

Fotokemijska sinteza i molekulsko modeliranje novih klorovih derivata naftotriazola

Borić, Ingo

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:380437>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ingo Borić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidat **Ingo Borić**

Predao je izrađen diplomski rad dana: 05. srpnja 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Irena Škorić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Doc. dr. sc. Dragana Vuk, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Ljerka Kratožil Krehula, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Sanja Lučić Blagojević, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 10. srpnja 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
PRIMIENJENA ORGANSKA KEMIJA

Ingo Borić

Fotokemijska sinteza i molekulsko modeliranje novih klorovih derivata
naftotriazola

DIPLOMSKI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Irena Škorić

Komentor rada: dr. sc. Borislav Kovačević, viši znanstveni suradnik, IRB

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Irena Škorić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

izv. prof. dr. sc. Ljerka Kratofil Krehula

Zagreb, srpanj, 2024.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu i na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u

Grupi za računalne bioznanosti.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na pruženoj prilici pri izradi ovog, ali i prijašnjih radova. Također joj se zahvaljujem na svom uloženom trudu u prenošenju znanja,

na ukazanom povjerenju, pomoći i pozitivnosti prilikom izrade ovog rada i cjelokupnog

školovanja na fakultetu.

Zahvaljujem komentoru dr. sc. Borislavu Kovačeviću s Instituta Ruđer Bošković na

nesebičnoj pomoći, susretljivosti i stručnom vođenju kroz područje računalne

kemije.

Istovremeno, zahvaljujem i ostalim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju te Instituta Ruđer

Bošković na pristupačnosti, pomoći i ugodnoj atmosferi, a posebno asistentici Mileni

Mlakić i dr. sc. Danijeli Barić.

Posebno se zahvaljujem se svojim roditeljima i Antoniji na neizmjerne podršci i

motivaciji, svojim prijateljima Vedranu, Toniju, Luki i Ianu kao i ostaloj obitelji i

prijateljima.

Hvala Vam za svaki dan strpljenja, podrške i pomoći.

Sažetak

Fotokemijska sinteza i molekulsko modeliranje novih klorovih derivata naftotriazola

U svrhu proučavanja biološke aktivnosti, specifično inhibicije acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE), sintetizirani su novi derivati naftotriazola **11-15**. Sinteza se sastojala od tri koraka. Prvi korak je činila nukleofilna supstitucija, čime su nastali aldehidi **1-5**. Nastali aldehidi su u drugom koraku podvrgnuti Wittigovoj reakciji, gdje su kao produkti nastali *cis*- i *trans*- izomeri heterostilbena **6-10**. U posljednjem koraku, heterostilbeni su podvrgnuti fotokemijskoj ciklizaciji pri čemu su nastali naftotriazoli **11-15**, koji literaturno nisu poznati. Naftotriazoli **11-14** uspješno su sintetizirani, dok se naftotriazol **15** pokazao zahtjevnijim za sintezu te nije pronađen uspjeh pri njegovoj sintezi. Novi sintetizirani i izolirani spojevi okarakterizirani su 1D NMR tehnikama. Biološka ispitivanja pokazala su kako naftotriazoli **11-13** posjeduju inhibicijski potencijal prema BChE, dok **12** jedini pokazuje isti i prema AChE te ujedno pokazuje najbolje rezultate pri inhibiciji oba enzima. Elektronska struktura i termodinamička stabilnost sintetiziranih naftotriazola istraživana je računalnim modeliranjem, a s obzirom na rezultate bioloških ispitivanja, naftotriazol **12** računalno je ispitan kao potencijalni inhibitor enzima AChE i BChE.

Ključne riječi: fotokemijska sinteza, inhibicija AChE i BChE, kolinesteraze, naftotriazoli, računalno modeliranje

Summary

Photochemical synthesis and molecular modeling of new chlorine derivatives of naphthotriazole

In order to study the biological activity, specifically inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), new naphthotriazole derivatives **11-15** were synthesized. The synthesis consists of three steps. The first step was the nucleophilic substitution, resulting in aldehydes **1-5**. The aldehydes were subjected to the Wittig reaction in the second step, where *cis*- and *trans*-isomers of heterostilbenes **6-10** were formed as products. In the last step, heterostilbenes were subjected to photochemical cyclization, whereby naphthotriazoles **11-15** were formed, which are not known in the literature. Naphthotriazoles **11-14** were successfully synthesized, while naphthotriazole **15** proved to be more demanding for synthesis and no success was found in its synthesis. New synthesized and isolated compounds were characterized by 1D NMR techniques. Biological tests showed that naphthotriazoles **11-13** possess inhibitory potential towards BChE, while **12** is the only one showing the same activity also towards AChE and at the same time showed the best results in inhibiting both enzymes. The electronic structure and thermodynamic stability of synthesized naphthotriazoles were investigated by computer modeling, and considering the results of biological tests, naphthotriazole **12** was computationally tested as a potential inhibitor of AChE and BChE enzymes.

Key words: cholinesterases, computer modeling, inhibition of AChE and BChE, naphthotriazoles, photochemical synthesis

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Triazoli i njihovi derivati	3
2.2. Biološka aktivnost.....	7
2.2.1. Antiinflamatorna aktivnost.....	7
2.2.2. Anti-neurodegenerativna aktivnost	9
2.4. Računalno modeliranje.....	14
2.4.1. Teorija funkcionala (elektronske) gustoće	15
2.4.2. Optimizacija geometrije molekula	15
2.4.3. Doking.....	16
2.4.4. Molekulska dinamika.....	18
3. RASPRAVA I REZULTATI	20
3.1. Uvod	20
3.2. Sinteza novih triazolnih stilbena 6-10	22
3.2.1. Sinteza triazolnih aldehida 1-5	22
3.2.2. Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih heterostilbena 6-10	22
3.3. Fotokemijska ciklizacija triazolnih heterostilbena.....	26
3.3.1. Sinteza novih naftotriazola 11-15.....	27
3.3.2. Spektroskopska karakterizacija fotoprodukata	28
3.4. Biološka aktivnost.....	31
3.4.1. Inhibicija kolinesteraza	31
3.5. Računalno modeliranje.....	35
4. EKSPERIMENTALNI DIO	41
4.1. Opće napomene	41
4.2. Sinteza spojeva 1 - 5	41
4.3. Sinteza spojeva 6 - 10	43
4.4. Sinteza spojeva 11 - 14.....	46
POPIS SIMBOLA	50
5. ZAKLJUČAK.....	52
6. LITERATURA.....	54
ŽIVOTOPIS.....	60
PRILOZI	61

1. UVOD

S namjerom pronalaska novih molekula koje bi uz inhibicijsko djelovanje prema enzimima kolinesterazama (ChE) imale i protuupalno djelovanje, velika je pozornost na naftotriazolima i njihovim derivatima, koji su poznati po obećavajućim potencijalnim terapijskim učincima. Posebice su u tom smislu interesantni njihovi klorirani derivati.

Acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE) dva su srodna enzima pristuna kod biljaka i kralježnjaka.¹ Značajna razlika je u njihovom aktivnom mjestu gdje AChE bilježi prisutnost 14 aromatskih aminokiselinskih ostataka, dok je osam aromatskih i šest alifatskih ostataka u BChE², zbog čega BChE hidrolizira značajno više molekula nego AChE.³⁻⁶ Enzim AChE obnaša vrlo važnu ulogu u tijelu kontrolirajući kanaliziranje živčanih impulsa u kolinergičkim sinapsama središnjeg i perifernog živčanog sustava hidrolizom neurotransmitera acetilkolina. Također, AChE sudjeluje i u procesima kao što su aktivacija dopaminskih neurona i stvaranje amiloidnih vlakana karakterističnih za Alzheimerovu bolest (AD).⁷⁻⁹ S druge strane, BChE sudjeluje u katalitičkoj i stehiometrijskoj detoksikaciji ksenobiotika (organofosfati, aspirin) i bioaktivaciji droga (heroin).^{10,11} Vrlo važna je i mogućnost BChE u koregulaciji kolinergičke neurotransmisije, čime učinkovito katalizira hidrolizu acetilkolina.¹² Utvrđeno je da su visoke razine BChE direktno povezane s distinktivnom neuropatološkom karakteristikom AD.^{13,14} Zbog sudjelovanja AChE u stvaranju amiloidnih vlakana karakterističnih za AD te zbog povezanosti visokih razina BChE s pojavom AD, AChE i BChE su prikladne farmakološke mete u neurodegenerativnim poremećajima. Liječenje ovih poremećaja trenutno uključuje inhibitore kolinesteraza kao što su galantamin, donepezil ili rivastigmin,¹⁵ stoga se mnogi drugi spojevi koji djeluju kao inhibitori kolinesteraza smatraju potencijalno korisnima za AD.¹⁶⁻²⁰

Prošla istraživanja pokazala su kako derivati tienobenzona/naftotriazola imaju potencijalnu mogućnost inhibicije ChE, dok su naftotriazoli pokazali uz to i protuupalnu aktivnost.²¹ Dobiven je uvid u biološku aktivnost naftotriazola i tienobenzona/naftotriazola, pri čemu su naftotriazoli pokazali bolje rezultate inhibicije TNF- α citokina, a time i bolju povezanost inhibicije ChE i antiinflamatornog djelovanja.²² Daljni derivati su također pokazali obećavajuće rezultate, no među njima se isticao derivat sa supstituiranim klorom na arilnom prstenu te butenilnim supstituentom na triazolnom prstenu koji je pokazao izvrsnu inhibiciju ChE, no ne i protuupalnu aktivnost. Zaključeno je da kombinacija supstitucije na arilnom i triazolnom prstenu igra značajnu ulogu u biološkoj aktivnosti ovih derivata.²³

Kako bi se dobio dodatni uvid u biološku aktivnost srodnih derivata, u ovom istraživanju sintetizirana su 4 derivata naftotriazola koji se razlikuju po supstituentu vezanom na triazolni prsten. Ovo istraživanje ima za cilj ispitati njihov inhibicijski potencijal prema kolinesterazama (osobito BChE) te identificirati najznačajnije interakcije odgovorne za eksperimentalno dobivenu inhibiciju kolinesteraza. Molekularno pristajanje odabranih novih kloriranih derivata naftotriazola u aktivno mjesto AChE i BChE daje uvid u strukturu formiranih kompleksa i omogućuje prepoznavanje stabilizacijskih interakcija između potencijalnog inhibitora i enzima.

2. OPĆI DIO

2.1. Triazoli i njihovi derivati

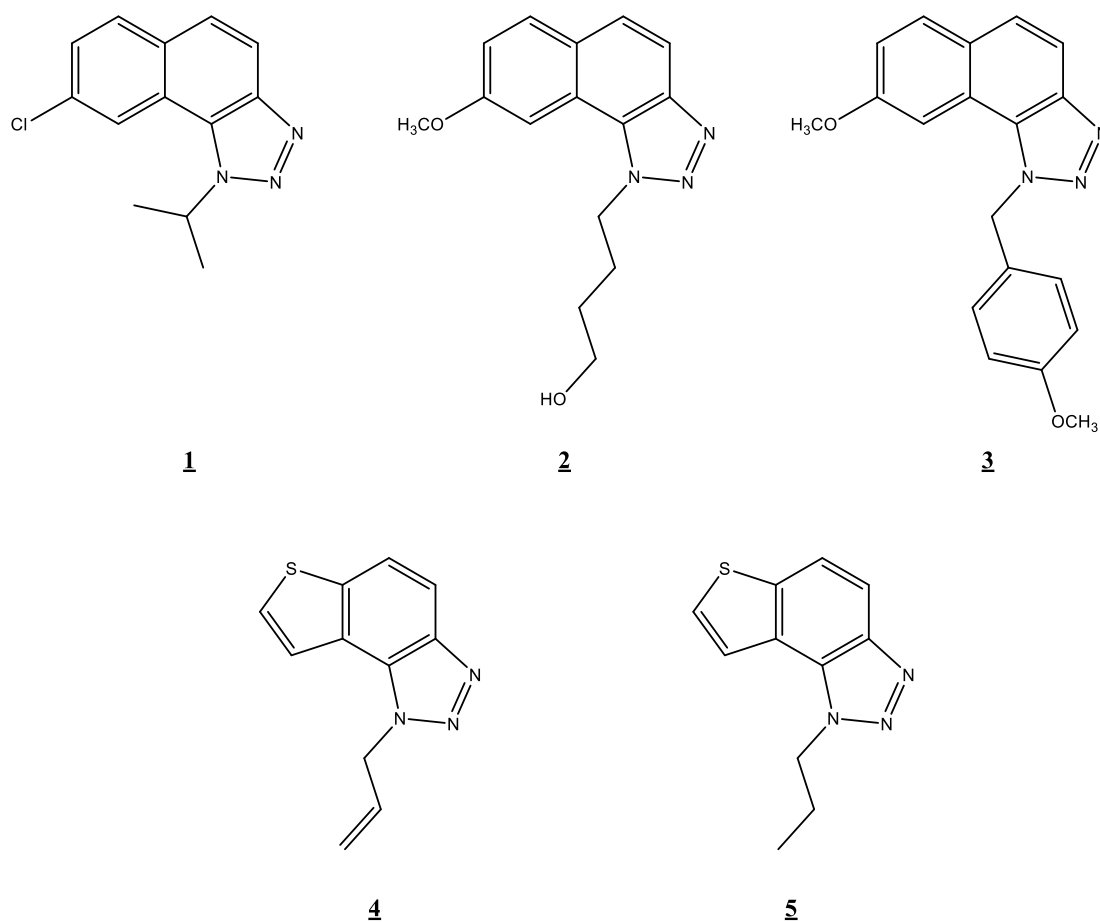
Triazoli privlače posebnu pozornost zbog svoje potencijalne primjene kao ljekovitih sredstava. Ova klasa spojeva često se koristi u agrokemikalijama, supramolekularnim ligandima te biomimetičkim katalizatorima²⁴ te pokazuje velik potencijal za daljnja istraživanja. Jedinstvena struktura triazola posljedica je prisutnosti tri atoma dušika i pratećeg bogatog sustava elektrona koji omogućuje triazolima i njegovim derivatima odličnu interakciju s nizom enzima i receptora u biološkim sustavima putem koordinacije, vodikovih veza, ionskih dipola, π,π -slaganja, hidrofobnog učinka, van der Waalsovih sila itd.²⁵

Triazolna jezgra prisutna je u spojevima koji posjeduju antimikrobna, antitumorska, antituberkulozna, antidepresivna i protuupalna djelovanja. Modifikacije triazola pokazale su se vrlo učinkovitima, a također se uočava da noviji derivati imaju bolju aktivnost i manju toksičnost. Između ostaloga, razvijaju se lijekovi s karakterističnom 1,2,3-triazolnom jezgrom za liječenje neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti (AD).²⁶ Triazolostilbeni se koriste u proizvodnji nelinearnih optičkih materijala, dok triazolni derivat prirodnog pigmenta kurkumina pokazuju značajnu biološku aktivnost i spektroskopska svojstva. Ovi spojevi su pogodni za daljnja istraživanja zbog njihove lako ostvarive promjene strukture.²⁷ Nadalje, lijekovi poput etiozolama, alprazolama i votikonazola, koji su izvedeni iz jezgre 1,2,4-triazola, dokazani su relaksanti mišića, protuupalni lijekovi i antifungicidi.²⁸⁻³⁰

Nesteroidni protuupalni lijekovi imaju široku terapijsku primjenu u liječenju raznih vrsta upalnih stanja. Dugotrajna primjena ovih lijekova ima štetne učinke na gastrointestinalni trakt i posljedično dovodi do problema kao što su oštećenje bubrega, čir na želucu i hepatotoksičnost.³¹ Upravo zato se nastoji sintetizirati nove vrste ovih spojeva koji bi trebali biti visoko učinkoviti i poboljšane sigurnosti kako bi se upale suzbile te kako bi bilo što manje neželjenih učinaka.

Upravo se ovo istraživanje nadovezuje na prethodna tri koja su dala odlične rezultate te poslužila kao podloga za daljnji razvoj derivata naftotriazola.²¹⁻²³ Kao podloga ovih istraživanja poslužili su 1,2,3-triazolo-stilbeni te tienobenzonaftotriazoli. Iako su se 1,2,3-triazolo-stilbeni pokazali kao uspješni inhibitori TNF- α , znatno bolje rezultate su postigli derivati tienobenzonaftotriazola (**1**, **2**, **3**) (Slika 2.1.). Posebno se ovdje ističe derivat **3** koji ima supstituiranu metoksi-skupinu na arilnom prstenu te *para*-metoksibenzilnu skupinu na triazolnom prstenu. S

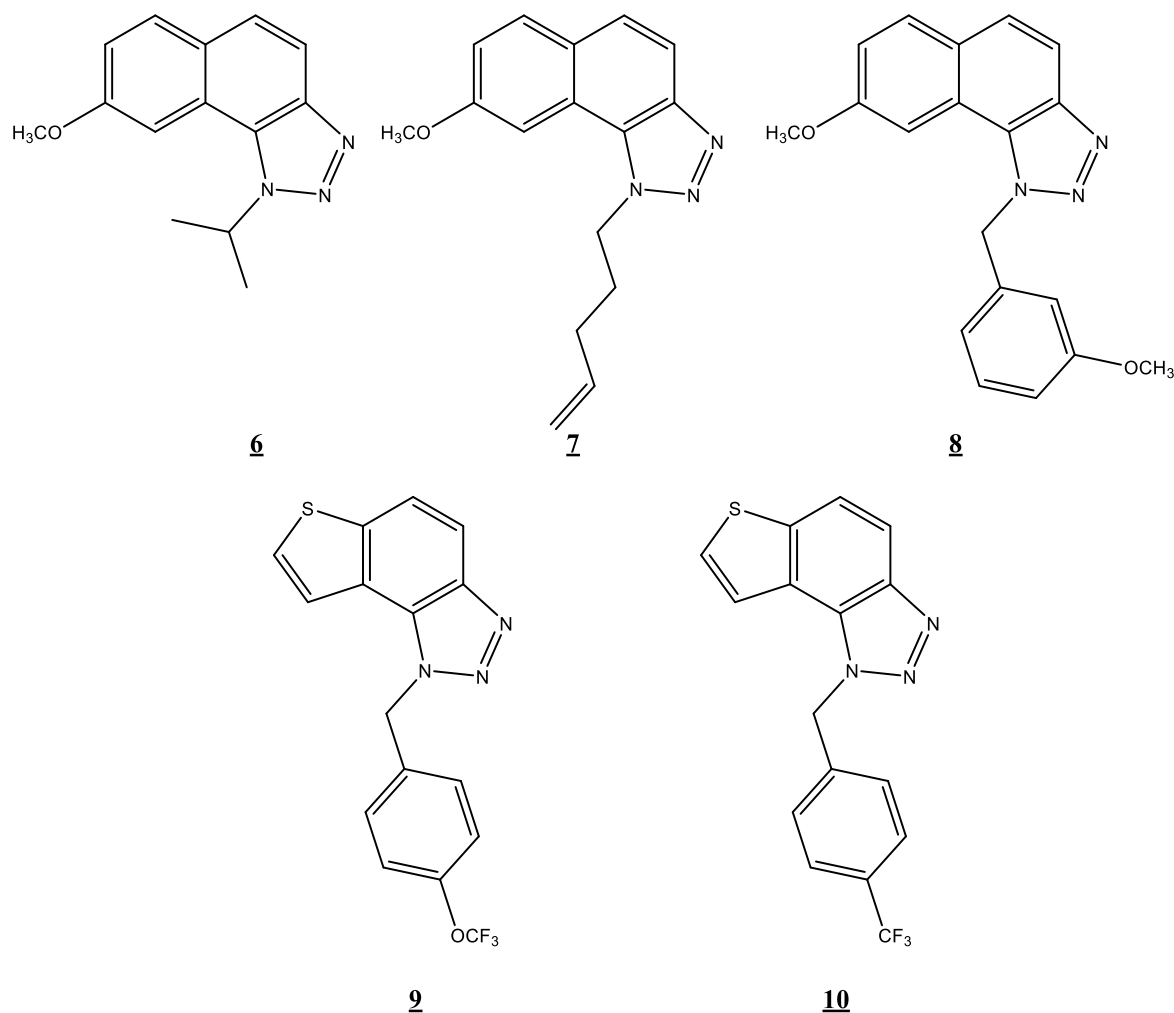
druge strane, ovaj derivat nije pokazao inhibicijsko djelovanje. Najbolju inhibicijsku aktivnost pokazali su tiofenski derivati što nam ukazuje na to da tiofenska jezgra povećava inhibicijsku aktivnost prema kolinesterazama. Upravo su takvi derivati **4** i **5**, pri čemu derivat **4** pokazuje odlične rezultate kod oba enzima. Kao što je već spomenuto, inhibitori ChE mogu imati i antiinflamatorno djelovanje, a rezultati navedenih derivata upravo i potvrđuju ovo povezano djelovanje.²¹



Slika 2.1. Strukture derivata tienobenzo/nafto-triazola **1-5** s dokazanom protuupalnom i anti-neurodegenerativnom aktivnošću.²¹

Daljnje istraživanje dalo je nove rezultate u kojima novi 1,2,3-naftotriazoli pokazuju vrlo dobre rezultate inhibicije proizvodnje TNF- α (**6**, **7**, **8**), no konkuriraju im također tienobenzo/nafto-triazoli (**9**, **10**) (Slika 2.2.). Također, derivat **7** pokazao je obećavajuće rezultate inhibicije prema kolinestrezama, no još uvijek slabije od standarda, galantamina.

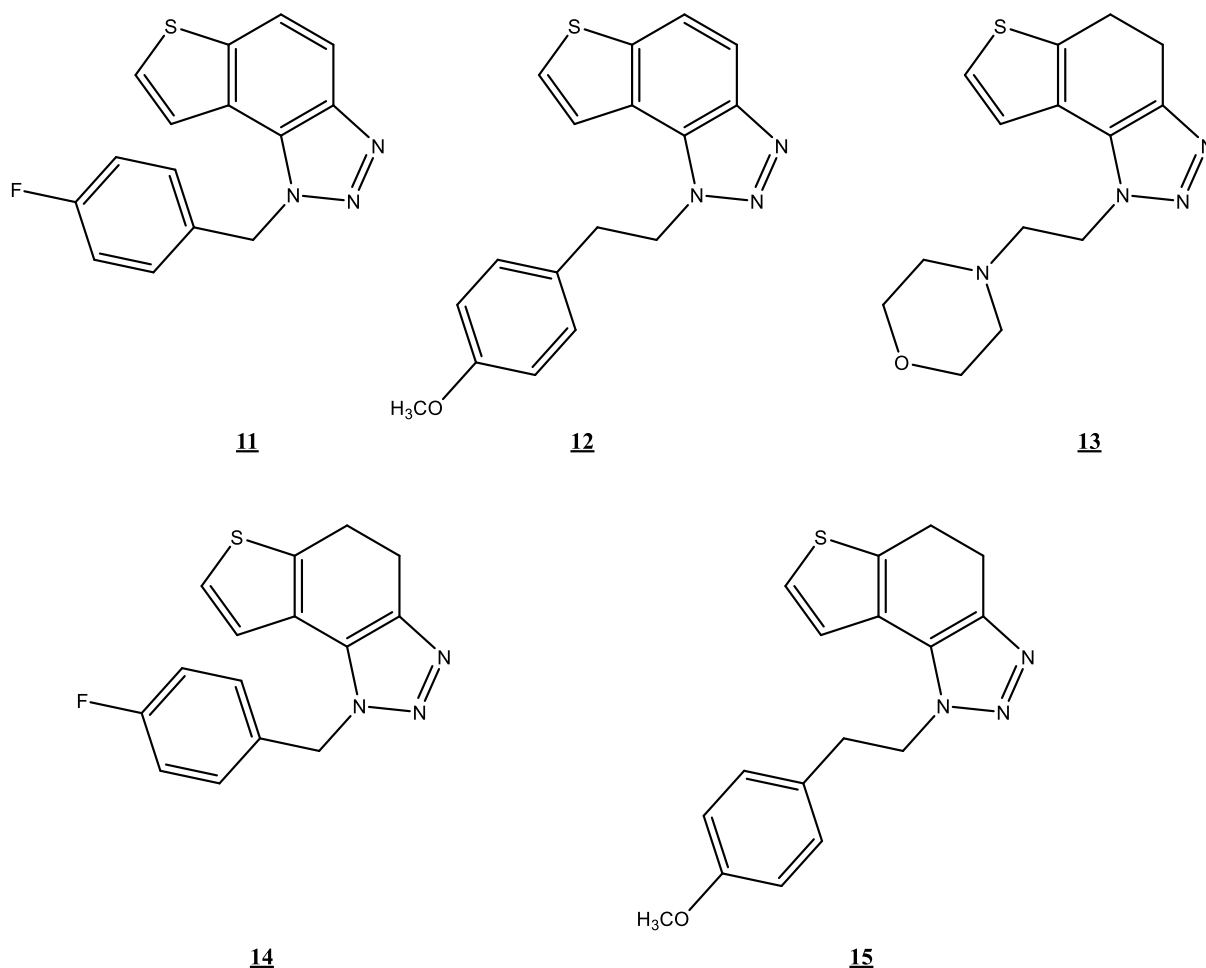
Istraživanje je pokazalo kako pristunost metoksi-skupine na arilnom prstenu znatno utječe na inhibicijska svojstva prema AChE.²²



Slika 2.2. Strukture derivata tienobenzo/nafto-triazola **6-10** s dokazanom protuupalnom i anti-neurodegenerativnom aktivnošću.²²

Navedena istraživanja pokazala su kako određeni derivati pokazuju odlično protuupalno djelovanje (**1**, **2**, **6**), no s druge strane to ne mora značiti da će imati i odlično inhibicijsko djelovanje. Za takve derivate može se pretpostaviti da nemaju povezano protuupalno i inhibicijsko djelovanje, već djeluju protuupalno nekim drugim mehanizmom. Također, veliku ulogu u konačnom djelovanju naftotriazola igra kombinacija supstituenata na arilnom i triazolnom prstenu. Upravo se posljednje istraživanje usmjerilo na otkrivanje najbolje kombinacije supstituenata. Najbolju inhibicijsku aktivnost prema kolinesterazama pokazao je

derivat **11** (Slika 2.3.) s *para*-flurbenzilnom skupinom vezanom na triazolni prsten. Osim toga, usporedbom derivata **12** i **13** s derivatima **14** i **15** (Slika 2.3.), ustanovljeno je kako najveći utjecaj na aktivnost ima supstituent na triazolnom prstenu, te da aktivnost slabije ovisi o prirodi središnjeg prstena.²³



Slika 2.3. Strukture derivata tienbenzo/nafto-triazola **11-15** s dokazanom protuupalnom i anti-neurodegenerativnom aktivnošću.²³

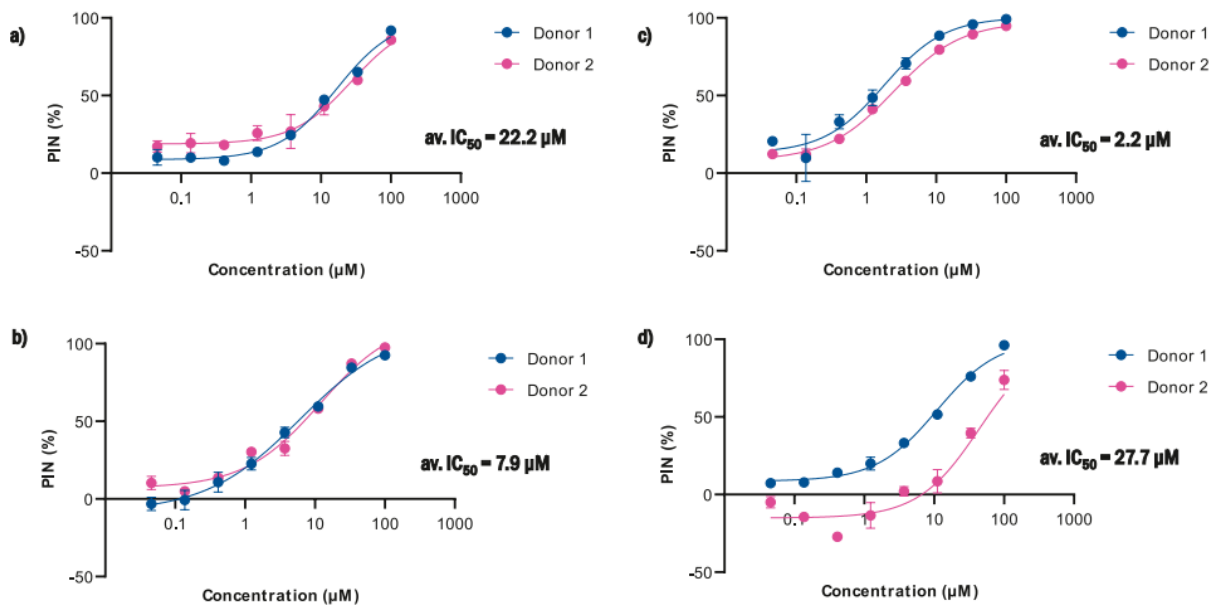
Kako bi se dobio bolji uvid u aktivnost, ali i u utjecaj supstituenata, u ovom diplomskom radu sintetizirana su četiri nova derivata naftotriazola s klorom kao supstituentom na arilnom prstenu, a na kojima su napravljena ispitivanja inhibicijske i predviđena mjerenja protuupalne aktivnosti.

2.2. Biološka aktivnost

2.2.1. Antiinflamatorna aktivnost

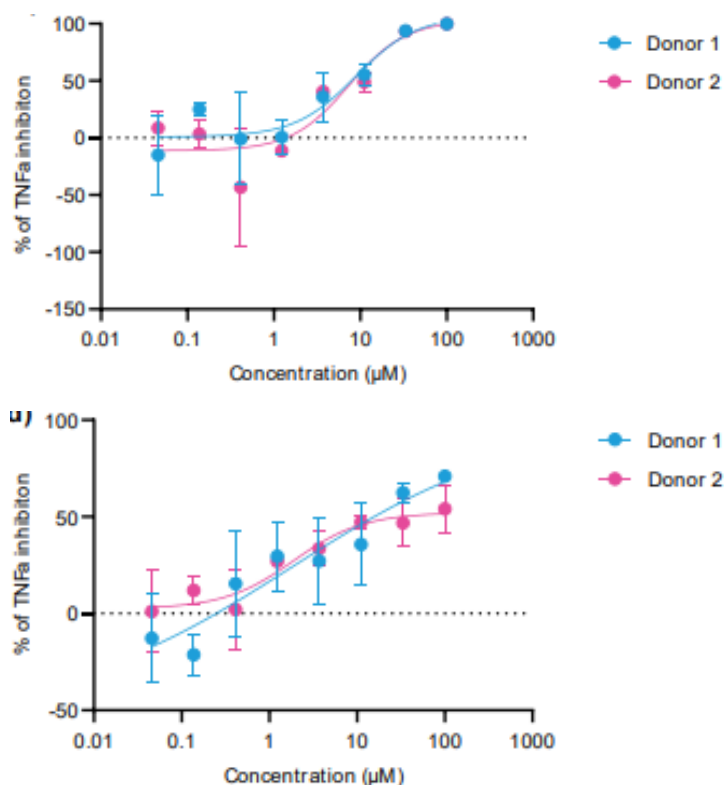
Upala je proces izazvan reakcijom imunoloških stanica koje nastoje zaštititi organizam od raznih ozljeda. Tijelo nastoji regulirati jačinu upale kroz kolinergički protuupalni sustav. Neurotransmitter acetilkolin (ACh) bitan je sudionik ovog sustava, a djelovanje mu je povezano s receptorima $\alpha 7nAChR$ i $M1AChR$. Kolinergički put funkcionira otpuštanjem ACh, koji agonizira $\alpha 7nAChR$ receptor i uzrokuje priljev Ca^{2+} u stanice.³² Povećane razine kalcija u stanicama na tom putu dovode do aktivacije transkripcijskog faktora $NF\alpha B$ i supresije imunološkog odgovora.³³ ChE mogu prekinuti ovaj put razgradnjom enzima AChE i BChE. Inhibitori ovih enzima također mogu imati antiinflamatoran učinak.³⁴⁻³⁶ AChE i BChE također predstavljaju farmakološki pogodne mete u neurodegenerativnim poremećajima, s obzirom na njihovu fiziološku ulogu u tijelu.^{37,38}

Prethodna istraživanja pokazala su kako derivati naftotriazola posjeduju antiinflamatorna svojstva direktnom inihibicijom proizvodnje $TNF\alpha$ ili pak djelujući nekim drugim tipovima mehanizama. Kako bi se utvrdila antiinflamatorna aktivnost pojedinih derivata, mjerena je IC_{50} vrijednost u odnosu na standard deksametazon koji pokazuje srednju IC_{50} vrijednost od 3.6 nM. Iz slike 2.4. može se zaključiti kako najbolja antiinflamatorna svojstva pokazuju derivati **2** i **3**, dok ih prate derivati **1** i **4**. Možemo zaključiti kako položaj i priroda supstituenata igra vrlo važnu ulogu u konačnim rezultatima. U ovom slučaju najbolji rezultat daje kombinacija metoksi-supstituenta na arilnom te *para*-metoksibenzilne skupine supstituirane na triazolnom prstenu. S druge strane, malo slabije, ali još uvijek dobre rezultate pokazuje tienobenzo-derivat **4**. Metoksi-skupina je poželjan supstituent koji povećava antiinflamatornu aktivnost derivata naftotriazola te je sličan koncept korišten i u daljnim istraživanjima.²¹



Slika 2.4. Grafički prikaz inhibicije proizvodnje $\text{TNF}\alpha$ u PBMC stimuliranim s LPS-om od dva donora za naftotriazole **1** (a), **2** (b), **3** (c) i tienobenzotriazol **4** (d).²¹

Uspoređujući rezultate ispitivanja derivata **6** i **8**, možemo zaključiti kako supstituent na triazolnom prstenu jače utječe na antiinflamatornu aktivnost u odnosu na arilni supstituent. Oba derivata pokazuju vrlo dobre rezultate, pri čemu derivat **6** daje rezultat od 8.1 μM , dok **8** daje 1.9 μM .²²



Slika 2.5. Grafički prikaz inhibicije proizvodnje TNF α u PBMC stimuliranim s LPS-om od dva donora za naftotriazole **6** (gore) i **8** (dolje).²²

Mnoga istraživanja dokazala su kako naftotriazoli imaju protuupalna svojstva. Upravo neke od strukturnih značajki naftotriazola koje doprinose antiinflamatornom djelovanju uključuju prisutnost sustava bogatog π -elektronima te razne varijante hidrofobnih alkilnih supstituenata.^{21,22}

2.2.2. Anti-neurodegenerativna aktivnost

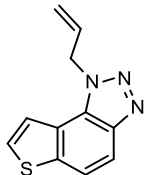
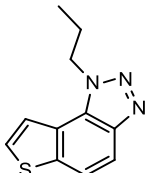
Kolinesteraze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu neurotransmitera ACh u kolin i octenu kiselinu. AChE se nalazi u različitim provodnim tkivima, kolinergičkim i nekolinergičkim vlaknima. Također, AChE je prisutna u membranama crvenih krvnih stanica koje posjeduju slična katalitička svojstva, ali se razlikuju u oligomernom sklopu i načinu vezanja na površinu stanice. S druge strane, BChE se nalazi prvenstveno u jetri te brže hidrolizira butirilkolin u odnosu na AChE.³⁹ AChE hidrolizira acetilkolin brže u usporedbi s drugim esterazama i meta je raznih moćnih toksina koji uključuju zmijski otrov, insekticide i kemijsko oružje.⁴⁰ Ima važnu ulogu u kolinergičkoj neurotransmisiji i brzo hidrolizira

neurotransmitter ACh. Utvrđeno je da je AChE izravno povezana s raznim neuromuskularnim poremećajima kao što su glaukoma i miastenija gravis, te da ublažava kolinergički nedostatak povezan s Alzheimerovom bolešću.^{41,42}

BChE je nespecifični enzim kolinesteraza koji hidrolizira različite estere kolina, a kodiran je genom BChE.⁴³ Funkcija BChE nije u potpunosti razjašnjena, međutim on čisti antikolinesterazne agense i brani sinaptički AChE od inhibicije. BChE je istraživao kao mogući stehiometrijski biohvatač kod trovanja organofosforim živčanim agensom. Opsežno je raspršen u živčanom sustavu sisavaca, što ukazuje na sudjelovanje u neuralnim funkcijama i neurodegenerativnim bolestima.⁴⁴ Njegov nedostatak dovodi do usporenog metabolizma određenih spojeva kao što su sukcinilkolin, mivakurij, heroin, prokain i kokain. Uspjeh imidazola kao važne strukturne komponente raznih medicinskih sredstava doveo je do uvođenja triazola. Triazoli se mogu opisati kao izosteri imidazola u kojima je ugljikov atom imidazola izosterički zamijenjen dušikom. Jezgra triazola uvedena je u širok raspon terapijski zanimljivih kandidata za lijekove uključujući stimulanse središnjeg živčanog sustava, protuupalne, antianksiozne, sedativne i antimikrobne agense.⁴⁵ Jedan od takvih lijekova je upravo citalopram, antidepresiv iz klase selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina. Citalopram je pokazao pozitivno djelovanje u liječenju AD kada se kombinira s galantaminom, pri čemu poboljšava cerebralni protok krvi.⁴⁶ Također, objavljeno je da se klinička prednost zajedničkog djelovanja galantamina i citaloprama može povezati sa sinergističkom inhibicijom BChE, pomažući kolinergičkoj neurotransmisiji.⁴⁷

Razne dokaze o inhibiciji kolinesteraza od strane derivata naftotriazola možemo pronaći u prethodno provedenim istraživanjima. Iz Tablice 2.1. uočava se kako su jedino derivati **4** i **5** pokazali obećavajuće rezultate inhibicije, posebice inhibicije BChE. Derivat **4** se ovdje ističe zbog IC_{50} vrijednosti koja je čak duplo manja od iste vrijednost standarda galantamina. S druge strane derivati **1-3** nisu pokazali inhibicijsko djelovanje prema ChE.²¹

Tablica 2.1. Inhibicija AChE i BChE u derivatima **4** i **5** uz pripadajuće IC₅₀ vrijednosti.²¹

Molekula	Struktura	eqBChE		eeAChE	
		IC ₅₀	% Inhibicije	IC ₅₀	% Inhibicije
4		3.8	80±1.6 (50)	56.2	76.9±2.3 (500)
5		48.8	91.7±9.6 (200)	607.0	56.2±1.6 (1000)
Galantamin		7.9	90.0±1.5 (60)	0.15	90.1±3.4 (4.5)

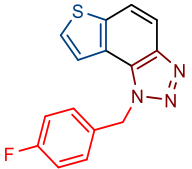
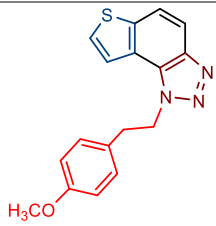
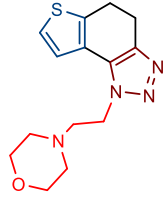
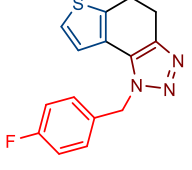
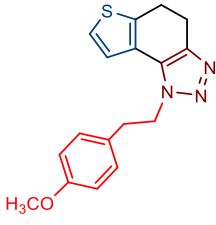
Za razliku od prijašnjih derivata, promjenom supstituenata na triazolnom prstenu, derivati sa supstituiranom metoksi-skupinom na arilnom prstenu pokazuju obećavajuće rezultate. Među njima se ističe derivati **7** koji pokazuje inhibiciju obje kolinesteraze (Tablica 2.2.). Osim njega valja izdvojiti dva derivata koji pokazuju selektivnu inhibiciju. Derivat **5**, koji sadrži *meta*-fluorbenzilnu skupinu supstituiranu na triazolni prsten, pokazuje selektivnu inhibicijsku aktivnost prema AChE, dok derivat **13**, koji uz tiofensku jezgru sadrži i pentenilni supstituent na triazolnom prstenu, pokazuje selektivnu inhibiciju BChE. Ostali derivati s tiofenskom jezgrom nisu pokazali dovoljno dobre rezultate, vjerojatno zbog metilne skupine koja je vezana na tiofensku jezgru. Time možemo zaključiti kako je nesupstituirana tiofenska jezgra najpogodnija za izraženiju inhibicijsku aktivnost.²²

Tablica 2.2.. Inhibicija AChE i BChE u derivatima **6**, **7** i **8**, uz pripadajuće IC₅₀ vrijednosti.²²

Molekula	AChE		BChE	
	IC ₅₀ /μM	% Inhibicije	IC ₅₀ /μM	% Inhibicije
6	329.0	58.1±1.6 (500)	261.1	65.3±0.7 (500)
7	51.3	64.8±5.3 (250)	53.5	76.6±1.8 (250)
8	176.7	78.6±3.8 (250)	-	47.8±0.5 (250)
Galantamin	0.15	90.0±1.5 (60)	7.9	90.1±3.4 (4.5)

Iz Tablice 2.3. može se zaključiti na sljedećem nizu derivata kako konačni rezultat više ovisi o triazolnom supstituentu, nego o aromatskoj prirodi središnjeg prstena. Usporedbom derivata **11** i **14** te derivata **13** i **14** uočavaju se veće oscilacije u rezultatima pri promjeni prirode triazolnog supstituenta. Posebno je to uočljivo u drugom primjeru gdje spoj **13** selektivno inhibira BChE, a **14** selektivno inhibira AChE.²³

Tablica 2.3. Inhibicija AChE i BChE u derivatima **11**, **12**, **13**, **14** i **15**, uz pripadajuće IC₅₀ vrijednosti.²³

Molekula	Struktura	IC ₅₀ (μM) AChE	IC ₅₀ (μM) BChE
11		97.0	37.5
12		-	18.6
13		45.6	-
14		-	58.0
15		145.3	119.4
Galantamin		0.15	7.9

2.4. Računalno modeliranje

Računalna kemija predstavlja područje koje koristi računalno modeliranje i simulacije, što uključuje *ab initio* (lat. od početka) pristupe temeljene na kvantnoj mehanici, te račune molekulske mehanike i dinamike zasnovane na klasičnoj mehanici, u svrhu proučavanja strukturnih karakteristika i svojstava molekula i materijala. Računalni kvantno-kemijski programi služe proučavanju te simulaciji kemijskih fenomena bez provedbe laboratorijskih istraživanja pri određivanju svojstava molekula i ispitivanju tijeka kemijskih reakcija. Metode računalne kemije koriste se za predviđanja struktura i svojstava molekulskih sustava, ali i za interpretaciju i dublje razumijevanje eksperimentalno dobivenih rezultata.⁴⁸ Osnovna i najkorisnija veličina kojom se služi je energija sustava s obzirom na njegovu strukturu. Energijskom analizom molekula moguće je predvidjeti koji procesi će se moći odviti i njihovu vjerojatnost. Kako bi se pobliže opisala i utvrdila točna elektronska struktura molekula, koristi se kvantna mehanika, odnosno već spomenuti *ab initio* pristup, koji se još naziva metoda valne funkcije. Kod primjene metoda računalne kemije temeljenih na kvantnoj mehanici, koriste se određene aproksimacije, poput Born-Oppenheimerove aproksimacije i varijacijskog teorema. U kvantno-mehaničkom pristupu, rješavanjem vremenski neovisne Schrödingerove jednadžbe dobije se elektronska valna funkcija sustava kao i svojstvena vrijednost energije. Međutim, Schrödingerovu jednadžbu moguće je egzaktno riješiti samo za jednoelektronske sustave., npr. za H_2^+ . Zbog toga, za detaljniji uvid u kvantno-mehanička svojstva i strukturu višeatomnih molekula, potrebno je uzeti u obzir dodatne parametre, primijeniti aproksimacije te iterativno rješavati Schrödingerovu jednadžbu. Hartree-Fock (HF) metoda višeelektronsku Schrödingerovu jednadžbu rastavlja se na jednostavnije jednoelektronske koje se potom rješavaju za dobivanje valne funkcije jednog elektrona. Veliki broj metoda započinje HF izračunom te zatim, zbog važnosti koreliranog gibanja elektrona, kako bi se točnije predvidjela molekulska struktura i energija, primjenjuje neka od post Hartree-Fock metoda. Jedna od takvih je Møller-Plesset (MP) skupina metoda te skupina metoda konfiguracijske interakcije (CI). Zbog računalne zahtjevnosti *ab initio* pristupa za kvantno-kemijski opis višeelektronskih sustava, razvijene su metode zasnovane na teoriji funkcionala gustoće, koje su manje zahtjevne u smislu duljine računa i korištenja računalnih resursa, ali omogućavaju približno jednako točne karakterizacije proučavanih sustava.⁴⁹

2.4.1. Teorija funkcionala (elektronske) gustoće

Elektronska gustoća koristi se kao središnja veličina u teoriji funkcionala (elektronske) gustoće (engl. Density Functional Theory, DFT). Teorija se temelji na pretpostavci da je za određivanje energije molekule umjesto računanja valnih funkcija (kod *ab initio* metoda) dovoljna elektronska gustoća. Elektronska gustoća funkcija je samo triju prostornih varijabli, dok valna funkcija ovisi o položaju svih elektrona u sustavu i zbog toga je mnogo zahtjevnija u izračunu, a to je upravo glavna prednost DFT-a u odnosu na metode temeljene na valnoj funkciji. Za razliku od HF metode, DFT metode uključuju efekt elektronske korelacije, tj. činjenicu da elektroni u molekulskom sustavu reagiraju na kretanje drugih elektrona omogućavajući tako da su privlačne i odbojne sile unutar molekula u ravnoteži.^{49,50}

Najpoznatiji i najčešće korišten DFT funkcional je Becke Three Parameter Hybrid Functionals (B3LYP), koji se sastoji od Becke funkcionala izmjene (B), korekcijskog funkcionala (LYP) te određenog udjela HF funkcionala u elektronskoj izmjeni. Uz B3LYP također se vrlo često koriste i BP86, PW91, PBE1PBE, M06-2X, wB97XD, OLYP te BMK. Zbog svoje popularnosti, prednosti u brzini nad *ab initio* metodama te usporedive preciznosti s naprednim *ab initio* metodama, DFT je postao najčešća korištena kvantno-kemijska metoda.⁵⁰

2.4.2. Optimizacija geometrije molekula

Optimizacija geometrije je iterativni proces izračunavanja strukturnih parametara molekula u određenom koordinatnom sustavu koji opisuje položaj jezgara. Bitan cilj korištenja metoda kvantne kemije jest predviđenu strukturu molekule optimizirati do njezine najniže energije što ju čini termodinamički najstabilnijom u danom sustavu. Energijski najpovoljnije konformacije u ovom istraživanju određene su na B3LYP/6-31G(d) razini teorije, odnosno korišten je Becke Three Parameter Hybrid Functional. U računima je korišten programski paket Gaussian16. Pri malim strukturnim promjenama dolazi do promjene energije molekule, a odnos tih dviju promjena prikazuje ploha potencijalne energije (PES). Točke minimuma nazivaju se potencijalne jame i odgovaraju strukturama najnižih potencijalnih energija. Suprotno tome, točke maksimuma na PES odgovaraju prijelaznim stanjima koja se nalaze na putu između dva minimuma na plohi. Molekule sa složenijom strukturom (više jednostrukih i dvostrukih veza) imaju mogućnost zauzimanja velikog broja konformacija uslijed rotacija supstituenata oko veza te prostornog razmještaja. Pri tome, različite početne konformacije takvih molekula završavaju u najbližim minimumima na plohi potencijalne energije, stoga je potrebno svaki konformer

individualno optimizirati i usporediti kako bi se moglo procijeniti koji od njih je najstabilniji i time najviše zastupljen u realnom sustavu.⁵¹

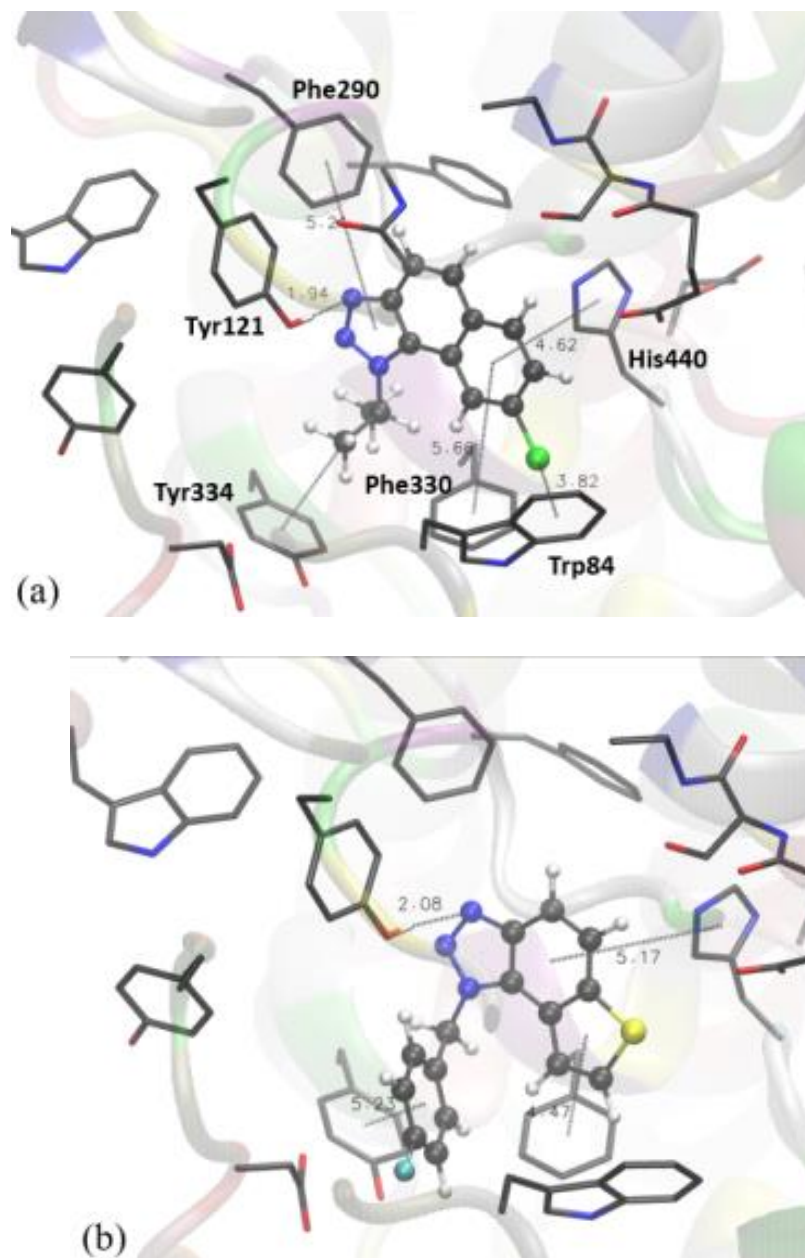
2.4.3. Doking

Molekulski doking je metoda kojom se opisuje tzv. pristajanje dviju ili više struktura (npr. pristajanje lijeka i enzima). Molekulski doking je tehnika molekulskog modeliranja korištena za predviđanje interakcija između proteina (enzima) i malih molekula, tj. liganada. O mogućnosti interakcije ovih molekula ovisi biološka funkcija samog proteina koja se time može inhibirati ili povećati. Molekulski doking može opisati ponašanje liganada u veznim mjestima određenih proteina čime se može odrediti željena orijentacija liganda u veznom mjestu proteina kao i afinitet između proteina i liganda. Molekulski doking se, s obzirom na vrste liganada, može podijeliti na nekoliko skupina. Molekulski doking između proteina i malih molekula (liganada) predstavlja najjednostavniju metodu. S druge strane, molekulski doking između dvije molekule proteina predstavlja nešto kompleksniji sustav zbog fleksibilnosti proteinske strukture te vrlo lagane promjene njihove konformacije. Dva najčešća pojma korištena u molekularnom dokingu su receptori i ligandi. Receptorima podrazumijevamo proteine ili polimerne strukture koje specifično prepoznaju i vežu ligande, najčešće manje organske molekule koje se ponašaju kao supstrat ili inhibitor enzima (proteina). Ligandi su, dakle, komplementarne molekule koje se vežu u aktivno mjesto receptora, čime se ostvaruje efektivan biomolekulski odgovor.⁴⁸

Upravo na slici 2.8. možemo vidjeti interakcije između liganda **1**, te liganda **11** spojenih na aktivno mjesto AChE koje predstavlja receptor. Pomoću molekularnog dokinga utvrđujemo interakcije koje se zbivaju između receptora i liganda, a one su bitne pri stabilizaciji samog liganda u aktivnom mjestu AChE, odnosno receptoru. Vidljivo je kako orijentacija triazolnog prstena u derivatu **1** pogoduje stvaranju vodikovih veza između dušika triazolnog prstena i OH-skupine Tyr121. Također, vidljive su alkil- π interakcije između izopropilnog supstituenta i Tyr334. Naposljetku, zbog prisutnosti sustava bogatog elektronima, vidljivo je π - π slaganje aromatske jezgre liganda s His440, Phe290 i Phe330.²³

Promatrajući interakciju derivata **11** s aktivnim mjestom AChE, uočavaju se slične interakcije. Vidljivo je stvaranje vodikovih veza između triazolnih dušika i OH-skupine Tyr121. Nadalje, fenilna aromatska jezgra liganda pokazuje okomito π - π slaganje s His330, dok

tiofenski prsten ostvaruje sličnu interakciju s Phe330. Fluorirani benzilni supstituent na triazolu je također uključen u π - π slaganje s Tyr334.²³



Slika 2.8. Prikaz struktura aktivnog mjesta AChE spojenog s derivatom **1** (a) i derivatom **11** (b). Molekule potencijalnih inhibitora prikazane su pomoću modela kuglice i štapića.²³

Molekularni doking se uspješno primjenjuje u dizajniranju lijekova i procesima otkrivanja novih lijekova, a tri osnovne svrhe su mu: predviđanje načina vezivanja poznatog

aktivnog liganda, identifikacija novih liganada i predviđanje afiniteta vezivanja srodnih spojeva iz poznatih aktivnih skupina. Ova metoda ne samo da igra glavnu ulogu u procesu dizajniranja novih lijekova, već može poslužiti i za traženje potencijalnih meta za identifikaciju različitih bolesti.⁵²

2.4.4. Molekulska dinamika

Razumijevanje mehanizma kemijskih reakcija u otopini ili enzimima na molekularnoj razini izazovan je zadatak u računalnoj kemiji, između ostalog i zbog velikog broja stupnjeva slobode proučavanih sustava. Promjena slobodne energije tijekom reakcijskog procesa središnja je veličina u simulacijama. Ovisno tretira li se atom kao najmanja čestica ili su u račun uključene i subatomske čestice, rezultati se mogu dobiti upotrebom klasične molekulske mehanike (eng. molecular mechanics, MM) ili kvantno-mehaničkim (eng. quantum-mechanics, QM) računima. Molekulska mehanika tretira atome kao najmanje jedinice - tvrde kuglice povezane oprugom te se zanemaruje elektronska struktura atoma. Sukladno tome, jedan atom ima više podtipova ovisno o okolnim atomima za koje je vezan i svaki je opisan tzv. poljem sila, odnosno parametrima koji određuju udaljenost i jakost veza te valentnih i torzijskih kutova. Ako u računalne simulacije želimo uključiti i vremensku domenu odnosno vremensku evoluciju sustava, koristimo se metodom molekulske dinamike koja može biti klasična ili kvantna.^{53,54} Klasična molekulska dinamika (MD) koristi Newtonove zakone gibanja za simulaciju kretanja atoma i molekula. Simulacije se uobičajeno provode uz korištenje tzv. periodičnih rubnih uvjeta (eng. periodic boundary conditions, PBC) kako bi se eliminirali artefakti uzrokovani rubnim uvjetima i omogućilo proučavanje beskonačnih sustava koristeći konačne veličine uzoraka. Na taj način se jedna kutija periodički ponavlja u svim smjerovima čime se eliminiraju spomenuti artefakti nastali uslijed rubnih uvjeta, a u obzir se uzimaju i međusobne interakcije kutija čime se bolje opisuje realan sustav. Ova metoda je prikladna za velike sustave s mnogo atoma (do milijun) na dužim vremenskim skalama (nanosekunde do milisekunde). Njome se simuliraju makroskopska svojstva molekula te se najčešće koristi za proučavanje konformacijskih promjena proteina, interakcije liganda i receptora, simulacije membranskih sustava itd. Jedan od važnijih parametara za praćenje konformacijskih promjena odnosno „konvergencije“ MD simulacije je korijen srednjeg kvadratnog odstupanja (Root Mean Square Deviation), RMSD. Niske vrijednosti RMSD ukazuju na strukturalnu stabilnost sustava, dok visoke vrijednosti ukazuju na značajne promjene u konformaciji. Praćenje promjene RMSD pomaže u

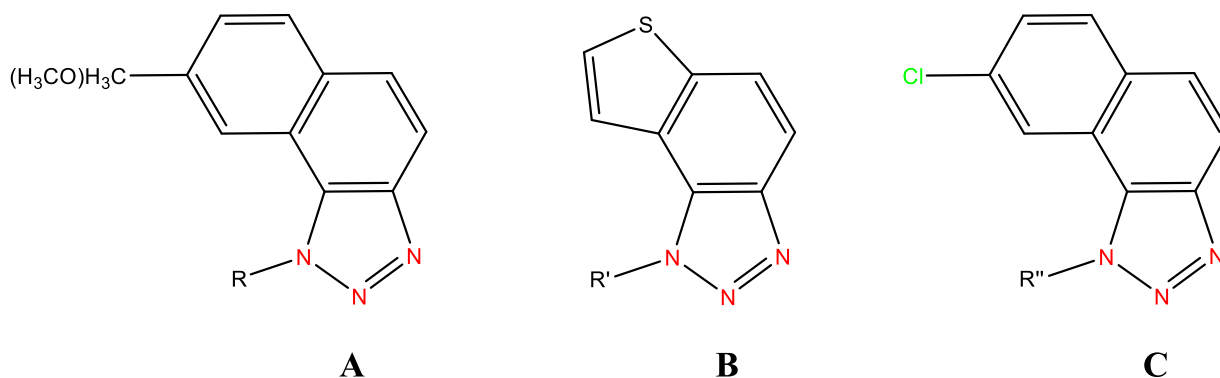
identifikaciji ključnih događaja tijekom simulacije, kao što su promjene konformacije, vezanje liganda ili disocijacija kompleksa.⁵⁵

Kvantna dinamika koristi kvantno-mehaničke zakone za opisivanje ponašanja čestica i prikladna je samo za simulacije manjih sustava s manjim brojem atoma, gdje su kvantni efekti značajni. Najčešće se koristi za proučavanje elektronskih struktura molekula, reakcijskih mehanizama, modeliranje prijelaznih stanja i kemijskih reakcija. Za modeliranje veoma velikih sustava kakvi su proteini, često je potrebno kombinirati kvantno-mehanički i molekulsko-mehanički (QM/MM) pristup, koji su prvi predložili Warshel i Levitt- To je računalni alat u više razmjera koji omogućuje pouzdan kvantno-mehanički izračun na aktivnom mjestu enzima s realnim modeliranjem složenog okoliša.^{53,54} Model QM/MM zahtijeva proračune elektronske strukture u svakom koraku tijekom MD uzorkovanja. Ako se radi o većem broju uzorkovanja MD struktura onda govorimo o QM/MD (Quantum Mechanics/Molecular Dynamics) pristupu. Ovaj pristup omogućava korištenje prednosti oba svijeta: preciznost kvantne mehanike za opisivanje kemijskih reakcija i složenih elektronskih interakcija te računalnu učinkovitost klasične molekulske dinamike za simulacije velikih sustava na dužim vremenskim skalama.⁵⁶

3. RASPRAVA I REZULTATI

3.1. Uvod

Prema prethodno spomenutim informacijama, naftotriazoli i njihovi derivati vrlo su zanimljivi spojevi s mogućnošću korištenja u kombiniranoj anti-neurodegenerativnoj i protuupalnoj terapiji. U prijašnjim znanstvenim istraživanjima, u našem istraživačkom laboratoriju, nekoliko analoga naftotriazola, derivati **A**, **B** i **C** (Slika 3.1.), pokazalo je dobro biološko djelovanje. S obzirom na obećavajuće rezultate inhibicije enzima kolinesteraza te povezanog protuupalnog djelovanja, u ovom su znanstvenom radu spojevi **A**, **B** i **C** korišteni kao polazište za razvoj novih derivata naftotriazola.^{21, 22, 23}



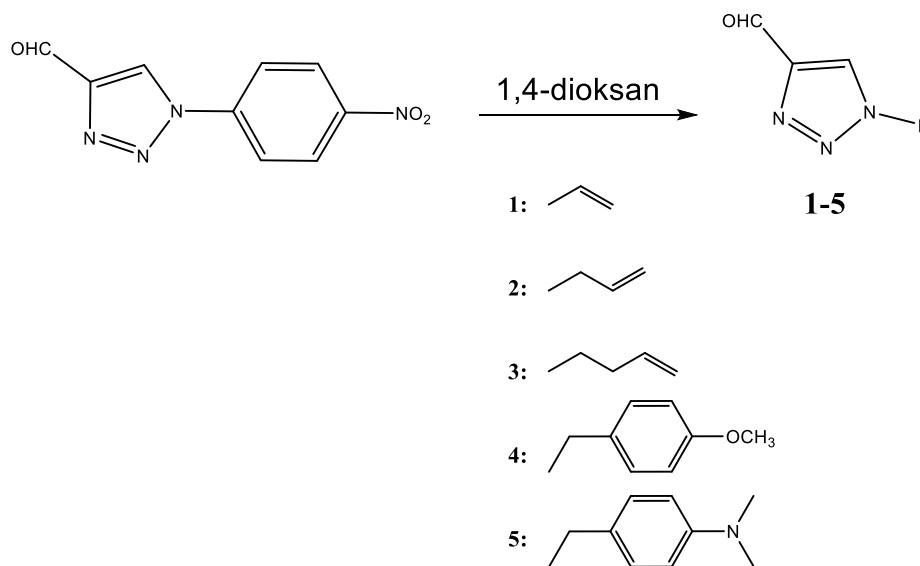
Slika 3.1. Strukture sintetiziranih derivata **A**, **B** i **C** u našem laboratoriju.

U svrhu širenja našeg znanja o potencijalnoj biološkoj aktivnosti derivata naftotriazola, u ovom radu sintetizirano je 15 novih spojeva (Slika 3.2., spojevi **1-15**), od kojih je 5 novih naftotriazola (**11-15**), s naglaskom na promjenjivi supstituent na triazolnom prstenu te klorom supstituirani arilni prsten. Ciljani novi naftotriazoli **11-15** pokazali su mogućnost inhibicije enzima kolinesteraza, dok se protuupalna aktivnost trenutno ispituje. To ih već sada čini zanimljivom novom skupinom spojeva s mogućnošću daljnjeg razvoja kao aktivnih komponenti.

3.2. Sinteza novih triazolnih stilbena 6-10

3.2.1. Sinteza triazolnih aldehida 1-5

Triazolni aldehidi **1-5** sintetizirani su nukleofilnom supstitucijom između početnog aldehida, 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida, te odgovarajućih amina, odnosno odgovarajućih nukleofila, pritom se kao otapalo koristio nepolarni 1,4-dioksan (Shema 3.1.).



Shema 3.1. Reakcijski put dobivanja triazolnih aldehida **1-5**.

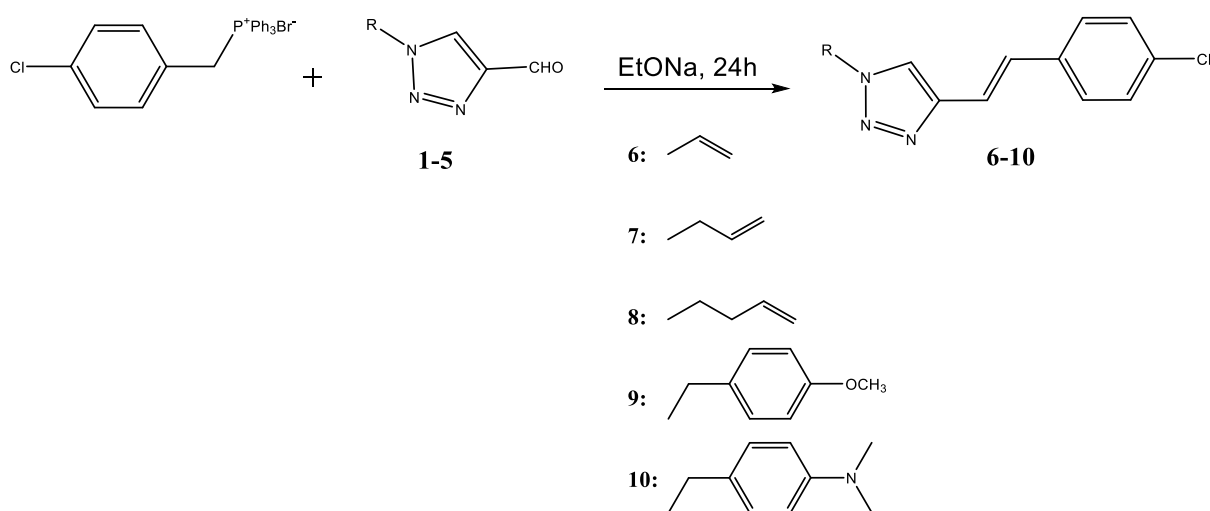
Dobivene reakcijske smjese pročišćene su kolonskom kromatografijom te su izolirani produkti. Kolona je punjena silika-gelom, dok je kao eluens korišten sustav otapala PE/DCM različitih polarosti. Važno je napomenuti kako su svi derivati pokazali obećavajuća iskorištenja, pri čemu su produkti **1**, **2** i **5** dali vrlo dobra izolirana iskorištenja (69,5 %, 71,9 %, 98,0 %), dok su produkti **3** i **4** dali nešto slabija iskorištenja (27,3 %, 36,0 %), no još uvijek vrlo zadovoljavajuća.

3.2.2. Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih heterostilbena 6-10

Wittigova reakcija se pretežito koristi za sintezu alkena, a u skladu s time i za sintezu stilbena i njihovih derivata. Za provedbu reakcije potreban je aldehid ili keton koji sadrži karbonilnu funkcijsku skupinu te fosfonijev ilid. Kao najbolji mehanizam Wittigove reakcije pokazao se betainski mehanizam. Betainski mehanizam je regioselektivan, ne zahtjeva

ekstremne uvjete te se stereoselektivnost reakcije lako može kontrolirati promjenom reaktanata.⁵⁷ Velika prednost Wittigove reakcije je što omogućuje korištenje mnogo različitih kombinacija baza i otapala. Neka najčešće korištena otapala su THF ili DMF u kombinaciji s NaH⁵⁸ ili u našem slučaju bazom NaOEt. Važno je naglasiti kako će odabrana kombinacija baze i otapala znatno utjecati na omjer dobivenih *cis*- i *trans*-izomera.⁵⁹

Novi heterostilbeni **6-10** sintetizirani su Wittigovom reakcijom prikazanom na Shemi 3.2.. Kao polazni reaktanti korištene su odgovarajuće fosfonijeve soli i aldehidi, pri čemu je NaOEt korišten kao baza te apsolutni etanol kao otapalo. Kao produkti, dobivene su smjese s različitim udjelima *cis*- i *trans*-izomera.

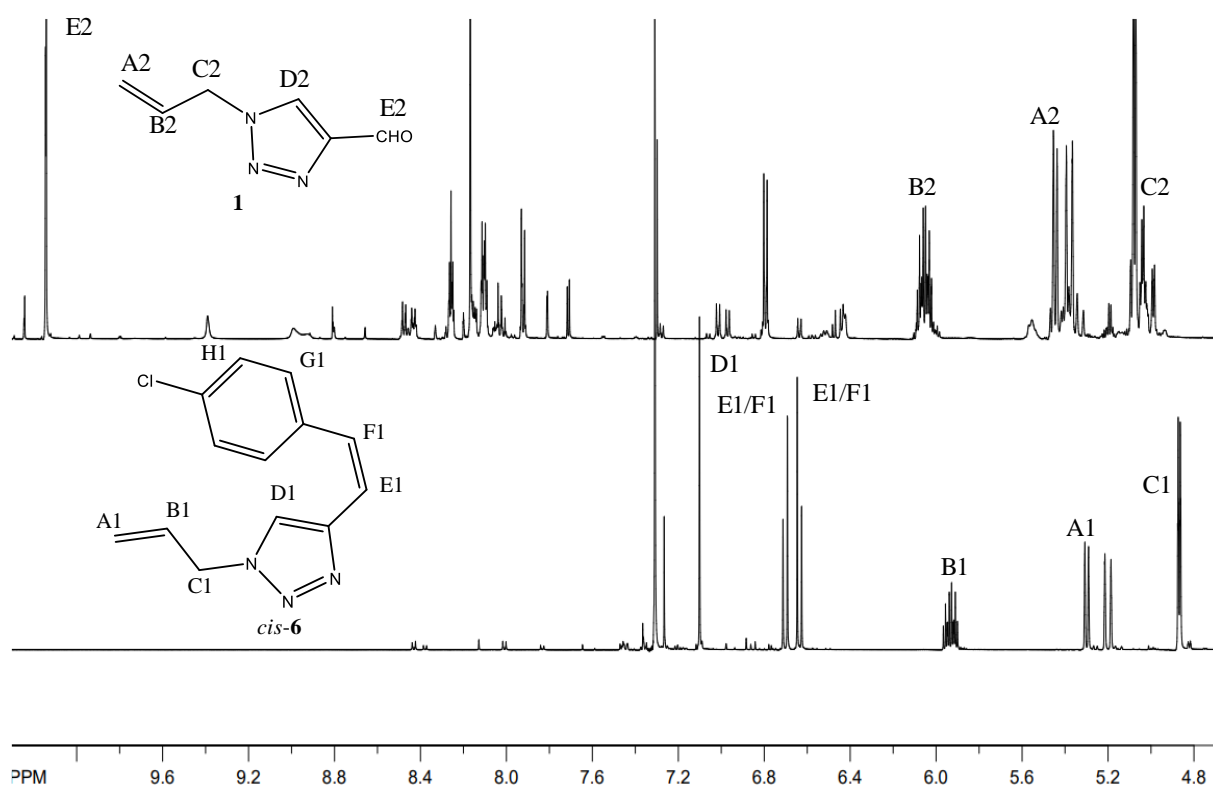


Shema 3.2. Shematski prikaz Wittigove reakcije dobivanja novih heterostilbena **6-10**.

Dobivene smjese pročišćene su kolonskom kromatografijom te su istim principom izolirani čisti izomeri. Kolona je punjena silika-gelom, a kao eluens korištena je smjesa otapala PE/E različitih polarnosti. Izrazito veliko iskorištenje pokazao je derivat **10** (91,1 %), dok ga prate heterostilbeni **6** (32,0 %) i **7** (60,5 %). Nešto slabija iskorištenja daju derivati **8** (20,0 %) i **9** (23,0 %). Također, valja naznačiti da je za smjese izomera derivata **8** bilo potrebno provesti više od jednog postupka sinteze zbog iznimno male količine nastalog produkta. Uspoređujući iskorištenja derivata **6**, **7** i **8** može se zaključiti kako iskorištenje raste smanjenjem veličine alkenilnog supstituenta na triazolnom prstenu. S druge strane, usporedbom iskorištenja kod dobivanja derivata **9** i **10**, može se uočiti kako metoksi-skupina supstituirana na aromatskoj

jezgri u *para*-položaju doprinosi smanjenju iskorištenja u odnosu na jednako supstituiranu dimetilamino-skupinu.

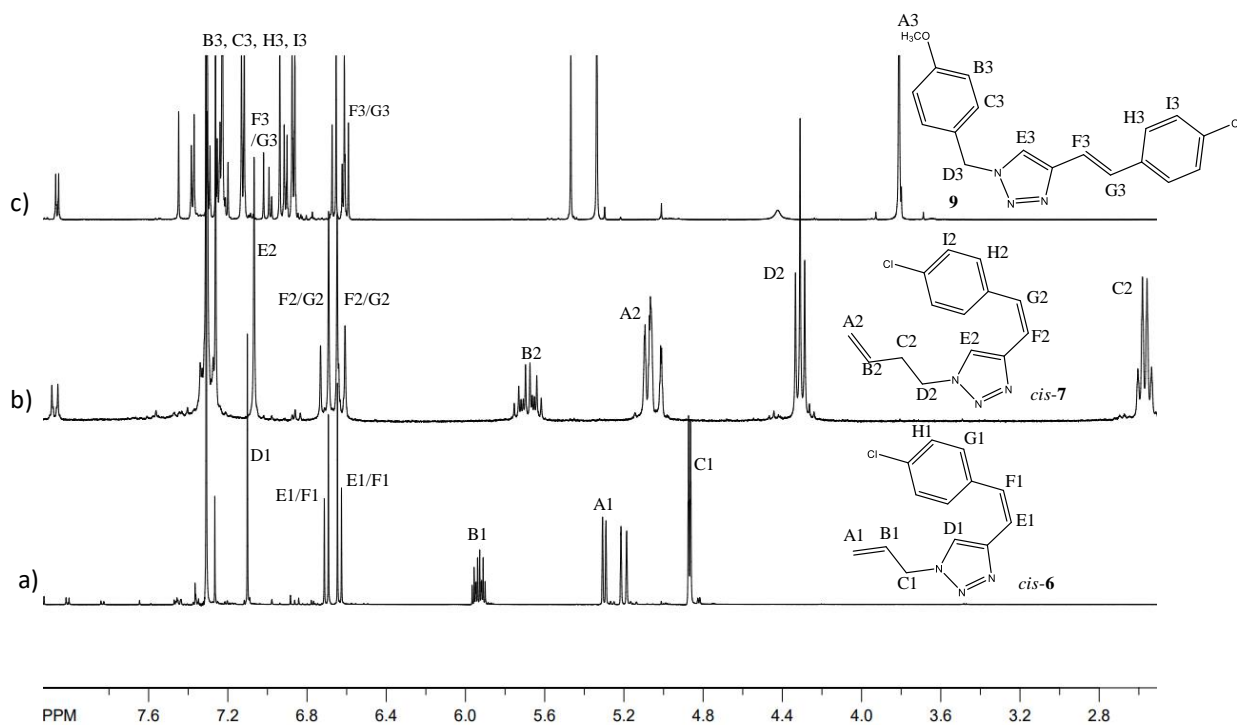
Na Slici 3.3. prikazani su ^1H NMR spektri aldehida **1** i heterostilbena *cis*-**6**. Glavnu razliku u protonskim signalima kod ova dva derivata predstavljaju kemijski signali protona F i G kod derivata *cis*-**6**. Ova dva signala ugljika dvostruke veze nalaze se na 6,70 i 6,64 ppm te su direktna potvrda nastanka produkta Wittigove reakcije.



Slika 3.3. Prikaz dijela ^1H NMR spektra molekula **1** (gore) i *cis*-**6** (dolje).

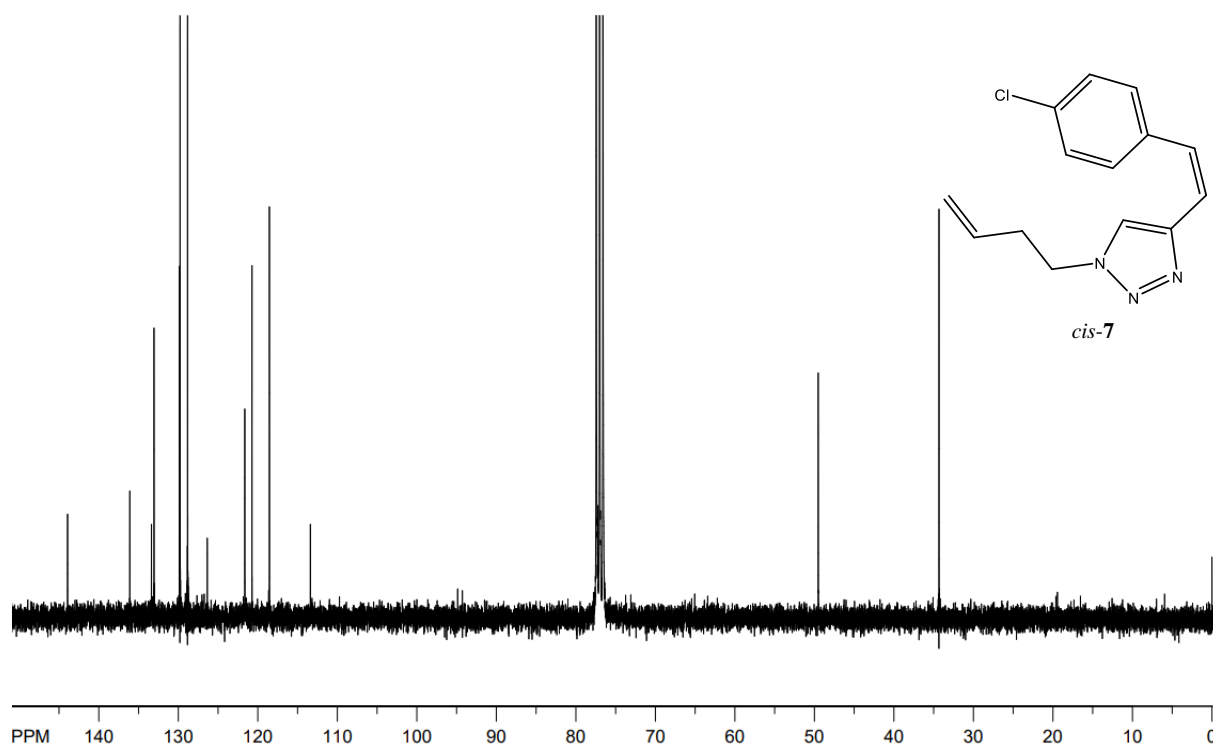
Također, konstanta sprege ovih signala iznosi 12,2 Hz što potvrđuje kako je nastali produkt u *cis*-konfiguraciji. Osim toga, vidljivi su i kemijski signali protona na alkenilnom supstituentu. U ovom slučaju su ti signali kod derivata *cis*-**6** blago pomaknuti prema nižim kemijskim pomacima u odnosu na iste signale kod derivata **1**. Pri tomu B1/B2 daju multiplet na 5,95/6,10 ppm, protoni A1/A2 pokazuju dublet na 5,30/5,44 ppm, a protoni C1/C2 također pokazuju dublet na 5,07/4,86 ppm.

Na Slici 3.4. prikazani su ^1H NMR spektri derivata *cis-6*, *cis-7* i **9**. Sva tri derivata pokazuju karakteristične signale etenskih protona na otprilike 6,7 ppm (E1/F1, F2/G2, F3/G3), a ovi signali upravo imaju spregu od 12 Hz te odgovaraju *cis*-konfiguraciji.



Slika 3.4. Prikaz dijela ^1H NMR spektra molekula *cis-6* (a), *cis-7* (b) i **9** (c).

Jedino derivat **9** pokazuje i kemijske signale etenskih protona sa spregom od 16 Hz na otprilike 7,0 ppm, a oni odgovaraju *trans*-konfiguraciji spomenutog derivata. Također, derivat **9** je jedini derivat koji ima vidljive kemijske signale aromatskih protona između 6,8 i 7,4 ppm (B3, C3, H3, I3). Nadalje, usporedbom kemijskih signala derivata *cis-6* i *cis-7*, može se uočiti kako su kemijski signali derivata *cis-7* znatno pomaknuti prema nižim kemijskim pomacima. Također, *cis-7* sadrži jedan signal više, a on je vidljiv kao dublet-dubleta C2 na 2,57 ppm. Za razliku od C2 signala, D2 signal koji također sadrži metilenske protone, pomaknut je prema višem kemijskom pomaku od 4,30 ppm unatoč induktivnom efektu dušikovog atoma.



Slika 3.5. Prikaz ^{13}C NMR spektra molekule *cis-7*.

Kao dodatna potvrda strukture dobivenih heterostilbena, poslužili su ^{13}C NMR spektri. Na slici 3.5. prikazan je ^{13}C NMR spektar heterostilbena *cis-7*. Na oko 35 i 50 ppm vidljivi su signali ugljikovih atoma koji pripadaju metilenskim skupinama, dok su signali etenskih ugljikovih atoma pomaknuti prema području 130-120 ppm, što je očekivano. Također, molekula *cis-7* sadrži tri kvaterna ugljikova atoma koji se u spektru javljaju kao signali slabijeg intenziteta u području 145-115 ppm, pri čemu se ugljik uz atom klora, zbog njegovog induktivnog utjecaja, nalazi na najvišem kemijskom pomaku od oko 145 ppm. Naposljetku, za ugljikove atome arilnog prstena vidljiva su samo 2 signala zbog jednake prirode ugljikovih atoma.

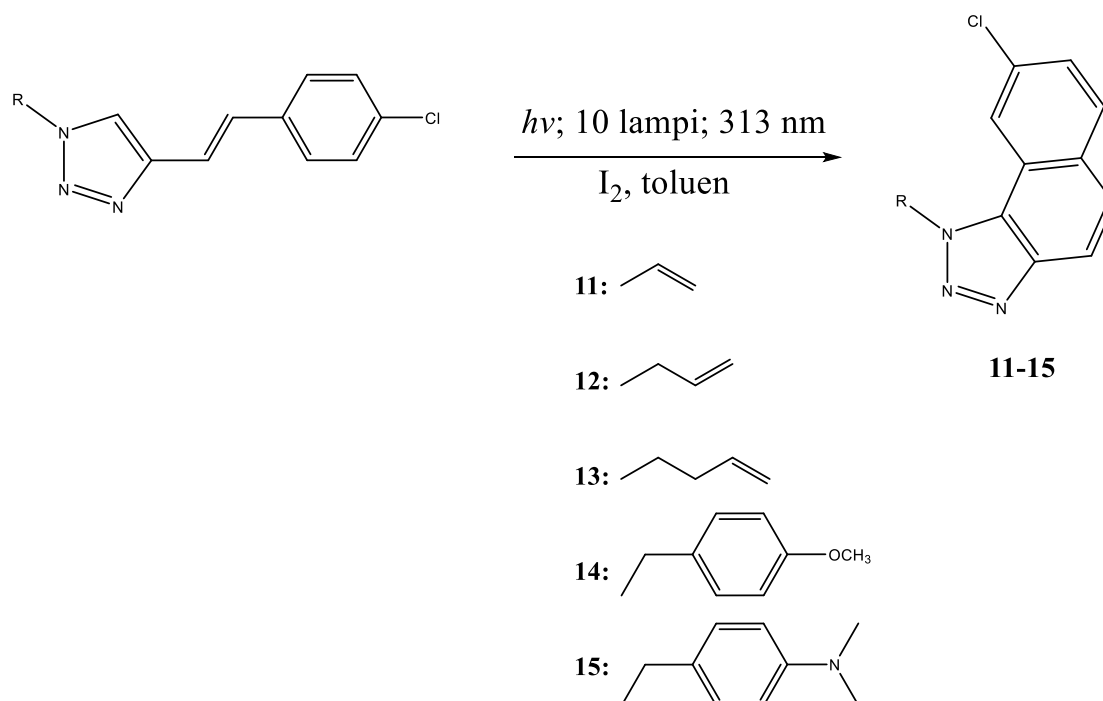
3.3. Fotokemijska ciklizacija triazolnih heterostilbena

Reakcije elektrociklizacije su unimolekulski periciklički procesi u kojima se krajevi konjugiranog sustava povezuju σ -vezom uz preraspodjelu elektrona. Elektrociklički procesi su reverzibilni i mogu se kategorizirati prema broju uključenih π elektrona u ciklizaciji/otvaranju prstena. Prema Woodward-Hoffmannovim pravilima termičke reakcije koje uključuju $(4n)$ π elektrona se odvijaju s konrotatornim načinom zakretanja reznjeva orbitala, dok se termičke

reakcije koje uključuju $(4n + 2) \pi$ elektrona odvijaju disrotatornim načinom. U pobuđenom stanju te su preferencije obrnute, stoga se očekuje suprotan stereokemijski ishod. Kada su dva aromatska prstena dio heksatrienskog sustava, kao što je slučaj kod stilbena, obje fenilne skupine sudjeluju u ciklizaciji. Osvjetljavanjem stilbena u razrijeđenim otopinama (u koncentriranim otopinama prevladava dimerizacija) nakon početne *cis/trans* izomerizacije, 6π elektrocikličkim zatvaranjem prstena iz *cis*-stilbena nastaje dihidrofenantren, koji se lako prevede u fenantren u oksidativnim uvjetima, npr. dodatkom joda ili u prisutnosti kisika. Ove reakcije omogućuju sintezu velikog broja policikličkih aromatskih i heteroaromatskih spojeva.⁶⁰

3.3.1. Sinteza novih naftotriazola 11-15

Novi naftotriazoli **11-15** sintetizirani su reakcijom fotokemijske ciklizacije prikazanom na Shemi 3.3.. Kao polazni reaktanti korišteni su heterostilbeni **6-10** otopljeni u toluenu, dok je kao katalizator korišten jod. Reakcija je provedena osvjetljavanjem reakcijskih smjesa u fotokemijskom reaktoru sastavljenom od 10 lampi valne duljine 313 nm.



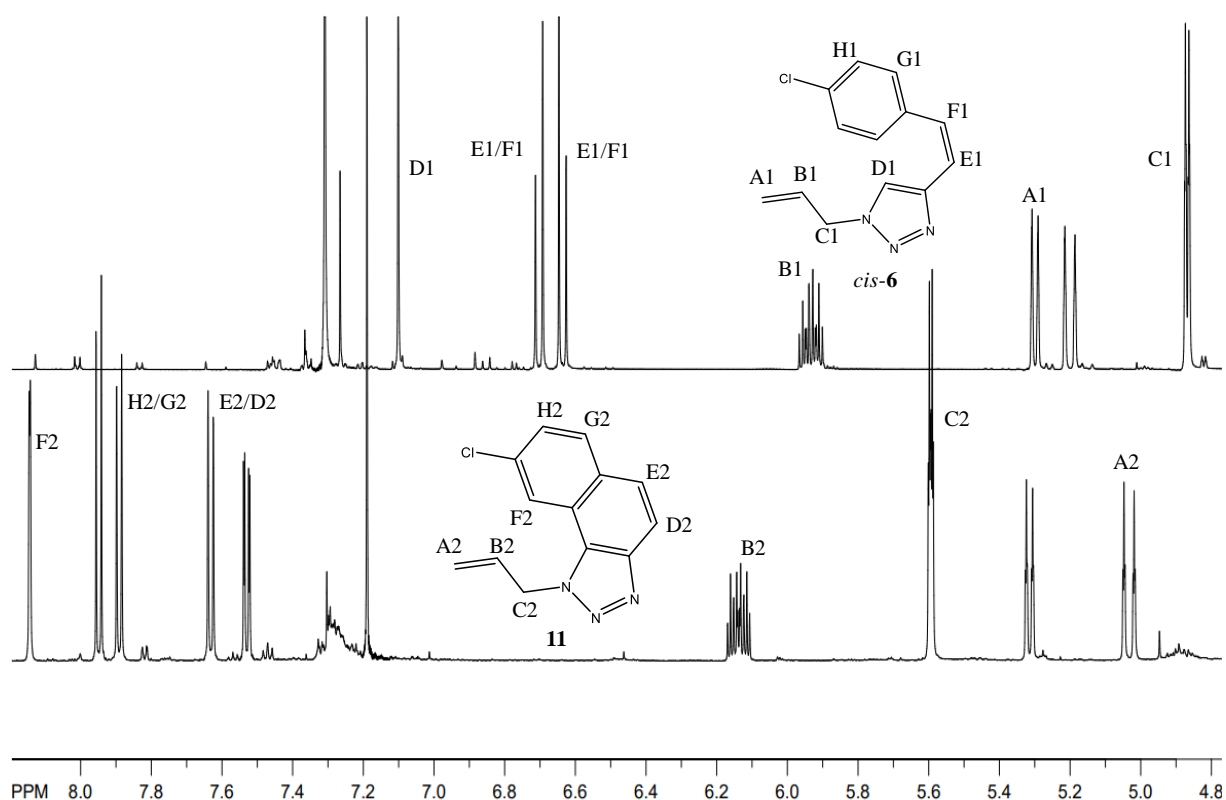
Shema 3.3. Shematski prikaz reakcije dobivanja novih naftotriazola **11-15**.

Dobiveni produkti **11-15** izolirani su iz reakcijske smjese pomoću kolonske kromatografije. Kolona je punjena silika-gelom, a kao eluens koristila se smjesa PE/E promjenjiva omjera.

Svi produkti pokazuju izolirana iskorištenja od otprilike 15 %, dok jedini produkt koji nije uspješno sintetiziran je derivat **15**, posljedica čega može biti slabo iskorištenje Wittigove reakcije kod nastanka njegovog prekursora, derivata **8**, ali i drugi elektronski čimbenici kod same reakcije elektrociklizacije.

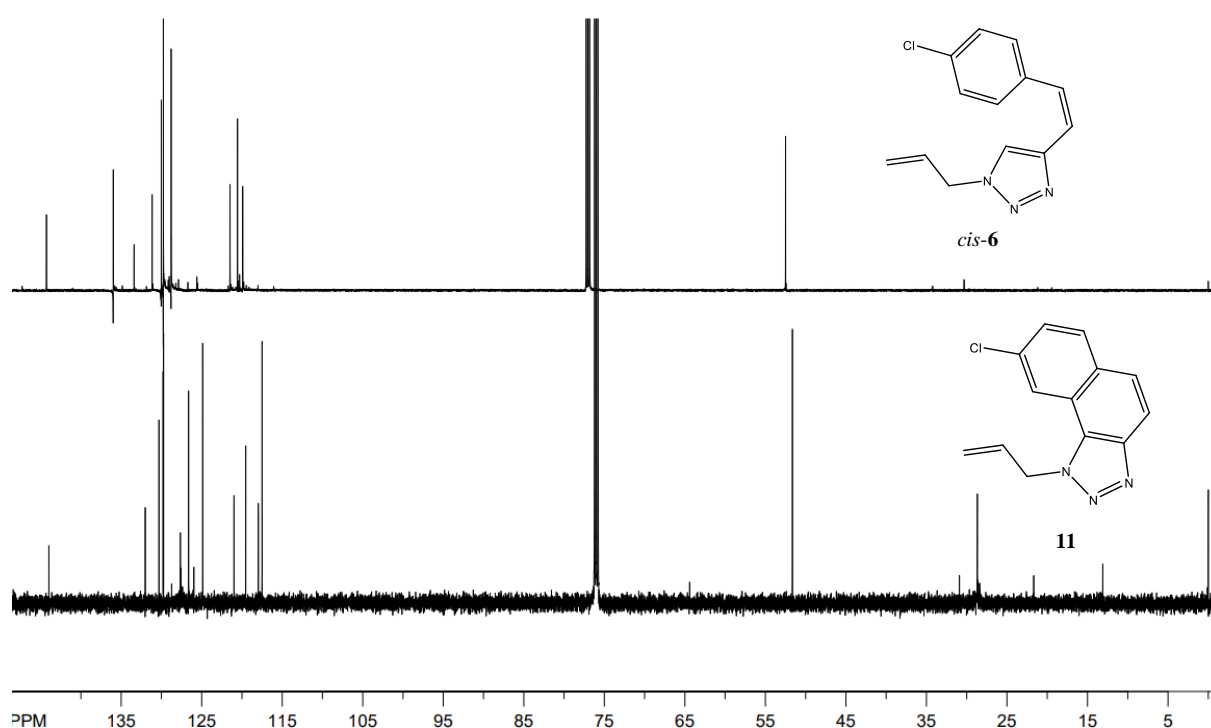
3.3.2. Spektroskopska karakterizacija fotoprodukata

Dobiveni fotoprodukti **11-14** izolirani su iz reakcijske smjese uzastopnim kromatografskim odjeljivanjem na koloni, a njihove strukture potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom.



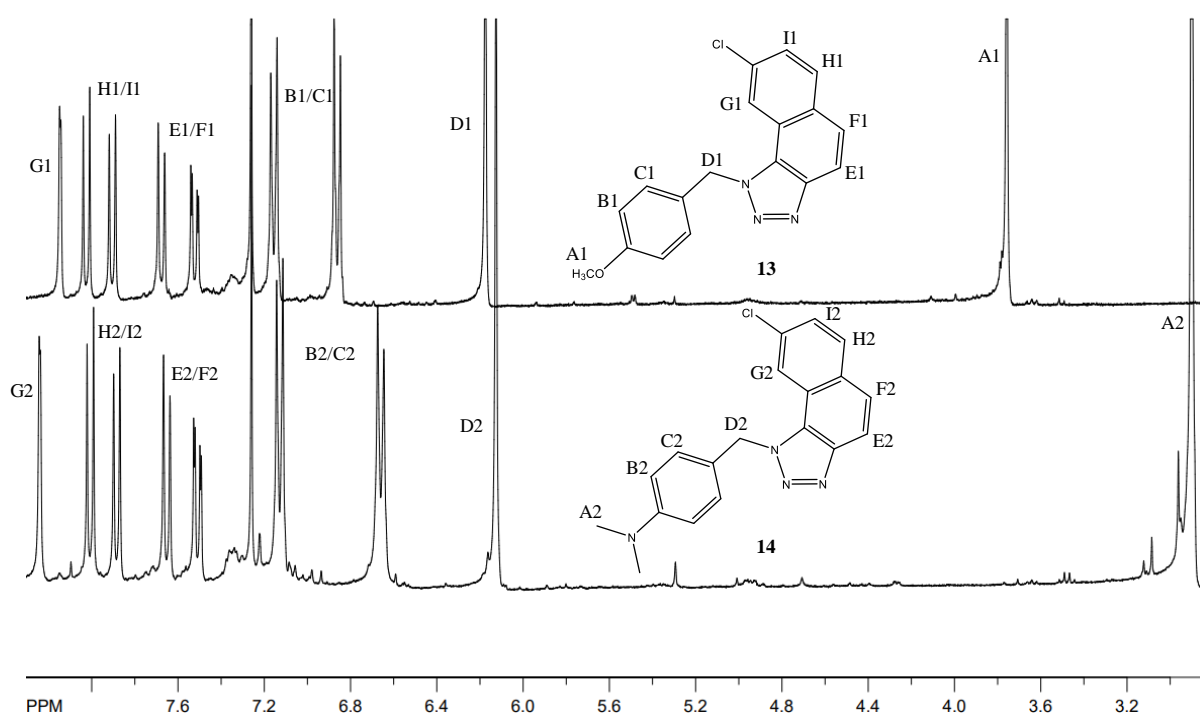
Slika 3.6. Prikaz dijela ^1H NMR spektara molekula *cis-6* (gore) i **11** (dolje).

Na Slici 3.6. prikazani su ^1H NMR spektri derivata *cis-6* i **11**. Glavni pokazatelj uspješnosti reakcije fotokemijske ciklozacije, odnosno pokazatelj nestanka derivata *cis-6* je odsutnost kemijskih signala etenskih protona E1/F1 u ^1H NMR spektru derivata **11**. Također, kao potvrda nastanka fotokemijskog produkta služe signali aromatskih protona E2/D2 koji su vidljivi kao dva dubleta na 7,53 i 7,63 ppm te signali aromatskih protona H2/G2 također vidljivi kao dva dubleta na 7,94 i 7,89 ppm. Osim toga, vidljiv je i signal aromatskog protona F2 u obliku singleta na 8,14 ppm. Nadalje, vidljiva je znatna razlika u kemijskim pomacima alkenskih protona. Kemijski signal protona A1 u ^1H NMR spektru *cis-6* derivata nalazi se na većem kemijskom pomaku od kemijskog signala protona C1, dok je u ^1H NMR spektru derivata **11** kemijski signal protona A2 na nižem kemijskom pomaku od kemijskog signala protona C2. Ovakva pojava može se pripisati povećanju aromatskog sustava u derivatu **11** koji zbog toga slabije zasjenjuje proton C2 te se njegov kemijski signal nalazi na većem kemijskom pomaku. Naposljetku, zbog prelaska dihidrofenantrena u fenantren, gubi se proton D1 te jedan G1 proton i oni iz tog razloga nisu vidljivi u ^1H NMR spektru derivata **11**.



Slika 3.7. Prikaz ^{13}C NMR spektara molekula *cis-6* (gore) i **11** (dolje).

Na Slici 3.7. prikazani su usporedno ^{13}C NMR spektri molekula *cis*-**6** i **11**. Oba ^{13}C NMR spektra imaju očekivani broj signala koji odgovaraju strukturi analiziranih molekula. Kod oba derivata prisutan je signal ugljikova atoma metilenske skupine na oko 50 ppm. Dok derivat *cis*-**6** sadrži 3 kvaterna ugljikova atoma, derivat **11** ih ima čak 5 što je vidljivo po izgledu njegovog spektra, gdje u području 145-120 ppm ima znatno više signala slabijeg intenziteta. Također, moguće je uočiti da su signali aromatskih ugljikovih atoma naftotriazola **11** pomaknuti prema nešto nižim kemijskim pomacima što se može pripisati većoj elektronskoj gustoći naftotriazolnog sustava.



Slika 3.8. Prikaz dijela ^1H NMR spektra molekula **13** (gore) i **14** (dolje).

Na Slici 3.8. vidljiv je usporedni prikaz ^1H NMR spektara derivata **13** i **14**. Kod oba derivata može se uočiti kako su kemijski signali aromatskih protona E, F, G, H i I pomaknuti na najviše kemijske pomake u području 7,5 - 8,2 ppm. S druge strane, signali aromatskih protona triazolnih supstituenata (B i C) nalaze se na nešto nižim kemijskim pomacima, pri čemu se kemijski signali B1 i C1 nalaze na malo većim kemijskim pomacima zbog jačeg induktivnog efekta kisika od dušika. Nadalje, kod oba derivata vidljivi su kemijski signali metilenskih protona D1 i D2 u obliku singleta sa integralom 2H na 6,17, odnosno 6,12 ppm. Naposljetku, derivat **13** pokazuje kemijski signal metilnih protona A1 pomaknut na 3,75 ppm zbog induktivnog efekta

kisika. S druge strane, derivat **14** na 2,90 ppm pokazuje signal metilnih protona s integralom od 6H.

3.4. Biološka aktivnost

Kao što je već pokazano u prijašnjim objavljenim radovima, naftotriazoli i njihovi derivati imaju poželjnu biološku aktivnost. U ovome radu pripremljeni su novi derivati naftotriazola **11-14** u svrhu ispitivanja njihove potencijalne biološke aktivnosti. Na novim sintetiziranim derivatima provedena su ispitivanja inhibicije enzima AChE i BChE u suradnji sa suradnicima s vanjskih ustanova s kojima postoji kontinuirana suradnja. Ovisno o razlikama u strukturi sintetiziranih derivata razlikuje se i biološka aktivnost. Čimbenici koji najviše utječu na odnos strukture i aktivnosti su vrsta i veličina supstituenata na triazolnom i arilnom prstenu te geometrija same molekule.

3.4.1. Inhibicija kolinesteraza

Istaknute klase organskih spojeva pokazale su potencijalno djelovanje kao inhibitori enzima kolinesteraza, stoga je važan osvrt na njih. U okviru ovoga rada ispitana je inhibicija enzima AChE i BChE na derivatima **11-14**, zbog prijašnjih rezultata ispitivanja spojeva s bliskim strukturnim svojstvima koji su pokazali potencijal inhibicije obaju enzima. U Tablici 1 dan je prikaz rezultata ispitivanja za svaki novosintetizirani derivat **11-14**, kao i za galantamin koji služi kao standard za usporedbu aktivnosti, jer predstavlja poznati reverzibilni inhibitor. Također, u Tablici 1 prikazani su rezultati ispitivanja za derivate **I, II, III** i **IV** koji su pokazali obećavajuće rezultate inhibicije AChE i BChE, a strukturno su bliski derivatima sintetiziranim u ovome radu. Osnovna razlika je u tome što su oni rezultat alkiliranja, pa nose pozitivni naboj na triazolnom prstenu. Rezultati su izraženi u obliku potrebne koncentracije spoja za postizanje inhibicije 50 % djelovanja AChE i BChE (IC_{50}).

Najbolje rezultate ispitivanja među novosintetizirani derivatima **11-14** pokazao je derivat **12**. Ovaj derivat ima supstituiranu butenilnu skupinu na triazolnom prstenu te je pokazao rezultat od 195,4 μ M za inhibiciju AChE te 71,0 μ M za inhibiciju BChE. U usporedbi sa standardom galantaminom koji za inhibiciju AChE pokazuje IC_{50} od 0,15, rezultat ispitivanja derivata **12** je vrlo slab. S druge strane, galantamin za inhibiciju BChE pokazuje IC_{50} od 7,9, a derivat **12** pokazuje otprilike 6 puta veću vrijednost što je prihvatljiv rezultat, no još uvijek nije vrlo zadovoljavajući. Ostali derivati nisu pokazali mogućnost inhibicije AChE, no **11** i **13** su

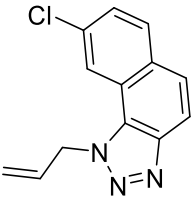
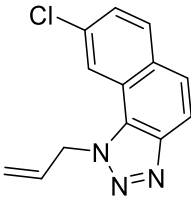
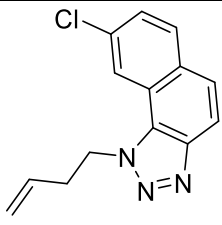
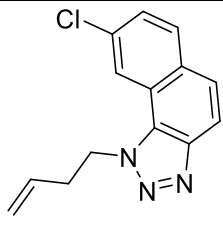
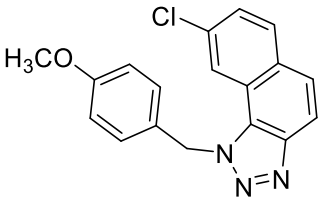
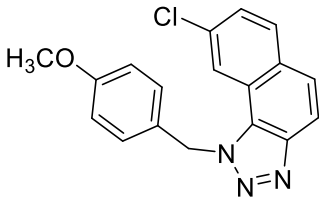
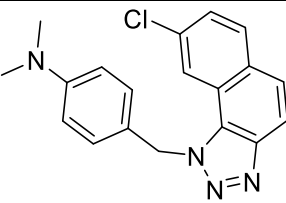
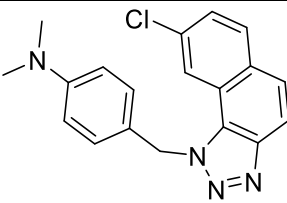
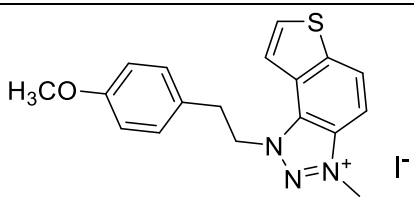
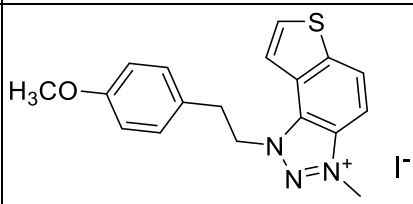
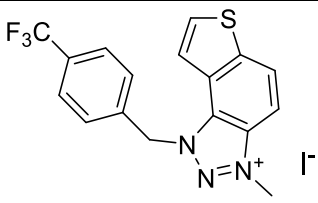
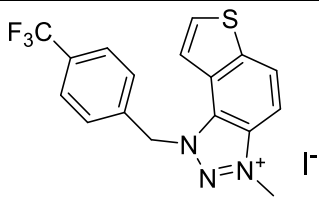
pokazali mogućnost inhibicije BChE. Bolji rezultat među njima pokazao je derivat **13** s IC_{50} vrijednošću od 195,4 μM , dok je **11** pokazao IC_{50} vrijednošću od 232,5 μM . Oba rezultata daleko odstupaju od IC_{50} vrijednosti galantamina, kao i od rezultata derivata **12**.

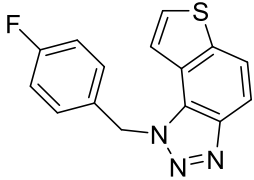
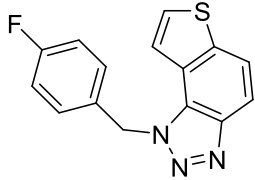
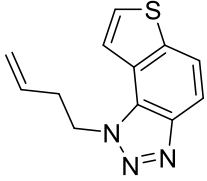
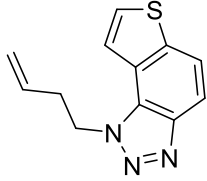
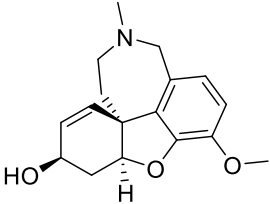
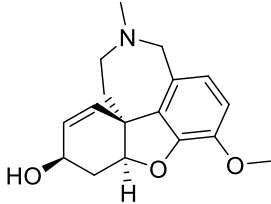
U našem laboratoriju su također sintetizirani i drugi derivati, koji su u ovom radu imenovani sa **I**, **II**, **III** i **IV**. Ovi derivati poslužit će za usporedbu rezultata ispitivanja s derivatima sintetiziranim u ovom radu, a isto tako pomoći će pri otkrivanju potrebnih strukturnih karakteristika u svrhu postizanja najboljih rezultata ispitivanja. Za razliku od derivata **11-14**, derivati **I**, **II**, **III** i **IV** sadrže tiofensku jezgru. Također, derivati **I**, **II**, **III** i **IV** su sintetizirani kao soli sa pozitivnom nabijenim atomom dušika i jodidnim anionom.

Usporedbom rezultata ispitivanja derivata **IV** i **12**, koji imaju jednako supstituirani triazolni prsten butenilnim supstituentom, može se uočiti kako su IC_{50} vrijednosti kod inhibicije BChE približno jednake (79,4 i 71,0 μM). Nasuprot tome, derivat **IV** ne pokazuje mogućnost inhibicije AChE, što daje naznaku da tiofenski prsten smanjuje mogućnost inhibicije AChE u kombinaciji s prisutnim supstituentom na triazolnom prstenu. Derivat **III** pokazuje bolje rezultate inhibicije obiju enzima od derivata **12**, a ima supstituirani *para*-fluorbenzilnu skupinu na triazolnom prstenu. Obje IC_{50} vrijednosti derivata **III** su gotovo duplo manje, 113,0 μM za AChE te 31,0 μM za BChE, nego kod derivata **12**. U ovom slučaju može se diskutirati kako klorom supstituirani arilni prsten negativno utječe na rezultate inhibicije obiju enzima, ali isto tako kako fluorom supstituirani benzilni supstituent pozitivno utječe na isto. Derivati **I** i **II** pokazali su puno bolje rezultate u usporedbi s prijašnje spomenutim derivatima. Posebno se ističe derivat **I** koji pokazuje vrijednost od 1,8 μM za AChE te 0,3 μM za BChE. Kako je već rečeno, oba derivata su sintetizirana u obliku soli, a to u ovom slučaju znatno utječe na poboljšanje rezultata ispitivanja, posebno na znatno poboljšanje u inhibiciji AChE usporedbom s njihovim nenabijenim derivatima. Također, oba derivata imaju tiofenski prsten te se može zaključiti kako pristunost klora na arilnom prstenu smanjuje mogućnost inhibicije enzima kolinesteraza. Zaključno, najvažnije strukturne značajke ispitivanih derivata koje utječu na mogućnost inhibicije su tip supstitucije te naboj na dušikovom atomu triazolnog prstena, iako može doći do gubitka selektivnosti.⁶¹

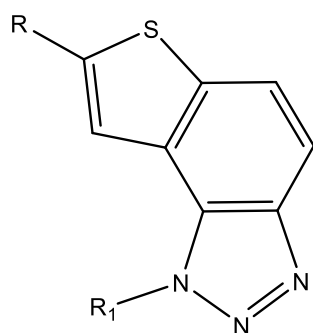
Za naftotriazole **11-14** svakako je predviđeno u planiranju sinteze i ispitivanje protuupalne aktivnosti, no ona je u tijeku, te nije dovršena do trenutka završavanja pisanja ovoga diplomskog rada.

Tablica 1. Rezultati ispitivanja inhibicijske aktivnosti sintetiziranih spojeva **11-14** te ostalih sintetiziranih derivata na AChE i BChE.

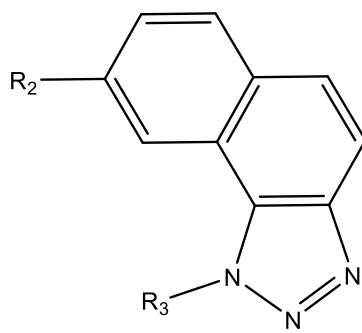
Spoj	Struktura	IC ₅₀ (μM) AChE	Spoj	Struktura	IC ₅₀ (μM) BChE
11		/	11		232,5
12		195,4	12		71,0
13		/	13		195,4
14		/	14		/
I		1,8	I		0,3
II		6,9	II		1,8

III		113	III		31
IV		/	IV		79,4
Galantamin		0,15	Galantamin		7,9

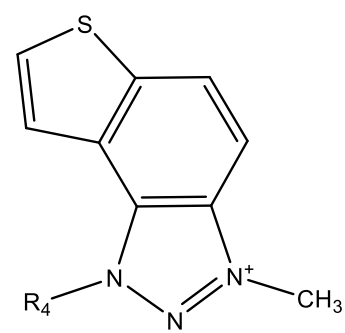
Na slici 3.9. sumiran je utjecaj različitih supsttuenata na biološku aktivnost sintetiziranih derivata u smislu inhibicije enzima kolinesteraza.



R = H, CH₃ – slabija aktivnost s metilnim supstituentom; R₁ = *meta*-Cl-benzil – najaktivniji nenabijeni derivat prema BChE



R₂ = Cl, OCH₃ – bolja aktivnost s metoksi supstituentom; R₃ = *butenil*– najaktivniji nenabijeni derivat naftotriazola



R₄ = *para*-metoksifenil-etenil – najaktivniji nabijeni derivat prema BChE, pokazuje znatno povećanje aktivnost prema oba enzima zbog pristinosti naboja

Slika 3.9. Prikaz utjecaja različitih supsttuenata na biološku aktivnost sintetiziranih derivata.⁶¹

3.5. Računalno modeliranje

Na temelju eksperimentalnih rezultata prikazanih u Tablici 1 uočljivo je kako se derivat **12**, među novosintetiziranim derivatima u ovom radu, pokazao kao najbolji inhibitor enzima BChE. S obzirom da kod ovakvih tipova molekula očekujemo kako će inhibicija enzima butirilkolinesteraze biti reverzibilna, odnosno da će doći do stvaranje nekovalentnog kompleksa između liganda i aktivnog mjesta u enzima, istražene su moguće strukture kompleksa između derivata **12** i BChE. Kompleksi su dobiveni metodom molekuskog dokinga (pristajanja), korištenjem Autodock programa.

Kristalna struktura enzima humane BChE s pdb kodom 1AIY preuzeta je iz proteinske baze podataka. Aktivno mjesto BChE sadrži 15 aminokiselina i podijeljeno je na nekoliko manjih strukturnih domena. Najvažniji dio aktivnog mjesta je katalitička trijada (estersko mjesto) koju čine Ser198, His438 i Glu325 i ono direktno sudjeluje u katalizi. Drugi dijelovi aktivnog mjesta su: anionska subdomena (Trp82, Phe329 i Glu197), oksianionska šupljina koju čine aminokiseline Gly116, Gly117 i Ala199, acilni džep (Leu286 i Val288) te periferno anionsko mjesto (Asp70, Tyr114, Tyr128 i Tyr332).

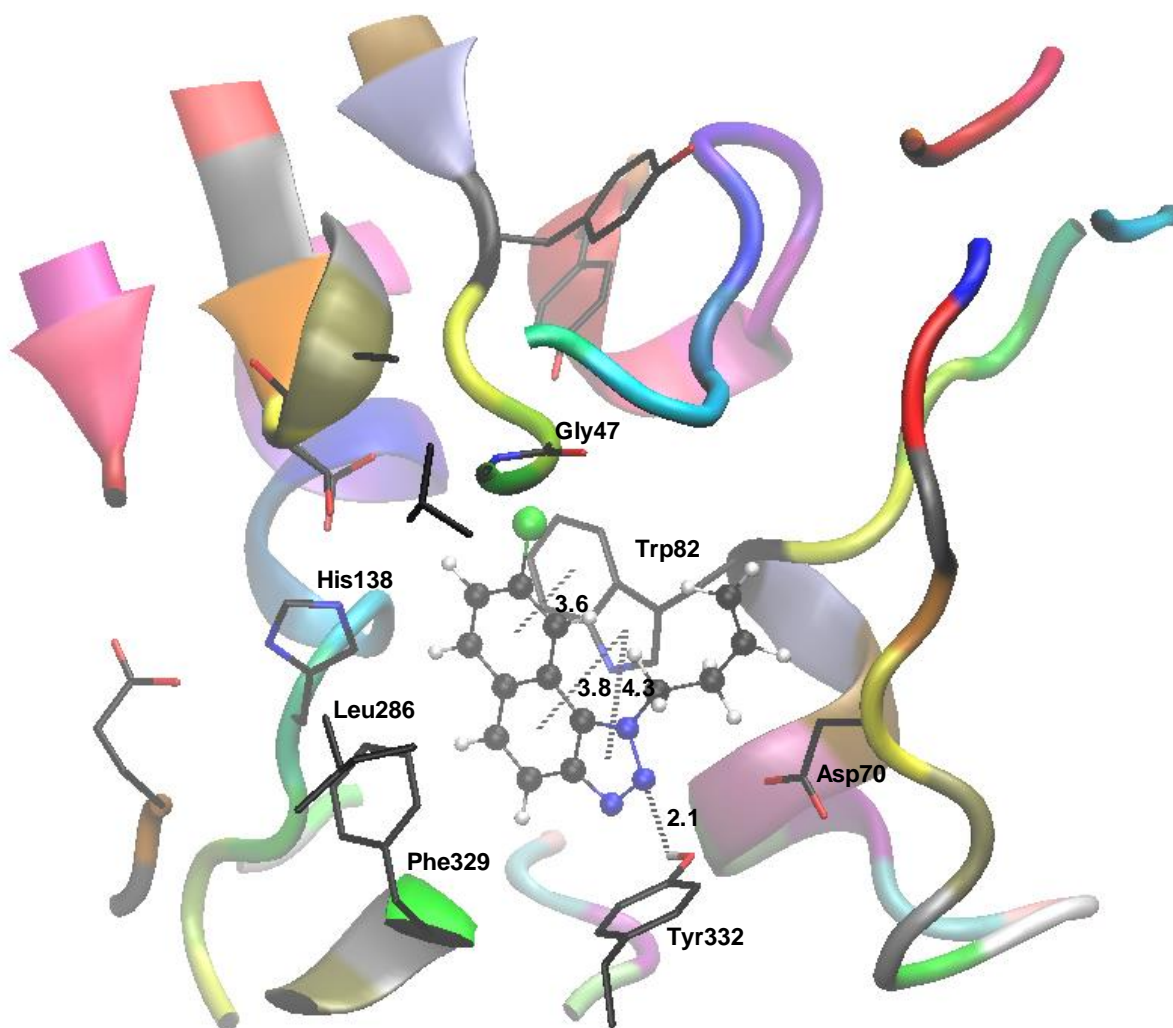
Molekulskim dokingom dobiven je uvid u strukturu kompleksa između naftotriazola **12** i aktivnog mjesta BChE, što omogućuje identifikaciju međudjelovanja koja su odgovorna za stabilnost kompleksa. Što je stabilniji kompleks između enzima i liganda, to je raspoloživost kolinesteraze da sudjeluje u katalizi supstrata ograničenija, tj. uspješnija je inhibicija enzima.

Budući da molekulski doking daje statičku sliku sustava napravljena je simulacija molekulske dinamike na istom kompleksu kako bi vrednovali rezultate molekuskog dokinga. Najpovoljniji smještaj naftotriazola **12** u aktivnom mjestu BChE dobiven dokiranjem, kao i stabilizirajuće interakcije prisutne u kompleksu, prikazan je na Slici 3.10.

U strukturi kompleksa koji nastaje smještanjem molekule naftotriazola **12** u aktivno mjesto enzima BChE (Slika 3.10.) vidljivo je nekoliko stabilizirajućih nekovalentnih interakcija. Prvotno, vidljive su interakcije π - π *stackinga* (eng. π - π slaganje) između arilnih prstena u derivatu **12** s arilnim i pirolnim prstenom Trp82 na udaljenosti od 3,6 Å, odnosno 3,8 Å. Također, uočava se π - π *stacking* između triazolnog prstena liganda te arilnog prstena Trp82 (4,3 Å). Osim toga, vidljivo je kako dolazi do formiranja vodikove veze između dušikova atoma triazolnog prstena te vodika hidroksilne skupine koja pripada Tyr332 (2,1 Å). Zanimljivo je kako elektronegativan atoma klora uopće ne stvara značajne interakcije s atomima susjednih aminokiselina. Ova pojava može sugerirati kako u kompleksu postoji kompetitivan odnos

između atoma klora i triazolnog prstena pri stvaranju interakcija s atomima susjednih aminokiselina u aktivnom mjestu enzima. U ovom slučaju, interakcije koje stvara triazolni prsten (vodikova veza) su značajnije za stabilnost kompleksa, a sukladno tome interakcije s atomom klora su nezamjetne.

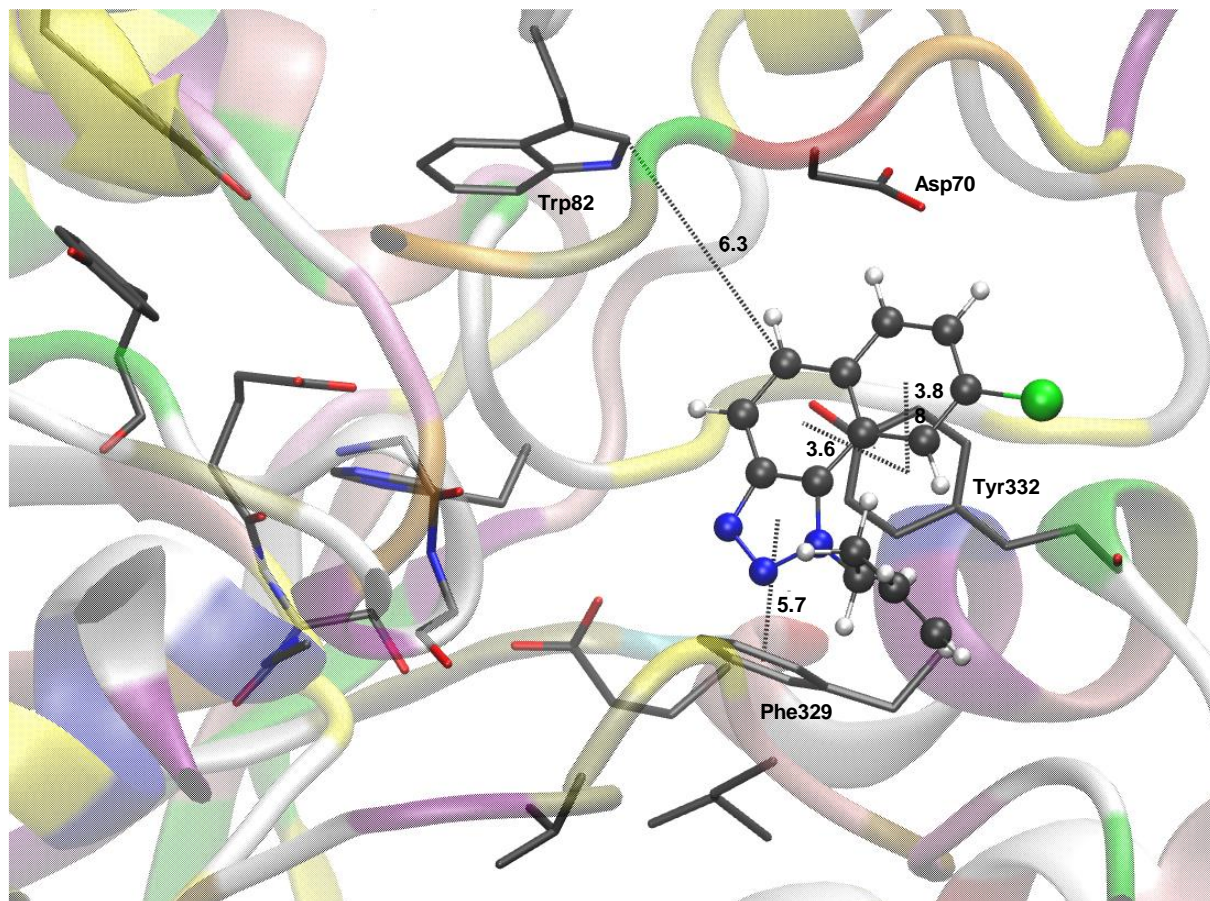
U prilogu 1. prikazana je struktura kompleksa između naftotriazola **I** i aktivnog mjesta BChE dobivena molekulskim dokingom. Kao što je već spomenuto, naftotriazol **I** je sintetiziran kao sol te je pokazao izrazito dobra svojstva inhibicije AChE i BChE. Kao i kod kompleksa prikazanog na slici 3.10., prisutan je π - π *stacking* između triazolnog te arilnih prstenova liganda te arilnih prstenova Trp82. Znatna razlika je u tome što kod kompleksa nastalog između naftotriazola **I** i BChE dolazi do kation- π interakcija. Ova vrsta interakcije prisutna javlja se između triazolnog dušika i Trp82 u anionskom mjestu. Također, dolazi do elektrostatskog privlačenja između metilne skupine triazolnog prstena i Glu197, ponovno u anionskom području. S obzirom na dobivene rezultate inhibicije, moguće je da su upravo ove stabilizirajuće interakcije odgovorne za bolju inhibiciju ChE kod derivata sintetiziranih kao soli u odnosu na derivate koji nisu soli.



Slika 3.10. Reverzibilni kompleks između naftotriazola **12** i BChE, dobiven molekulskim dokingom. Udaljenosti su izražene u Å, a nepolarni vodikovi atomi na aminokiselinama izostavljeni su radi preglednosti.

Nakon provedenih MD simulacija kompleksa između naftotriazola **12** i aktivnog mjesta BChE, napravljen je molekulski doking prikazan na slici 3.11. U strukturi kompleksa vidljivo je nekoliko stabilizirajućih nekovalentnih interakcija. Uočava se kako se ligand udaljio od Trp82 s kojim je na slici 3.8. stvarao interakcije π - π *stacking-a*, te je sada od Trp82 udaljen čak 6,3 Å što je prevelika udaljenost za značajne interakcije. Također, prije provedene MD simulacije, triazolni dušik stvarao je vodikovu vezu s vodikom hidroksilne skupine koja pripada Tyr332, dok nakon MD simulacija se ova interakcija gubi te zbog rotacija liganda dolazi do π - π *stacking-a* između arilnih prstenova liganda te arilnog prstena u Tyr332 (3,6 Å i 3,8 Å).

Naposlijetku, dolazi do okomitog π - π *stacking-a* između triazolnog prstena i arilnog prstena Phe329 na udaljenosti od 5,7 Å.

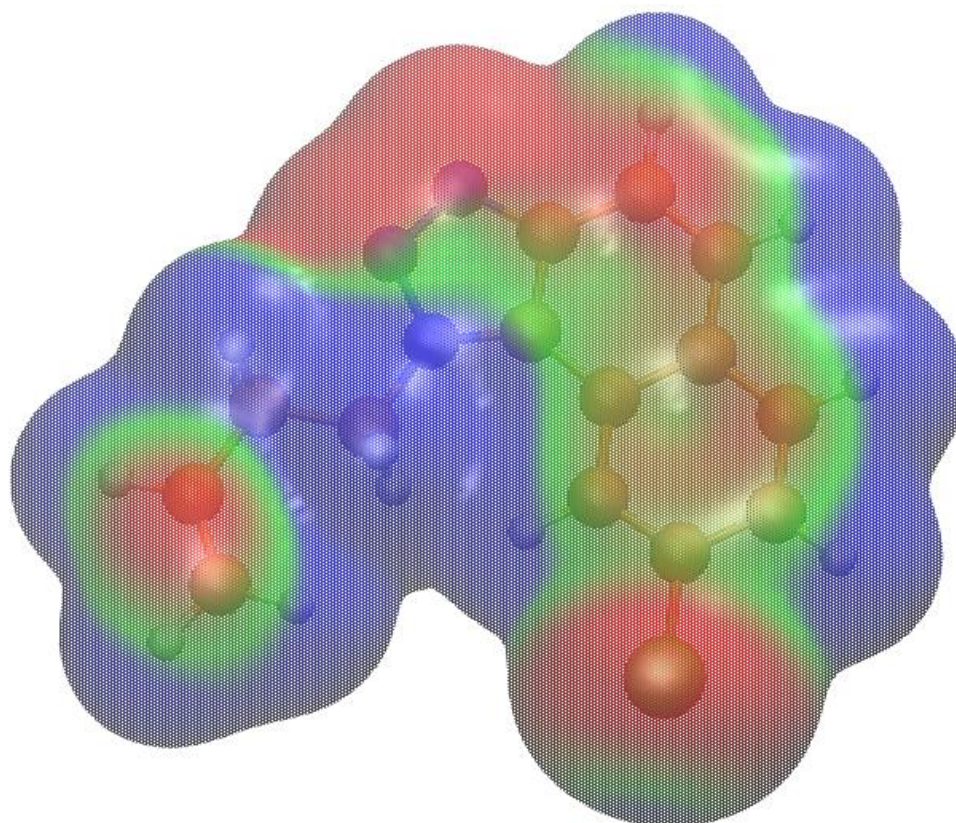


Slika 3.11. Reverzibilni kompleks između naftotriazola **12** i BChE, dobiven molekulskim dokingom nakon MD simulacija. Udaljenosti su izražene u Å, a nepolarni vodikovi atomi na aminokiselinama izostavljeni su radi preglednosti.

Kvalitativna procjena molekularnih interakcija, reaktivnosti i svojstva poput polariteta i topljivosti molekula može se dobiti iz mape elektrostatskog potencijala (MEP). MEP se dobiva računalo iz distribucije elektronske gustoće korištenjem kvantno-mehaničkih metoda a predstavlja privlačnu ili odbojnu silu koju osjeća fiksni naboj (najčešće točkasti pozitivni naboj, tj. proton) u različitim točkama u prostoru koje su jednako udaljene od površine molekule. Mapa elektrostatskog potencijala otkriva područja pozitivnog, negativnog i neutralnog elektrostatskog potencijala oko molekule i najčešće se prikazuje kombinacijom crvene, plave i zelene boje, pri čemu crvena boja označava područje s viškom elektrona, plava označava

područja s manjkom elektrona, dok dok zelena boja označava neutralno područje. Crveno područje je stoga privlačno pozitivno nabijenim vrstama (elektrofilima) i odbojno negativno nabijenim vrstama (nukleofilima), dok plavo područje privlači negativno nabijene vrste (nukleofile) i odbija pozitivno nabijene vrste (elektrofile).

Na slici 3.12. prikazan je elektrostatski potencijal naftotriazola **12**. Najnegativniji elektrostatski potencijal javlja se na atomima dušika u triazolnom prstenu, dvostrukoj vezi butenilnog supstituenta te na atomu klora. Također, aromatski π -sustav pokazuje samo blago negativan elektrostatski potencijal, što se može objasniti jakom elektronegativnošću atoma klora koji sve elektrone odvlači prema sebi. Elektronegativniji dijelovi proučavanog sustava vjerojatnije će reagirati s pozitivnim ograncima aminokiselina koje ih okružuju.

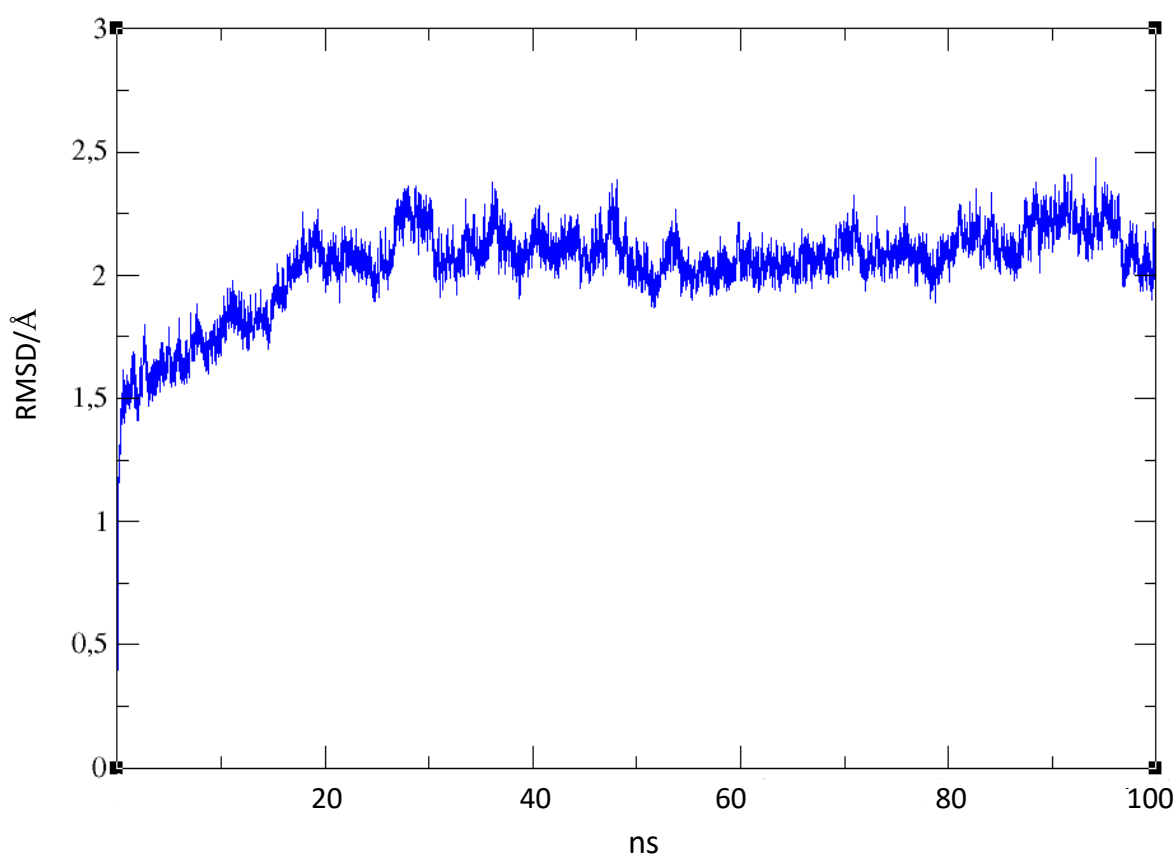


Slika 3.12. Prikaz elektrostatskog potencijala naftotriazola **12**.

Nadalje, na proučavanom sustavu provedene su simulacije MD kako bi se procijenila stabilnost kompleksa protein-ligand koji je dobiven molekulskim pristajanjem. Za kompleks između aktivnog mjesta BChE te derivata **12** određena je struktura s najnižom procijenjenom

slobodnom energijom vezanja i provedena je MD simulacija u trajanju 100 ns. Za izabran sustav izračunate su vrijednosti korijena srednjeg kvadratnog odstupanja, RMSD, (eng. *Root-mean-square deviation values*) kako bi se izmjerile strukturne promjene kompleksa protein-ligand tijekom vremena simulacije. RMSD analiza je provedena na svim atomima u kompleksu protein-ligand, isključujući atome vodika. U ovom slučaju je RMSD vrlo bitan iz razloga što kvantificira koliko se struktura kompleksa razlikuje od početne.

Na slici 3.13. prikazani su rezultat MD simulacije za kompleks između naftotriazola **12** i aktivnog mjesta BChE. RMSD analiza pokazuje kako nakon početnog razdoblja od 20 ns sustav postiže konvergenciju, bez značajnih fluktuacija u daljnjim RMSD vrijednostima. Prosječna RMSD vrijednost preko cijele krivulje iznosi 2,07 Å, s maksimalnom vrijednošću od 2,47 Å, što rezultira razlikom od 0,40 Å između maksimalne i prosječne RMSD vrijednosti. Ispitivanje vrijednosti između 20 i 90 ns ove putanje, gdje je sustav konvergirao, otkriva prosječni RMSD od 2,08 Å i maksimalnu vrijednost od 2,39 Å, smanjujući razliku između njih na 0,31 Å.



Slika 3.13. Simulacija molekularne dinamike kompleksa protein-ligand BChE s naftotriazolom **12**.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

U eksperimentima su korištena sljedeća otapala i kemikalije: acetonitril (ACN), dietil-eter (E), diklormetan (DCM), etanol (EtOH), petroleter (PE), te toluen. Sva korištena otapala su pročišćena destilacijom i komercijalno su dostupna. Kod sinteze je korišten reagens 1,4 - dioksan. Za sintezu fosfonijevih soli korišten je trifenilfosfin (PPh₃) kao kupovna kemikalija. U Wittigovim reakcijama korišten je natrij (Na) čuvan iznad PE koji je reakcijom s EtOH dao natrijev etoksid (NaOEt). Za sušenje organskog sloja nakon ekstrakcije korišten je bezvodni magnezijev sulfat (MgSO₄). Za provođenje tankoslojne kromatografije (TLC) korištene su pločice prevučene silika-gelom (0.2 mm, Kieselgel 60 F₂₅₄). Kod provođenja kolonske kromatografije korištene su kolone punjene silika-gelom (60 Å, tehnički), a otapala su uparena pomoću rotacijskog uparivača pod sniženim tlakom.

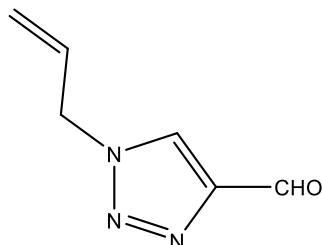
¹H i ¹³C spektri NMR snimani su na spektrometru Bruker Avance koji radi na frekvenciji od 600 MHz za ¹H jezgre i frekvenciji od 150 MHz za ¹³C jezgre, na *Institutu Ruđer Bošković*. Za otapanje spojeva korišten je deuterirani kloroform (CDCl₃), a kao standard za snimanje NMR spektara korišten je tetrametilsilan (TMS). Kemijski pomaci izraženi su u ppm (eng. *parts per million*), a kod karakterizacije signala korištene su sljedeće oznake: s - singlet, d - dublet, dd - dublet-dubleta, t - triplet i m - multiplet. Sljedeći signali u ¹H NMR spektrima su specifični i ne odgovaraju spojevima: signal za vodu u CDCl₃ pri 1,50 ppm, signal za CDCl₃ pri 7,24 ppm i signal za DCM u CDCl₃ pri 5,26 ppm. Svaki ¹³C NMR spektar sadrži jedan specifični signal pri 77 ppm koji odgovara korištenom otapalu - deuteriranom CDCl₃. Fotokemijske reakcije provedene su u 50,0 mL otopine u kvarcnim kivetama koje propuštaju svjetlost. U tu svrhu koristi se fotokemijski reaktor Rayonet opremljen UV lampama (10) valne duljine 313 nm.

4.2. Sinteza spojeva 1 - 5

Spojevi **1-5** sintetizirani su reakcijom između 1-(4-nitro-fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida i odgovarajućeg amina. Reakcija je provedena u maloj, staklenoj bočici. U bočicu je dodan karbaldehid (**1-4**: 9,2 mmol, **5**: 8,3 mmol), te 1,4 – dioksan (0,0823 – 0,148 mL). Kada se karbaldehid otopio dodan je odgovarajući amin u omjeru 1:1. Zatim se reakcijska smjesa propuše minutu argonom. Reakcija se odvija 24h. Reakcijska smjesa je uparena na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom. Produkt je pročišćen na koloni punjenoj silika-gelom. Kao eluens korišten je sustav otapala PE/DCM različitih polarnosti.

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

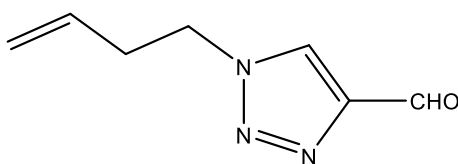
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/DCM (0-50 %).



1-alil-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid: iskorištenje 69,5 %; žuto ulje; R_f (DCM/EtOAc (2 %)) = 0,47; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 10,14 (s, 1H), 6,10-6,01 (m, 1H), 5,44 (d, $J = 10,1$ Hz, 2H), 5,07 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H).

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

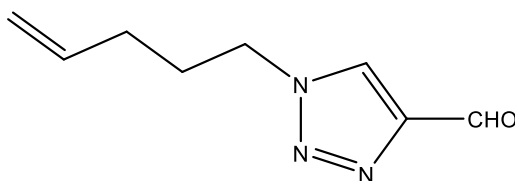
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/DCM (0-50 %).



1-(but-3-en-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid: iskorištenje 71,9 %; žuto ulje; R_f (DCM/EtOAc (2 %)) = 0,46; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 10,13 (s, 1H), 5,80-5,72 (m, 1H), 5,31 (s, 1H), 5,04 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H), 4,52 (t, $J = 4,5$ Hz, 2H), 3,65-3,60 (m, 2H).

1-(pent-4-en-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (3)

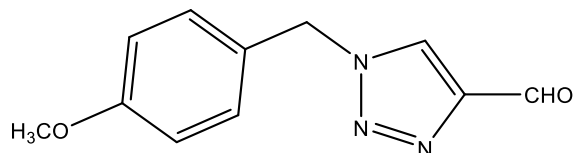
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/DCM (0-100 %).



1-(pent-4-en-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid: iskorištenje 27,3 %; žuto ulje; R_f (DCM/EtOAc (2 %)) = 0,47; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 10,14 (s, 1H), 5,82-5,73 (m, 1H), 5,03 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H), 4,44 (t, $J = 4,4$ Hz, 2H), 3,87-3,82 (m, 2H), 3,65-3,60 (m, 2H).

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

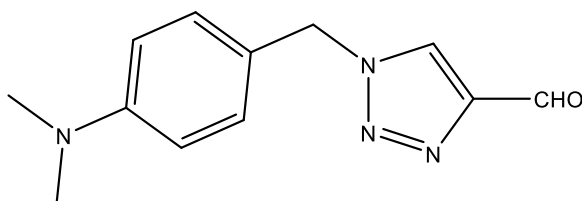
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/DCM (0-100 %).



1-(4-metoksibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid: iskorištenje 36,0 %; žuto ulje; R_f (DCM/EtOAc (2 %)) = 0,33; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 10,10 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,26 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,91 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 5,52 (s, 2H), 3,81 (s, 3H).

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

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/DCM (0-90 %).



1-(4-(dimetilamino)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid: iskorištenje 98 %; žuto ulje; R_f (DCM/EtOAc (2 %)) = 0,30; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 10,10 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,19 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 6,70 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H), 5,46 (s, 2H), 2,97 (s, 6H).

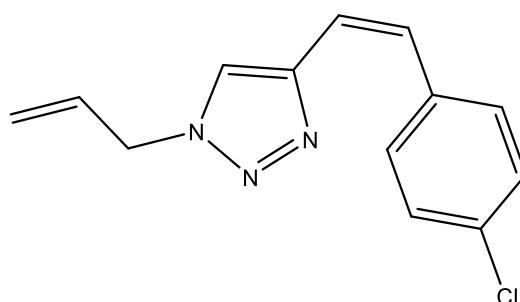
4.3. Sinteza spojeva 6 - 10

Spojevi **6-10** sintetizirani su Wittigovom reakcijom. Prije provođenja reakcije aparatura je propuhana dušikom 15 minuta. Reakcija je provedena u trogloj tikvici (0,25 L) na čija dva sporedna grla su stavljeni klor-kalcijska cijev i balon s N_2 , spojen putem igle i septuma na grlo tikvice. Na srednje grlo tikvice pričvršćen je lijevak za dokapavanje u kojeg je dodano 50 mL EtOH, te pola volumena ispušteno u tikvicu. U tikvicu je zatim dodana fosfonijeva sol (3,0-10,2 mmol) i smjesa se počela miješati pomoću magnetne miješalice. U preostalih 25 mL EtOH dodan je postupno kroz 20 minuta odvagani Na (1,1 ekv). Smjesa je ostavljena da se miješa dok sav Na nije izreagirao u NaOEt.

Zatim je u reakcijsku smjesu uz dokapavanje NaOEt dodan aldehid (1 ekv), te je reakcijska smjesa ostavljena da se miješa 24h na određenoj temperaturi (25 °C). Reakcijska smjesa je uparena na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom, te otopljena u toluenu. Smjesa je zatim ekstrahirana toluenom (3x15 mL). Organski sloj je odvojen u Erlenmayerovu tikvicu, te sušen iznad MgSO₄ koji služi kao sredstvo za sušenje. Nakon 30 minuta sušenja, otapalo je upareno, a organski produkt kao smjesa izomera (s različitim udjelima izomera) pročišćen na koloni punjenoj silika-gelom. Čisti *cis*-izomer (**6**), te smjese izomera (**7-10**) izolirani su kolonskom kromatografijom. Kao eluens korišten je sustav otapala PE/E različitih polarnosti.

1-alil-4-(4-klorostiril)-1*H*-1,2,3-triazol (**6**)

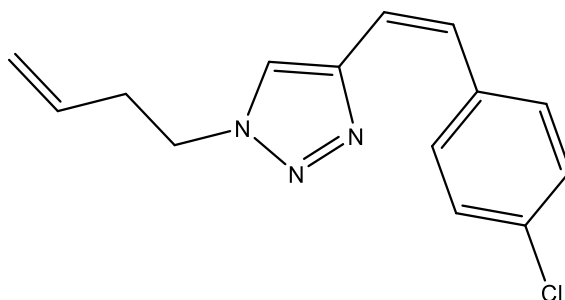
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-45 %). Dobiveno je 43,6 mg smjese izomera.



(Z)-1-alil-4-(4-klorostiril)-1*H*-1,2,3-triazol (*cis*-6): iskorištenje 32,0 %; žuto ulje; R_f (PE/E(50 %)) = 0,43; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ /ppm: 7,10 (s, 1H), 6,70 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H), 6,64 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H), 5,30 (d, $J = 10,6$ Hz, 1H), 5,20 (d, $J = 17,2$ Hz, 1H), 5,95 (m, 1H), 4,86 (d, $J = 6,1$ Hz, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ /ppm: 144,3 (s), 135,8 (s), 133,4 (s), 131,2 (s), 130,0 (s), 129,7 (s), 128,8 (s), 121,5 (s), 120,6 (s), 119,9 (s), 52,5 (s).

1-(but-3-en-1-il)-4-(4-klorostiril)-1*H*-1,2,3-triazol (**7**)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-45 %). Dobiveno je 87,0 mg *cis*-izomera.

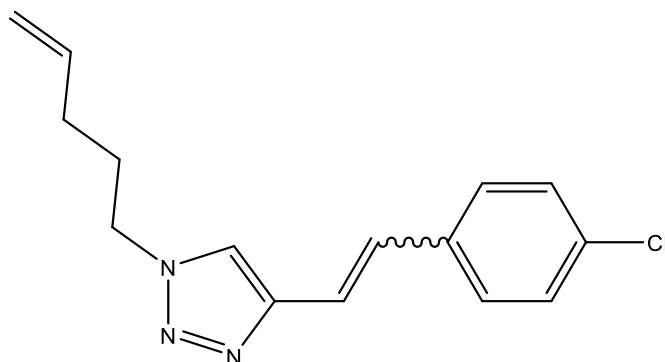


(Z)-1-(but-3-en-1-yl)-4-(4-klorostiril)-1H-1,2,3-triazol (cis-7): iskorištenje 60,5 %; žuto ulje; $R_f(\text{PE/E}(50\%)) = 0,51$; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 8,07 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,31 (m, 4H), 6,71 (d, $J = 12,3$ Hz, 1H) 6,62 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H), 5,68 (m, 1H), 5,0 (s, 1H), 4,30 (t, 1H), 2,57 (dd, $J = 6,9$ Hz/ 13,2 Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 143,9, 136,1, 133,4, 133,1, 129,9, 129,8, 128,8, 121,6, 120,7, 118,5, 49,5, 34,3.

4-(4-klorostiril)-1-(pent-4-en-1-yl)-1H-1,2,3-triazol (8)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-60 %).

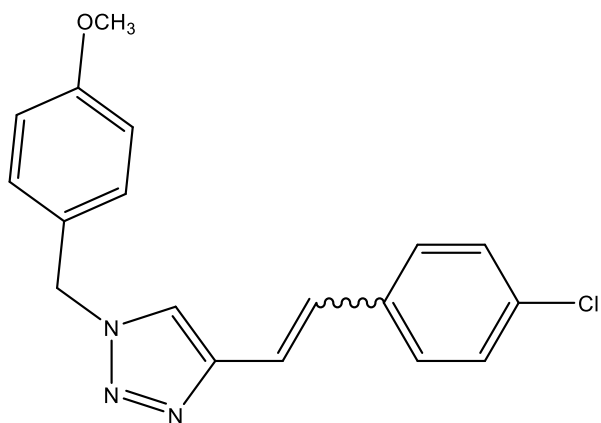
Dobiveno je 10,0 mg smjese izomera.



4-(4-klorostiril)-1-(pent-4-en-1-yl)-1H-1,2,3-triazol: iskorištenje 20 %, žuto ulje; $R_f(\text{PE/E}(50\%)) = 0,56$.

4-(4-klorostiril)-1-(4-metoksibenzil)-1H-1,2,3-triazol (9)

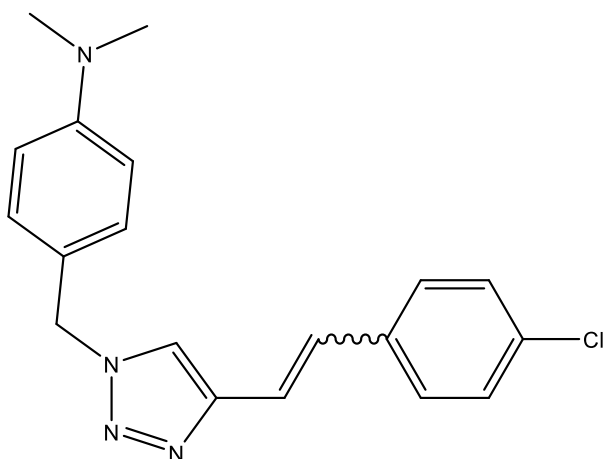
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-60%).



4-(4-klorostiril)-1-(4-metoksibenzil)-1H-1,2,3-triazol: iskorištenje 23 %; žuto ulje; R_f (PE/E(%)) = 0,52.

4-((4-(4-klorostiril)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-N,N-dimetilanilin (10)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-90 %). Dobiveno je 91,1 mg smjese izomera.



4-((4-(4-klorostiril)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-N,N-dimetilanilin: iskorištenje 91,1 %; žuto ulje; R_f (PE/E(50 %)) = 0,58.

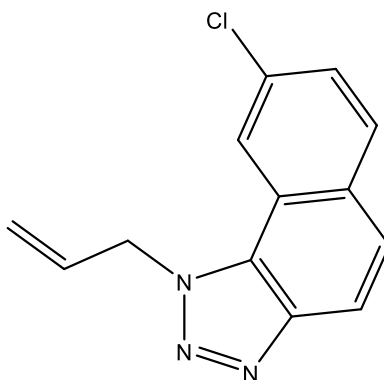
4.4. Sinteza spojeva 11 - 14

Spojevi 11-14 sintetizirani su elektrocikličkim reakcijama u fotokemijskom reaktoru Rayonet. Odgovarajuća masa spoja otopila se u 50 mL toluena p.a. u velikoj kvarcnoj kiveti. Otopini je dodana katalitička količina joda (na vrhu špahtle).

Stijenke kvarcne kivete su s vanjske strane prebrisane vaticom umočenom u etanol kako nečistoće ne bi ometale smjer svjetlosnih zraka. Uzorci su osvjetljavani istovremeno s 10 lampi od 313 nm određeno vrijeme (**11**, **12**, **14** - 2h, **13** - 1h).

1-alil-8-kloro-1H-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol (11**)**

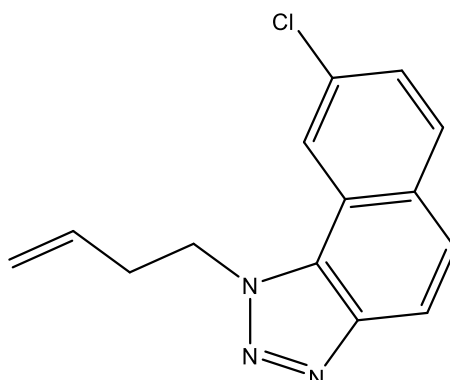
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-70 %).



1-alil-8-kloro-1H-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol: iskorištenje 14,8 %; žuto ulje; R_f (PE/E(30 %)) = 0,60; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 8,14 (s, 1H), 7,94 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 7,89 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,63 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,53 (dd, $J = 2$ Hz/ 9 Hz, 1 H), 6,17-6,10 (m, 1H), 5,05-5,01 (dt, $J = 2$ Hz/ 17 Hz, 1H), 5,6-5,58 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 143,9 (s), 132,0 (s), 130,3 (s), 129,7 (s), 127,6 (s), 126,6 (s), 124,9 (s), 120,9 (s), 119,5 (s), 117,9 (s), 117,5 (s), 51,6 (s), 28,7 (s).

1-(but-3-en-1-il)-8-kloro-1H-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol (12**)**

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-70 %).

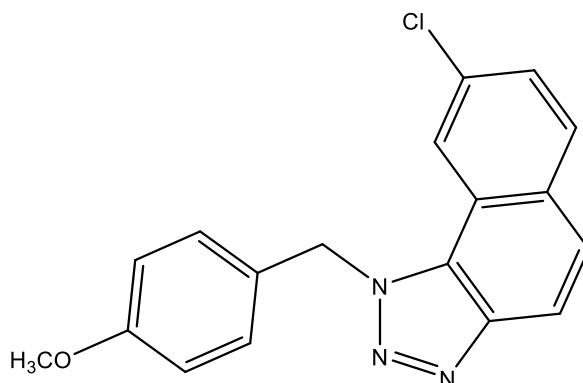


1-(but-3-en-1-il)-8-kloro-1H-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol: iskorištenje 16,2 %; žuto ulje; R_f (PE/DCM(30 %)) = 0,51; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 8,15 (s, 1H), 7,95 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,90 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,63 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,53 (dd, $J = 2$ Hz/ 9 Hz, 1 H), 6,20-

6,05 (m, 1H), 5,60 (t, 2H), 5,30 (d, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 132,0 (s), 130,3 (s), 129,8 (s), 129,7 (s), 126,6 (s), 124,9 (s), 120,9 (s), 119,5 (s), 117,9 (s), 117,5 (s), 51,6 (s), 28,6 (s).

8-kloro-1-(4-metoksibenzil)-1H-nafto[1,2-d][1,2,3]triazol (13)

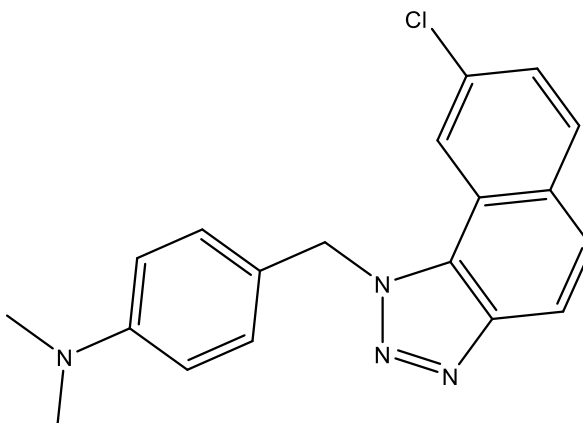
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-50 %).



8-kloro-1-(4-metoksibenzil)-1H-nafto[1,2-d][1,2,3]triazol: iskorištenje 14,6 %; žuto ulje; R_f (PE/E(30 %)) = 0,49; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 8,14 (s, 1H), 8,02 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,90 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,67 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,52 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 6,84 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 6,17 (s, 2H), 3,75 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 158,6 (s), 131,9 (s), 130,2 (s), 129,6 (s), 126,9 (s), 126,8 (s), 126,5 (s), 125,1 (s), 124,8 (s), 121,1 (s), 119,5 (s), 117,4 (s), 113,6 (s), 54,2 (s), 52,7 (s), 28,7 (s).

4-((8-kloro-1H-nafto[1,2-d][1,2,3]triazol-1-il)metil)-N,N-dimetilanilin (14)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-60 %).



4-((8-kloro-1*H*-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)metil)-*N,N*-dimetilanilin: iskorištenje 15,3 %; žuto ulje; $R_f(\text{PE/E}(50\%)) = 0,75$; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 8,24 (s, 1H), 8,01 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H), 7,88 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,65 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,51 (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H), 7,12 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,66 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,12 (s, 2H), 2,90 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 145,2 (s), 132,9 (s), 131,2 (s), 130,5 (s), 128,6 (s), 127,8 (d), 127,4 (d), 125,7 (s), 122,3 (s), 120,7 (s), 118,4 (d), 112,7 (s), 53,9 (s), 40,4 (s).

POPIS SIMBOLA

ACN - acetonitril

ACh - eng. *acetylcholine* - acetilkolin

AChE - eng. *Acetylcholinesterase* - acetilkolinesteraza

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

BChE - eng. *Butyrylcholinesterase* - butirilkolinesteraza

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

CDCl₃ - deuterirani kloroform

ChE - eng. *cholinesterase* - kolinesteraza

DCM - diklormetan

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

DMF - dimetilformamid

E - dietileter

EtOAc - etilacetat

EtOH - etanol

HF - Hartree-Fock

IC₅₀ - eng. *half-maximal inhibitory concentration* - koncentracija za polovičnu inhibiciju

LPS - lipopolisaharid

MgSO₄ - magnezijev sulfat

MD - eng. *molecular dynamics* - molekulska dinamika

MM - eng. *molecular mechanics* - molekulska mehanika

Na - natrij

NaH - natrijev hidrid

NaOEt - natrijev etoksid

NFαB - eng. *nuclear factor alpha B* - nuklearni faktor alfa B

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

PBC - eng. *periodic boundary conditions* - periodični rubni uvjeti

PBMC - eng. *Peripheral blood mononuclear cells* - mononuklearne stanice periferne krvi

PE - petroleter

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

PPh₃ - trifenilfosfin

QM - eng. *quantum-mechanics* - kvantna mehanika

RMSD - eng. *Root-mean-square deviation values* - srednji korijenski kvadrat odstupanja

THF - tetrahidrofur

TLC - eng. *thin-layer chromatography* - tankoslojna kromatografija

TMS - tetrametilsilan

TNF- α - eng. *tumour necrosis factor alpha* - faktor tumorske nekroze alfa

5. ZAKLJUČAK

S ciljem pronalaženja novih naftotriazolnih derivata kao potencijalnih terapijskih sredstava, sintetizirani su naftotriazoli **11-15**. Novi naftotriazoli sintetizirani su kroz 3 koraka. U prvom koraku su nukleofilnom supstitucijom sintetizirani aldehidi **1-5**, nakon čega su podvrgnuti Wittigovoj reakciji, gdje kao produkti nastaju *cis*- i *trans*- izomeri heterostilbena **6-10**. U posljednjem koraku, iz heterostilbena procesom fotokemijske ciklizacije nastali su naftotriazoli **11-14**, dok se naftotriazol **15** pokazao zahtjevnijim za sintezu te nije pronađen uspjeh pri njegovoj sintezi. Dobiveni spojevi spektroskopski su okarakterizirani pomoću 1D NMR tehnika, čime je potvrđena njihova struktura i čistoća.

Novi naftotriazolni derivati **11-15** podvrgnuti su biološkim testiranjima pri čemu se ispitala potencijalna inhibicija enzima AChE i BChE. Biološka ispitivanja pokazala su kako naftotriazoli **11-13** posjeduju inhibicijski potencijal prema BChE, dok **12** jedini pokazuje isti prema AChE te ujedno pokazuje najbolje rezultate pri inhibiciji oba enzima. Naftotriazol **12** pokazuje IC₅₀ vrijednosti od 195,4 μM za inhibiciju AChE, te 71,0 μM za inhibiciju BChE. U usporedbi sa standardom Galantaminom koji za inhibiciju BChE ima IC₅₀ vrijednost od 7,9 μM, vrijednost IC₅₀ od 71,0 μM pokazuje obećavajući rezultat, stoga ovaj derivat ima potencijal za daljnje istraživanje i razvoj. Valja naglasiti kako su naftotriazoli **11-15** sintetizirani prvotno s ciljem potencijalnog protuupalnog djelovanja, stoga su očekivani rezultati inhibicije ChE koji će nešto biti slabiji od standarda Galantamina. Protuupalna ispitivanja objavit će se i obraditi u budućim radovima kada budu dovršena. Ukoliko bi se na derivatima **11-15** provelo metiliranje triazolnog prstena kako bi se dobile soli, vjerojatno bi i rezultati inhibicije ChE bili znatno bolji kao što je rezultat i kod sličnih derivata citiranih u ovome radu.

Nadalje, u ovom radu provedeno je i računalno istraživanje elektronske strukture i termodinamičke stabilnosti novih sintetiziranih naftotriazola **11-15**. Budući da je naftotriazol **12** pokazao najbolje rezultate inhibicije BChE, molekulskim dokingom dobivena je struktura kompleksa između naftotriazola **12** sintetiziranog u ovom radu i aktivnog mjesta butirilkolinesteraze. Uvid u dobiveni strukturu kompleksa omogućio je identifikaciju elektronskih međudjelovanja koja doprinose stabilnosti kompleksa i time povećavaju inhibicijski potencijal sintetiziranog naftotriazola.

Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti kako sintetizirani naftotriazol **12** pokazuje obećavajući potencijal kao terapeutik pri liječenju neurodegenerativnih bolesti. Ovaj rad naglašava važnost strukturnih karakteristika, kao što je tip supstitucije i naboj na dušikovom

atomu triazolnog prstena, u povećanju inhibicijske učinkovitosti prema kolinesterazama. Stoga bi se potencijal naftotriazola **12**, pri inhibiciji AChE i BChE mogao povećati prevođenjem derivata u razne soli što će biti testirano u budućim studijama u istraživačkoj grupi. Za sintetizirane naftotriazole **11-14** provodi se trenutno i ispitivanje protuupalne aktivnosti, čiji rezultati će biti objavljeni u budućim publikacijama.

6. LITERATURA

1. Taylor, P., Radić, Z., The cholinesterases: From genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 33 (1994) 281-320.
2. Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I., Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo Californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein, *Science*, 253 (1991) 872-897.
3. Kovarik, Z., Amino acid residues conferring specificity of cholinesterases, *Period. Biol.*, 101 (1999) 7-15.
4. Radić, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S., Taylor, P., Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors, *Biochemistry*, 32 (1993) 12074-12084.
5. Saxena, A., Redman, A.M.G., Jiang, X., Lockridge, O., Doctor, B.P., Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterase revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase, *Chem. Biol. Interact.*, 119-120 (1999) 61-69.
6. Taylor, P., Radić, Z., Hosea, N.A., Camp, S., Marchot, P., Berman, H.A., Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition, *Toxicol. Lett.*, 82-83 (1995) 453-458.
7. Soreq, H., Seidman, S., Acetylcholinesterase-New roles for an old actor, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2 (2001) 294-302.
8. Silman, I., Sussman, J.L., Acetylcholinesterase: 'Classical' and 'non-classical' functions and pharmacology, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5 (2005) 293-302.
9. Pienica, C., Soreq, H., MicroRNA regulators of cholinergic signaling link neuromuscular, cardiac and metabolic systems, *Period. Biol.*, 118 (2016) 373-379.
10. Chatonnet, A., Lockridge, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase, *Biochem. J.*, 260 (1998) 625-634.
11. Çokugras, A.N., Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance, *Turk. J. Biochem.*, 28 (2003) 54-61.

12. Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E.G., Lockridge, O., Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine, *Neuroscience*, 110 (2002) 627-639.
13. Guillozet, A.L., Smiley, J.F., Mash, D.C., Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques, *Ann. Neurol.*, 42 (1997) 909-918.
14. Mesulam, M.M., Geula, C., Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia, *Ann. Neurol.*, 36 (1994) 722-727.
15. Darvesh, S., Walsh, R., Kumar, R., Caines, A., Roberts, S., Magee, D., Rockwood, K., Martin, E., Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 17 (2003) 117-126.
16. Šagud, I., Maček Hrvat, N., Grgičević, A., Cadež, T., Hodak, J., Dragojević, M., Lasić, K., Kovarik, Z., Škorić, I., Design, synthesis and cholinesterase inhibitory properties of new oxazole benzylamine derivatives, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 1 (2020) 460-467.
17. Bosak, A., Opsenica, D.M., Šinko, G., Zlatar, M., Kovarik, Z., Structural aspects of 4-aminoquinolines as reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Chem. Biol. Interact.*, 308 (2019) 101-109.
18. Mamedova, G., Mahmudova, A., Mamedov, S., Erden, Y., Taslimi, P., Tüzün, B., Tas, R., Farzaliyev, V., Sujayev, A., Alwasel, S.H. et al., Novel tribenzylaminobenzolsulphonylimine based on their pyrazine and pyridazines: Synthesis, characterization, antidiabetic, anticancer, anticholinergic, and molecular docking studies, *Bioorg. Chem.*, 93 (2019) 103313.
19. Katalinić, M., Bosak, A., Kovarik, Z., Flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase variants, *Food Technol. Biotechnol.*, 52 (2014) 64-67.
20. El-Sayed, N.A.E., El-Said Farag, A., Ezzat, M.A.F., Akincioglu, H., Gülçin, I., Abou-Seri, S.M., Design, synthesis, in vitro and in vivo evaluation of novel pyrrolizine-based compounds with potential activity as cholinesterase inhibitors and anti-Alzheimer's agents, *Bioorg. Chem.*, 93 (2019) 103312.
21. Mlakić, M., Faraho, I., Odak, I., Talić, S., Bosnar, M., Lasić, K., Barić, D., Škorić, I., New naphtho/thienobenzo-triazoles with interconnected anti-inflammatory and cholinesterase inhibitory activity, *Eur. J. Med. Chem.*, 241 (2022) 114616.

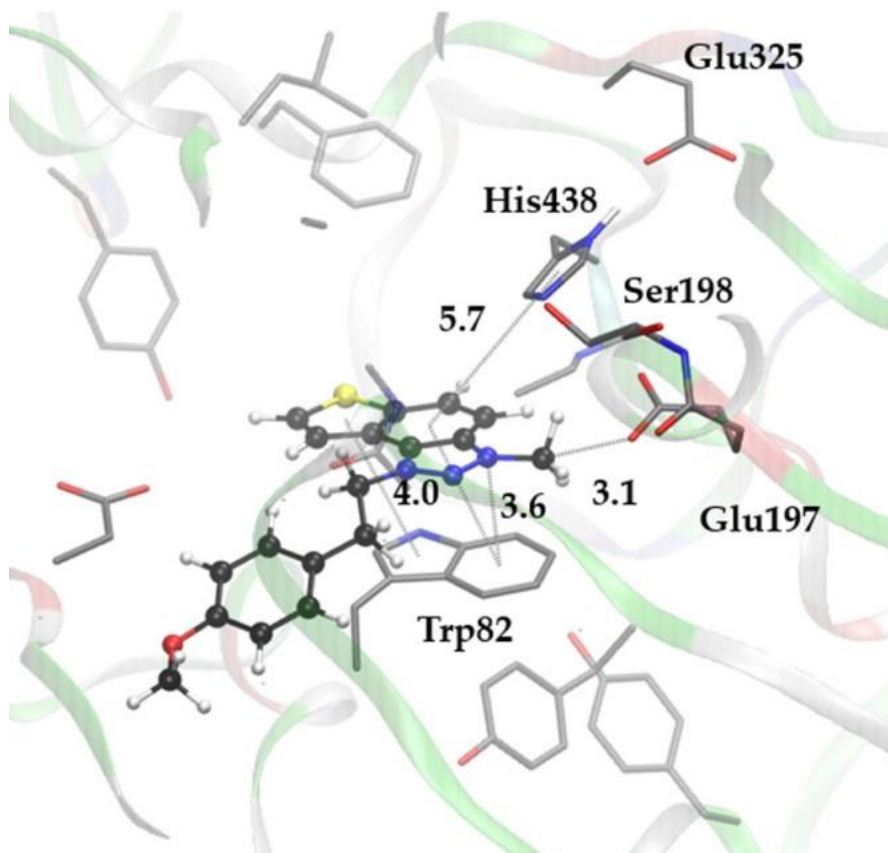
22. Mlakić, M., Faraho, I., Odak, I., Kovačević, B., Raspudić, A., Šagud, I., Bosnar, M., Škorić, I., Barić, D., Cholinesterase Inhibitory and Anti-Inflammatory Activity of the Naphtho- and Thienobenzo-Triazole Photoproducts: Experimental and Computational Study, *Int. J. Mol. Sci.*, 24 (2023) 14676.
23. Mlakić, M., Selec, I., Čaleta, I., Odak, I., Barić, D., Ratković, A., Molčanov, K., Škorić, I., New Thienobenzo/Naphtho-Triazoles as Butyrylcholinesterase Inhibitors: Design, Synthesis and Computational Study, *Int. J. Mol. Sci.*, 24 (2023) 5879.
24. Al-Masoudi, I.A., Al-Soud, Y.A., Al-Salihi, N.J., Al-Masoudi, N.A., 1,2,4-Triazoles: synthetic approaches and pharmacological importance, *Chem. Hetero. Comp.*, 42 (2006) 1377-1403.
25. Sahu, J.K., Ganguly, S., Kaushik, A., Triazoles: a valuable insight into recent developments and biological activities, *Chin. J. Nat. Med.*, 11 (2013) 456-465.
26. Lee, I., Choe, Y.S., Choi, Y.J., Lee, K.H., Kim, B.T., Synthesis and Evaluation of 18F-Labeled Styryltriazole and Resveratrol Derivatives for β -Amyloid Plaque Imaging, *J. Med. Chem.*, 55 (2012) 883-92.
27. Ji, X., Guang, S., Xu, H., Ke, F., Qin, X., Fluorene-based click polymers: Relationship between molecular structure and nonlinear optical properties, *J. Appl. Polym. Sci.*, 131 (2014) 40878.
28. Caprioglio, D., Torretta, S., Ferrari, M., Travelli, C., Grolla, A.A., Condorelli, F., Genazzani, A.A., Minassi, A., Triazole curcuminoids: A new class of derivatives for 'tuning' curcumin bioactivities, *Bioorg. Med. Chem.*, 24 (2016) 140-152.
29. Li, W., Jia, Q., Du, Z., Wang, J., Direct access to triazole-olefins through catalytic cycloaddition of azides to unsaturated aldehydes, *Chem. Commun.*, 49 (2013) 10187-10189.
30. Terasawa, M., Mikashima, H., Tahara, T., Maruyama, Y., Antagonistic activity of etizolam on platelet-activating factor in vivo experiments, *Japan J. Pharmacol.*, 44 (1987) 381-386.
31. Allison, M.C., Howatson, A.G., Torrance, C.J., Lee, F.D., Russell, R.I., Gastrointestinal damage associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *N. Engl. J. Med.*, 327 (1992) 749-754.

32. Núñez Miguel, R., Wong, J., Westoll, J.F., Brooks, H.J., O'Neill, L.A., Gay, N.J., Bryant, C.E. and Monie, T.P., A dimer of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins, *PLoS One*, 2 (2007) 788.
33. Ueda, F., Iizuka, K., Tago, K., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Kasahara, T., Tamura, H. and Funakoshi-Tago, M., Inhibitory effects of flavonoids extracted from Nepalese propolis on the LPS signaling pathway, *Int. Immunopharmacol*, 28 (2015) 967.
34. Feroze, U., Kalantar-Zadeh, K., Sterling, K.A., Molnar, M.Z., Noori, N., Benner, D., Shah, V., Dwivedi, R., Becker, K., Kovcsdy, C.P. and Raj, D.S., Examining associations of circulating endotoxin with nutritional status, inflammation and mortality in hemodialysis patients, *J. Ren. Nutr*, 22 (2012) 317.
35. Szafer, H., Cichocki, M., Krajka-Kuz'niak, V., Stefan'ski, T., Sobiak, S., Licznarska, B., Baer-Dubowska, W., The effect of resveratrol and its methylthio-derivatives on NF- κ B and AP-1 signaling pathways in HaCaT keratinocytes, *Pharmacological Reports*, 66 (2014) 732-740.
36. Hu, S., Wang, Y., Li, H., The regulation effect of α 7nAChRs and M1AChRs on inflammation and immunity in sepsis, *Mediat. Inflamm*, 9059601 (2021) 1-10.
37. Pohanka, M., Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity, *Int. J. Mol. Sci.*, 15 (2014) 9809-9825.
38. Bernik, T.R., Friedman, S.G., Ochani, M., DiRaimo, R., Ulloa, L., Yang, H., Sudan, S., Czura, C.J., Ivanova, S.M., Tracey, K.J., Pharmacological stimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway, *J. Exp. Med.*, 195 (2002) 781-788.
39. Colovic, M.B., Krstic, D.Z., Lazarevic-Pasti, T.D., Bondzic, A.M., Vasic, V.M., Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology, *Curr. Neuropharmacol.*, 11 (2013) 315-335.
40. Silman, I. and Sussman, J. L., Structural studies on cholinesterases. In: *cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*, Giacobini, E., Ed., Martin Dunitz: London, 2000., 9-25.
41. Nachmensohn, D., Chemical and molecular basis of nerve activity. Physiologically significant features of acetylcholinesterase, Academic Press: New York and London, 1959.
42. Taylor, P. Anticholinesterase agents. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W. and Gilman, A. G., Eds.; McGraw-Hill: New York, 1996; pp. 161–176.

43. Hawkins, R. D. and Mendel, B., Selective inhibition of pseudocholinesterase by diisopropyl fluorophosphonate, *Brit. J. Pharmacol.*, 2 (1947) 173-180.
44. Xie, S. S., Wang, X.B., Li, J.Y., Yang, L. and Kong, L.Y., Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.*, 64 (2013) 540-553.
45. Singhal, N., Sharma, P. K., Dudhe, R. and Kumar, N., Recent advancement of triazole derivatives and their biological significance, *J. Chem. Pharm. Res.*, 3 (2011) 126-133.
46. Smith, G. S., Kramer, E., Ma, Y., Hermann, C. R., Dhawan, V., Chaly, T. and Eidelberg, D., Cholinergic modulation of the cerebral metabolic response to citalopram in Alzheimer's disease, *Brain.*, 132 (2009) 392-401.
47. Walsh, R., Rockwood, K., Martin, E. and Darvesh, S., Synergistic inhibition of butyrylcholinesterase by galantamine and citalopram. *Biochim, Biophys. Acta.*, 1810 (2012) 1230-1235.
48. Foresman, J.B., Frisch, A., Gaussian, I., Exploring chemistry with electronic structure Methods, Second edition, Gaussian (1996).
49. Young, D.C., Introduction In Computational Chemistry. John Wiley and Sons (2001).
50. Bachrach, S.M., Computational organic chemistry, Wiley-Interscience: Hoboken, New Jersey, 2007., 496.
51. Ewing, J.A.T., Kuntz, I.D., Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening, *J. Comput. Chem.*, 18 (1997) 1175.
52. Warshel, A., Levitt, M., Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme, *J. Mol. Biol.*, 103 (1976) 227-249.
53. Pezeshki, S., Lin, H., Recent developments in QM/MM methods towards open-boundary multi-scale simulations, *Mol. Simul.*, 41 (2015) 168-189.
54. Elstner, M., Porezag, D., Jungnickel, G., Elsner, J., Haugk, M., Frauenheim, T., Suhai, S., Seifert, G., Self-consistent-charge densityfunctional tight-binding method for simulations of complex materials properties, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, 58 (1988) 7260-7268.

55. Chandrasekhar, J., Smith, S.F. and Jorgensen, W.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 154.
56. Allen M.P. and Tildesley, D.J., *Computer Simulations of Liquids*, Oxford University Press, London, 1987.
57. Khaskin, E., Milstein, D., Catalytic, oxidant-free, direct olefination of alcohols using Wittig reagents, *Chemical Communications*, 43 (2015) 9002-9005.
58. Yan, J., Yueyan Guo, Yali Wang, Mao, F., Huang, L., Xingshu Li, Design, synthesis, and biological evaluation of benzoselenazole-stilbene hybrids as multi-target-directed anti-cancer agents, *Eur J Med Chem.*, 95 (2015) 220-229.
59. Hart, J.H., Role of phytostilbenes in decay and disease resistance, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 19 (1981) 437-458.
60. Horspool, W. M. & Lenci F., *Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, 33 (2004) 638-650.
61. Mlakić, M., Barić, D., Ratković, A., Šagud, I., Čipor, I., Piantanida, I., Odak, I., Škorić, I., New Charged Cholinesterase Inhibitors: Design, Synthesis, and Characterization, *Molecules*, 29 (2024) 1622.

PRILOZI



Prilog 1. Reverzibilni kompleks između naptotriazola **I** i BChE, dobiven molekulskim dockingom. Udaljenosti su izražene u Å, a nepolarni vodikovi atomi na aminokiselinama izostavljeni su radi preglednosti.