun, M.T. Kabir, G.M. Ashraf, M.N. Bin-Jumah, M.M. Abdel-Daim, *Multi-Target Drug Candidates for Multifactorial Alzheimer's Disease: AChE and NMDAR as Molecular Targets*, Molecular Neurobiology, 58 (2021) 281-303.
- [10] L.K. Huang, S.P. Chao, C.J. Hu, *Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease*, Journal of Biomedical Science, 27 (2020) 1-13.
- [11] L. Wu, P. Rosa-Neto, G.Y.R. Hsiung, A.D. Sadovnick, M. Masellis, S.E. Black, J. Jia, S. Gauthier, *Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD)*, Canadian Journal of Neurological Sciences, 39 (2012) 436-445.
- [12] S. Andrieu, N. Coley, S. Lovestone, P.S. Aisen, B. Vellas, *Prevention of sporadic Alzheimer's disease: lessons learned from clinical trials and future directions*, Lancet Neurology, 14 (2015) 926-944.
- [13] H. Braak, K. Del Tredici, *The preclinical phase of the pathological process underlying sporadic Alzheimer's disease*, Brain, 138 (2015) 2814-2833.

- [14] S.J. Vos, F. Verhey, L. Frölich, J. Kornhuber, J. Wiltfang, W. Maier, O. Peters, E. Rütger, F. Nobili, S. Morbelli, *Prevalence and prognosis of Alzheimer's disease at the mild cognitive impairment stage*, Brain, 138 (2015) 1327-1338.
- [15] M.A. Lovell, W.R. Markesbery, *Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease*, Nucleic acids research, 35 (2007) 7497-7504.
- [16] T. Voisin, B. Vellas, *Diagnosis and treatment of patients with severe Alzheimer's disease*, Drugs & aging, 26 (2009) 135-144.
- [17] M.M. Ibrahim, M.T. Gabr, *Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer's disease*, Neural regeneration research, 14 (2019) 437.
- [18] W. Zhang, B. Jiao, T. Xiao, X. Liu, X. Liao, X. Xiao, L. Guo, Z. Yuan, X. Yan, B. Tang, L. Shen, *Association of rare variants in neurodegenerative genes with familial Alzheimer's disease*, Annals of Clinical and Translational Neurology, 7 (2020) 1985-1995.
- [19] Y. Li, H. Fan, J. Sun, M. Ni, L. Zhang, C. Chen, X. Hong, F. Fang, W. Zhang, P. Ma, *Circular RNA expression profile of Alzheimer's disease and its clinical significance as biomarkers for the disease risk and progression*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 123 (2020) 105747.
- [20] C. Lecrux, C. Sandoe, S. Neupane, P. Kropf, X. Toussay, X.K. Tong, M. Lacalle-Aurioles, A. Shmuel, E. Hamel, *Impact of Altered Cholinergic Tones on the Neurovascular Coupling Response to Whisker Stimulation*, Journal of Neuroscience, 37 (2017) 1518-1531.
- [21] P.P. Liu, Y. Xie, X.Y. Meng, J.S. Kang, *History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease*, Signal Transduction and Targeted Therapy, 4 (2019) 29.
- [22] P. Davies, A. Maloney, *Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease*, Lancet, 308 (1976) 1403.
- [23] M.R. Picciotto, M.J. Higley, Y.S. Mineur, *Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior*, Neuron, 76 (2012) 116-129.
- [24] G. Mushtaq, N.H. Greig, J.A. Khan, M.A. Kamal, *Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus*, CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, 13 (2014) 1432-1439.
- [25] X.Q. Chen, W.C. Mobley, *Exploring the pathogenesis of Alzheimer disease in basal forebrain cholinergic neurons: Converging insights from alternative hypotheses*, Frontiers in Neuroscience, 13 (2019) 446.

- [26] T. Ferreira-Vieira, I. Guimaraes, F. Silva, F. Ribeiro, *Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System*, Current Neuropharmacology, 14 (2016) 101-115.
- [27] G.D. Stanciu, A. Luca, R.N. Rusu, V. Bild, S.I.B. Chiriac, C. Solcan, W. Bild, D.C. Ababei, *Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement*, Biomolecules, 10 (2020) 1-21.
- [28] G.T. Grossberg, *Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on*, Current Therapeutic Research, 64 (2003) 216-235.
- [29] F. Kametani, M. Hasegawa, *Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease*, Frontiers in Neuroscience, 12 (2018) 1-11.
- [30] J. TCW, A.M. Goate, *Genetics of β -amyloid precursor protein in Alzheimer's disease*, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 7 (2017) 024539.
- [31] V.W. Chow, M.P. Mattson, P.C. Wong, P. M. Gleichmann, *An overview of APP processing enzymes and products*, Neuromolecular Medicine, 12 (2010) 1-12.
- [32] G.M. Ashraf, N.H. Greig, T.A. Khan, I. Hassan, S. Tabrez, S. Shakil, I.A. Sheikh, S.K. Zaidi, M. Akram, N.R. Jabir, *Protein misfolding and aggregation in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus*, CNS & Neurological Disorders - Drug Targets 13 (2014) 1280-1293.
- [33] T. Kanekiyo, H. Xu, G. Bu, *ApoE and A β in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners*, Neuron, 81 (2014) 740-754.
- [34] <https://www.ptglab.com/news/blog/vascular-dysfunction-in-alzheimer-s-disease/> (pristup 12. lipnja 2024.)
- [35] E. Drolle, F. Hane, B. Lee, Z. Leonenko, *Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease*, Drug Metabolism Reviews, 46 (2014) 1-17.
- [36] B. Nizynski, W. Dzwolak, K. Nieznanski, *Amyloidogenesis of Tau protein*, The Protein Society, 26 (2017) 2126-2150.
- [37] D.W. Wesson, R.A. Nixon, E. Levy, D.A. Wilson, *Mechanisms of neural and behavior dysfunction in Alzheimer's disease*, Molecular neurobiology, 43 (2011) 163-179.
- [38] <https://www.stressmarq.com/amyloid-hypothesis-vs-tau-hypothesis/?v=3e8d115eb4b3> (pristup 12. lipnja 2024.)
- [39] D.E. Edmondson, C. Binda, Monoamine oxidases, In: J. Harris, E. Boekema, (eds) *Membrane protein complexes: Structure and function*, Subcellular Biochemistry, 87 (2018) 117-139.

- [40] A. Singh, K. Singh, J. Kaur, R. Kaur, A. Sharma, J. Kaur, U. Kaur, R. Chadha, P.M. Singh Bedi, *Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Diversity of 1,2,3-Triazole Scaffold in Drug Development: Design Strategies, Structural Insights, and Therapeutic Potential*, ACS Chemical Neuroscience, 14 (2023) 3291-3317.
- [41] T. Behl, D. Kaur, A. Sehgal, S. Singh, N. Sharma, G. Zengin, F.L. Andronie-Cioara, M.M. Toma, S. Bungau, A.G. Bumbu, *Role of monoamine oxidase activity in Alzheimer's disease: an insight into the therapeutic potential of inhibitors*, Molecules, 26 (12) (2021) 3724.
- [42] R.I. Teleanu, A.G. Niculescu, E. Roza, O. Vladacenco, A.M. Grumezescu, D.M. Teleanu, *Neurotransmitters-Key Factors in Neurological and Neurodegenerative Disorders of the Central Nervous System*, International Journal of Molecular Sciences, 23 (2022) 5954.
- [43] E. Tamagno, M. Guglielmotto, V. Vasciaveo, M. Tabaton, *Oxidative stress and beta amyloid in Alzheimer's disease. Which comes first: The chicken or the egg?*, Antioxidants, 10 (2021) 1479.
- [44] M. Simunkova, SH. Alwasel, I. M. Alhazza, K. Jomova, V. Kollar, M. Rusko, M. Valko, *Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease*, Archives of Toxicology, 93 (2019) 2491-2513.
- [45] R. Cascella, C. Cecchi, *Calcium Dyshomeostasis in Alzheimer's Disease Pathogenesis*, International Journal of Molecular Sciences, 22 (2021) 4914.
- [46] B.C.K. Tong, A.J. Wu, M. Li, K.H. Cheung, *Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies*, Bbamcr (2018).
- [47] E. Pchitskaya, E. Popugaeva, I. Bezprozvanny, *Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases*, Cell Calcium, 70 (2018) 87-94.
- [48] O.J. Olajide, I.T. Gbadamosi, E.O. Yawson, T. Arogundade, F.S. Lewu, K.Y. Ogunrinola, O.O. Adigun, O. Bamisi, E. Lambe, L.O. Arietarhire, O.O. Oluyomi, O.K. Idowu, R. Kareem, N.T. Asogwa, P.A. Adeniyi, *Hippocampal Degeneration and Behavioral Impairment During Alzheimer-Like Pathogenesis Involves Glutamate Excitotoxicity*, Journal of Molecular Neuroscience, 71 (2021) 1205-1220.
- [49] C. Giorgi, S. Marchi, P. Pinton, *The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 19 (2018) 713-730.
- [50] S.N. Rai, C. Singh, A. Singh, M.P. Singh, B.K. Singh, *Mitochondrial Dysfunction: a Potential Therapeutic Target to Treat Alzheimer's Disease*, Molecular Neurobiology (2020).

- [51] A. Misrani, S. Tabassum, L. Yang, *Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease*, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13 (2021).
- [52] *2019 Alzheimer's disease facts and figures*, *Alzheimer's & Dementia*, 15 (2019) 321-387.
- [53] O. Sheppard, M. Coleman, *Alzheimer's disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis in Alzheimer's disease: Drug Discovery*, O. Sheppard, M. Coleman, X. Huang (Eds.), Exon Publications, Brisbane, Australia (2020).
- [54] T.H. Wong, H. Seelaar, S. Melhem, A. J. Rozemuller, J.C. van Swieten, *Genetic screening in early-onset Alzheimer's disease identified three novel presenilin mutations*, *Neurobiology of Aging*, 86 (2020) 201.e9-201.e14.
- [55] J. Hoogmartens, E. Hens, S. Engelborghs, P.P. De Deyn, J. van der Zee, C. Van Broeckhoven, R. Cacace, *Investigation of the role of matrix metalloproteinases in the genetic etiology of Alzheimer's disease*, *Neurobiology of Aging*, (2021) 104-105.
- [56] I. Šutić, M. Bubaš, A. Bulog, *Uloga matriks metaloproteinaza u razvoju bolesti uzrokovanim čimbenicima okoliša*, 65 (2023) 191-199.
- [57] S. Rivera, L. García-González, M. Khrestchatisky, et al, *Metalloproteinases and their tissue inhibitors in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76 (2019) 3167-3191.
- [58] N.J. Justice, *The relationship between stress and Alzheimer's disease*, *Neurobiology of Stress*, 8 (2018) 127-133.
- [59] K. Pietrzak, K. Czarnecka, E. Mikiciuk-Olasik, P. Szymanski, *New Perspectives of Alzheimer Disease Diagnosis – the Most Popular and Future Methods*, *Medicinal Chemistry*, 14 (2018).
- [60] K. Blennow, H. Zetterberg, *Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future*, *Journal of Internal Medicine*, 284 (2018) 643-663.
- [61] B. Shui, D. Tao, A. Florea, J. Cheng, Q. Zhao, Y. Gu, W. Li, N. Jaffrezic Renault, Y. Mei, Z. Guo, *Biosensors for Alzheimer's disease biomarker detection: A review*, *Biochimie*, 147 (2018) 13-24.
- [62] G. Chételat, J. Arbizu, H. Barthel, V. Garibotto, I. Law, S. Morbelli, A. Drzezga, *Amyloid-PET and 18F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias*, *The Lancet Neurology*, 19 (2020) 951-962.
- [63] M. Chapleau, L. Iaccarino, D. Soleimani-Meigooni, G.D. Rabinovici, *The Role of Amyloid PET in Imaging Neurodegenerative Disorders: A Review*, *Journal of Nuclear Medicine*, 63 (2022) 13S-19S.

- [64] A. Mobed, M. Hasanzadeh, *Biosensing: The best alternative for conventional methods in detection of Alzheimer's disease biomarkers*, International Journal of Biological Macromolecules, 161 (2020) 59-71.
- [65] T. Hu, S. Lu, C. Chen, J. Sun, X. Yang, *Colorimetric sandwich immunosensor for A β (1-42) based on dual antibody-modified gold nanoparticles*, Sensors and Actuators B: Chemical, 243 (2017) 792-799.
- [66] S.A. Khan, M.J. Akhtar, U. Gogoi, D.U. Meenakshi, A. Das, *An Overview of 1, 2, 3-triazole-Containing Hybrids and Their Potential Anticholinesterase Activities*, Pharmaceuticals, 16 (2023) 179.
- [67] E. Bonandi, M.S. Christodoulou, G. Fumagalli, D. Perdicchia, G. Rastelli, D. Passarella, *The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry*, Drug Discovery Today, 22 (2017) 1572-1581.
- [68] L.M. Rečnik, W. Kandoll, T.L. Mindt, *1,4-Disubstituted 1,2,3-triazoles as amide bond surrogates for the stabilisation of linear peptides with biological activity*, Molecules, 25 (2020) 3576.
- [69] G. Le-Nhat-Thuy, N.N. Thi, H. Pham-The, T.A.D. Thi, H.N. Thi, T.H.N. Thi, S.N. Hoang, T. Van Nguyen, *Synthesis and biological evaluation of novel quinazoline-triazole hybrid compounds with potential use in Alzheimer's disease*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 30 (2020) 127404.
- [70] M. Mohammadi-Khanaposhtani, M. Saeedi, N.S. Zafarghandi, M. Mahdavi, R. Sabourian, E.K. Razkenari, H. Alinezhad, M. Khanavi, A. Foroumadi, A. Shafiee, T. Akbarzadeh, *Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, biological evaluation, and docking study of acridone linked to 1,2,3-triazole derivatives*, European Journal of Medicinal Chemistry, 92 (2015) 799-806.
- [71] M. Mohammadi-Khanaposhtani, M. Mahdavi, M. Saeedi, R. Sabourian, M. Safavi, M. Khanavi, A. Foroumadi, A. Shafiee, T. Akbarzadeh, *Design, synthesis, biological evaluation, and docking study of acetylcholinesterase inhibitors: New acridone-1,2,4-oxadiazole-1,2,3-triazole hybrids*, Chemical biology & drug design, 86 (2015) 1425-1432.
- [72] Z. Najafi, M. Mahdavi, M. Saeedi, E. Karimpour-Razkenari, R. Asatouri, F. Vafadarnejad, F.H. Moghadam, M. Khanavi, M. Sharifzadeh, T. Akbarzadeh, *Novel tacrine-1,2,3-triazole hybrids: In vitro, in vivo biological evaluation and docking study of cholinesterase inhibitors*, European journal of medicinal chemistry, 125 (2017) 1200-1212.

- [73] H. Sugimoto, Y. Yamanish, Y. Iimura, Y. Kawakami, *Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors*, Current Medicinal Chemistry, 7 (2000) 303-339.
- [74] T.T. Lan, D.T. Anh, D.T.M. Dung, L.T.T. Huong, E.J. Park, H.W. Jeon, J.S. Kang, N.T. Thuan, S.B. Han, N.H. Nam, *Design, synthesis, and bioevaluation of novel oxoindolin-2-one derivatives incorporating 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole*, Medicinal Chemistry Research, 29 (2020) 396-408.
- [75] M. Saeedi, A. Maleki, A. Iraj, R. Hariri, T. Akbarzadeh, N. Edraki, O. Firuzi, S.S. Mirfazli, *Synthesis and bio-evaluation of new multifunctional methylindolinone-1,2,3-triazole hybrids as anti-Alzheimer's agents*, Journal of Molecular Structure, 1229 (2021) 129828.
- [76] S. Im, H. Choi, Y.H. Jeon, M.K. Song, W. Kim, J. M. Woo, *Comparison of effect of twohour exposure to forest and urban environments on cytokine, anti-oxidant, and stress levels in young adults*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 13 (2016) 625.
- [77] G.X. Mao, X.G. Lan, Y.B. Cao, Z.M. Chen, Z.H. He, Y.D. Lv, Y.Z. Wang, X.L. Hu, G.F. Wang, Y. Jing, *Effects of short-term forest bathing on human health in a broad-leaved evergreen forest in Zhejiang Province, China*, Biomedical and Environmental Sciences, 25 (2012) 317-324.
- [78] M. Shin, Q.F. Liu, B. Choi, C. Shin, B. Lee, C. Yuan, K.S. Cho, *Neuroprotective effects of limonene (+) against A β 42-induced neurotoxicity in a Drosophila model of Alzheimer's disease*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 43 (2019) 409-417.
- [79] K. Yoshiyama, H. Arita, J. Suzuki, *The Effect of Aroma Hand Massage Therapy for People with Dementia*, Journal of Alternative and Complementary Medicine, 2 (2015) 759-765.
- [80] A. Herman, A.P. Herman, *Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 67 (2015) 473-485.
- [81] K.A. Wojtunik-Kulesza, K. Targowska-Duda, K. Klimek, G. Ginalska, K. Jóźwiak, M. Waksmundzka-Hajnos, Ł. Cieřła, *Volatile terpenoids as potential drug leads in Alzheimer's disease*, Open Chemistry, 15 (2017).
- [82] A.M. Pisoschi, A. Pop, C. Cimpeanu, G. Predoi, *Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016 (2016) 9130976.

- [83] T. Kim, B. Song, K.S. Cho, I.S. Lee, *Therapeutic Potential of Volatile Terpenes and Terpenoids from Forests for Inflammatory Diseases*, International Journal of Molecular Sciences, 21 (2020) 2187.
- [84] I. Piccialli, V. Tedeschi, L. Caputo, G. Amato, L. De Martino, V. De Feo, A. Pannaccione, *The Antioxidant Activity of Limonene Counteracts Neurotoxicity Triggered by A β 1-42 Oligomers in Primary Cortical Neurons*, Antioxidants, 10 (2021) 937.
- [85] L. Aliberti, L. Caputo, V. De Feo, L. De Martino, F. Nazzaro, L.F. Souza, *Chemical Composition and in Vitro Antimicrobial, Cytotoxic, and Central Nervous System Activities of the Essential Oils of Citrus medica L. cv. 'Liscia' and C. medica cv. 'Rugosa' Cultivated in Southern Italy*, Molecules, 21 (2016) 1244.
- [86] M. Shin, Q.F. Liu, B. Choi, C. Shin, B. Lee, C. Yuan, Y.J. Song, H.S. Yun, I.S. Lee, B.S. Koo, et al., *Neuroprotective Effects of Limonene (+) against A β 42-Induced Neurotoxicity in a Drosophila Model of Alzheimer's Disease*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 43 (2020) 409-417.
- [87] F. Maqoud, R. Scala, M. Hoxha, B. Zappacosta, D. Tricarico, *ATP-sensitive potassium channel subunits in the neuroinflammation: Novel drug targets in neurodegenerative disorders* CNS & Neurological Disorders – Drug Targets, 21 (2022) 130-149.
- [88] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*, John Wiley and Sons, 2. izdanje, West Sussex, England (2007) str. 16-20.
- [89] D.C. Young, *Computational Chemistry*, John Wiley and Sons, New York, USA (2001).
- [90] J.B. Foresman, A. Frisch, I. Gaussian, *Exploring chemistry with electronic structure methods*, 2. izdanje, Gaussian Inc., Pittsburgh, USA (1996).
- [91] D. Šakić, *Kvantno-kemijsko istraživanje reakcija pregrađivanja odabranih psihofarmaka*, Disertacija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (2015).
- [92] S.M. Bachrach, *Computational organic chemistry*, Wiley-Interscience, Hoboken, USA (2007).
- [93] I. Nikšić-Franjić, *Računalno istraživanje reakcija slobodnih radikala s halogeniranim organskim spojevima u vodenim otopinama*, Disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu (2020).
- [94] Y. Zhao, D.G. Truhlar, *Theoretical Chemistry Accounts*, 120 (2008) 215-241.
- [95] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A.V.

- Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J.V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J.J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T.A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, Gaussian Inc, Wallingford CT (2016).
- [96] P. Kirkpatrick, *Virtual screening: gliding to success*, Nature Reviews Drug Discovery, 3 (2004) 299.
- [97] F. Stanzione, I. Giangreco, J.C. Cole, *Use of molecular docking computational tools in drug discovery*, Progress in Medicinal Chemistry, 60 (2021) 273-343.
- [98] J.A.T. Ewing, I.D. Kuntz, *Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening*, Journal of Computational Chemistry, 18 (1997) 1175.
- [99] P. Kolb, R.S. Ferreira, J.J. Irwin, B.K. Shoichet, *Docking and chemoinformatic screens for new ligands and targets*, Current Opinion in Biotechnology, 20 (2009) 429-436.
- [100] A.N. Jain, *Scoring functions for protein ligand docking*, Current Protein & Peptide Science, 7 (2006) 407-420.
- [101] S.J. Teague, *Implications of protein flexibility for drug discovery*, Nature Reviews Drug Discovery, 2 (2003) 527-541.
- [102] G.P.A. Vigers, J.P. Rizzi, *Multiple active site corrections for docking and virtual screening*, Journal of Medicinal Chemistry, 47 (2004) 80-89.
- [103] D.A. Antunes, D. Devaurs, L.E. Kavraki, *Understanding the challenges of protein flexibility in drug design*, Expert Opinion on Drug Discovery, 10 (2015) 1301-1313.
- [104] R.T. Kroemer, *Structure-based drug design: docking and scoring*, Current Protein & Peptide Science, 8 (2007) 312-328.
- [105] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, *Journal of Computational Chemistry*, 30 (2009) 2785-2791.

SAŽETAK

Inhibicija enzima kolinesteraza tienbenzo/nafto-triazolima - Fotokemijska sinteza, genotoksičnost i molekulsko modeliranje

Cilj ovog rada bila je sinteza novih 1,2,3-triazolnih stilbena i njihovih fotokemijskih produkata kao potencijalnih biološki aktivnih spojeva. Prvi stupanj pripreve bila je sinteza triazolnih aldehida **1-6**, koji su zatim s odgovarajućim trifenilfosfonijevim solima Wittigovom reakcijom prevedeni u smjese *cis*- i *trans*-izomera novih triazolostilbena **7-14**. Tako dobivene smjese izomera novih triazolostilbena **7-14** podvrgnute su fotokemijskim reakcijama, prilikom kojih dolazi do elektrocikličkog zatvaranja šesteročlanog prstena te aromatizacije u tienbenzo/naftotriazole **15-22**. Dobiveni su spojevi spektroskopski okarakterizirani ^1H i ^{13}C NMR tehnikama te MS i HRMS analizom. Ispitivanja biološke aktivnosti novih tienbenzo/naftotriazola **15-22** provedena su u smislu istraživanja mogućnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). S obzirom na dobivene IC_{50} vrijednosti, vrlo dobru inhibicijsku aktivnost prema BChE pokazali su spojevi **16-19**, za koje su provedene računalne analize i ispitivanja molekuskog pristajanja. Dodatno, ispitivanja mutagenog potencijala sintetiziranih tienbenzo/naftotriazola **15-22** pokazala su prihvatljive vrijednosti.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, elektrociklizacija, kolinesteraze, molekulsko pristajanje, tienbenzo/naftotriazoli

SUMMARY

Inhibition of cholinesterase enzymes by thienobenzo/naphtho-triazoles - Photochemical synthesis, genotoxicity and molecular modeling

The aim of this study was the synthesis of new 1,2,3-triazole stilbenes and their photochemical products as potential biologically active compounds. The first stage of preparation involved the synthesis of triazole aldehydes **1-6**, which were then converted into mixtures of *cis*- and *trans*-isomers of new triazole stilbenes **7-14** using the Wittig reaction with the corresponding triphenylphosphonium salts. The obtained mixtures of isomers of new triazole stilbenes **7-14** were subjected to photochemical reactions, leading to the electrocyclic closure of a six-membered ring and aromatization into thienobenzo/naphthotriazoles **15-22**. The resulting compounds were characterized spectroscopically using ^1H and ^{13}C NMR techniques and MS/HRMS analyses. The biological activity of the new thienobenzo/naphthotriazoles **15-22** was examined in terms of their potential to inhibit acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes. Based on the obtained IC_{50} values, compounds **16-19** showed very good inhibitory activity against BChE, for which computational analyses and molecular docking studies were conducted. Additionally, tests of the mutagenic potential of the synthesized thienobenzo/naphthotriazoles **15-22** showed acceptable values.

Keywords: Alzheimer's disease, cholinesterases, electrocyclization, molecular docking, thienobenzo/naphthotriazoles

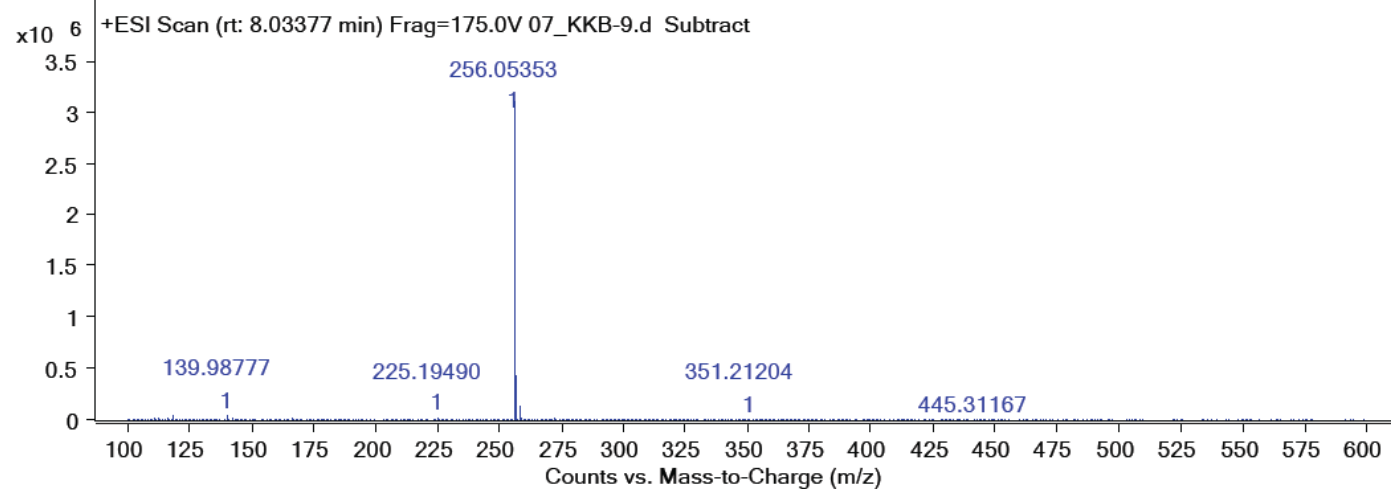
ŽIVOTOPISI

Karla Bulava rođena je 20. srpnja 2000. godine u Puli. Pohađala je Osnovnu školu Vidikovac, nakon čega 2015. godine upisuje Gimnaziju Pula, smjer opća gimnazija. Godine 2019. upisuje prijediplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. U akademskoj godini 2021./2022. primala je stipendiju grada Pule. Stručnu praksu tijekom prijediplomskog studija odradila je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Istarske županije na Odjelu za zdravstvenu ekologiju u Laboratoriju za ispitivanje pitkih i površinskih voda. Prijediplomski studij završava 2023. godine s težinskim prosjekom ocjena 3,983, čime dobiva akademski naziv sveučilišne prvostupnice primijenjene kemije. Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, s trenutnim težinskim prosjekom ocjena 4,267.

Karla Karadža rođena je 8. prosinca 2000. godine u Bjelovaru. Pohađala je Prvu osnovnu školu Bjelovar, nakon čega 2015. godine upisuje Medicinsku školu Bjelovar, smjer farmaceutski tehničar. Godine 2019. upisuje prijediplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu tijekom prijediplomskog studija odradila je na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju. Prijediplomski studij završava 2023. godine s težinskim procjekom ocjena 4,178, čime dobiva akademski naziv sveučilišne prvostupnice primijenjene kemije. Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu., s trenutnim težinskim prosjekom ocjena 4,600.

PRILOZI

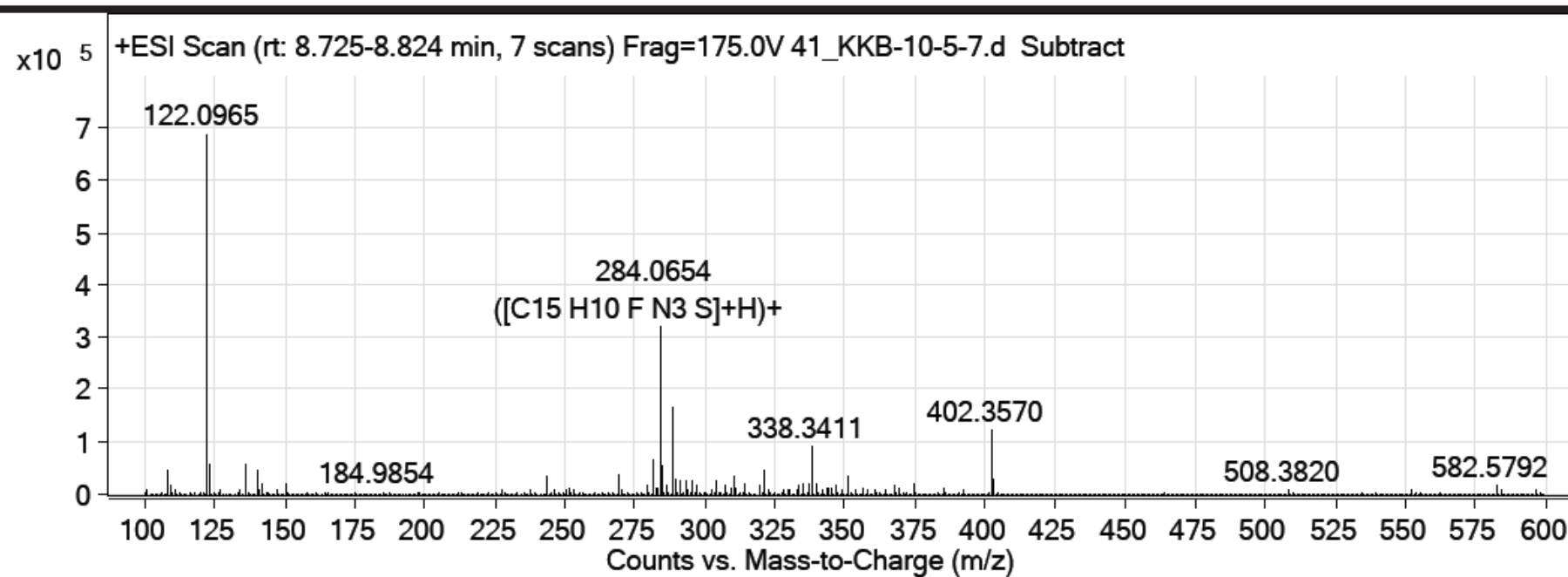
Maseni spektri i HRMS analize tienobenzotriazola 15-22



Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C13 H9 N3 O S	True	255.04633	255.04663	1.2	C13 H10 N3 O S	96.98

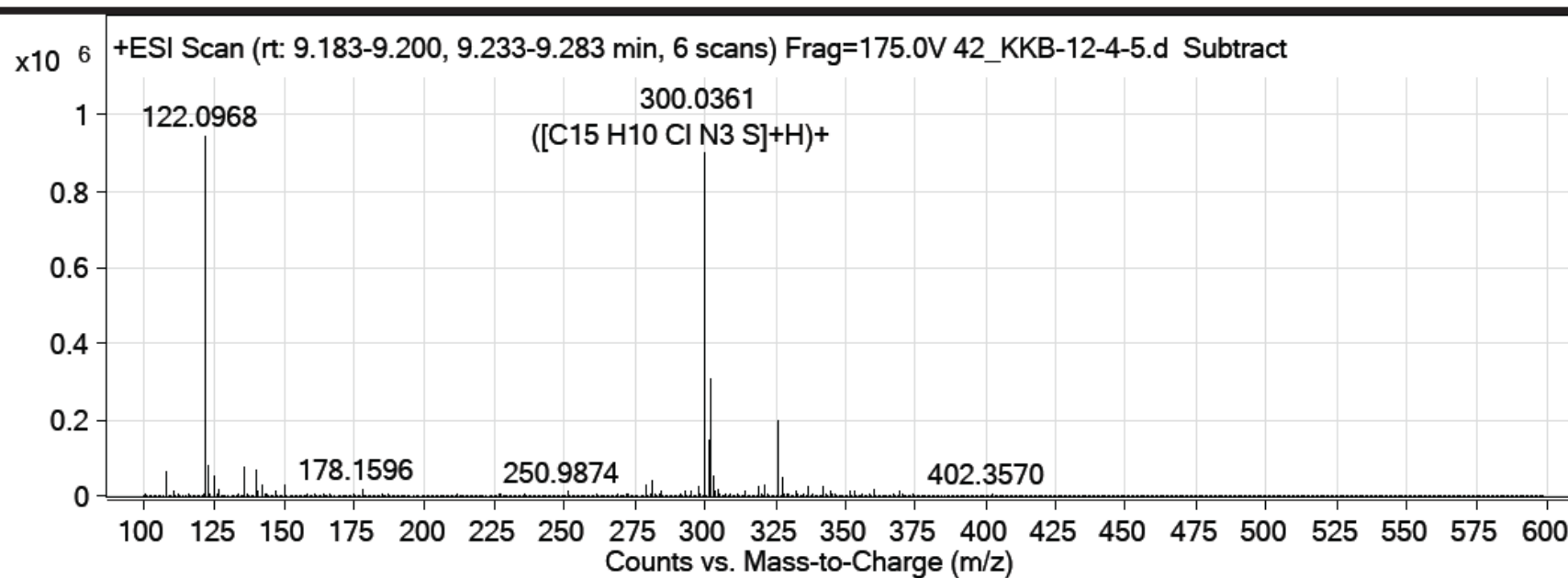
Slika P1. Maseni spektar i HRMS analiza spoja **15**.



Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C15 H10 F N3 S	True	283.0581	283.0579	-0.53	C15 H11 F N3 S	98.47

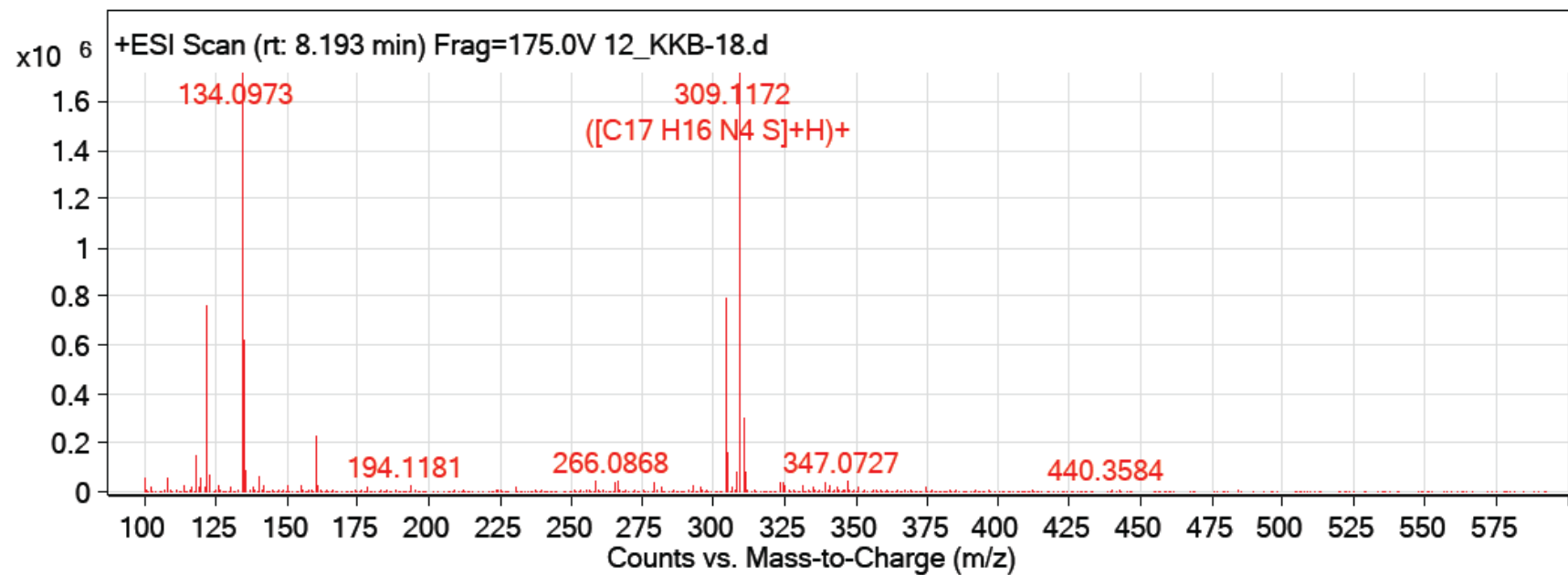
Slika P2. Maseni spektar i HRMS analiza spoja 16.



Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C15 H10 Cl N3 S	True	299.0288	299.0284	-1.5	C15 H11 Cl N3 S	97.66

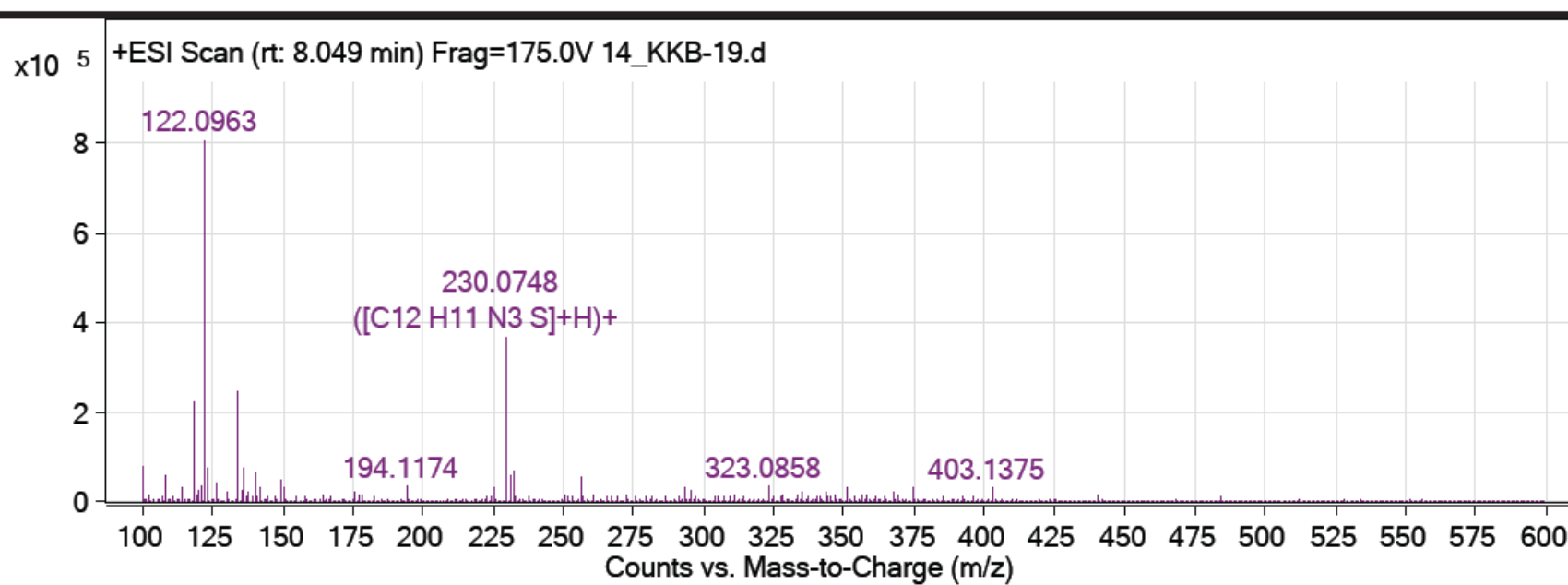
Slika P3. Maseni spektar i HRMS analiza spoja **18**.



Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C17 H16 N4 S	True	308.11	308.1096	-1.44	C17 H17 N4 S	96.35

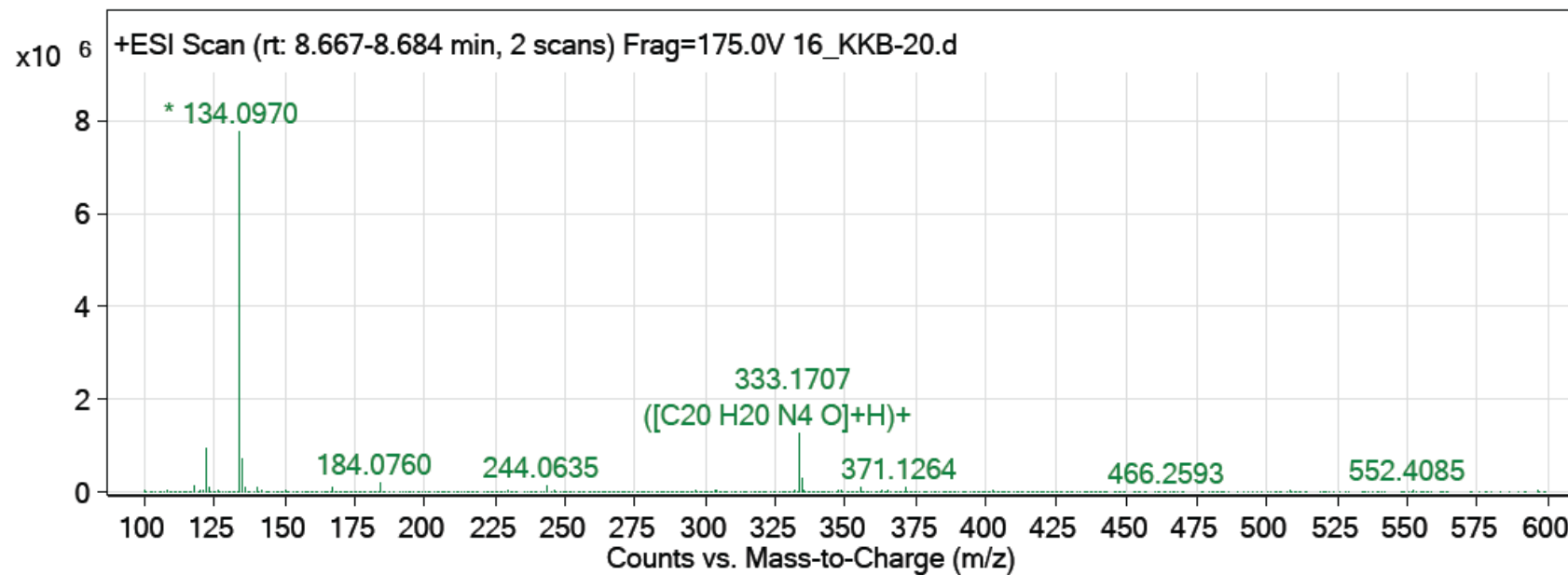
Slika P4. Maseni spektar i HRMS analiza spoja 19.



Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C12 H11 N3 S	True	229.0676	229.0674	-0.87	C12 H12 N3 S	47.44

Slika P5. Maseni spektar i HRMS analiza spoja 20.



Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C20 H20 N4 O	True	332.1635	332.1637	0.64	C20 H21 N4 O	98.1

Slika P6. Maseni spektar i HRMS analiza spoja **22**.