

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



Tomaž Trobec

INTERAKCIJE NOVIH RUTENIJEVIH
ORGANOKOVINSKIH KOMPLEKSOV S SESALSKIM
HOLINERGIČNIM SISTEMOM

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2022

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



UDK 577.15:546.95.612.741.591.181(043.3)

Tomaž Trobec, dr. vet. med.

INTERAKCIJE NOVIH RUTENIJEVIH ORGANOKOVINSKIH
KOMPLEKSOV S SESALSKIM HOLINERGIČNIM SISTEMOM

Doktorska disertacija

INTERACTIONS OF NEW RUTHENIUM ORGANOMETALLIC
COMPLEXES WITH THE MAMMALIAN CHOLINERGIC
SYSTEM

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2022

Tomaž Trobec

Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom

Delo je bilo opravljeno na:

- Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete, Ljubljana, Slovenija;
- Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, Ljubljana, Slovenija;
- Inštitutu Service d'Ingénierie Moléculaire pour la Santé, Gif-sur-Yvette, Francija.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: prof. dr. Robert Frangež

Somentorica: doc. dr. Monika Cecilija Žužek

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Tomaž Snoj

Član: prof. dr. Dušan Šuput

Član: izr. prof. dr. Andraž Stožer

Izjava o delu: Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni ter da nisem kršil avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

IZVLEČEK

Iz knjižnice novosintetiziranih organorutenijevih(II) arenških kompleksov smo z biokemično karakterizacijo določili komplekse, ki: i) selektivno zavirajo butirilholinesterazo (BChE); ii) zavirajo holinesteraze; iii) zavirajo holinesteraze in glutation S-transferaze (GST) in iv) selektivno zavirajo GST. Z elektrofiziološkimi metodami smo na živčno-mišičnih preparatih mišjih hemidiafragem proučili vpliv izbranih organorutenijevih(II) kompleksov ($[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(1\text{-hidroksi-3-metoksipiridin-2}(1H)\text{-tionato)pta}]\text{PF}_6$ (C1)) in ($[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(5\text{-nitro-1,10-fenantrolin)Cl}]\text{Cl}$ (C1-Cl)) z ugotovljeno antiholinesterazno aktivnostjo v nizkem mikromolarnem območju na krčenje in membranske potenciale mišičnih vlaken. Ugotovili smo, da kompleks C1, ki v pogojih *in vitro* selektivno zavre encim BChE, *ex vivo* v najvišji uporabljeni koncentraciji (120 μM) ne vpliva na amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične izometrične kontrakcije. Poleg tega tudi ne vpliva na mirovni membranski potencial (rVm) skeletnih mišičnih vlaken in na amplitudo potenciala motorične ploščice (PMP). Največja koncentracija (120 μM) kompleksa C1 značilno zmanjša le amplitudo ter skrajša razpolovni čas padajoče faze spontaninih miniaturnih potencialov motorične ploščice in razpolovni čas padajoče faze PMP. C1 pri zelo visoki koncentraciji (120 μM) ne zavira pomembno acetilholinesteraze (AChE) in nikotinskih acetilholinskih receptorjev (nAChR), prisotnih v živčno-mišičnem stiku, in s tem ne vpliva na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema. Za kompleks C1-Cl, ki *in vitro* zavira delovanje holinesteraz, je elektrofiziološka karakterizacija pokazala, da kompleks v nizkih mikromolarnih koncentracijah reverzibilno zavre posredno izzvano enostavno ($\text{IC}_{50} = 19,44 \mu\text{M}$) in tetanično ($\text{IC}_{50} = 9,68 \mu\text{M}$) izometrično kontrakcijo in zmanjša amplitude PMP ($\text{IC}_{50} = 7,61 \mu\text{M}$), pri čemer se rVm skeletnih mišičnih vlaken ne spremeni. Amplituda mišične kontrakcije se je po dodatku 3 μM neostigmina, ki je povratni zaviralec AChE, izjemno hitro povrnila, kar kaže selektivno kompetitivno zaviralno delovanje kompleksa C1-Cl na posinaptične nAChR mišičnega tipa. To smo potrdili tudi z metodo vpete napetosti na oocitih navadne krepljarke (*Xenopus laevis*) z meritvami ionskih tokov skozi v membrani mikroimplantirane nAChR iz navadnega električnega skata (*Torpedo marmorata*). Ugotovili smo, da C1-Cl deluje kot povratni antagonist nAChR iz navadnega električnega skata ($\text{IC}_{50} = 332 \text{ nM}$). Elektrofiziološka karakterizacija kompleksa C1-Cl je tako pokazala, da kompleks *ex vivo* v farmakološko zanimivih koncentracijah s povratno vezavo na posinaptične nAChR prek nedepolarizirajočega

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

mehanizma zavre živčno-mišični prenos. Zato je kompleks C1-C1 zanimiv za nadaljnja predklinična testiranja kot nov nedepolarizirajoč miorelaksant za potencialno uporabo v veterinarski in humani medicini.

Ključne besede: Rutenij-kemija; organokovinske spojine; holinesterazni inhibitorji; nikotinski receptorji; membranski potenciali; mišična kontrakcija; živčno mišični stik; motorična ploščica; elektrofiziologija; metoda vpete napetosti.

ABSTRACT

From the library of newly synthesized organoruthenium(II) arene complexes, we identified biochemical characterization complexes that i) selectively inhibit butyrylcholinesterase (BChE); ii) inhibit cholinesterases; iii) inhibit cholinesterases and glutathione S-transferases (GSTs) or iv) selectively inhibit GSTs. Two selected organoruthenium(II) complexes ($[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{II})(1\text{-hydroxy-3-methoxypyridine-2}(1H)\text{-thionato})\text{pta}]\text{PF}_6$ (C1) and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{II})(5\text{-nitro-1,10-phenanthroline})\text{Cl}]\text{Cl}$ (C1-Cl) with anticholinesterase activity in the low micromolar range were studied with electrophysiological methods on mouse neuromuscular hemidiaphragm preparations for their effect on contractility and membrane potentials. We found that complex C1 selectively inhibited BChE *in vitro* but exhibited no effect on the amplitude of directly muscle-elicited and nerve-evoked single twitch and tetanic isometric contraction *ex vivo* at the highest concentration used (120 μM). Furthermore, C1 also had no effect on the resting membrane potential (rVm) of skeletal muscle fibres and the amplitudes of the end-plate potentials (EPPs). The 120 μM concentration of complex C1 decreased only the amplitude and shortened the half-decay time of the miniature end-plate potentials and the half-decay time of the EPPs. Complex C1 had no significant antagonistic effects on acetylcholinesterase (AChE) activity and the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) present in neuromuscular junctions; thus, C1 did not affect the function of the peripheral neuromuscular system. For the C1-Cl complex, which inhibits cholinesterase activity *in vitro*, electrophysiological characterization showed that the complex reversibly inhibited nerve-evoked single twitch ($\text{IC}_{50} = 19.44 \mu\text{M}$) and tetanic ($\text{IC}_{50} = 9.68 \mu\text{M}$) isometric contraction at low, micromolar concentrations and decreases the amplitudes of EPPs ($\text{IC}_{50} = 7.61 \mu\text{M}$) without any significant change in the rVm of skeletal muscle fibres. The amplitude of muscle contraction recovered rapidly after applying the reversible AChE inhibitor neostigmine (3 μM), strongly suggesting that the C1-Cl complex exhibits a selective competitive antagonistic effect on postsynaptic muscle-type nAChRs. We also confirmed antagonistic activity by measuring ion currents through nAChRs in the presence of C1-Cl with a two-electrode voltage clamp on *Xenopus laevis* oocytes with nAChRs from *Torpedo marmorata* microimplanted in their membrane. We found that complex C1-Cl is a reversible antagonist of *Torpedo* nAChRs ($\text{IC}_{50} = 332 \text{ nM}$). Electrophysiological characterization of the C1-Cl complex showed that at concentrations of pharmaceutical interest, the complex inhibits

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

neuromuscular transmission *ex vivo* by a nondepolarizing mechanism through reversible binding on postsynaptic muscle-type nAChRs. Therefore, the C1-Cl complex may be interesting for further preclinical testing as a novel nondepolarizing myorelaxant for potential use in veterinary and human medicine.

Keywords: Ruthenium-chemistry; organometallic compounds; cholinesterase inhibitors; receptors, nicotinic; membrane potentials; muscle contraction; neuromuscular junction, motor endplate; electrophysiology; Voltage clamp technique

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	4
ABSTRACT	6
KAZALO VSEBINE	8
KAZALO SLIK	13
KAZALO TABEL	16
SEZNAM OKRAJŠAV	17
1 UVOD	20
2 PREGLED LITERATURE	22
2.1 Kovine in kovinski kompleksi	22
2.1.1 Rutenij in rutenijevi kompleksi	23
2.1.2 Biološki učinki rutenijevih kompleksov	23
2.1.3 Rutenijevi(II) arenski kompleksi kot zaviralci encimov	25
2.2 Holinergični živčni sistem	27
2.2.1 Holinesterazni encimi	28
2.2.1.1 Acetilholinesteraza	29
2.2.1.2 Butirilholinesteraza	30
2.2.1.3 Zaviralci holinesteraz	31
2.2.1.3.1 Donepezil	32
2.2.1.3.2 Rivastigmin	32

2.2.1.3.3	Galantamin	33
2.2.2	Nikotinski acetilholinski receptorji	33
2.2.2.1	Živčni tip nikotinskih acetilholinskih receptorjev	33
2.2.2.2	Mišični tip nikotinskih acetilholinskih receptorjev	34
2.2.2.3	Konformacijske oblike nikotinskih acetilholinskih receptorjev	34
2.2.2.4	Potencial motorične ploščice, akcijski potencial in kontrakcija mišičnega vlakna	35
2.2.2.5	Zaviralci nikotinskih acetilholinskih receptorjev	35
2.2.3	Muskarinski acetilholinski receptorji	36
2.3	Bolezni, povezane z motnjami delovanja holinergičnega sistema	37
2.3.1	Alzheimerjeva bolezen	37
2.3.1.1	Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni	38
2.3.1.1.1	Zaviralci holinesteraz	38
2.3.1.1.2	Agonisti muskarinskih acetilholinskih receptorjev	39
2.3.1.1.3	Agonisti nikotinskih acetilholinskih receptorjev	39
2.3.2	Miastenija gravis	39
2.3.3	Miastenija gravis pri psih	41
2.3.3.1	Zdravljenje miastenije gravis	41
3	MATERIALI IN METODE	43
3.1	Seznam kemikalij	43

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

3.2	Organorutenijevi(II) arenški kompleksi, prekursorji in ligandi.....	46
3.3	Priprava osnovnih raztopin encimov	50
3.4	Test zaviranja holinesteraznih encimov.....	50
3.4.1	Priprava 100 mM K-fosfatnega pufra.....	50
3.4.2	Priprava Ellmanovega reagenta.....	51
3.4.3	Priprava substrata (1 M AChSH)	51
3.4.3.1	Priprava treh različnih koncentracij raztopin substrata (AChSH) in Ellmanovega reagenta.....	51
3.4.4	Priprava rutenijevih kompleksov, prekursorjev in ligandov za biokemično karakterizacijo	51
3.4.5	Presejalni test zaviranja holinesteraznih encimov.....	52
3.4.6	Določanje konstante inhibicije	53
3.5	Test zaviranja glutation S-transferaz	54
3.5.1	Priprava Na-fosfatnega pufra.....	55
3.5.2	Priprava substratov	55
3.5.2.1	Raztopina A: priprava raztopine Cl-2,4-DNB	55
3.5.2.2	Priprava raztopin treh različnih koncentracij substrata Cl-2,4-DNB.....	55
3.5.3	Raztopina B: priprava raztopine L-GSH	55
3.5.4	Presejalni test zaviranja encimov glutation S-transferaze	55
3.5.5	Določanje konstante inhibicije	57

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

3.6	Meritve vpliva izbranih organorutenijevih(II) kompleksov na izometrično kontrakcijo in membranske potenciale mišičnih vlaken izoliranih hemidiafragem miši.....	58
3.6.1	Priprava živčno-mišičnega preparata.....	58
3.6.2	Meritve vpliva izbranih organorutenijevih(II) kompleksov na izometrično mišično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši.....	59
3.6.3	Meritve vpliva izbranih organorutenijevih(II) kompleksov na membranske potenciale mišičnih vlaken izoliranih hemidiafragem miši.....	60
3.7	Elektrofiziološke meritve na oocitih navadne kreppljarke (<i>Xenopus laevis</i>) z vgrajenimi nAChR iz navadnega električnega skata (<i>Torpedo marmorata</i>).....	62
3.8	Analize podatkov in statistična analiza.....	64
4	REZULTATI.....	66
4.1	Učinki organorutenijevih(II) kompleksov, prekurzorjev in ligandov na holinesterazne encime in glutation S-transferazi	66
4.2	Biokemično ovrednotenje zaviralne aktivnosti izbranih organorutenijevih(II) kompleksov.....	69
4.2.1	Zaviranje holinesteraznih encimov s kompleksom $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(5\text{-nitro-1,10-fenantrolin})\text{Cl}]\text{Cl}$ (C1-Cl), ligandom nitrofenom (5-nitro-1,10-fenantrolin) in prekurzorjem dikloro(<i>p</i> -cimen)rutenijev(II) dimer	69
4.2.2	Zaviranje holinesteraznih encimov s kompleksom $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(1\text{-hidroksi-3-metoksipiridin-2(1H)-tionato})\text{pta}]\text{PF}_6$ (C1), njegovimi ligandi (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantan (L1) in 1-hidroksi-3-metoksipiridin-2(1H)-tion (L2)) in prekurzorjem dikloro(<i>p</i> -cimen)rutenijev(II) dimer.....	70

4.3	Elektrofiziološka karakterizacija izbranih organorutenijevih(II) kompleksov	71
4.3.1	Meritve kontrakcije skeletnih mišic <i>in vitro</i>	71
4.3.1.1	Vpliv C1-C1 na kontrakcijo skeletnih mišic <i>in vitro</i>	71
4.3.1.2	Vpliv C1 na kontrakcijo skeletnih mišic <i>in vitro</i>	76
4.4	Meritve membranskih potencialov skeletnih mišičnih vlaken.....	80
4.4.1	Vpliv C1-C1 na membranske potenciale skeletnih mišičnih vlaken.....	80
4.4.1.1	C1-C1 ne vpliva na mirovni membranski potencial skeletnih mišičnih vlaken	80
4.4.1.2	C1-C1 zmanjša amplitudo PMP in MPMP	81
4.4.2	Vpliv C1 na membranske potenciale skeletnih mišičnih vlaken.....	84
4.4.2.1	C1 ne učinkuje na rVm skeletnih mišičnih vlaken	84
4.4.2.2	C1 zmanjša amplitudo MPMP, vendar ne vpliva na amplitudo PMP	86
4.5	Elektrofiziološke meritve na oocitih <i>Xenopus laevis</i> z vgrajenimi nAChR iz navadnega električnega skata.....	89
5	RAZPRAVA	91
6	SKLEPI.....	99
7	POVZETEK	100
8	SUMMARY	102
9	ZAHVALE	104
10	LITERATURA	106

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz splošne strukture rutenijevih(II) cimenskih kompleksov. X, Y in Z so različne kemične skupine, kar omogoča pripravo raznovrstne kemične knjižnice spojin.	26
Figure 1: General structure of ruthenium(II) cymene complexes. X, Y and Z represent different chemical groups, which allows the preparation of diverse chemical libraries.	26
Slika 2: Pomembni aminokislinski ostanki v strukturi človeške acetilholinesteraze (hAChE) in človeške butirilholinesteraze (hBChE). Povzeto po Rosenberry in sod., 2017.	31
Figure 2: Important aminoacid residues in the structure of human acetylcholinesterase (hAChE) and human butyrylcholinesterase (hBChE). Adopted from Rosenberry et al., 2017.	31
Slika 3: Kemične strukture proučevanih organorutenijevih(II) arenskih kompleksov.	48
Figure 3: Chemical structures of studied organoruthenium(II) arene complexes.	48
Slika 4: Prekurzorja in ligandi proučevanih organorutenijevih(II) arenskih kompleksov.	49
Figure 4: Precursors and ligands of studied organoruthenium(II) arene complexes.	49
Slika 5: Določanje vrste in konstante inhibicije (K_i) za kompleks C1-C1 pri acetilholinesterazi, izolirani iz električne jegulje (eeAChE), človeški rekombinantni acetilholinesterazi (hrAChE) in konjski serumski butirilholinesterazi (hsBChE).	69
Figure 5: Determination of the type of inhibition and inhibitory constant (K_i) for C1-C1 towards electric eel (eeAChE), human recombinant acetylcholinesterase (hrAChE) and horse serum butyrylcholinesterase (hsBChE).	70
Slika 6: Določanje vrste in konstante inhibicije (K_i) za kompleks C1 pri konjski serumskibutirilholinesterazi (hsBChE).	71
Figure 6: Determination of the type of inhibition and inhibitory constant (K_i) for C1 towards horse serum butyrylcholinesterase (hsBChE).	71

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Slika 7: Učinki C1-Cl na amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši.....	73
Figure 7: Effects of C1-Cl on nerve-evoked and directly muscle-elicited single twitch and tetanic contraction of isolated mouse nerve-hemidiaphragm preparation.....	74
Slika 8: Kinetika učinkov C1-Cl na enostavno in tetanično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši.....	76
Figure 8: Kinetics of C1-Cl effects on single twitch and tetanic contraction of isolated mouse nerve-hemidiaphragm preparation.....	76
Slika 9: Učinek C1 na amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne kontrakcije izoliranih hemidifragem miši.....	78
Figure 9: Effects of C1 on nerve-evoked and directly muscle-elicited single twitch of isolated mouse nerve-hemidiaphragm preparation.	78
Slika 10: Učinek C1 na amplitudo posredno in neposredno izzvane tetanične kontrakcije izoliranih hemidifragem miši.....	79
Figure 10: Effects of C1 on nerve-evoked and directly muscle-elicited tetanic contraction of isolated mouse nerve-hemidiaphragm preparation.....	80
Slika 11: Koncentracijsko in časovno odvisen učinek C1-Cl na mirovni membranski potencial (rVm) površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.	81
Figure 11: Concentration- and time-dependent effect of C1-Cl on the resting membrane potential (rVm) of isolated mouse hemidiaphragm fibres.....	81
Slika 12: Učinek C1-Cl na amplitudo PMP površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.	82
Figure 12: Effects of C1-Cl on EPP amplitude in mouse hemidiaphragm skeletal muscle fibres. C1-Cl blocked EPPs in a concentration-dependent manner.....	82

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Slika 13: Vpliv kompleksa C1-C1 na amplitudo in frekvenco MPMP površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.....	83
Figure 13: Effects of C1-C1 on the MEPP amplitude and frequency in the muscle fibres of isolated mouse hemidiaphragm.	84
Slika 14: Časovno odvisen učinek 120 μ M kompleksa C1 na mirovni membranski potencial (rVm) površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.	85
Figure 14: Time-dependent effect of 120 μ M C1 on the resting membrane potential (rVm) of mouse hemidiaphragm fibres.	85
Slika 15: Časovno odvisen učinek 120 μ M koncentracije kompleksa C1 na amplitudo potenciala motorične ploščice (PMP) površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.....	86
Figure 15: Time-dependent effect of 120 μ M C1 on the amplitude of end-plate potential of isolated mouse hemidiaphragm fibres.	87
Slika 16: Vpliv kompleksa C1 na amplitudo MPMP površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.	87
Figure 16: Effect of C1 on the amplitude of miniature end-plate potential of isolated mouse hemidiaphragm fibres.	87
Slika 17: Zaviralni učinek različnih koncentracij kompleksa C1-C1 (50, 10, 1, 0,5, 0,1, 0,01 in 0,001 μ M) na ionski tok skozi nAChR iz navadnega elektirčnega skata vgrajene v membrano oocitov žab <i>Xenopus laevis</i>	90
Figure 17: Antagonistic effects of different C1-C1 concentrations (50, 10, 1, 0.5, 0.1, 0.01 and 0.001 μ M) in <i>Xenopus laevis</i> oocytes microtransplanted with Torpedo membranes containing nAChR incorporated into their membranes.....	90

KAZALO TABEL

Tabela 1: Seznam uporabljenih kemikalij.	44
Table 1: List of chemicals used.	44
Tabela 2: Seznam uporabljenih encimov.....	45
Table 2: List of enzymes used.	45
Tabela 3: Zaviralne aktivnosti organorutenijevih(II) kompleksov, prekurzorjev in ligandov za holinesterazne encime.....	67
Table 3: Inhibitory activity of organoruthenium complexes, precursors and ligands towards cholinesterase enzymes.....	67
Tabela 4: Zaviralne aktivnosti organorutenijev(II) kompleksov, prekurzorja in ligandov za glutation S-transferazne encime.	68
Table 4: Inhibitory activity of organoruthenium(II) complexes, precursor and ligands towards glutathion S-transferase enzymes.	68

SEZNAM OKRAJŠAV

A β – amiloid- β

A β PP – amiloidni prekursorski protein

ACh – acetilholin

AChE – acetilholinesteraza

AChSH – acetiltioholin klorid

BCh – butirilholin

CAS – katalitično anionsko mesto

Cl-2,4-DNB – 1-kloro-2,4-dinitrobenzen

C1 – $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{II})(1\text{-hidroksi-3-metoksipiridin-2}(1H)\text{-tionato})\text{pta}]\text{PF}_6$

C1-Cl – $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{II})(5\text{-nitro-1,10-fenantrolin})\text{Cl}]\text{Cl}$

DAG – diacilglicerol

dH₂O – deionizirana voda

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kislina

dsBChE – pasja serumska butirilholinesteraza

DTNB – 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojska kislina)

EE – encimska enota

eeAChE – acetilholinesteraza, izolirana iz električne jegulje

EtOH – etanol

ERK – z zunajceličnimi signali uravnana kinaza

GST – glutation S-transferaza

hBChE – človeška butirilholinesteraza

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

hrAChE – človeška rekombinantna acetilholinesteraza

hsBChE – butirilholinesteraza, izolirana iz konjskega seruma

hGST – človeška placentarna glutathion S-transferaza

hlGST – glutathion S-transferaza, izolirana iz konjskih jeter

IC₅₀ – srednja zaviralna koncentracija

IP₃ – inozitol 1,4,5-trifosfat

IP₃R – inozitol trifosfat receptor

KP1019 – indazolijev trans-[tetrakloridobis(1*H*-indazolo)rutenat(III)]

K-R – Krebs-Ringerjeva raztopina

L-GSH – reducirana oblika L-glutathiona

LRP4 – protein 4, povezan z lipoproteinskim receptorjem z nizko gostoto

mAChR – muskarinski acetilholinski receptor

MeOH – metanol

MPMP – miniaturni potencial motorične ploščice

MuSK – mišična specifična tirozinska kinaza

MT – mišična tenzija v mirovanju

nAChR – nikotinski acetilholinski receptor

NAMI-A – imidazolijev trans-[tetraklorido(dimetilsulfoksido)(1*H*-imidazolo) rutenat(III)]

NFP – nevrofibrilarne pentlje

n_H – Hillov koeficient

PAS – periferno anionsko mesto

PIP₂ – fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat

PMP – potencial motorične ploščice

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

p-NFP – 4-nitrofenil fosfat di(tris)sol

rVm – mirovni membranski potencial

S. E. – standardna napaka

WHO – Svetovna zdravstvena organizacija

3,4 DAP – 3,4-diaminopiridin

1 UVOD

Rutenijevi kompleksi imajo širok spekter bioloških aktivnosti, ki vključujejo protitumorsko, antibiotsko, protivirusno, protiparazitno, protiglivično in imunosupresivno delovanje (Bastos in sod., 1998; Cetinkaya in sod., 1999; Costa in sod., 2017; Alessio in Messori, 2019; Munteanu in Uivarosi, 2021). Poleg tega nekateri od rutenijevih kompleksov selektivno zavirajo delovanje nekaterih medicinsko pomembnih encimov, ki imajo pomembno vlogo v patogenezi različnih obolenj. V to skupino encimov spadajo holinesteraze, glutation S-transferaze (GST), proteinske kinaze, aldo/keto-reduktaze, tioredoksinske reduktaze, katepsin B, topoizomeraze II in HIV-1 reverzne transkriptaze (Casini in sod., 2008; Che in Siu 2010; Vyas in sod., 2014; Kljun in sod., 2016; Sundaraneedi in sod., 2017; Brabec in Kasparkova, 2018; Mitrovic in sod., 2019). Nekateri rutenijevi kompleksi, med katere uvrščamo tudi organorutenijeve(II) arenske komplekse, delujejo tudi kot zaviralci holinesteraz (acetilholinesteraze (AChE) in butirilholinesteraze (BChE)) (Vyas in sod., 2014; Trobec in sod., 2021) in/ali kot zaviralci agregacije peptidov amiloida- β (A β) (Vyas in sod., 2014). Zaviralci holinesteraz so še danes pomembne terapevtske učinkovine za simptomatsko zdravljenje nekaterih kroničnih neurodegenerativnih obolenj, povezanih s funkcionalnimi motnjami holinergičnega sistema, kot so Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonovi boleznii pridružena demenca in travmatska poškodba možganov (Giacobini, 2004; Moodie in sod., 2019). Uporabljajo se tudi za zdravljenje glavkoma in preprečevanja optične nevropatije, pri simptomatskem zdravljenju avtoimune bolezni miastenije gravis pa so nenadomestljivi (Moodie in sod., 2019).

Osrednji nameni raziskave so bili: i) identificirati organorutenijeve(II) arenske komplekse z najučinkovitejšo antiholinesterazno aktivnostjo, ii) proučiti njihov morebitni vpliv oziroma interakcijo s holinergičnim sistemom sesalcev in iii) ugotoviti njihov morebitni potencial kot nove antiholinesterazne učinkovine za nadaljnja predklinična testiranja.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

V doktorski disertaciji smo se zato odločili potrditi ali ovreči te hipoteze:

1. S spektrofotometričnimi metodami bomo iz pripravljene knjižnice novih rutenijevih(II) arenskih spojin identificirali spojine z zaviralnim delovanjem na sesalske holinesteraze in/ali GST *in vitro*.
2. Iz knjižnice rutenijevih(II) arenskih spojin bomo z elektrofiziološkimi metodami odkrili spojine, ki v encimskih testih v farmakološko zanimivih koncentracijah zavirajo AChE, ne vplivajo pa na AChE in nAChR v živčno-mišičnem stiku.
3. Med testiranimi rutenijevimi(II) arenskimi spojinami, ki zavirajo AChE, bomo z elektrofiziološkimi metodami našli spojine, ki zavrejo AChE in/ali nAChR v živčno-mišičnem stiku.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Kovine in kovinski kompleksi

Znano je, da organizmi za svoje normalno delovanje potrebujejo različne biološko pomembne elemente. Kljub nekaterim že znanim dejstvom so nove metode omogočile proučevanje vlog različnih elementov, s tem pa odpirajo nove razprave o tem, kateri elementi bi morali biti razvrščeni kot strupeni, koristni ali esencialni za žive organizme, čeprav se potrebe po različnih elementih lahko razlikujejo med posameznimi organizmi (Zoroddu in sod., 2019). Pomembno dejstvo je, da so tudi esencialni elementi lahko strupeni, če je njihov odmerek dovolj visok, kar potrjuje znano Paracelzijevo načelo »odmerek naredi strup« (Grandjean, 2016; Zoroddu in sod., 2019). Za ljudi je danes približno 20 elementov opredeljenih kot esencialnih, mednje spadajo: i) elementi H, C, N, O, ii) makroelementi Na, K, Mg, Ca, Cl, P in S ter iii) mikroelementi Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Co, Mo in I (Fraga, 2005; Zoroddu in sod., 2019). Iz te delitve je razvidno, da je med esencialnimi elementi tudi deset kovinskih elementov, in sicer Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Co in Mo. Potekajo tudi razprave o tem, da bi se navedenim kovinskim elementom na listi esencialnih elementov pridružili nekateri drugi, kot so V, Ni in Sn (Zoroddu in sod., 2019). Pri živalih in ljudeh imajo kovinski ioni strukturno in/ali funkcionalno vlogo. Udeleženi so v različnih biokemičnih reakcijah ter posledično v različnih fizioloških in tudi patofizioloških procesih, s čimer pomembno vplivajo na življenjske funkcije in bolezenske procese (Sodhi, 2019). Sodelujejo pri ohranjanju električnega naboja in osmotskega tlaka, združevanju in stabilnosti nukleotidnih baz ter regulaciji prepisovanja DNA, prenosu elektronov, zvijanju proteinov in vzdrževanju njihove strukture, prenosu živčnih in živčno-mišičnih signalov, kot kofaktorji pri encimsko kataliziranih reakcijah in številnih drugih procesih v telesu (Sodhi, 2019; Zoroddu in sod., 2019).

V medicini se kovinski ioni (Li, Zn, Cu, Pt, Ru, Ag, Co, Ir, Os, Tc in Gd) in njihovi kompleksi uporabljajo v terapevtske in diagnostične namene.

Kovinski kompleksi so znani po svojem širokem naboru bioloških aktivnosti, ki so odvisne od vrste kovine in njenega oksidacijskega stanja, vrste in števila ligandov in njihove koordinacijske geometrije (Barry in Sadler, 2014; Yousuf in sod., 2021). Načrtovanje, razvoj in preizkušanje novih kovinskih kompleksov so se naglo povečali, še posebej z odkritjem citostatičnih učinkov platinskega kompleksa – zdravila cisplatin – v 60. letih prejšnjega stoletja (Gomez-Ruiz in sod.,

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

2012). Nekateri od kovinskih kompleksov so do danes uspešno prestali vse faze kliničnega preizkušanja in se porabljajo v diagnostične namene ali kot zdravila za klinično uporabo (Barry in Sadler, 2014; Alessio in Messori, 2018; Alessio in Messori, 2019).

2.1.1 Rutenij in rutenijevi kompleksi

Rutenij je prehodna kovina z atomskim številom 44, ki leži v 8. skupini periodnega sistema elementov. Poleg rodija, paladija, osmija, iridija in platine je član platinske skupine. Značilnost teh kovin je, da imajo vse podobne fizikalno-kemične lastnosti. Rutenij je v naravi prisoten v obliki sedmih stabilnih izotopov, med katerimi je najpogostejši ^{102}Ru . Rutenij ima širok razpon oksidacijskih stanj od -2 do $+8$, običajno pa je v oksidacijskih stanjih $+2$, $+3$ in $+4$. Rutenijeve komplekse uvrščamo v skupino kovinskih kompleksov. Kot pri drugih kovinskih kompleksih je biološka aktivnost rutenijevih kompleksov odvisna od oksidacijskega stanja kovine, vrste in števila ligandov, koordinacijske geometrije, jakosti koordinacijske vezi, redoksnega potenciala in možnosti izmenjave ligandov (Barry in Sadler, 2014; Kladnik, 2021; Yousuf in sod., 2021).

2.1.2 Biološki učinki rutenijevih kompleksov

Rutenijevi kompleksi imajo širok spekter bioloških aktivnosti. Delujejo lahko protitumorsko, antibiotično, protivirusno, protiparazitno, protiglivično in imunosupresivno (Bastos in sod., 1998; Cetinkaya in sod., 1999; Costa in sod., 2017; Alessio in Messori, 2019; Munteanu in Uivarosi, 2021). Francis Dwyer in sodelavci (1952) so že v sredini prejšnjega stoletja prvič opisali bakteriostatično in protivirusno delovanje celotne skupine tris (polipiridil) rutenijevih kompleksov (Puckett in Barton, 2008;). Poleg tega so se nekateri rutenijevi kompleksi izkazali kot zelo učinkoviti tudi proti bakterijskim sevom, odpornim na že uveljavljene antibiotike (Zeglis in sod., 2007; Viganor in sod., 2017).

Nekateri rutenijevi kompleksi delujejo tudi selektivno protitumorsko in imajo ob tem nizko sistemsko toksičnost. Pri razvoju teh kompleksov je bistvenega pomena njihova topnost v vodi, da kompleks doseže ciljno mesto. Zelo pomembno je tudi dejstvo, da se po *i. v.* aplikaciji vežejo na prenašalne proteine v plazmi, kot sta albumin in transferin (Bergamo in Sava, 2007). Njihova vezava s transferinom, ki je prenašalec železa, je ključna, saj imajo rakave celice večje potrebe po železu, zaradi česar se močneje izražajo transferinski receptorji v njihovi membrani (Kostova, 2006; Bergamo in Sava, 2007). Na podlagi opisanega mehanizma je lahko rutenijev

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

kompleks, ki v večjih količinah selektivno vstopi v tarčne celice, bolj citotoksičen kot npr. cisplatin.

Rutenij je v fizioloških pogojih v telesu pretežno v oksidacijskih stanjih Ru(II) ali Ru(III). Clarke je za protitumorsko delovanje Ru(III) kompleksov predvidel mehanizem aktivacije z redukcijo (*ang. activation-by-reduction hypothesis*) (Clarke, 2003). Rutenijevi(III) kompleksi ostanejo v nereaktivnem oziroma neaktivnem oksidacijskem stanju Ru(III), vse dokler ne dosežejo tumorjev. Tam pride do njihove aktivacije (prehod iz oksidacijskega stanja Ru(III) v Ru(II)) zaradi pogojev v rakavih celicah (nižji parcialni tlak O₂ in nižji pH) (Graf in Lippard, 2012). Poleg tega je prisoten tudi drugi že zgoraj opisani mehanizem, ki Ru(III) kompleksom omogoča zelo učinkovito in selektivno protitumorsko delovanje. To je vezava Ru(III) kompleksov na protein transferin, ki omogoča, da Ru(III) kompleksi delujejo na tumorje z visoko gostoto transferinskih receptorjev (Kostova, 2006).

Rutenijevi(III) kompleksi so se v preteklosti izkazali za zelo obetavne komplekse na področju protirakavega delovanja, saj so bili kar trije vključeni v fazo kliničnih raziskav. To sta KP1019 (indazolijev trans-[tetrakloridobis(1*H*-indazolo)rutenat(III)]) in njegova natrijeva sol NKP1339 ter NAMI-A (imidazolijev trans-[tetraklorido(dimetilsulfoksido)(1*H*-imidazolo) rutenat(III)]) (Puckett in Barton, 2008). Kompleks NAMI-A je bil najprej testiran na miših, pri čemer so ugotovili, da preprečuje razvoj in rast metastaz v pljučih in možganih različnih solidnih tumorjev (Lewisov pljučni karcinom, MCa-karcinom dojke, TS/A-karcinom dojke, melanom B16 in H460M2, človeški nedrobnocelični pljučni karcinom in levkemija P388) (Alessio in Messori, 2019). Poleg tega so tudi *in vitro* raziskave na različnih celičnih linijah rakavih celic potrdile, da kompleks NAMI-A pomembno vpliva na tumorske celice z metastatsko sposobnostjo prek interferiranja s pomembnimi procesi metastatskega napredovanja tumorja. Raziskave so prav tako pokazale, da kompleks NAMI-A ni značilno internaliziran s strani celic, ampak se veže na kolagene v zunajceličnem matriksu in integrine, izražene na membrani celic, posledica tega pa je povečana adhezija in zmanjšana invazivnost rakavih celic (Sava in sod., 1998; Sava in sod., 2003; Alessio in Messori, 2018). Kompleks NAMI-A so v klinični fazi I/II uporabili sočasno z gemcitabinom pri bolnikih z nedrobnoceličnim karcinomom pljuč. Raziskava je pokazala, da kombinacija NAMI-A in gemcitabina pri bolnikih, obolelih za nedrobnoceličnim karcinomom pljuč, zdravljenja ne izboljša v primerjavi z gemcitabinom, zato je bil kompleks NAMI-A izključen iz kliničnih raziskav (Alessio in Messori, 2018; Alessio in Messori, 2019). Tako kot

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

kompleks NAMI-A je bil v klinične raziskave vključen tudi kompleks KP1019. Zaradi njegove slabe topnosti ni bilo mogoče določiti najvišjega odmerka, ki ga bolniki še lahko prenesejo. Zato so raziskavo nadaljevali z njegovim bolj topnim natrijevim analogom NKP1339 in določili najvišji odmerek, ki pri bolnikih ne povzroči hudih stranskih učinkov. Pri uporabi najvišjega odmerka niso zaznali večjih stranskih učinkov, ugotovili pa so zmerno protitumorsko aktivnost, zaradi česar je kompleks NKP1339 še vedno vključen v klinične raziskave (Trondl in sod., 2014; Alessio in Messori, 2019).

Pri organorutenijevih(II) kompleksih je bilo ugotovljeno, da so za protitumorsko delovanje odgovorni njihovi učinki na različne proteine in encime v celici. Kompleksi so po vstopu v rakave celice najpogosteje v jedru, mitohondrijih in/ali lizosomih in lahko povzročijo neposredne poškodbe deoksiribonukleinske kisline (DNA). Pogosteje so tarče proteinske kinaze, vključene v celični privzem, proliferacijo in apoptozo rakavih celic. Nadaljnje raziskave so pokazale, da najobetavnejši kompleksi motijo redoks homeostazo rakavih celicah, saj vplivajo na razmerje NAD^+/NADH in proizvodnjo reaktivnih zvrsti, ki v večjih koncentracijah privedejo do oksidacijskega stresa. Te spremembe v celici sprožijo sprostitvev citokroma c iz mitohondrijev, ki se veže na aktivacijski faktor 1. Ta sproži apoptozno proteazo kaspazo 9, ki uravnava druge proteine, ki sodelujejo pri programirani celični smrti, kar v končni fazi privede do apoptoze rakavih celic (Zeng in sod., 2017).

Nenazadnje so raziskave pokazale tudi, da različni rutenijevi kompleksi selektivno zavirajo delovanje različnih medicinsko pomembnih encimov, ki so vključeni v različna patološka stanja. V to skupino encimov spadajo holinesteraze, GST, proteinske kinaze, aldo/keto-reduktaze, tioredoksinske reduktaze, katepsin B, topoizomeraze II in HIV-1 reverzne transkriptaze in številni drugi (Casini in sod., 2008; Che in Siu, 2010; Vyas in sod., 2014; Kljun in sod., 2016; Sundaraneedi in sod., 2017; Mitrović in sod., 2019).

2.1.3 Rutenijevi(II) arenški kompleksi kot zaviralci encimov

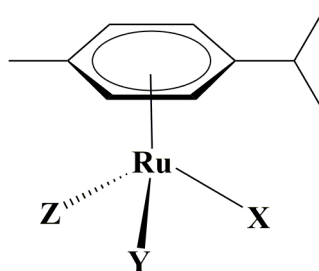
Zanimanje za biološke aktivnosti rutenijevih(II) arenških kompleksov se je v zadnjem času močno povečalo (Nazarov in sod., 2014) zaradi njihove interakcije z različnimi encimi kot terapevtskimi tarčami. Zaradi zaviranja encimov, izražanje in delovanje katerih je spremenjeno pri različnih patoloških stanjih ljudi in/ali živali, je bilo zasnovanih veliko različnih

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

kompleksov. Pri tem je treba poudariti, da je njihov biološki učinek tako kot pri vseh kovinskih kompleksih odvisen od njihove strukture.

Arenski ligandi v strukturi rutenijevih(II) arenških kompleksov vplivajo na elektronsko porazdelitev kompleksa in povečajo hidrofobnost. Elektronska porazdelitev pri tem vpliva na stabilnost kompleksa, medtem ko povečana hidrofobnost olajša prehod skozi lipidne membrane. Na fizikalno-kemične lastnosti rutenijevih(II) arenških kompleksov in posledično na njihove biološke lastnosti še posebej vplivajo ligandi na mestih X, Y in Z (slika 1) (Zeng in sod., 2017; Kladnik, 2021; Trobec in sod., 2021).



Slika 1: Prikaz splošne strukture rutenijevih(II) cimenskih kompleksov. X, Y in Z so različne kemične skupine, kar omogoča pripravo raznovrstne kemične knjižnice spojin.

Figure 1: General structure of ruthenium(II) cymene complexes. X, Y and Z represent different chemical groups, which allows the preparation of diverse chemical libraries.

Poleg tega tridimenzionalna zgradba in dobro prileganje kompleksov v aktivna mesta encimov izboljšata koordinacijo z aminokislinskimi ostanki in določata njihovo selektivno delovanje (Zeng in sod., 2017; Kladnik, 2021; Trobec in sod., 2021).

Eden od prvih člankov, v katerem je opisana aplikacija rutenijevega(II) arenskega kompleksa v medicinske namene (selektivno protitumorsko delovanje), je bil objavljen že leta 1992 (Dale in sod., 1992).

Različni rutenijevi kompleksi, med katere uvrščamo tudi organorutenijeve(II) arenske komplekse, delujejo kot zaviralci holinesteraz (AChE in BChE) in/ali kot zaviralci agregacije A β (Dwyer in sod., 1952; Vyas in sod., 2014). Zaviralci holinesteraz so danes pomembne terapevtske učinkovine za simptomatsko zdravljenje številnih kroničnih nevroloških degenerativnih stanj, ki so povezana s funkcionalnimi motnjami holinergičnega sistema, kot so Alzheimerjeva bolezen, miastenija gravis, glavkom, Parkinsonovi bolezni pridružena demenca in travmatska poškodba možganov (Vyas in sod., 2014; Moodie in sod., 2019). Znano je, da se zaviralci AChE vežejo na periferno anionsko in tudi na katalitično anionsko mesto AChE, hkrati

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

pa zavrejo njeno delovanje in upočasnijo agregacijo A β (Singh in sod., 2013; Vyas in sod., 2014; Hamulakova in sod., 2017). Pri Alzheimerjevi bolezni je znano, da imajo bolniki v začetnem stadiju bolezni povečano aktivnost encima AChE v osrednjem živčnem sistemu. Z napredovanjem bolezni začne ta upadati (55–67-odstotni upad glede na normalne vrednosti), temu pa sledi povečanje aktivnosti encima BChE (40–90 % nad normalnimi vrednostmi) (Mushtaq in sod., 2014). Posledično je pri bolnikih zaradi povečane razgradnje acetilholina (ACh) in odmiranja holinergičnih nevronov ugotovljena zmanjšana koncentracija ACh v nekaterih območjih možganov. Zato je za učinkovito simptomatsko zdravljenje Alzheimerjeve bolezni treba razviti spojine, ki lahko hkrati zavirajo delovanje AChE in BChE (Li in sod., 2017). Poleg zelenih učinkov se lahko ob učinkovitem znižanju aktivnosti AChE pojavijo tudi neželeni/stranski učinki uporabe zaviralcev holinesteraz, ki glede na mehanizem delovanja vključujejo: i) aktivacijo muskarinskih acetilholinskih receptorjev (mAChR) v osrednjem živčnem sistemu (znaki so tremor, bradikardija), ii) mešano osrednjo in periferno aktivacijo mAChR (izraža se kot slabost, bruhanje), iii) periferno stimulacijo mAChR (driska) in iv) čezmerno stimulacijo/blokado nikotinskih acetilholinskih receptorjev (nAChR) v živčno-mišičnem stiku (mišična oslabelost) (Gauthier, 2001). Snovi z zaviralnim učinkom na AChE lahko imajo tudi dvojno delovanje, in sicer delujejo zaviralno na nAChR v osrednjem in perifernem živčno-mišičnem sistemu in lahko povzročijo paralizo skeletnih mišičnih vlaken (Okonjo in sod., 1991; Grandič in Frangež, 2014).

2.2 Holinergični živčni sistem

Holinergični živčni sistem je del vegetativnega živčnega sistema, v katerem je v končnih sinapsah živčni prenašalec ACh. Holinergični nevroni so v osrednjem in perifernem živčnem sistemu (Moodie in sod., 2019). ACh je prvi odkril Dale (Tansey, 2006). Loewi ga je sprva imenoval »Vagusstoff« zaradi njegovega izločanja iz končičev *N. vagusa*. Sinteza ACh in ponovni privzem holina sta danes dobro znana procesa. Nevrotransmitter se v holinergičnem nevronu sintetizira z acetilacijo holina ob prisotnosti encima holin acetiltransferaze in acetil koencima A. Nevroni niso edine celice, ki sintetizirajo ACh. Njegova sinteza lahko poteka tudi v drugih celicah: celicah kože, ledvic, oči, jeter, posteljice, limfocitih T, podpornih celicah osrednjega živčnega sistema (predvsem astrocitih), saj imajo vse izražen encim holin acetiltransferazo (Maurer in Williams, 2017). ACh je v presinaptičnih holinergičnih nevronih shranjen v sinaptičnih mešičkih. Ločimo dve vrsti rezerv ACh. Manjše oblikujejo mešički, ki

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

so membransko vezani in se lahko nemudoma sprostijo (Ali in Savarese, 1976), večje pa molekule ACh, ki se ne morejo direktno sprostiti in ležijo prosto v citoplazmi ali so shranjene v prostih mešičkih. V sinaptičnem mešičku je do 10.000 molekul ACh, kar imenujemo tudi en kvant (Ali in Savarese 1976; Matthews, 2003; Slater, 2017). Depolarizaciji membrane holinergičnega nevrona sledi odprtje od napetosti odvisnih kalcijevih kanalov, temu pa tok Ca^{2+} v nevron. Zvišana raven Ca^{2+} sproži eksocitozo ACh mešičkov, pri čemer se mešički zlijejo s presinaptično membrano v aktivnih območjih. Pri fuziji ACh mešičkov sodelujejo štirje proteini: sinaptotagmin, sinaptobrevin, sintaksin in SNAP-25 (Matthews, 2003). Molekule ACh, ki se pri tem sprostijo v sinaptično špranjo, difundirajo do posinaptične membrane, kjer se vežejo na i) ionotropne nAChR ali ii) metabotropne z G-proteinom sklopljene mAChR (Moodie in sod., 2019). Delovanje posamezne molekule ACh na receptorje je kratkotrajno in traja nekaj milisekund. Nato encim AChE razgradi molekulo ACh, pri čemer nastaneta produkta acetat in holin. Vsaka molekula AChE lahko v sekundi razgradi do 5000 molekul ACh (Silman in Sussman, 2005).

2.2.1 Holinesterazni encimi

V družino holinesteraznih encimov uvrščamo encima AChE in BChE. Njuna glavna funkcija je hidroliza estrov holina, vključno z naravno prisotnim substratom ACh. ACh razgradita do acetata in holina ter s tem ustavita aktivnost živčnega prenašalca in posledično preprečita prenos signalov (Darvesh in sod., 2008; Taylor in Radić 1994; Safa in sod., 2022). AChE je posebna serinska hidrolaza, ki razgrajuje živčni prenašalec ACh. Prisotna je v holinergičnih sinapsah osrednjega, perifernega in avtonomnega živčnega sistema. Poleg tega jo najdemo tudi v živčno-mišičnem stiku in na membrani eritrocita (Tsim in Soreq 2012; Colović in sod., 2013). BChE je neznatna holinesteraza, ki razgrajuje holinske in neholinske estre. Prisotna je v krvni plazmi, jetrih, trebušni slinavki in živčno-mišičnem stiku (Minic in sod., 2003; Colović in sod., 2013). Znano je, da umetni substrat butirilholin hidrolizira hitreje kot ACh. Njen endogeni substrat do zdaj še ni bil ugotovljen, prav tako še ni jasna njena prava fiziološka vloga (Huang in sod., 2007; Masson in sod., 2009). Zaradi višje koncentracije BChE v plazmi v primerjavi z AChE in dejstva, da je BChE prisotna pri številnih vretenčarjih in tudi prenaša več mutacij, so predvidevali, da se je BChE razvila iz AChE kot splošni razstrupljevalec, medtem ko je še vedno ohranila določeno funkcijo v procesu nevrottransmisije. V možganih je BChE zlasti v

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

glijalnih celicah, najdemo pa jo lahko tudi v endotelijskih celicah in nevronih, kjer je v nasprotju z AChE večinoma zunaj sinaptične špranje (Darvesh in sod., 2003).

Treba je poudariti pojavljanje holinesteraz že pred nevrogenezo ter tudi njihovo prisotnost v neoplojenih jajčnih celicah, spermijih, enoceličnih organizmih, glivah in rastlinah, kar kaže, da imajo ti encimi alternativne funkcije. Ugotovili so njihovo vpletenost v celično proliferacijo, diferenciacijo, medcelično komunikacijo ter tudi v razvoj in ohranjanje sinaptičnih in mionevralnih struktur. Nenazadnje je bila ugotovljena tudi vpletenost AChE v različne patološke procese (Moodie in sod., 2019).

2.2.1.1 Acetilholinesteraza

AChE je običajno v sinaptični špranji v obliki amfifilnega tetramera, povezanega s plazemsko membrano prek glikofosfatidilinozitola. Poleg tega je lahko prisotna tudi v obliki prostega encima (Colović in sod., 2013; Moodie in sod., 2019).

V strukturi AChE sta periferno anionsko mesto (PAS) in katalitično anionsko mesto (CAS) (slika 2) (Colović, Krstić in sod., 2013; Rosenberry in sod., 2017). PAS je vezno mesto za ACh, zgrajeno pa je iz aminokislinskih ostankov pri vhodu v aktivni žep, ki sodelujejo pri interakciji s kationi- π kvartarne skupine ACh, s tem se poveča verjetnost njegovega pomika proti aktivnemu mestu na dnu žepa. PAS obdaja deset kislih aminokislinskih ostankov, kar imenujemo obročasti elektrostatični motiv (Felder in sod., 1997). Aminokislinski ostanki PAS sodelujejo v interakcijah s kationi- π kvartarne skupine ACh (Greenblatt in sod., 2003; Houghton in sod., 2006). Aromatski aminokislinski ostanki v aktivnem žepu z zaporednimi interakcijami kation- π omogočijo njegovo drsenje proti CAS, lociranemu na dnu ozkega žepa, približno 2 nm od površine encima (Sussman in sod., 1991; Barak in sod., 2009). Zgrajen je iz anionskega mesta, imenovanega tudi holinski žep, estrskega mesta, oksianionske luknje in acilnega žepa (Greenblatt in sod., 2003; Sharma, 2019). Acilni žep vsebuje ostanke fenilalanina, ki so pomembni pri omejevanju dimenzije substratov, ki vstopajo v aktivno mesto in tesno vežejo acetilni del molekule ACh. Aminokislinski ostanki anionskega mesta sodelujejo v interakcijah kation- π z nabito kvartarno skupino holinskega dela ACh, kar omogoča njegovo pravilno orientacijo s katalitskim serinom. Členi katalitične triade estrskega mesta sodelujejo pri hidrolizi estrske vezi ACh, aminokislinski ostanki oksianionske luknje pa delujejo kot donorji H-vezi, s čimer stabilizirajo tetrahedralni intermediat ACh. Med interakcijo anionskega

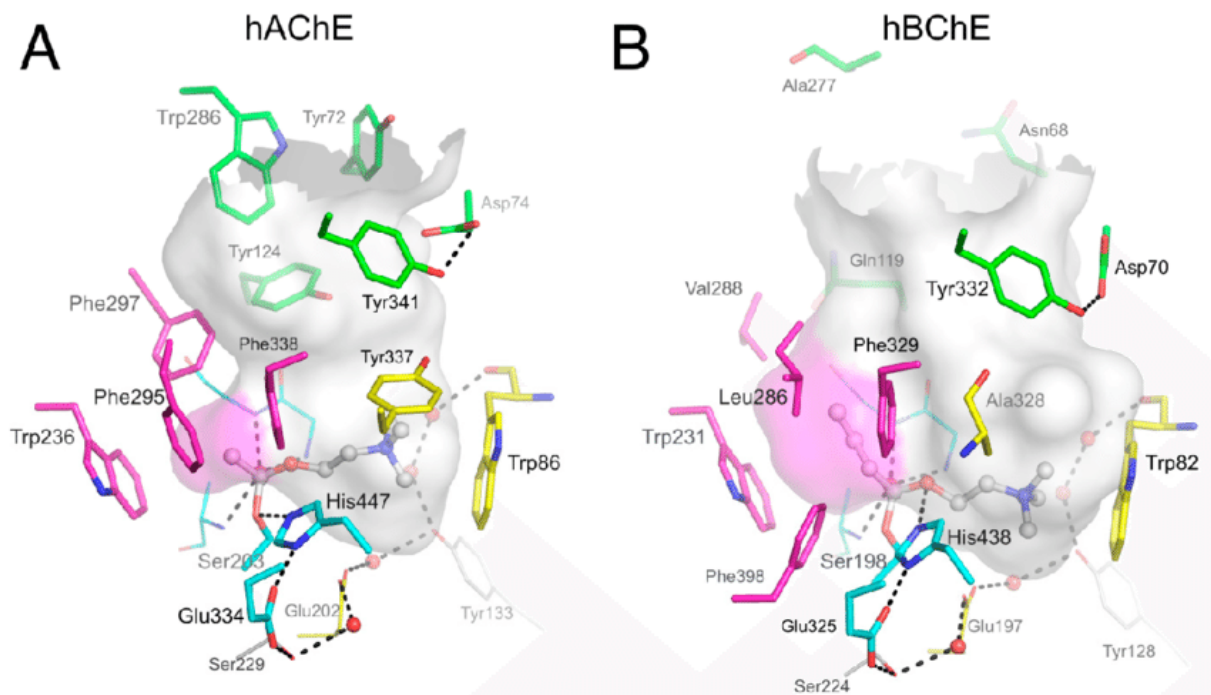
T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

mesta s kvartarnim dušikovim atomom molekule ACh estrska podenota razcepi estrsko vez ACh, kar povzroči razcepitev molekule ACh na acetat in holin (Pohanka, 2011; Colović in sod., 2013; Moodie in sod., 2019).

2.2.1.2 Butirilholinesteraza

3D-struktura BChE je razkrila, da je aktivni žep več kot za polovico večji kot pri AChE in da je v njem približno 40 % manj aromatskih aminokislinskih ostankov, ki jih nadomeščajo alifatski ali polarni ostanki. Aktivni žep BChE je zgrajen iz i) mesta acilacije, ii) holinskega žepa, iii) acilnega žepa in iv) PAS (slika 2)(Masson in sod., 2009; Ha in sod., 2020; Rosenberry in sod., 2017). Acilacijsko mesto vsebuje aminokislinske ostanke, ki so vključeni v proces katalize (katalitična triada) (Masson in sod., 2009). Holinski žep BChE vsebuje zelo pomemben aminokislinski ostanek triptofan⁸², ki je odgovoren za interakcije s kationi- π , to pa je tudi pomembna razlika v primerjavi z AChE, saj sta pri AChE za tovrstne interakcije odgovorna 2 aminokislinska ostanka (Masson in sod., 1997; Nachon in sod., 1998). V primerjavi z AChE sta pri BChE v acilnem žepu namesto dveh ostankov fenilalanina dva alifatska ostanka, ki omogočata vezavo večjih acilnih skupin (Harel in sod., 1992; Radić in sod., 1993; Masson in sod., 2009). PAS BChE je na robu aktivnega žepa ter je prvo vezno mesto za pozitivno nabite substrate in zaviralce. V PAS BChE manjkajo trije ključni aromatski ostanki, ki so prisotni v PAS AChE. Zaradi tega je včasih veljalo, da BChE nima PAS oz. vsaj ne podobnega kot AChE. Ima pa BChE šibkejšo afiniteto kot AChE za ligande, ki se tipično vežejo na PAS (npr. propidij in fascikulin). PAS BChE gradijo trije aminokislinski ostanki, dva asparagina⁷⁰ in tirozin³³², in služi kot vezavno mesto za pozitivno nabite substrate, preden vstopijo v aktivni žep encima (Masson in sod., 2009).



Slika 2: Pomembni aminokislinski ostanki v strukturi človeške acetilholinesteraze (hAChE) in človeške butirilholinesteraze (hBChE). Povzeto po Rosenberry in sod., 2017.

Figure 2: Important aminoacid residues in the structure of human acetylcholinesterase (hAChE) and human butyrylcholinesterase (hBChE). Adopted from Rosenberry et al., 2017.

2.2.1.3 Zaviralci holinesteraz

Zaviralci holinesteraz so snovi, ki upočasnijo oziroma popolnoma ustavijo aktivnost holinesteraznih encimov in posledično razgradnjo ACh, s čimer se podaljša razpoložljivosti in trajanje delovanja ACh v sinaptični špranji (Colović in sod., 2013; Singh in Sadiq, 2022).

Glede na izvor delimo zaviralce na naravne in sintetične, glede na način delovanja pa na povratne (reverzibilne), nepovratne (ireverzibilne) in pseudoreverzibilne (Singh in Sadiq, 2022). Povratne zaviralce delimo še na kompetitivne in nekompetitivne. Mesto vezave kompetitivnih AChE-zaviralcev je CAS, nekompetitivnih pa PAS (Weiner in sod., 2009). Povratni zaviralci holinesteraz se običajno uporabljajo v terapevtske in/ali diagnostične namene, zlasti pri boleznih, kot so Alzheimerjeva bolezen, miastenija gravis, Parkinsonovi bolezni pridružena demenca, distenzija mehurja, pooperativni ileus in glavkom. Ireverzibilni in pseudoreverzibilni zaviralci AChE se pogosto uporabljajo kot pesticidi ali bojna sredstva (Colović in sod., 2013; Sharma, 2019). V nekaterih primerih so uporabni tudi v terapevtske

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

namene, saj se nekatere organofosforne spojine uporabljajo za lokalno zdravljenje kroničnega glavkoma (Colović in sod., 2013). Pri klinični uporabi zaviralcev holinesteraz se pogosto v odvisnosti od odmerka pojavljajo različni stranski učinki, ki omejujejo njihovo terapevtsko uporabo.

Organizacija EMA (angl. *European medicines agency*) je do danes odobrila le štiri učinkovine, ki so zaviralci holinesteraz: takrin (1995), donepezil (1998), rivastigmin (1998) in galantamin (2000) (Maia in Sousa, 2019). Takrin, ki je nekompetitivni, neselektivni, reverzibilni zaviralec AChE, je bil leta 2012 zaradi slabe biorazpoložljivosti in stranskih učinkov umaknjen s tržišča (Moodie in sod., 2019). V klinične namene, zlasti za simptomatsko zdravljenje Alzheimerjeve bolezni, se trenutno uporabljajo le trije holinesterazni zaviralci, in sicer donepezil, galantamin in rivastigmin (Sharma, 2019).

2.2.1.3.1 Donepezil

Donepezil je selektivni povratni zaviralec AChE. Njegova struktura je posebna, saj omogoča sočasno zaviranje aktivnega žepa in PAS pri AChE, vendar pri tem ne vpliva na oksianionsko luknjo in katalitično triado (Colović in sod., 2013; Sharma, 2019; Silva in sod., 2020). Odobren je za zdravljenje blage do zmerne stopnje Alzheimerjeve bolezni. Poleg zaviranja AChE ima tudi druge pozitivne učinke pri Alzheimerjevi bolezni: zmanjšuje ekscitotoksičnost glutamata, izražanje vnetnih citokinov in oksidativni stres (Sharma, 2019).

2.2.1.3.2 Rivastigmin

Rivastigmin uvrščamo v skupino karbamatov, ki povratno ali psevdoreverzibilno zavira AChE (Colović in sod., 2013). Karbamatne skupine karbamatov se vežejo s serinskim ostankom estrskega mesta z večjo afiniteto kot acetilne skupine ACh med njegovo razgradnjo ter pri tem tvorijo kompleks AChE-karbamat, kar za določen čas zavre delovanje encima (Pohanka, 2011; Sharma, 2019). Vezava je lahko kovalentna ali nekovalentna, kar je odvisno od vrste karbamata in časa, po katerem postaneta vezava in kompleks nepovratna (Barak in sod., 2009). Pri slabše stabilnih kompleksih pride do spontane dekarbamilacije v približno 30 minutah (Darvesh in sod., 2008; Colović in sod., 2013). Rivastigmin zavira obe holinesterazi, zaradi tega njegovo delovanje ni strogo selektivno (Kandiah in sod., 2017). Odobren je za zdravljenje blage do zmerne stopnje Alzheimerjeve bolezni, uporablja pa se tudi za zdravljenje demence pri Parkinsonovi bolezni (Kandiah in sod., 2017; Sharma, 2019).

2.2.1.3.3 Galantamin

Galantamin je alkaloid, ki je prisoten v številnih rastlinah, med drugim v zvončku in čebulicah narcis. Je kompetitiven povratni zaviralec, ki zavira AChE z vezavo na anionsko mesto znotraj CAS in fenilalaninske ostanke acilnega žepa (Greenblatt in sod., 1999; Pilger in sod., 2001; Kitisripanya in sod., 2011). Poleg tega zavira tudi delovanje BChE (Faraone in sod., 2019), veže pa se tudi na nAChR, ločeno od veznih mest, na katera se vežejo ACh ter drugi nikotinski agonisti in antagonisti, in deluje kot alosterični modulator nAChR (Maelicke in sod., 2001; Colović in sod., 2013). Z alosterično vezavo na nAChR lahko galantamin potencira delovanje njihovih agonistov (Colović in sod., 2013). Odobren je za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni, uporablja pa se tudi za zdravljenje Parkinsonove bolezni (Faraone in sod., 2019; Sharma, 2019).

2.2.2 Nikotinski acetilholinski receptorji

nAChR uvrščamo v skupino neselektivnih od liganda odvisnih kationskih kanalov (Albuquerque in sod., 2009; Dani, 2015). Delimo jih v dve podskupini, in sicer na živčni in mišični tip nAChR (Dutertre in sod., 2017). nAChR sesalcev so zgrajeni iz petih podenot, razporejenih okrog centralne pore, napolnjene z vodo. Vsaka podenota je sestavljena iz N-terminalne zunajcelične domene, štirih hidrofobnih transmembranskih segmentov (M1–M4), zunaj- in znotrajceličnih zank, ki povezujejo segmente M1–M4, ter kratke zunajcelične C-terminalne domene. Segmenti M2 vseh petih podenot oblikujejo centralno poro oziroma kanal receptorja (Kalamida in sod., 2007; Unwin, 2013; Dani, 2015).

2.2.2.1 Živčni tip nikotinskih acetilholinskih receptorjev

Heteromerni živčni tip nAChR je zgrajen iz podenot α in β , homomerni živčni tip nAChR pa je zgrajen samo iz podenot α . Razdelitev na podenote α in β v živčnem tipu nAChR temelji na prisotnosti cisteinskih skupin le v zunajcelični domeni podenot α (Dani, 2015; Zoli in sod., 2018). Strukturna in funkcionalna raznolikost živčnih podtipov nAChR izvirata zlasti iz številnih mogočih kombinacij podenot. Najpogostejša živčna podtipa, ki ju najdemo pri sesalcih, sta heteromerni receptor $\alpha 4 \beta 2$ in homomerni receptor $\alpha 7$. Pomembno je, da je prvi lahko sestavljen iz dveh podenot $\alpha 4$ in treh podenot $\beta 2$, receptor $\alpha 4 \beta 2$ pa iz treh podenot $\alpha 4$ in dveh podenot $\beta 2$, zato ima lahko drugo vezavno mesto, na katero se veže agonist. Vsak različen pentamerni kompleks lahko oblikuje nAChR, ki ima različne funkcionalne značilnosti: i)

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

kinetiko odpiranja, zapiranja in desenzibilizacije; ii) ionsko prevodnost; iii) kationsko selektivnost in iv) farmakološke lastnosti (Dani, 2015). Vsi živčni podtipi nAChR sesalcev imajo enako funkcionalno lastnost, prepustni so za nekatere majhne monovalentne in dvovalentne katione (Zoli in sod., 2018). Glavni kationi, ki so prisotni v bioloških pogojih, so Na^+ , K^+ in Ca^{2+} . Heteromerni nAChR živčnega in mišičnega tipa imajo dve vezavni mesti za ACh. Vsako je oblikovano med sosednjima podenotama znotraj zunajcelične N-terminalne domene. Kompleksneje je v primeru homomernih receptorjev $\alpha 7$, pri katerih je med sosednjimi podenotami α zagotovljenih pet potencialnih vezavnih mest (Dani, 2015).

2.2.2.2 Mišični tip nikotinskih acetilholinskih receptorjev

Mišični tip nAChR je prisoten v vrhovih gub, ki jih oblikuje posinaptična membrana v žično-mišičnem stiku (Unwin, 2013). Gre za heteromerne nAChR, ki so prav tako sestavljeni iz petih podenot, in sicer iz dveh podenot $\alpha 1$ ter po ene podenote $\beta 1$, γ in δ (Unwin, 2013; Ho in sod., 2020). Pri ljudeh, govedu in podganah podenota γ med njihovim odraščanjem zamenja homologno podenoto ε (Witzemann in sod., 1990). Vloga nAChR mišičnega tipa je pretvarjanje kemičnih signalov v električne z maksimalno hitrostjo in učinkovitostjo, kar v končni fazi privede do prenosa živčnih impulzov na mišično vlakno. ACh, ki se sprosti iz živčnega končiča, v normalnih pogojih difundira skozi sinaptično špranjo in se veže na podenoti α receptorja na stičišču s podenotama γ in δ . Tam se veže na zunajcelično domeno mišičnega tipa nAChR, približno 50 Å stran od hidrofobnega vhoda (Unwin, 2013).

2.2.2.3 Konformacijske oblike nikotinskih acetilholinskih receptorjev

Receptorji so v presinaptični in posinaptični membrani lahko v več konformacijskih oblikah: odprti, zaprti in desenzibilizirani. Desenzibilizacija je izraz, ki opredeljuje zmanjšanje oziroma izgubo biološkega odgovora zaradi podaljšane ali ponavljajoče se stimulacije receptorjev (Quick in Lester, 2002). Vezava fiziološkega agonista ACh ali eksogenega agonista nikotina povzroči konformacijsko spremembo in odpiranje nAChR ter stabilizira odprto konformacijo kanala nAChR (Chakrapani in Auerbach, 2005; Dani, 2015). Odprta konformacija za nekaj milisekund omogoča prehodno prehajanje majhnih kationov (Na^+ , K^+ in Ca^{2+}) (Zoli in sod., 2018), zlasti gre za močen tok natrija v celico (približno 20.000 ionov ms^{-1}) (Unwin, 2013), preden se receptor zapre in preide nazaj v stanje mirovanja oziroma desenzibilizirano stanje, v katerem se receptor ne odziva na agoniste (Dani, 2015). Običajno količina ACh v sinaptični

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

špranji v nekaj milisekundah močno upade zaradi aktivnosti encima AChE (Colović in sod., 2013). Šibko vezan ACh se odpusti iz podenot α nAChR, kar povzroči zaprtje receptorjev. Desenzibilizacija nAChR nastane ob neprekinjeni vezavi ACh, kar se izraža s prenehanjem odzivnosti receptorja na delovanje agonista. Značilnost receptorjev v tem konformacijskem stanju je visoka afiniteta za ACh in zaprt ionski kanal ob stabilno vezanem ACh na podenotah α receptorja, kar se izraža kot relativna izguba aktivnih receptorjev (Quick in Lester, 2002). Stanje je popolnoma povratno, saj lahko receptor po odpuščanju agonista preide iz desenzibiliziranega stanja v normalno. Pri kroničnem zdravljenju z agonisti nAChR, pri katerem pride do dolgotrajnega stanja receptorjev v desenzibiliziranem stanju (Katz in Thesleff, 1957) ali celo do trajne izgube funkcionalnih receptorjev (Boyd, 1987), je lahko tovrstno stanje tudi nepovratno.

2.2.2.4 Potencial motorične ploščice, akcijski potencial in kontrakcija mišičnega vlakna

ACh, ki se sprosti iz živčnega končiča, difundira skozi sinaptično špranjo in se veže na podenoti α nAChR mišičnega tipa, kar povzroči prehodno odprtje velikega števila nAChR mišičnega tipa, prehajanje majhnih kationov (Na^+ , K^+ in Ca^{2+}) in naglo depolarizacijo posinaptične membrane mišičnega vlakna (Unwin, 2013), imenovano potencial motorične ploščice (PMP) (Westfall in Westfall, 2011), ki je hitra in prehodna sprememba membranskega potenciala motorične ploščice z vrednosti mirovnega membranskega potenciala (rVm) -90 mV proti 0 mV. Če depolarizacija posinaptične membrane doseže ali preseže prag za nastanek akcijskega potenciala, pride do njegovega nastanka in širjenja vzdolž sarkoleme mišičnega vlakna, kar prek več zaporednih dogodkov sproži kontrakcijo mišičnega vlakna.

2.2.2.5 Zaviralci nikotinskih acetilholinskih receptorjev

Zaviralce nAChR lahko razdelimo na: ganglijske zaviralce in periferne mišične relaksante. Razlike v podtipu nAChR v avtonomnih ganglijah in živčno-mišičnem stiku vplivajo na farmakološko delovanje omenjenih skupin zaviralcev. Na splošno velja, da imajo ganglijski zaviralci nAChR majhen učinek na živčno-mišični prenos oz. nanj ne učinkujejo. Tipični predstavnik zaviralcev nAChR v ganglijah je heksametonij, ki povzroči blokado simpatičnih ganglijev in padec krvnega tlaka. Učinkovina se je v preteklosti uporabljala kot antihipertenzivno zdravilo, vendar so ga nadomestili zaviralci β -adrenergičnih receptorjev in druge antihipertenzivne učinkovine (Kleinz in Spence, 2008).

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Periferne mišične relaksante oz. zaviralce živčno-mišičnega prenosa v veterinarski in humani medicini delimo na kompetitivne oz. nedepolarizirajoče in depolarizirajoče učinkovine (Kleinz in Spence, 2008; Adams, 2009). Med najbolj znanimi predstavniki perifernih mišičnih relaksantov je d-tubokurarin. Kurare je mešanica alkaloidov iz južnoameriške trte (*Chondodendron tomentosum*), glavna učinkovina katere je d-tubokurarin. Tubokurarin je antagonist nAChR mišičnega tipa, poleg tega blago zavira tudi nAChR, ki so prisotni v ganglijih (Bowman, 2006; Kleinz in Spence, 2008). Nedepolarizirajoči periferni mišični relaksanti se vežejo na nAChR v živčno-mišičnem stiku in delujejo kot kompetitivni zaviralci (tekmujejo za vezavna mesta z ACh) ter s tem zavirajo živčno-mišični prenos. Med nedepolarizirajoče snovi poleg d-tubokurarina spadajo tudi benzilzokinolini (atrakurij, mivakurij, doksakurij) in aminosteroidi (pankuronij, pipekuronij, rokuronij, vekuronij) (Kleinz in Spence, 2008; Adams, 2009). Njihov učinek lahko zmanjšamo z zaviralci holinesteraz, ki upočasnijo razgradnjo ACh. S tem v živčno-mišičnem stiku ostane več ACh, ki lahko tekmuje z zaviralcem za vezno mesto na nAChR mišičnega tipa in ga lahko tudi izpodrine (Kleinz in Spence, 2008). Depolarizirajoči periferni mišični relaksanti delujejo kot agonisti nAChR v živčno-mišičnem stiku. Pri sesalcih z depolarizacijo posinaptične membrane povzročijo ohlapno paralizo skeletnih mišic, ki je posledica izjemno počasne disociacije učinkovine iz nAChR mišičnega tipa. Med depolarizirajoče periferne mišične relaksante spada sukcinilholin, ki se kot edini kratko delujoči depolarizirajoči miorelaksant uporablja v klinični praksi (Hager in Burns, 2022). Delovanje sukcinilholina je kratkotrajno, ker ga hitro razgradi BChE (Kleinz in Spence, 2008; Adams, 2009).

2.2.3 Muskarinski acetilholinski receptorji

mAChR spadajo v družino heteromernih s proteinom G sklopljenih receptorjev. Prisotni so v osrednjem živčnem sistemu in tudi v tkivih, ki jih oživčuje parasimpatični živčni sistem, ter drugih celicah (Hulme in sod., 1991; Saternos in sod., 2018). Poznamo pet podtipov mAChR, označenih od M₁ do M₅. Receptorji M₁, M₃, M₅ so povezani z G_{q/11} obliko proteina G, ki aktivira fosfolipazo C (Haga in sod., 2012). Temu sledi pretvorba fosfatidilinozitol 4,5-bifosfata (PIP₂) v inozitol 1,4,5- trifosfat (IP₃) in diacilglicerol (DAG). IP₃ se veže na receptorje IP₃ (IP₃R), posledica česar je sproščanje Ca²⁺ iz sarkoplazemskega retikula. DAG pa aktivira protein kinazo C (Ishii in Kurachi, 2006).

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Pomembno je, da se različne celice funkcionalno različno odzivajo na aktivacijo mAChR. V možganih aktivacija posinaptičnih M_3 mAChR vodi v zaviranje kalijevih kanalov prek zmanjšanja PIP_2 , ki je odgovoren za bazalno kontrolo vzdraženja nevronov. Posledica tega ni direktno proženje akcijskega potenciala, temveč povečanje odziva na ekscitatorni dražljaj (Ishii in Kurachi, 2006). M_2 in M_4 mAChR so sklopljeni z $G_{i/o}$ obliko proteina G, ki zavira adenilat ciklazo, kar povzroči znižanje cikličnega adenozin monofosfata. To posledično prepreči aktivacijo proteinske kinaze A (Haga in sod., 2012). V nevronih so M_2 in tudi M_4 mAChR prisotni na živčnih končičih in zavirajo vzdražnost aksona, kar zmanjša izločanje živčnega prenašalca (Ishii in Kurachi, 2006).

2.3 Bolezni, povezane z motnjami delovanja holinergičnega sistema

Danes poznamo številna obolenja, ki so povezana s poškodbami oziroma motnjami v delovanju holinergičnega sistema. Vzrok za njihov nastanek temelji na nevrodegenerativnih in avtoimunih procesih ali pa so posledica zavrtja živčno-mišičnega prenosa. Med obolenji holinergičnega sistema sta najbolj znani: i) Alzheimerjeva bolezen in ii) miastenija gravis. Poleg tega pa poznamo tudi druge bolezni, pri katerih je v patogenezo vključen holinergični sistem: i) shizofrenija, ii) avtizem, iii) mikrodelecijski sindrom, iv) Parkinsonova bolezen in v) bolezni, ki niso povezane z živčevjem (rakava obolenja) (Bertrand in sod., 2015; Moodie in sod., 2019).

2.3.1 Alzheimerjeva bolezen

Alzheimerjeva bolezen je kronična progresivna nevrodegenerativna bolezen in od začetka 21. stoletja najpogostejša oblika demence pri geriatričnih pacientih. Glede na svoj začetek se deli na dve skupini: na dedno obliko Alzheimerjeve bolezni (*ang. familial Alzheimer's disease/ early onset form of Alzheimer's disease*) (genska sprememba amiloidnega prekursorkega proteina ($A\beta$ PP) in presenilina-1 in 2) in obliko Alzheimerjeve bolezni s poznim začetkom (*ang. late onset form of Alzheimer's disease – LOAD*). Približno 95 % pacientov ima diagnosticirano obliko bolezni s poznim začetkom in le 5 % dedno obliko bolezni (Chatterjee in Mudher, 2018; Knopman in sod., 2021). Leta 2016 je bila demenca po podatkih prisotna pri 47,5 milijona ljudi, število obolelih pa naj bi po predvidevanjih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) do leta 2030 naraslo na približno 75 milijonov, leta 2050 pa naj bi delež obolelih znašal celo 131 milijonov (Dos Santos Picanco in sod., 2018). Pomembno dejstvo je, da natančen vzrok za

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

nastanek Alzheimerjeve bolezni še ni bil ugotovljen. Prav tako ni zdravila, ki bi lahko ozdravilo to bolezen. Obstaja le simptomatsko zdravljenje bolezni, npr. uporaba zaviralcev holinesteraz. Bolezen se klinično izraža s postopno izgubo spomina in intelektualnih sposobnosti. Za bolezen je najznačilnejši nastanek oligomerov A β , fibril A β in senilnih plakov, prihaja pa tudi do hiperfosforilacije proteina tau in nastanka nevrofibrilarnih pentelj (NFP). Poleg tega so bili pri bolnikih ugotovljeni povečana aktivnost holinesteraznih encimov, znižana raven ACh, oksidativni stres in motnja v delovanju oziroma propad holinergičnih nevronov (Fan in sod., 2019; Liu in sod., 2019; Saha in Sen, 2019). Za nastanek oblike Alzheimerjeve bolezni s poznim začetkom je opisanih več hipotez: holinergična hipoteza, amiloidna hipoteza, hipoteza o hiperfosforilaciji in širjenju proteina tau, hipoteza o mitohondrijski kaskadi, vnetna hipoteza, nevrovaskularna hipoteza, hipoteza o kovinskih ionih in hipoteza limfnega sistema (Liu in sod., 2019).

Za naše delo je bila ključnega pomena holinergična hipoteza, ki je podprta s presinaptično holinergično disfunkcijo, izgubo holinergičnih povezav ter čezmerno aktivnostjo encimov AChE in BChE v odvisnosti od stadija bolezni. Vsi navedeni dejavniki privedejo do oslabiljenega prenosa živčnih signalov prek živčnega prenašalca ACh, ki ima pomembno vlogo pri pomnjenju, razmišljanju in učenju (Volpato in Holzgrabe, 2018). Pri holinergični hipotezi smo se osredinili zlasti na ugotovitev, da je v začetni fazi bolezni povišana aktivnost encima AChE, z napredovanjem bolezni pa začne raven AChE v možganih upadati (do 85-odstotni upad normalnih vrednosti), zviša pa se raven izražanja encima BChE (do 120-odstotno povečanje normalnih vrednosti), ki ima vlogo v poznejših fazah Alzheimerjeve bolezni, kajti ta prav tako vpliva na povečano razgradnjo ACh (Mushtaq in sod., 2014; Li in sod., 2017). Zato so bili pri simptomatskem zdravljenju bolezni do zdaj glavne terapevtske tarče zlasti serinske esteraze (AChE in BChE) in acetilholinski receptorji (mAChR in nAChR).

2.3.1.1 Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni

2.3.1.1.1 Zaviralci holinesteraz

Pri pacientih z Alzheimerjevo boleznijo ima AChE dvojno vlogo. Zvišana aktivnost privede do povečane razgradnje ACh, kar povzroči znižanje ravni ACh v možganih in posledično upad kognitivnih funkcij. Poleg tega je v patogenezi bolezni dokazano, da je PAS AChE vključeno v pospeševanje agregacije A β (Vyas in sod., 2014) in nastajanje senilnih plakov. Uporaba

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

zaviralcev AChE je tako eden izmed načinov, ki lahko delno upočasnijo napredovanje bolezni s podaljšanjem obstojnosti ACh v sinaptičnih špranjah. Z napredovanjem bolezni začne raven AChE v možganih upadati, zviša pa se izražanje BChE. Zaradi tega je za učinkovito simptomatsko zdravljenje bolezni pomembna uporaba spojin, ki hkrati zavirajo delovanje AChE in tudi BChE (Li in sod., 2017). Kot že omenjeno, se v klinične namene trenutno uporabljajo trije holinesterazni zaviralci, in sicer donepezil, galantamin in rivastigmin.

2.3.1.1.2 Agonisti muskarinskih acetilholinskih receptorjev

M1 tip mAChR je izražen v hipokampusu in skorji velikih možganov ter ima pomembno vlogo v kognitivnih procesih, spominu in učenju. Pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo ostajata njihova struktura in gostota nespremenjeni. Vendar so pomembna tarča simptomatskega zdravljenja bolezni. Uporaba agonistov M1 tipa mAChR zmanjša tvorbo amiloidnih plakov, poškodbe in njihove posledice, povzročene z oksidativnim stresom. Poleg izboljšanja holinergične funkcije aktivira neamiloidogenično pot amiloidnega prekursorskega proteina prek aktivacije proteinske kinaze C, domene 17 metaloproteinaz in disintegrinov. Poleg tega aktivacija M1 tipa mAChR zmanjša hiperfosforilacijo proteina tau prek inaktivacije glikogen sintaze kinaze 3β , zmanjšanja sinteze peptidov A β in povečane aktivacije z zunajceličnimi signali uravnane kinaze (ERK; *ang. extracellular signal-regulated kinase*) (Volpato in Holzgrabe, 2018).

2.3.1.1.3 Agonisti nikotinskih acetilholinskih receptorjev

nAChR imajo pomembno vlogo pri nevrointerakciji zaradi koncentracijsko odvisne interakcije s peptidom A β . Zlasti fiziološka koncentracija A β lahko neposredno stimulira nikotinske receptorje $\alpha 7$, medtem ko pri višjih (patoloških) koncentracijah A β moti holinergične signale, ki so posredovani prek receptorjev $\alpha 7$ in $\alpha 4\beta 2$. V ta namen so bile sintetizirane spojine, ki so hkrati zaviralci AChE in agonisti receptorjev $\alpha 7$ (Volpato in Holzgrabe, 2018).

2.3.2 Miastenija gravis

Miastenija gravis je avtoimuna bolezen, povzročena z avtoprotitelesi, ki se vežejo na nAChR oziroma funkcionalno povezane molekule v posinaptični membrani živčno-mišičnega stika in s tem prek različnih mehanizmov motijo njihovo normalno delovanje (Verschuuren in sod., 2013; Gilhus, 2016). Prevalenca bolezni je od 150 do 300 primerov na milijon ljudi, medtem

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

ko je incidenca bolezni več kot 10 primerov na milijon ljudi. Pomembno je poudariti, da tako prevalenca kot incidenca bolezni naraščata s starostjo populacije. Značilna znaka bolezni sta mišična slabost in utrujenost skeletnih mišic, ki sta posledica motenega živčno-mišičnega prenosa (Gilhus in sod., 2016). Mišična slabost je lahko lokalizirana ali generalizirana. Praviloma je simetrična, le pri prizadetih zunanjih mišicah očesa je običajno asimetrična. Najpogosteje so prizadete očesne, zrkelnne, vratne in proksimalne mišice okončin. Pri nekaterih bolnikih so lahko prizadete tudi dihalne mišice, kar lahko vodi v dihalno stisko (Jayam Truth in sod., 2012; Gilhus, 2016). Mišična slabost in utrujenost skeletnih mišic naraščata z aktivnostjo mišic oziroma vadbo ter se razlikujeta v različnih delih dneva in tudi med dnevi. Mišična moč je pri bolnikih pogosto skoraj normalna zjutraj, nato se začne z mišično aktivnostjo zmanjševati (Gilhus, 2016). Pri bolnikih z miastenijo gravis je glavni antigen mišični tip nAChR. Nekateri bolniki, ki nimajo protiteles proti nAChR, imajo protitelesa proti mišično specifični tirozinski kinazi (MuSK), ki je posinaptični transmembranski protein in tvori del receptorja za agrin, ki je protein v bazalni lamini sinapse (Jayam Truth in sod., 2012; Gilhus in sod., 2016). MuSK je odgovorna za združevanje in ohranjanje nAChR, kajti interakcije agrin/MuSK sprožijo in ohranjajo od rapsina odvisno povezavo nAChR in drugih posinaptičnih proteinov (Burden in sod., 2013; Gilhus in sod., 2016). Poleg navedene funkcije ima tudi številne druge vloge, ki so pomembne za prenos signalov med motoričnim nevronom in skeletnim mišičnim vlaknom (Burden in sod., 2013). Del bolnikov, ki nima protiteles proti nAChR niti proti MuSK, ima protitelesa proti proteinu 4, povezanim z lipoproteinskim receptorjem z nizko gostoto (ang. *low-density lipoprotein receptor-related protein 4*; LRP4). To je receptor za nevralni agrin, ki posreduje signale MuSK, da sproži proces združevanja nAChR (Jayam Truth in sod., 2012; Gilhus, 2016). Bolniki brez protiteles proti tem trem antigenom se uvrščajo med seronegativne (Gilhus in sod., 2016).

Bolniki s timomom imajo pogosto tudi protitelesa proti rianodinskemu receptorju in titinu, ki naj bi prav tako imela patološko vlogo. Pri nekaterih bolnikih z miastenijo gravis se poleg patogenih protiteles proti omenjenim antigenom pojavljajo tudi nepatogena protitelesa proti drugim mišičnim proteinom, ki so v citoplazmi. Ta protitelesa lahko služijo kot označevalci bolezni (Jayam Truth in sod., 2012).

Pri miasteniji gravis, povzročeni zaradi delovanja protiteles proti nAChR, protitelesa vplivajo na živčno-mišični prenos signalov prek najmanj treh mehanizmov: vezave in aktivacije

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

komplementa v živčno-mišičnem stiku, modulacije antigenov (pospeši endocitozo AChR navzkrižno povezanih s protitelesi) in funkcionalne blokade nAChR (prepreči normalno vezavo in delovanje ACh na nAChR). Protitelesa proti AChR so visoko afinitetni IgG, njihova sinteza pa zahteva interakcijo in aktivacijo limfocitov B s strani celic T pomagalk (CD4+) (Jayam Truth in sod., 2012).

2.3.3 Miastenija gravis pri psih

Pri psih in mačkah delimo miastenijo gravis v štiri skupine: i) fokalna, ii) generalizirana, iii) fulminantna in iv) paraneoplastična. Pri fokalni obliki je mišična slabost prisotna v eni mišični skupini ali več mišičnih skupinah mišic obraza, požiralnika, žrela in grla. Psi imajo lahko le megaezofagus z vključenostjo drugih mišic ali brez te in brez splošne šibkosti oziroma oslabelosti. Generalizirana oblika se lahko izraža v širokem razponu kliničnih znakov, od blage mišične šibkosti do hude mišične šibkosti vse do megaezofagusa. Zadnje okončine so pogosteje prizadete v primerjavi s sprednjimi. Generalizirana oblika se pojavlja v 57–64 % vseh primerov pri psih, pri čemer jih ima 90 % megaezofagus. Za fulminatno obliko je značilen hiter razvoj kliničnih znakov, poleg tega se pri živali lahko pojavijo tetrapareza, dihalna stiska in aspiracijska pljučnica, medtem ko se pri 5 % živali razvije generalizirana oblika, ki je povezana z visoko smrtnostjo zaradi prizadetosti dihalnih mišic. Paraneoplastična oblika se lahko pojavi pri timomih in drugih tumorjih, npr. holangio-celičnim karcinomom in limfomom osrednjega živčevja. Ugotovljeno je bilo, da imajo psi s timomom v 30–50 % tudi miastenijo gravis (Khorzad in sod., 2011).

2.3.3.1 Zdravljenje miastenije gravis

Poznamo štiri načine zdravljenja miastenije gravis: i) simptomatsko zdravljenje bolezni z uporabo zaviralcev AChE, ii) hitro in kratkoročno imunomodulacijsko zdravljenje s plazmaforezo in intravensko imunoglobulinsko terapijo, iii) dolgotrajno imunomodulacijsko zdravljenje z glukokortikoidi in drugimi imunosupresivnimi zdravili in (iv) kirurško zdravljenje v primeru timomov (Jayam Truth in sod., 2012).

Zelo pogosto se za simptomatsko zdravljenje miastenije gravis uporabljajo zaviralci AChE, ki s svojim delovanjem v živčno-mišičnem stiku zmanjšajo razgradnjo ACh, s čimer se poveča količina razpoložljivega ACh. Zelo pomembno je, da uporaba zaviralcev AChE ne spreminja

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

napredovanja ali izida bolezni. Prav tako se razlikuje odziv na zdravljenje, in sicer od izrazitega izboljšanja pri nekaterih bolnikih do majhnega izboljšanja ali brez tega pri drugih. Najpogosteje uporabljen zaviralec AChE je piridostigmin. Deluje v od 15 do 30 minutah, najvišjo aktivnost doseže v dveh urah, njegov učinek pa traja približno od tri do štiri ure (Jayam Truth in sod., 2012; Gilhus, 2016).

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Seznam kemikalij

V tabeli 1 in 2 so prikazani kemikalije in encimi, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Tabela 1: Seznam uporabljenih kemikalij.

Table 1: List of chemicals used.

Ime spojine	Proizvajalec	Mesto, Država	Okrajšava
1-kloro-2,4-dinitrobenzen	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	Cl-2,4-DNB
3,4-diaminopiridin	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	3,4 DAP
4-nitrofenil fosfat di(tris)sol	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	<i>p</i> -NFP
5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojska kislina)	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	DTNB
acetilholin klorid	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	ACh
acetiltioholin klorid	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	AChSH
barijev klorid	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	BaCl ₂
dikalijev hidrogen fosfat	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	K ₂ HPO ₄
dimetilsulfoksid	Merck KGaA	Darmstadt, Nemčija	DMSO
dinatrijev hidrogen fosfat	Merck KGaA	Darmstadt, Nemčija	Na ₂ HPO ₄
etanol, 96 %	Merck KGaA	Darmstadt, Nemčija	EtOH
etanol, 99 %	Carlo erba reagents S.A.S	Val de reuil cedex, Francija	EtOH
glicin	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	/
glukoza	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	Glukoza
hepes	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	HEPES
kalcijev klorid	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	CaCl ₂
kalcijev nitrat	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	CaNO ₃
kalijev dihidrogen fosfat	Merck KGaA	Darmstadt, Nemčija	KH ₂ PO ₄
kalijev hidroksid	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	KOH
kalijev klorid	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	KCl
kanamicin	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	/
metanol	Gram-mol d.o.o.	Zagreb, Hrvaška	MeOH
magnezijev klorid	Merck KGaA	Darmstadt, Nemčija	MgCl ₂
magnezijev sulfat	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	MgSO ₄
natrijev acetat	Merck KGaA	Darmstadt, Nemčija	CH ₃ COONa
natrijev dihidrogen fosfat	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	NaH ₂ PO ₄
natrijev hidrogenkarbonat	Merck KGaA	Darmstadt, Nemčija	NaHCO ₃
natrijev klorid	Merck KGaA	Darmstadt, Nemčija	NaCl
neostigmin metilsulfat	TCI chemicals	Tokio, Japonska	/
reducirana oblika l-glutationa	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	L-GSH
trikain	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	/
μ-konotoksin GIIB	Bachem	Bubendorf, Švica	/

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Tabela 2: Seznam uporabljenih encimov.

Table 2: List of enzymes used.

Ime encima	Proizvajalec	Mesto, Država	Okrajšava
acetilholinesteraza, izolirana iz električne jegulje	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	eeAChE
humana rekombinantna acetilholinesteraza	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	hrAChE
butirilholinesteraza, izolirana iz konjskega seruma	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	hsBChE
humana placentarna glutation s-transferaza	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	hGST
glutation s-transferaza, izolirana iz konjskih jeter	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, Misuri, ZDA	hIGST

3.2 Organorutenijevi(II) arenski kompleksi, prekursorji in ligandi

Organorutenijeve(II) arenske komplekse so sintetizirali na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo (Ljubljana, Slovenija) in so prijazno darilo prof. dr. Iztoka Turela. Proučevali smo te organorutenijeve(II) arenske komplekse:

1. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(1\text{-hidroksi-3-metoksipiridin-2}(1H)\text{-tionato})\text{pta}]\text{PF}_6$ (C1),
2. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(5\text{-nitro-1,10-fenantrolin})\text{Cl}]\text{Cl}$ (C1-Cl),
3. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(4,4,4\text{-trifluoro-1-(2-bromofenil)-butan-1,3-dionato})\text{Cl}]$ (C2),
4. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(4,4,4\text{-trifluoro-1-(2-bromofenil)-butan-1,3-dionato})\text{pta}]\text{PF}_6$ (C3),
5. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(1\text{-fenilikoazan-1,3-dionato})\text{Cl}]$ (C4),
6. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(1\text{-hidroksipiridin-2}(1H)\text{-tionato})\text{Br}]$ (C5),
7. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(1\text{-hidroksipiridin-2}(1H)\text{-tionato})\text{I}]$ (C6),
8. $[\text{dikarbonil-bis}(1\text{-hidroksipiridin-2}(1H)\text{-tionato})\text{Ru(II)}]$ (C7),
9. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(1\text{-}(3,5\text{-dimetoksifenil})\text{-3-fenilpropan-1,3-dionato})\text{Cl}]$ (C8),
10. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(1,7\text{-bis}(2,4\text{-dimetoksifenil})\text{hepta-1,6-dien-3,5-dionato})\text{Cl}]$ (C9),
11. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(1\text{-}(4\text{-metoksifenil})\text{-3-fenilpropan-1,3-dionato})\text{Cl}]$ (C10) in
12. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(2\text{-}(3,5\text{-bis}(3,4\text{-dimetoksistiril})\text{pirazol-1-il})\text{piridin})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (C11)
(slika 3).

Za izdelavo kompleksov sta bila uporabljena ta rutenijeva prekursorja:

1. dikloro(*p*-cimen)rutenijev(II) dimer (P1) in
2. trikarbonildiklororutenijev(II) dimer (P2) (slika 4)

Pri izdelavi kompleksov so bili uporabljeni ti ligandi:

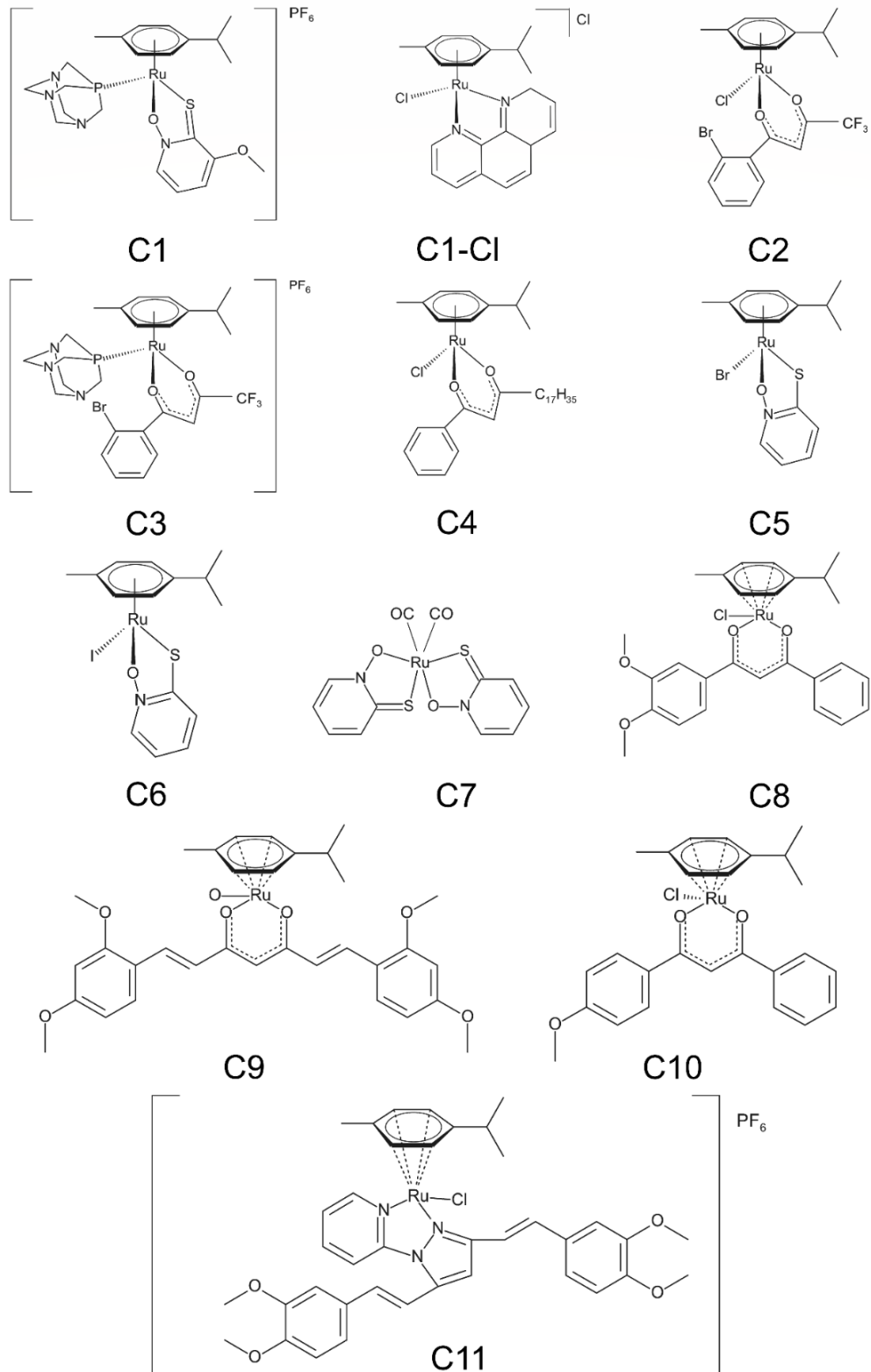
1. 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantan (L1),
2. 1-hidroksi-3-metoksipiridin-2(1*H*)-tion (L2),
3. 5-nitro-1,10-fenantrolin (L3),

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

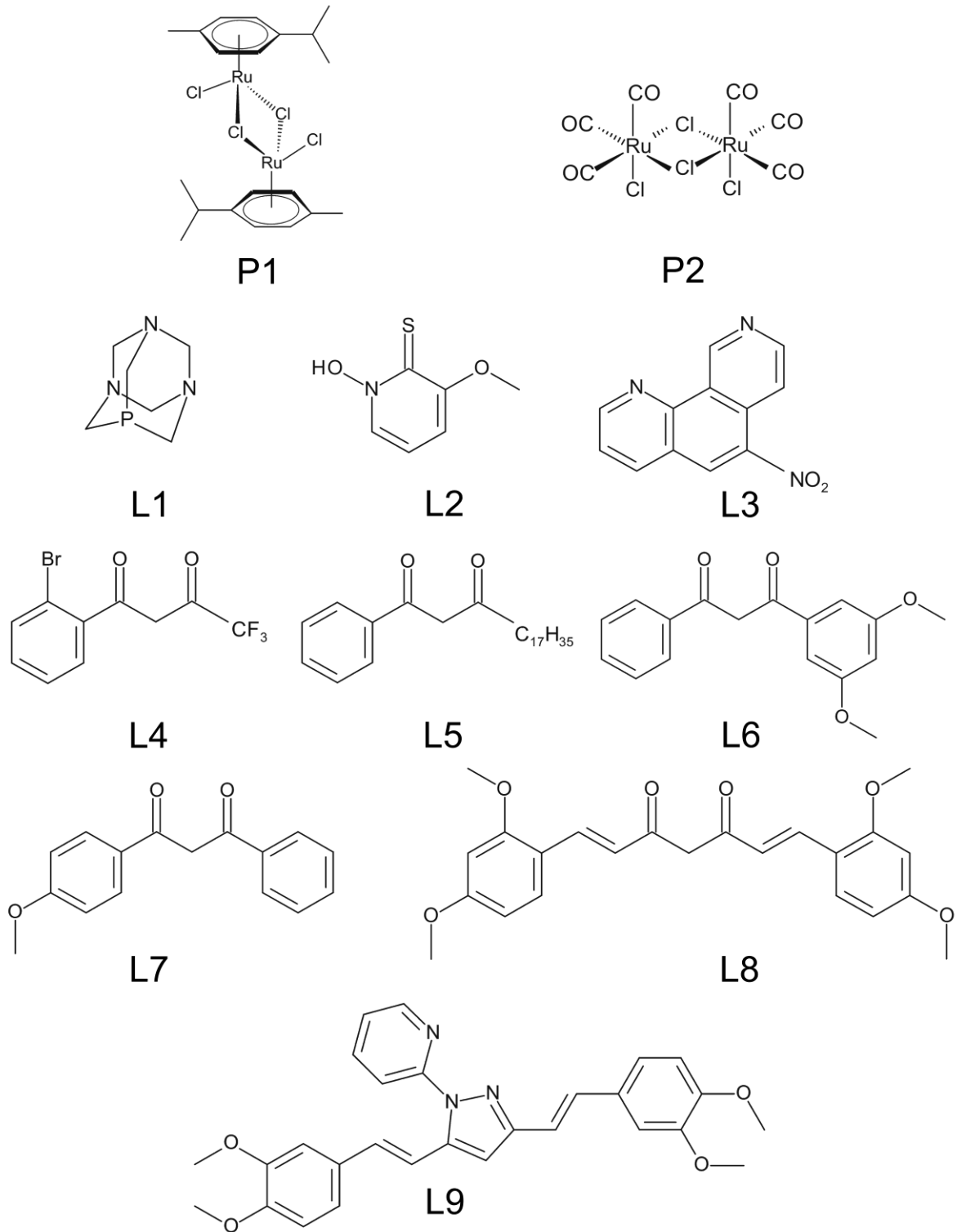
4. 4,4,4-trifluoro-1-(2-bromofenil)-butan-1,3-dion (L4),
5. 1-fenilikozan-1,3-dion (L5),
6. 1-(3,5-dimetoksifenil)-3-fenilpropan-1,3-dion (L6),
7. 1-(4-metoksifenil)-3-fenilpropan-1,3-dion (L7),
8. 1,7-bis(2,4-dimetoksifenil)hepta-1,6-dien-3,5-dion (L8) in
9. 2-(3,5-bis(3,4-dimetoksistiril)pirazol-1-il)piridin (L9) (slika 4).

Prekurzorja in tudi ligandi so komercialno dostopni. Organorutenijeve(II) arenske komplekse, prekurzorja in ligande smo prejeli v liofilizirani ali tekoči obliki in jih do uporabe hranili v temnem prostoru (zaščitene pred svetlobo) pri sobni temperaturi (20–24 °C).



Slika 3: Kemične strukture proučevanih organorutenijevih(II) arenskih kompleksov.

Figure 3: Chemical structures of studied organoruthenium(II) arene complexes.



Slika 4: Prekurzorja in ligandi proučevanih organorutenijevih(II) arenških kompleksov.

Figure 4: Precursors and ligands of studied organoruthenium(II) arene complexes.

3.3 Priprava osnovnih raztopin encimov

Za pripravo osnovnih raztopin holinesteraznih encimov smo AChE, izolirano iz električne jegulje (eeAChE), človeško rekombinantno AChE (hrAChE) in BChE, izolirano iz konjskega seruma (hsBChE), raztopili v 100 mM kalij-fosfatnem pufru (K-fosfatni pufer) s pH 7,4. Encimska aktivnost osnovnih raztopin holinesteraznih encimov je bila 50 encimskih enot (EE)/mL.

Za pripravo osnovne raztopine človeške placentarne GST (hGST) smo encim raztopili v 100 mM natrij-fosfatnem pufru (Na-fosfatni pufer) s pH 6,5. Encimska aktivnost osnovne raztopine encima hGST je bila 250–1250 EE/mL.

Za pripravo osnovne raztopine GST, izolirane iz konjskih jeter (hlGST), smo encim raztopili v 100 mM Na-fosfatnem pufru s pH 6,5. Encimska aktivnost osnovne raztopine encima hlGST je bila 50 EE/mL.

3.4 Test zaviranja holinesteraznih encimov

Spektrofotometrično metodo za določanje aktivnosti holinesteraz so razvili Ellman in sod. (1961). Acetiltioholin klorid (AChSH) smo v testu uporabili kot substrat, saj je analog naravnega ACh. Pri njegovi hidrolizi pod vplivom delovanja encima AChE nastaneta produkta tioholin in acetat. Tioholin reagira s 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojsko kislino) (DTNB), produkt je rumeno obarvana 5-tio-2-nitro-benzojska kislina, koncentracijo katere določamo spektrofotometrično pri valovni dolžini 412 nm in pri temperaturi 25 °C. Zelo pomembno je, da je reakcija dovolj hitra, da ne omejuje merjenja hitrosti encimske reakcije.

3.4.1 Priprava 100 mM K-fosfatnega pufra

Za pripravo 100 mM K-fosfatnega pufra smo stehali 17,42 g K_2HPO_4 in 13,61 g KH_2PO_4 in ju ločeno raztopili v 1 L deionizirane vode (dH_2O). Nato smo v raztopino K_2HPO_4 dodajali raztopino KH_2PO_4 , dokler pH raztopine ni dosegel vrednosti 7,4. Pripravljen 100 mM K-fosfatni pufer smo hranili v hladilniku pri 4 °C. Pred uporabo smo ga ogreli na temperaturo 25 °C.

3.4.2 Priprava Ellmanovega reagenta

Za pripravo Ellmanovega reagenta smo zatehtali 91 mg DTNB in 37,50 mg NaHCO₃ in ju raztopili v 1 L 100 mM K-fosfatnega pufru z vrednostjo pH 7,4. Pripravljen reagent smo hranili v steklenici, ki ščiti reagent pred stikom s svetlobo, v hladilniku pri 4 °C. Pred uporabo smo ga ogreli na temperaturo 25 °C in zaščitili pred svetlobo.

3.4.3 Priprava substrata (1 M AChSH)

V ependorfove epruvete smo zatehtali 0,198 mg AChSH in nato dodali 1 mL dH₂O. Ependorfove epruvete z raztopino 1 M AChSH smo nato zamrznili in hranili pri -20 °C. Pred poskusom smo raztopino odmrznili za čas priprave raztopine Ellmanovega reagenta in substrata. Med pripravo smo ependorfovo epruveto s substratom hranili na ledu. Preostali neporabljeni substrat smo ponovno zamrznili in uporabili naslednjič.

3.4.3.1 Priprava treh različnih koncentracij raztopin substrata (AChSH) in Ellmanovega reagenta

Najprej smo v tri erlenmajerice, obdane z aluminijasto folijo (zaščita pred svetlobo), dodali po 20 mL Ellmanovega reagenta. Nato smo po odmrzovanju iz ependorfove epruvete s pripravljeno raztopino 1 M AChSH odpipetirali tri različne volumne 1 M AChSH (5 µL, 10 µL in 20 µL) in vsakega od njih dodali v eno od erlenmajeric, v katerih je bilo po 20 mL Ellmanovega reagenta. Tako smo dobili raztopine AChSH v Ellmanovem reagentu s tremi različnimi koncentracijami (0,250 mM, 0,50 mM in 1 mM). Končna koncentracija treh različnih raztopin AChSH v jamici je bila 125, 250 in 500 µM.

3.4.4 Priprava rutenijevih kompleksov, prekursorjev in ligandov za biokemično karakterizacijo

V ependorfove epruvete, obdane z aluminijasto folijo, smo za biokemično karakterizacijo zatehtali po 1 mg kompleksa, prekursorja ali liganda in pripravili osnovno raztopino testirane snovi s koncentracijo 1 mg/mL. Kot topilo smo uporabili MeOH ali 5-odstotno (v/v) vodno raztopino DMSO. Raztopine kompleksov, prekursorjev in ligandov smo pripravljali dnevno in jih med opravljanjem testov hranili zaščitene pred svetlobo.

3.4.5 Presejalni test zaviranja holinesteraznih encimov

V mikrotitrski plošče s 96 jamicami z ravnim dnom smo z avtomatsko pipeto v vse jamice najprej dali 50 μL 100 mM K-fosfatnega pufru (pH 7,4). Nato smo v prvih šest od osmih jamic prvega stolpca mikrotitrski plošče dodali po 50 μL v koncentraciji 1 mg/mL pripravljene raztopine rutenijevih kompleksov ali prekurzorjev ali ligandov (potencialnih zaviralcev holinesteraz). V zadnji jamici smo v enaki količini (50 μL) dodali ustrezno topilo, ki smo ga uporabili pri pripravi raztopin rutenijevih kompleksov, prekurzorja in ligandov in nam je služil kot negativna kontrola, s katero smo ovrednotili vpliv topila na aktivnost holinesteraz. Na posamezni plošči smo preizkusili zaviralno aktivnost dveh različnih spojin v treh ponovitvah in v dveh ponovitvah negativno kontrolo (uporabljeno topilo). Za pripravo redčitev smo iz jamic prvega stolpca mikrotitrski plošče odpipetirali 50 μL in jih prenesli v jamice drugega stolpca ter tako dobili redčenja zaviralcev in negativne kontrole v sorazmerju 1 : 2. Redčenje smo nadaljevali in posamezno spojino redčili 11-krat (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, 1 : 512, 1 : 1024, 1 : 2048). Jamice zadnjega stolpca mikrotitrski plošče so nam služile kot kontrola brez dodanega zaviralca oziroma topila. Po opravljenem redčenju smo v vse jamice mikrotitrski plošče dodali po 100 μL raztopine Ellmanovega reagenta in substrata AChSH (1 mM). Osnovne raztopine holinesteraznih encimov eeAChE, hsBChE in hrAChE smo odmrznili in do uporabe hranili na ledu. Pred uporabo smo jih po naslednjem postopku dodali v 7 mL 100 mM K-fosfatnega pufru s pH 7,4:

1. V 7 ml K-fosfatnega pufru smo dodali 16 μL raztopine eeAChE, raztopljene v K-fosfatnem pufru z encimsko aktivnostjo 50 EE/mL. Nato smo v vse jamice mikrotitrski plošče dodali 50 μL raztopine eeAChE z encimsko aktivnostjo 114 mEE/mL, pri čemer je encimska aktivnost eeAChE v posamezni jamici znašala 5,7 mEE.
2. V 7 ml K-fosfatnega pufru smo dodali 70 μL raztopine hsBChE, raztopljene v K-fosfatnem pufru z encimsko aktivnostjo 50 encimskih EE/mL. Nato smo v vse jamice mikrotitrski plošče dodali 50 μL raztopine hsBChE z encimsko aktivnostjo 500 mEE/mL, pri čemer je encimska aktivnost hsBChE v posamezni jamici znašala 25 mEE.
3. V 7 ml K-fosfatnega pufru smo dodali 2 μL raztopine hrAChE, raztopljene v K-fosfatnem pufru z encimsko aktivnostjo 50 EE/mL. Nato smo v vse jamice

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

mikrotitrskne plošče dodali 50 μ L raztopine hrAChE z encimsko aktivnostjo 14,28 mEE/mL, pri čemer je encimska aktivnost hrAChE v posamezni jamicici znašala 0,71 mEE.

Na tržišču ni mogoče kupiti človeške BChE (hBChE) niti pasje BChE. Pri kompleksu C1 in njegovih ligandih (L1 in L2) smo najprej želeli preveriti zaviralno aktivnost kompleksa oziroma njegovih ligandov ob dodatku človeškega in pasjega seruma. Vendar smo nato hBChE prejeli kot darilo raziskovalne skupine, ki jo vodi prof. dr. Stanislav Gobec, za kar se jim na tem mestu prav lepo zahvaljujemo. Poleg tega smo preverili tudi zaviralno aktivnost kompleksa in njegovih ligandov ob dodatku pasjega seruma s pasjo serumsko BChE (dsBChE). Kot pri drugih komercialno dostopnih encimih smo v 7 ml K-fosfatnega pufru dodali ustrezne količine prejete raztopine hBChE in pasjega seruma (količine so bile eksperimentalno določene – sprememba absorbance med 100 in 200 mOD/min pri valovni dolžini 412 nm), ki so nam omogočale izvedbo meritev.

Meritve zaviranja holinesteraz smo opravljali s čitalcem mikrotitrskih plošč Dynex Technologies (Chantilly, Virginija, ZDA), in sicer 5 minut pri valovni dolžini 412 nm. Rezultati meritev so bili navedeni kot sprememba absorbance (mOD)/minuto. Meritve zaviralne aktivnosti spojin oziroma topila so bile izvedene v treh oziroma dveh ponovitvah. Z uporabo programske opreme Origin Pro (Northampton, Massachusetts, ZDA) smo analiziral izmerjene parametre in oblikovali graf, s katerim smo določili vrednost srednje zaviralne koncentracije spojine (IC_{50}).

Komplekse, pri katerih je bila ugotovljena zelo dobra zaviralna aktivnost proti navedenim encimom, smo izbrali za nadaljnja preizkušanja, pri katerih smo ugotavljali konstanto inhibicije (K_i).

3.4.6 Določanje konstante inhibicije

Pri izvedbi testa za določanje K_i smo uporabili Ellmanov reagent s tremi različnimi koncentracijami substrata (0,25, 0,50 in 1 mM AChSH). V mikrotitrskne plošče s 96 jamicami z ravnim dnom smo z avtomatsko pipeto v vse jamice najprej dali 50 μ L 100 mM K-fosfatnega pufru s pH 7,4. Nato smo v prvih devet od 12 jamic prve vrstice mikrotitrskne plošče dodali 50 μ L pripravljene raztopine rutenijevih kompleksov (zaviralca holinesteraz) v koncentraciji 1

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

mg/mL. Pri kompleksih, ki so se izkazali kot zelo močni zaviralci holinesteraz, smo uporabili koncentracijo 0,1 mg/mL. V zadnjih treh od 12 jamic prve vrste smo v enaki količini (50 μ L) dodali ustrezno topilo, ki smo ga uporabili pri pripravi raztopin rutenijevih kompleksov in nam je služil kot negativna kontrola, s katero smo ovrednotili vpliv topila na aktivnost holinesteraz pri treh različnih koncentracijah substrata. Temu je sledilo redčenje spojin na mikrotitrski plošči. Posamezen kompleks smo redčili 7-krat (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64). Jamice zadnje vrstice mikrotitrskе plošče so nam služile kot kontrola brez dodanega zaviralca oziroma topila. Za vsakega od kompleksov smo izvedli preizkušanje na svoji mikrotitrski plošči, za vsako koncentracijo substrata pa smo naredili po tri ponovitve. Negativno kontrolo (uporabljeno topilo) smo izvedli v eni ponovitvi pri posamezni koncentraciji substrata. Po opravljenem redčenju smo v jamice štirih stolpcev (kompleks – trije stolpci in negativna kontrola – en stolpec) dodali po eno koncentracijo raztopine Ellmanovega reagenta in AChSH (0,25, 0,50 in 1 mM AChSH). Nato smo v vse jamice mikrotitrskе plošče dodali 50 μ L raztopin holinesteraznih encimov (eeAChE, hsBChE in hrAChE), ki smo jih iz osnovnih raztopin pripravili po enakem postopku kot pri presejalnem testu zaviranja holinesteraznih encimov (opisanem v poglavju 3.4.5).

Meritve za določanje K_i smo izvedli s čitalcem mikrotitrskih plošč Dynex Technologies, in sicer 5 minut pri valovni dolžini 412 nm. Rezultati meritev so bili navedeni kot sprememba absorbance (mOD)/minuto. Z uporabo programske opreme Origin Pro smo analiziral izmerjene parametre. Rezultate smo prikazali v obliki Dixonovega grafa, pri katerem je na osi x navedena koncentracija testirane snovi (mg/mL), na osi y pa recipročna vrednost začetne hitrosti encimske reakcije ob prisotnosti treh različnih koncentracij substrata. Poleg K_i , smo z omenjenim testom določili tudi tip inhibicije (kompetitivna, akompetitivna, nekompetitivna in mešana).

3.5 Test zaviranja glutation S-transferaz

Za izvedbo testa zaviranja GST smo uporabili postopek po metodi, ki so jo razvili Habig in sod. (1974). Kot substrata smo pri navedenem testu uporabili 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (Cl-2,4-DNB) in reducirano obliko L-glutaciona (L-GSH). Encim GST povzroči konjugacijo Cl-2,4-DNB z L-GSH, posledica katerega je nastanek kloridnega iona in dinitrofenil-tioetra. Količino

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

nastalega produkta dinitrofenil-tioetra v encimski reakciji določamo s spektrofotometrom pri valovni dolžini 340 nm in temperaturi 25 °C.

3.5.1 Priprava Na-fosfatnega pufra

Zatehtali smo Na₂HPO₄ in NaH₂PO₄ in ju ločeno raztopili v 1 L deionizirane vode dH₂O. Nato smo v raztopino Na₂HPO₄ dodajali raztopino NaH₂PO₄, dokler pH raztopine ni dosegel vrednosti 6,5. Raztopino smo hranili v hladilniku pri 4 °C, pred uporabo pa smo ga ogreli na 25 °C.

3.5.2 Priprava substratov

3.5.2.1 Raztopina A: priprava raztopine Cl-2,4-DNB

Zatehtali smo 20,13 mg Cl-2,4-DNB in ga raztopili v 2 mL 99-odstotnega EtOH. Nato smo raztopino Cl-2,4-DNB dodali v 18,4 mL 100 mM Na-fosfatnega pufra. Raztopino substrata smo vsak dan sveže pripravili.

3.5.2.2 Priprava raztopin treh različnih koncentracij substrata Cl-2,4-DNB

Zatehtali smo i) 5,03 mg, ii) 10,06 mg in iii) 20,13 mg Cl-2,4-DNB, nato smo vsako od zateht posebej raztopili v 2 mL 99-odstotnega EtOH. Vsaki od treh raztopin Cl-2,4-DNB in EtOH smo dodali 18,4 mL 100 mM Na-fosfatnega pufra s pH 6,5. Tako smo dobili raztopine treh različnih koncentracij Cl-2,4-DNB (0,40, 0,80 in 1,6 mM). Končna koncentracija treh različnih raztopin substrata Cl-2,4-DNB v jamici je bila i) 200 µM, ii) 400 µM in iii) 800 µM.

3.5.3 Raztopina B: priprava raztopine L-GSH

Zatehtali smo 12,28 mg L-GSH in ga raztopili v 20 mL 100 mM Na-fosfatnega pufra. Raztopino substrata smo vsak dan sveže pripravili.

3.5.4 Presejalni test zaviranja encimov glutation S-transferaze

V mikrotitrski plošče s 96 jamicami z ravnim dnom smo z avtomatsko pipeto v vse jamice najprej dali 50 µL 100 mM Na-fosfatnega pufra s pH 6,5. Nato smo v prvih 10 od 12 jamic prve vrstice mikrotitrski plošče dodali po 50 µL pripravljene raztopine rutenijevih kompleksov, prekursorja in ligandov (potencialnih zaviralcev GST) v koncentraciji 1 mg/mL. V zadnji

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

jamici prve vrste smo dodali ustrezno topilo v enakem volumnu (50 μ L), ki smo ga uporabili pri pripravi raztopin rutenijevih kompleksov, prekursorjev in ligandov, kjer nam je služil kot negativna kontrola, s katero smo ovrednotili vpliv topila na aktivnost GST. Na posamezni plošči smo preizkusili zaviralno aktivnost petih različnih kompleksov in negativno kontrolo v dveh ponovitvah. Za pripravo redčitev smo iz jamic prve vrstice mikrotitrskje plošče odpipetirali 50 μ L in jih prenesli v jamice druge vrstice ter tako dobili redčenja zaviralcev in negativne kontrole v sorazmerju 1 : 2. Redčenje smo nadaljevali in posamezen kompleks redčili 7-krat (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64). Jamice zadnje vrstice mikrotitrskje plošče so nam služile kot kontrola brez dodanega zaviralca oziroma topila. Po opravljenem redčenju smo v vse jamice mikrotitrskje plošče dodali po 100 μ L raztopine B (substrat L-GSH) in 50 μ L raztopine A (substrat Cl-2,4-DNB). Tik pred meritvijo smo hGST in hGST raztopili v 7 mL 100 mM Na-fosfatnega pufra s pH 6,5 po tem postopku:

1. V 7 ml Na-fosfatnega pufra smo dodali 40 μ L raztopine hGST, raztopljene v Na-fosfatnem pufu z encimsko aktivnostjo 50 EE/mL. Nato smo v vse jamice mikrotitrskje plošče dodali 50 μ L raztopine hGST z encimsko aktivnostjo 286 mEE/mL, pri čemer je encimska aktivnost hGST v posamezni jamici znašala 14,3 mEE.
2. V 7 ml Na-fosfatnega pufra smo dodali 30 μ L raztopine hGST, raztopljene v Na-fosfatnem pufu z encimsko aktivnostjo med 250 in 1250 EE/mL. Nato smo v vse jamice mikrotitrskje plošče dodali 50 μ L raztopine hGST z encimsko aktivnostjo med 107,14 in 535,71 mEE/mL, pri čemer je encimska aktivnost hGST v posamezni jamici znašala med 5,21 in 26,79 mEE.

Meritve zaviranja GST smo opravili s čitalcem mikrotitrskjih plošč Cytation 3 cell imaging multi-mode reader, Biotek (Winooski, Vermont, ZDA), in sicer štiri minute pri valovni dolžini 340 nm in temperaturi 25 °C. Rezultate meritev smo navedli kot absorbanco (mOD), izmerjeno za posamezno jamico v razmiku 30 sekund. Iz dobljenih rezultatov smo nato izračunali spremembo absorbance/minuto, ki nam je služila kot izhodiščni rezultat meritev za nadaljnjo obdelavo podatkov. Kot že omenjeno, so bile meritve zaviralne aktivnosti spojin oziroma topila izvedene v dveh ponovitvah. Z uporabo programske opreme Origin Pro smo analizirali merjene parametre in oblikovali graf, s katerim smo določili vrednost IC₅₀.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Kompleksi, pri katerih je bila ugotovljena zelo dobra zaviralna aktivnost proti navedenim encimom, so bile izbrani za nadaljnja preizkušanja, pri katerih smo ugotavljali K_i .

3.5.5 Določanje konstante inhibicije

Pri izvedbi testa za določanje K_i smo uporabili tri različne koncentracije substrata Cl-2,4-DNB. V mikrotitrski plošči s 96 jamicami z ravnim dnom smo z avtomatsko pipeto v vse jamice najprej dali 50 μ L 100 mM Na-fosfatnega pufru s pH 6,5. Nato smo v prvih 10 od 12 jamic prve vrste mikrotitrski plošče dodali 50 μ L pripravljene raztopine rutenijevega kompleksa ali prekursorja (zaviralca GST) s koncentracijo 1 mg/mL. Pri kompleksih, ki so se izkazali kot zelo močni zaviralci GST, smo uporabili koncentracijo 0,1 ali 0,5 mg/mL. V zadnji jamici prve vrste smo dodali enako količino (50 μ L) ustreznega topila, ki smo ga uporabili pri pripravi raztopin rutenijevih kompleksov in nam je služilo kot negativna kontrola, s katero smo ovrednotili vpliv topila na aktivnost GST pri treh različnih koncentracijah substrata. Temu je sledilo redčenje spojin na mikrotitrski plošči. Posamezen kompleks smo redčili 7-krat (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64). Jamice zadnje vrstice mikrotitrski plošče so nam služile kot kontrola brez dodanega zaviralca oziroma topila. Za vsako od spojin smo izvedli preizkušanje na svoji mikrotitrski plošči, za vsako koncentracijo substrata smo naredili po tri ponovitve. Negativno kontrolo (uporabljeno topilo) smo izvedli v eni ponovitvi pri posamezni koncentraciji substrata. Po opravljenem redčenju smo v vse jamice mikrotitrski plošče dodali po 100 μ L raztopine B (substrat L-GSH). V jamice štirih stolpcev (spojina – trije stolpci in negativna kontrola – en stolpec) smo nato dodali po 50 μ L ene od treh koncentracij raztopine A (0,40, 0,80 in 1,6 mM Cl-2,4-DNB). Tik pred meritvijo smo hGST in hGST raztopili v 7 mL 100 mM Na-fosfatnega pufru s pH 6,5 po enakem postopku, kot je opisan v presejalnem testu zaviranja encimov glutation S-transferaze (poglavje 3.5.3).

Meritve zaviranja GST smo merili s čitalcem mikrotitrskih plošč Cytation 3 cell imaging multi-mode reader, Biotek, in sicer 4 minute pri valovni dolžini 340 nm. Rezultati meritev so bili navedeni kot absorbanca (mOD), izmerjena za posamezno jamico v razmiku 30 sekund. Iz dobljenih rezultatov smo nato izračunali spremembo absorbance mOD/minuto, ki nam je služila kot izhodiščni rezultat meritev za nadaljnjo obdelavo podatkov. Z uporabo programske opreme Origin Pro smo analiziral merjene parametre. Rezultate smo navedli v obliki Dixonovega grafa, pri katerem je na osi x navedena koncentracija snovi (mg/mL), na osi y pa recipročna vrednost

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

začetne hitrosti encimske reakcije ob prisotnosti treh različnih koncentracij substrata. Poleg K_i smo z omenjenim testom določili tudi tip inhibicije (kompetitivna, akompetitivna, nekompetitivna in mešana).

3.6 Meritve vpliva izbranih organorutenijevih(II) kompleksov na izometrično kontrakcijo in membranske potenciale mišičnih vlaken izoliranih hemidiafragem miši

Organorutenijeva(II) kompleksa C1-C1 ($M = 531,39$ g/mol) in C1 ($M = 693,59$ g/mol) smo izbrali za nadaljnja testiranja *ex vivo*. Prva spojina se je med proučevano knjižnico novih organorutenijevih(II) kompleksov v *in vitro* pogojih zaviranja holinesteraznih encimov izkazala kot zelo dober zaviralec holinesteraznih encimov, druga pa kot selektivni zaviralec BChE. Pred izvedbo elektrofizioloških meritev smo dnevno pripravili osnovno raztopino preizkušane snovi, v obeh primerih je bila osnovna koncentracija kompleksov 2 mg/mL. Kompleks C1-C1 smo raztopili v EtOH in Krebs-Ringerjevi raztopini (K-R raztopini) v razmerju v/v 1 : 10, kompleks C1 pa v 3-odstotni vodni raztopini DMSO. Poleg proučevane snovi smo za poskuse potrebovali še neostigmin metil sulfat, μ -konotoksin GIIIB, 96-odstotni EtOH in DMSO. Kot fiziološko raztopino za organe smo pripravili K-R raztopino, sestavljeno iz 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES in 11 mM D-glukoze.

3.6.1 Priprava živčno-mišičnega preparata

Delo na izoliranih organih je odobrila Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (številka dovoljenja U34401-8/2018/4). Potekalo je v skladu z etičnimi standardi. Za izvedbo poskusov na živčno-mišičnem preparatu smo uporabljali mišjo diafragma odraslih samcev (3–6 mesecev) linije BALB/C s telesno maso 22–30 g. Izolirane organe smo pridobili od 71 miši, izvor katerih sta Center za genomiko Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete (Ljubljana, Slovenija) in ENVIGO RMS S.R.L (Videm, Italija). Miši so bile žrtvovane z metodo cervikalne dislokacije s takojšnjo izkrvavitvijo. Sledila je preparacija, s katero smo izolirali diafragma s pripadajočima freničnima živcema (*n. phrenicus*). Diafragma smo prepolovili in dobili hemidiafragmi (dva živčno-mišična preparata), ki smo ju do začetka poskusa hranili v oksigenirani K-R raztopini (pH 7,4 pri sobni temperaturi 22–24 °C).

3.6.2 Meritve vpliva izbranih organorutenijevih(II) kompleksov na izometrično mišično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši

Priprava živčno-mišičnega preparata in poskusi so potekali pri sobni temperaturi (20–24 °C) ob stalni oksigenaciji K-R raztopine. Lateralni del hemidiafragme smo z entomološkimi iglami pričvrstili na dno kopeli za izolirane organe, prevlečeno s silikonsko prevleko in napolnjeno s 4 mL oksigenirane K-R raztopine. Tetivni del hemidiafragme smo povezali z ročico izometričnega mehanoelektričnega pretvornika (Grass FT03, Grass Instruments, West Warwick, Rhode Island, ZDA) in del freničnega živca s pomočjo podtlaka vsesali v lumen sukcijske elektrode. Temu je sledilo določanje supramaksimalne napetosti stimula, tako za prek živca kot tudi neposredno izzvane mišične kontrakcije ob delni raztegnitvi mišice. Nato smo nadaljevali raztezanje hemidiafragme do meje, pri kateri smo pri posredni supramaksimalni stimulaciji dosegli maksimalno amplitudo enostavne mišične kontrakcije (optimalna dolžina sarkomer). Čas zatezanja je znašal med 15 in 30 minut. Mišična tenzija v mirovanju (MT), pri kateri je bila amplituda kontrakcije najvišja, je znašala od 1,6 do 2,2 g. Meritve smo začeli ob doseženi maksimalni amplitudi kontrakcije in stabilni MT. Stimulacijo smo izvajali z uporabo napetostnega stimulatorja S-48 (Grass Instruments, West Warwick, Rhode Island, ZDA). Pri posredni mišični stimulaciji smo frenični živec stimulirali s sukcijsko elektrodo z 0,1 ms trajajočimi pravokotnimi stimuli supramaksimalne napetosti (10 V) in frekvenco 0,1 Hz. Z v kopel vpetima elektrodama iz platine, postavljenima vzdolž hemidiafragme, smo izvedli neposredno stimulacijo mišice z 0,1 ms trajajočimi stimuli supramaksimalne napetosti (50–70 V) in frekvenco 0,1 Hz. Tetanične mišične kontrakcije, posredne in neposredne, smo izzvali s supramaksimalnimi napetostnimi stimuli frekvence 80 Hz in trajanjem stimulacije 1000 ms, razlika je bila le v napetosti. Izometrične mišične kontrakcije smo registrirali s pomočjo mehansko-električnega pretvornika. Električne signale smo ojačali z DC-ojačevalnikom P122 (Grass Instruments, West Warwick, Rhode Island, ZDA). Električni šum (50/60 Hz) smo odstranili s prečiščevalcem šumov Hum bug noise eliminator (Digitimer, Welwyn Garden City, Združeno kraljestvo), nato smo električne signale digitalizirali s 16-bitnim analogno-digitalnim pretvornikom Digidata 1550b (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornija, ZDA), pri čemer je bila frekvenca vzorčenja signala 0,5 kHz. Za registracijo, vizualizacijo in shranjevanje na trdi disk ter analizo registriranih signalov smo uporabili program pClamp 10 (Molecular Devices, Union City, Kalifornija, ZDA). Proučevali smo učinek 5-, 10-, 20-, 25-, in 40- μ M koncentracij

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

kompleksa C1-Cl ter 30-, 40-, 80- in 120- μ M koncentracij kompleksa C1 na amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije. Kot pozitivno kontrolo smo v obeh primerih uporabili znani zaviralec AChE, 3 μ M neostigmin metil sulfat in še dodatno pri kompleksu C1-Cl zaviralca kalijevih kanalov (300 μ M 3,4-DAP). K-R raztopino, ki smo ji dodali 96-odstotni EtOH v deležu 0,105 % (v/v) ali DMSO v deležu 0,104 % (v/v), smo uporabili kot negativno kontrolo.

Poskuse z registracijo izometrične kontrakcije smo na vsaki hemidiafragmi izvajali po tem protokolu:

1. 25 minut kontrolnega zapisa, v okviru katerega smo registrirali posredno in neposredno izzvano enostavno in tetanično mišično kontrakcijo;
2. 10 minut zapisa posredno izzvane mišične kontrakcije;
3. 60-minutna registracija posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije ob odsotnosti ali prisotnosti proučevanih kompleksov v K-R raztopini oziroma topil v kopeli;
4. 5-minutni zapis neposredno izzvane mišične kontrakcije, nato pa še obeh posredno in neposredno izzvanih tetaničnih kontrakcij;
5. štirikratno spiranje z oksigenirano K-R raztopino;
6. 15-minutni zapis posredno izzvane mišične kontrakcije;
7. 5-minutni zapis neposredno izzvane mišične kontrakcije;
8. zapis posredno in neposredno izzvanih tetaničnih kontrakcij.

Zapise smo analizirali s programom pClamp-Clampfit 10.7 (Molecular Devices, Union City, Kalifornija, ZDA). Določali smo amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije. Amplitudo mišične kontrakcije smo izrazili kot odstotek maksimalnega odgovora kontrakcije pred dodatkom testiranega kompleksa v kopel.

3.6.3 Meritve vpliva izbranih organorutenijevih(II) kompleksov na membranske potenciale mišičnih vlaken izoliranih hemidiafragem miši

Hemidiafragmo smo 30 minut inkubirali v oksigenirani K-R raztopini z dodatkom 1,6 μ M μ -konotoksina, ki v sarkolemi selektivno zavre Nav1.4 podtip od napetosti odvisnih natrijevih

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

kanalov (Cruz, Gray in sod., 1985, Hong and Chang 1989). Zato ob nastanku PMP ne nastane akcijski potencial, kar prepreči krčenje mišičnih vlaken in nam omogoča mehansko stabilnost pri meritvah membranskih potencialov. Hemidiafragma smo s pomočjo entomoloških igel pričvrstili na dno s silikonsko prevleko prekrite kopeli za izolirane organe. Kopel smo pred tem napolnili z 2 mL oksigenirane K-R raztopine z dodanim μ -konotoksinom. Pred meritvami membranskih potencialov mišičnih vlaken smo *n. phrenicus* s pomočjo podtlaka vsesali v sukcijsko elektrodo, ki omogoča posredno električno stimulacijo živca. Vse meritve so bile opravljene pri sobni temperaturi (20–24 °C) ob stalni oksigenaciji K-R raztopine. Za meritve membranskih potencialov smo uporabili borosilikatne mikroelektrode, napolnjene s 3 M KCl in uporom od 10 do 20 M Ω . Za izdelavo mikroelektrod smo uporabili napravo 97 Flaming/Brown micropipette puller (Sutter Instruments, Novato, Kalifornija, ZDA). Mikroelektrodo smo uvedli v mišično vlakno v področju motorične ploščice, kar smo potrdili s prisotnostjo miniaturnih potencialov motorične ploščice (MPMP) v registriranem zapisu. Za sproženje PMP smo frenični živec prek sukcijske elektrode vzdražili z 0,1 ms supramaksimalnimi dražljaji napetosti 10 V pri frekvenci 0,1 Hz z uporabo stimulatorja S-48. Registrirali smo rVm, spontane MPMP in posredno z električno stimulacijo izzvane PMP. Za registracijo in ojačanje merjenih signalov smo uporabili ojačevalnik Axoclamp 900A (Molecular devices, Sunnyvale, Kalifornija, ZDA). S prečiščevalcem šumov Hum bug noise eliminator smo odstranili 50 Hz električni šum in nato signale digitalizirali s 16-bitnim analogno-digitalnim pretvornikom Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornija, ZDA), pri čemer je bila frekvenca vzorčenja signala 25 kHz, krmiljenega s programskim paketom pClamp 10. Meritve vseh potencialov so bile opravljene pred aplikacijo, 30 in 60 min po aplikaciji testirane snovi in 15 min po zamenjavi medija v kopeli s K-R raztopino. V vsakem časovnem obdobju smo opravili meritve na 6–10 mišičnih vlaknih na posamezni hemidiafragmi. Proučevali smo učinek izbranih rutenijevih kompleksov 5-, 10-, 20-, 25-, in 40- μ M koncentracij kompleksa C1-Cl in 120- μ M koncentracije kompleksa C1. Poleg tega smo izvedli tudi poskuse z negativno kontrolo z dodatkom EtOH v deležu 0,105 % (v/v) ali DMSO v deležu 0,104 % (v/v) v 2 mL K-R raztopine. Meritve smo analizirali s programom pClamp-Clampfit 10.7. Določali smo: rVm, amplitudo in razpolovni čas PMP, amplitudo in razpolovni čas MPMP ter frekvenco MPMP. Uporabili smo absolutne vrednosti navedenih parametrov.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

3.7 Elektrofiziološke meritve na oocitih navadne krempljarke (*Xenopus laevis*) z vgrajenimi nAChR iz navadnega električnega skata (*Torpedo marmorata*)

nAChR, ki so v električnem organu skata, imajo zelo podobno sestavo in funkcionalne lastnosti kot tisti v živčno-mišičnem stiku pri sesalcih v času fetalnega razvoja (Sine, 2012). Za ugotovitev vpliva izbranih rutenijevih spojin na mišični tip nAChR ($\alpha_1\beta_1\gamma\delta$) smo mikrotransplantirali membrane elektrocitov iz električnega organa navadnega električnega skata v oocite navadne krempljarke. Membrane elektrocitov navadnega električnega skata, ki vsebujejo veliko število $\alpha_1\beta_1\gamma\delta$ nAChR, so bile prečiščene po protokolu, kot so ga opisali Krieger in sodelavci (2008), nato so bili narejeni alikvoti v 5-mM glicinu (v končni koncentraciji proteina 2,7 mg/mL). Alikvoti proteina so bili do uporabe shranjeni na -80 °C.

Navadne krempljarke smo anestezirali z 20-minutno potopitvijo v vodno raztopino trikaina s koncentracijo 1,0 g/L. Nato smo žabe operirali in njihove oocite pridobili po postopku, kot so ga opisali Krieger in sodelavci (2008). Oocite v stadiju V-VI brez folikularnih celic smo hranili pri 18 °C v Bartovem mediju s sestavo 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,41 mM CaCl₂, 0,82 mM MgSO₄, 2,5 mM CaNO₃, 7,5 mM HEPES (pH 7,6) z dodatkom antibiotika kanamicina (0,5 mg/mL). Z mikroinjektorjem, krmiljenim z Nano-liter2000 Micro4 Controller (World Precision Instruments Inc., Stevenage, Herts, Združeno kraljestvo), smo prečiščene suspenzije membran elektrocitov navadnega električnega skata, bogate z $\alpha_1\beta_1\gamma\delta$ nAChR (50 nL; 2,7 mg/mL proteina v 5-mM glicinu), injicirali v citoplazmo oocitov. Postopek smo opravili pod lupo. Po opravljeni mikrotransplantaciji smo žabje oocite 24–48 ur inkubirali v inkubatorju pri 18 °C. Toliko časa potrebujejo mikroinjicirane membrane elektrocitov, da se vgradijo v plazemsko membrano oocitov. Vsakodnevno smo menjali Bartov medij in preverjali preživetje oocitov. Posamezen oocit smo nato namestili v merilno komorico z volumnom 300 μ L, temu je sledila prilagoditev oocita novim pogojem (~5 min). Za izvedbo meritev membranskih tokov smo uporabili dvoelektrodno metodo vpete napetosti. Za izvedbo meritev smo uporabili znotrajcelične borosilikatne mikroelektrode, napolnjene s 3 M KCl in upornostjo od 2 do 5 M Ω . Za izdelavo mikroelektrod smo uporabili napravo Narishige PC-10 puller (Narishige International Ltd., London, Združeno kraljestvo). Sledila je kontinuirana perfuzija oocita (8–12 mL/min) z modificirano Ringerjevo raztopino s to sestavo: 100 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,3 BaCl₂ in 5 mM HEPES. Namesto CaCl₂ smo v raztopini uporabili BaCl₂, ki preprečuje nastanek od Ca²⁺ odvisnega Cl⁻ toka. Pred izvedbo dvoelektrodne metode vpete

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

napetosti smo dnevno pripravili osnovno raztopino preizkušane kompleksa (1 mg/mL). Kompleks C1-C1 smo raztopili v modificirani Ringerjevi raztopini. Osnovne raztopine ACh (1 M) smo pripravili v dH₂O. Za pripravo končnih raztopin kompleksa in ACh smo nato vse osnovne raztopine redčili v ustrezni količini modificirane Ringerjeve raztopine. Polovična koncentracija maksimalne učinkovite koncentracije (EC₅₀) ACh je znašala 25 μM in je bila določena na podlagi krivulje, ki ponazarja vpliv koncentracije na odziv pri oocitih, pri katerih je bil membranski potencial vzdrževan pri -60 mV in ki so imeli v plazemski membrani prisoten mišični tip nAChR. Pri izvedbi meritev smo uporabili 50-μM koncentracijo ACh (2-kratna EC₅₀ za ACh), ki aktivira ~ 80 % nAChR, vgrajenih v plazemsko membrano oocita. Membranski potencial oocita je bil v času meritev konstantno vzdrževan pri napetosti -60 mV. Za registracijo in ojačanje merjenih signalov smo uporabili ojačevalnik Oocyte Clamp Amplifier OC-725B (Warner Instruments, LLC, Hamden, ZDA). S prečiščevalcem šumov Hum smo odstranili 50-Hz električni šum, nato pa signale digitalizirali s 16-bitnim analogno-digitalnim pretvornikom Digidata 1322A (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornija, ZDA) in jih shranili na disk računalnika. Frekvenca vzorčenja signala je bila 3,1 kHz, krmiljena s programskim paketom pClamp-9 (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornija, ZDA). Pozneje smo signale analizirali s programsko opremo pCLAMP-Clampfit 10.7.

Pri izvedbi meritev smo najprej trikrat zapored registrirali ionski tok skozi nAChR v membrani oocita, izzvanim s 50 μM ACh. Temu je sledila izpostavitvev oocita raztopini izbranih organorutenijevih kompleksov, nato pa njegova izpostavitvev raztopini izbranih organorutenijevih kompleksov skupaj s 50 μM ACh. Sledilo je spiranje oocita z modificirano Ringerjevo raztopino in ponovna izpostavitvev 50 μM ACh z registracijo ionskega toka. Računalniško vodeni perfuzijski sistem VC6 (Warner Instruments, LLC, Hamden, ZDA) je bil nastavljen tako, da je izpostavljenost organorutenijevim kompleksom in ACh trajala 45 sekund, mešanici organorutenijevega kompleksa in ACh pa 15 sekund. Čas, potreben za okrevanje (spiranje z modificirano Ringerjevo raztopino) med posameznimi aplikacijami, je bil 180 sekund. Amplitude tokov, registriranih ob izpostavljenosti posamezni učinkovini, smo normalizirali glede na maksimalne amplitude tokov, povzročenih z ACh.

Protokol izvedbe meritev:

1. 60 sekund modificirana Ringerjeva raztopina,

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

2. 15 sekund 50 μM ACh,
3. 180 sekund modificirana Ringerjeva raztopina,
4. 15 sekund 50 μM ACh,
5. 180 sekund modificirana Ringerjeva raztopina,
6. 15 sekund 50 μM ACh,
7. 180 sekund modificirana Ringerjeva raztopina,
8. 45 sekund organorutenijev kompleks,
9. 15 sekund organorutenijev kompleks in 50 μM ACh,
10. 180 sekund modificirana Ringerjeva raztopina,
11. 15 sekund 50 μM ACh,
12. 60 sekund modificirana Ringerjeva raztopina.

3.8 Analize podatkov in statistična analiza

Parametre mišične kontrakcije in membranskih potencialov poskusov s kompleksom C1-C1 smo analizirali s programom pClamp-Clampfit 10.7. Sledila je statistična analiza pridobljenih podatkov in izdelava grafov, za kar smo uporabili programa SigmaPlot za Windows 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, Kalifornija, ZDA) in GraphPad Prism 9.4.0 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, ZDA). Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost \pm standardna napaka (S. E.). Koncentracije, ki povzročajo 50-odstotno inhibicijo začetnih odzivov (IC_{50}), in Hillovi koeficienti (n_H) so bili določeni iz teoretičnih razmerij med koncentracijo in odzivom, izračunanih iz tipičnih sigmoidnih nelinearnih regresij prek podatkovnih točk (korelacijski koeficient = r^2) z uporabo štiriparametričnega nelinearnega regresijskega modela (GraphPad Prism 6.00). Podatke smo statistično analizirali z uporabo programa Sigma Plot za Windows različice 12.5. Najprej smo jih analizirali s testom normalnosti porazdelitve (Shapiro-Wilk) in enakovrednosti razlik za določanje parametrične ali neparametrične analize. Če so bile vrednosti spremenljivk normalno porazdeljene, smo za statistično analizo uporabili Studentov t-test, pri čemer je $p \leq 0,05$ štel za statistično značilen. Ti podatki so predstavljeni kot srednja vrednost \pm S. E. Za parno primerjavo med skupinama,

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

kadar ni bila ugotovljena enakovrednost razlik, je bila uporabljena neparametrična analiza z uporabo testa Mann-Whitney Rank Sum Test, pri čemer je p vrednost $\leq 0,05$ veljala za statistično značilno. Podatki so predstavljeni z mediano in interkvartilnim razmikom ter grafično z okvirjem z ročaji (*ang. box plot*).

Prav tako smo parametre mišične kontrakcije in membranskih potencialov poskusov s kompleksom C1 analizirali s programom pClamp-Clampfit 11.1. Sledila je statistična analiza pridobljenih podatkov in izdelava grafov s programom SigmaPlot za Windows 14.5 (Systat Software Inc., San Jose, Kalifornija, ZDA). Podatke smo analizirali s testom normalnosti porazdelitve (Shapiro-Wilk) in enakovrednosti razlik (Brown-Forsythe) za določanje parametrične ali neparametrične analize. Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med skupinami smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA). Statistično značilne razlike za pare skupin pri normalno porazdeljenih vrednostih spremenljivk smo ugotavljali s *post hoc* testom Holm-Sidak, pri čemer je p vrednost $\leq 0,05$ veljala za statistično značilno. Podatki so predstavljeni kot srednja vrednost \pm S. E. V primerih nenormalne porazdelitve vrednosti spremenljivk smo uporabili enosmerno analizo variance Kruskal-Wallis. Statistično značilne razlike za pare skupin smo ugotavljali z uporabo neparametričnega *post hoc* testa Dunn, pri čemer je p vrednost $\leq 0,05$ veljala za statistično značilno. Podatki so predstavljeni z mediano in interkvartilnim razmikom ter grafično z okvirjem z ročaji (*ang. box plot*).

Parametre ionskega toka skozi nAChR iz navadnega električnega skata smo analizirali s programom pClamp-Clampfit 11.1. Sledila je analiza podatkov in izdelava grafov, za kar smo uporabili programa SigmaPlot za Windows 14.5 in GraphPad Prism 9.4.0. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost \pm S. E. Koncentracija, ki povzroči 50-odstotno inhibicijo začetnih odzivov, in Hillov koeficient (n_H) sta bila določena iz teoretičnih razmerij med koncentracijo in odzivom, izračunanih iz tipičnih sigmoidnih nelinearnih regresij prek podatkovnih točk (korelacijski koeficient = r^2) z uporabo štiriparametričnega nelinearnega regresijskega modela (GraphPad Prism 9.4.0).

4 REZULTATI

4.1 Učinki organorutenijevih(II) kompleksov, prekurzorjev in ligandov na holinesterazne encime in glutation S-transferazi

Knjižnico, ki je vsebovala dvanajst novih organorutenijevih(II) arenjskih kompleksov, dva prekurzorja in devet ligandov smo uporabili v prvem delu raziskave za identifikacijo novih kompleksov z zaviralnim delovanjem na sesalske holinesteraze in/ali GST *in vitro*. Identificirali smo nove komplekse, ki i) selektivno zavirajo BChE; ii) zavirajo holinesteraze; iii) zavirajo holinesteraze in GST in iv) selektivno zavirajo GST. Rezultati so prikazani v tabelah 3 in 4.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Tabela 3: Zaviralne aktivnosti organorutenijevih(II) kompleksov, prekursorjev in ligandov za holinesterazne encime.

Table 3: Inhibitory activity of organoruthenium complexes, precursors and ligands towards cholinesterase enzymes.

Kompleks (C), ligand (L), prekurzor (P).	ee	ee	hs	hs	hr	hr	Vrsta inhibicije
	AChE	AChE	BChE	BChE	AChE	AChE	
	IC ₅₀ (μ M)	K _i (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	K _i (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	K _i (μ M)	
C1-CI	26,2	17,0	16,1	5,0	24,2	17,0	kompetitivna
C1	/	<i>n. d.</i>	2,88	1,33	/	<i>n. d.</i>	kompetitivna
C2	/	<i>n. d.</i>	30,98	6,19	/	<i>n. d.</i>	kompetitivna
C3	/	<i>n. d.</i>	19,20	9,26	/	<i>n. d.</i>	kompetitivna
C4	/	<i>n. d.</i>	31,99	8,84	/	<i>n. d.</i>	kompetitivna
C5	13,14	4,87	3,39	0,63	6,57	2,49	kompetitivna
C6	12,9	1,43	3,48	0,80	6,55	1,94	kompetitivna
C7	281,38	<i>n. d.</i>	346,45	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	
C8	/	<i>n. d.</i>	3,97	0,40	/	<i>n. d.</i>	kompetitivna
C9	72,06	<i>n. d.</i>	15,76	2,40	/	<i>n. d.</i>	kompetitivna
C10	/	<i>n. d.</i>	3,24	0,34	/	<i>n. d.</i>	kompetitivna
C11	10,19	1,86	4,16	1,75	6,52	2,63	kompetitivna
L1	<i>n. d.</i> *	<i>n. d.</i> *	<i>n. d.</i> *	<i>n. d.</i> *	<i>n. d.</i> *	<i>n. d.</i> *	
L2	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	
L3	5,3	1,8	4,0	0,7	40,0	18,7	kompetitivna
L4	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	
L5	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	
L6	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	
L7	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	
L8	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	
L9	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	
P1	/	<i>n. d.</i>	32,7	23,3	/	<i>n. d.</i>	kompetitivna
P2	205,07	<i>n. d.</i>	171,87	<i>n. d.</i>	/	<i>n. d.</i>	
neostigmin	3,9	<i>n. d.</i>	62,8	<i>n. d.</i>	4,8	<i>n. d.</i>	

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

IC₅₀: koncentracija spojine, ki povzroči 50-odstotno zavrtje encimske aktivnosti. K_i: konstanta inhibicije, /: ni bilo aktivnosti, n. d.: ni bilo določeno in n. d.*: ni bilo določeno zaradi nastanka barvne reakcije ob stiku liganda L1 s substratom. (eeAChE) acetilholinesteraza, izolirana iz električne jegulje; (hrAChE) človeška rekombinantna acetilholinesteraza; (hsBChE) butirilholinesteraza, izolirana iz konjskega seruma.

IC₅₀: concentration of the compound inducing 50 % inhibition of the enzyme activity. K_i: inhibitory constant, /: no activity, n. d.: non determined and n. d.*: non determined due to color reaction of ligand L1 with substrate. (eeAChE) electric eel acetylcholinesterase; (hrAChE) human recombinant acetylcholinesterase; (hsBChE) horse serum butyrylcholinesterase.

Tabela 4: Zaviralne aktivnosti organorutenijev(II) kompleksov, prekursorja in ligandov za glutation S-transferazne encime.

Table 4: Inhibitory activity of organoruthenium(II) complexes, precursor and ligands towards glutathion S-transferase enzymes.

Kompleks (C), ligand (L), prekursor (P).	hl	hl	h	h	Vrsta inhibicije
	GST	GST	GST	GST	
	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)	
C2	16,11	2,83	141,65	n. d.	kompetitivna
C3	/	n. d.	/	n. d.	
C4	18,28	1,83	/	n. d.	kompetitivna
C5	<3,39	0,79	4,64	4,08	kompetitivna
C6	<3,07	1,60	15,97	8,60	kompetitivna
C7	<3,66	0,85	16,61	9,65	kompetitivna
C8	<2,71	2,11	30,68	22,02	kompetitivna
C9	2,55	0,90	102,08	n.d.	kompetitivna
C10	<2,86	0,38	17,75	68,69	kompetitivna
C11	/	n. d.	/	n. d.	
L4	33,89	n. d.	/	n. d.	
L5	/	n. d.	/	n. d.	
L6	66,82	59,79	316,56	n. d.	kompetitivna
L7	393,27	n. d.	/	n. d.	
L8	/	n. d.	/	n. d.	
L9	134,17	n. d.	/	n. d.	
P2	9,76	2,93	97,65	n. d.	kompetitivna

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

IC₅₀: koncentracija spojine, ki povzroči 50-odstotno zavrtje encimske aktivnosti. K_i : konstanta inhibicije, /: ni bilo aktivnosti in *n. d.*: ni bilo določeno. (hIGST) glutation S-transferaza, izolirana iz konjskih jeter, in (hGST) človeška placentarna glutation S-transferaza.

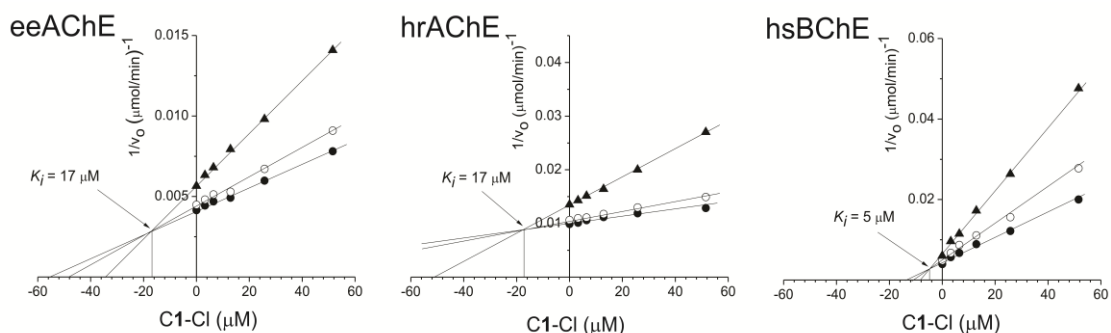
IC₅₀: concentration of the compound inducing 50 % inhibition of the enzyme activity. K_i : inhibitory constant, /: no activity, *n. d.*: non determined. (hIGST) horse liver glutathione S-transferaze and (hGST) human placental glutathione S-transferaze.

4.2 Biokemično ovrednotenje zaviralne aktivnosti izbranih organorutenijevih(II) kompleksov

4.2.1 Zaviranje holinesteraznih encimov s kompleksom $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru(II)}(\text{5-nitro-1,10-fenantrolin})\text{Cl}]\text{Cl}$ (C1-Cl), ligandom nitrofenom (5-nitro-1,10-fenantrolin) in prekursorjem dikloro(*p*-cimen)rutenijev(II) dimer

Kompleks C1-Cl zavira holinesterazne encime živalskega in človeškega izvora v farmacevtsko zanimivem območju z vrednostmi IC₅₀ 26,2, 24,2 in 16,1 μM za eeAChE, hrAChE oziroma hsBChE. Rezultati kažejo, da je ligand nitrofen (L3) močen zaviralec eeAChE in hsBChE z vrednostmi IC₅₀ 5,3 in 4,0 μM. V nasprotju z encimi eeAChE in hsBChE je njegova zaviralna aktivnost za hrAChE manjša, saj je vrednost IC₅₀ znašala 40 μM. Prav tako je bilo ugotovljeno, da rutenijev prekursor (P1) ne zavira niti eeAChE niti hrAChE, medtem ko je bilo opaženo zmerno zaviranje hsBChE z vrednostjo IC₅₀ 32,7 μM (tabela 3) (Ristovski in sod., 2018).

Ugotovili smo tudi, da kompleks C1-Cl kompetitivno povratno zavira vse uporabljene holinesterazne encime (slika 5). K_i za eeAChE in hrAChE sta znašali 17 μM, K_i za hsBChE pa je bila nekoliko nižja (5 μM).



Slika 5: Določanje vrste in konstante inhibicije (K_i) za kompleks C1-Cl pri acetilholinesterazi, izolirani iz električne jegulje (eeAChE), človeški rekombinantni acetilholinesterazi (hrAChE) in konjski serumski

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

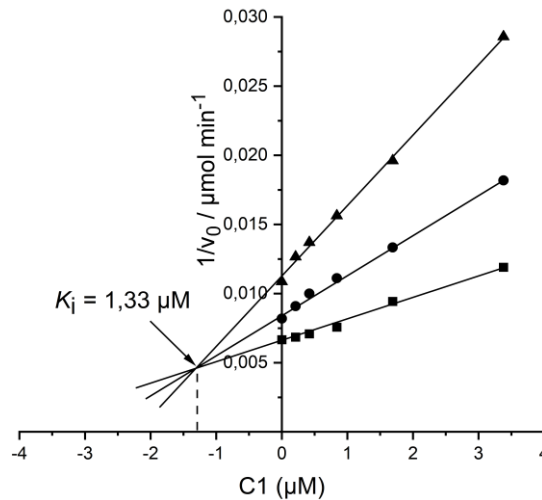
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

butirilholinesterazi (hsBChE). Uporabljene koncentracije substrata acetiltioholina so bile 0,125 mM (trikotniki), 0,25 mM (krogi brez polnila) in 0,5 mM (krogi s polnilom).

Figure 5: Determination of the type of inhibition and inhibitory constant (K_i) for C1-CI towards electric eel (eeAChE), human recombinant acetylcholinesterase (hrAChE) and horse serum butyrylcholinesterase (hsBChE). The concentrations of the substrate acetylthiocholine were 0.125 mM (full triangles), 0.25 mM (open circles) and 0.5 mM (full circles).

4.2.2 Zaviranje holinesteraznih encimov s kompleksom $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{II})(1\text{-hidroksi-3-metoksipiridin-2}(1H)\text{-tionato})\text{pta}]\text{PF}_6$ (C1), njegovimi ligandi (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantan (L1) in 1-hidroksi-3-metoksipiridin-2(1H)-tion (L2)) in prekurzorjem dikloro(*p*-cimen)rutenijev(II) dimer

Biokemično smo ovrednotili zaviralno aktivnost kompleksa C1 za eeAChE, hrAChE in hsBChE. Izbrani kompleks ni zaviral AChE (eeAChE ali hrAChE), temveč je selektivno zmanjšal aktivnost hsBChE. Zaviralni potencial C1 za BChE je bil v farmacevtsko zanimivem območju z vrednostjo IC_{50} 2,88 μM . Ugotovili smo, da kompleks C1 kompetitivno povratno zavira hsBChE (slika 6). Določali smo tudi zaviralno aktivnost kompleksa C1 za človeško BChE (hBChE) in pasjo serumsko BChE (dsBChE). Ugotovili smo, da kompleks v preizkušnem območju ne zavira aktivnosti dsBChE v pasjem serumu in da pri zelo visoki koncentraciji ($\text{IC}_{50} = 144,2 \mu\text{M}$) zavira aktivnost hBChE. Ligand L2 ni zaviral aktivnosti uporabljenih encimov, medtem ko meritev zaviralne aktivnosti zaradi obarvanja ob stiku s substratom pri ligandu L1 ni bilo mogoče izvesti. Prav tako je bilo ugotovljeno, da rutenijev prekurzor (P1) ne zavira niti eeAChE niti hrAChE, medtem ko je bilo opaženo zmerno zaviranje hsBChE z vrednostjo IC_{50} 32,7 μM . Zaviralni parametri kompleksa C1 in njegovih ligandov (L1 in L2) in prekurzorja za navedene holinesteraze (IC_{50} , K_i) so prikazani v tabeli 3.



Slika 6: Določanje vrste in konstante inhibicije (K_i) za kompleks C1 pri konjski serumski butirilholinesterazi (hsBChE). Uporabljene koncentracije substrata acetiltioholina so bile 0,125 mM (trikotniki), 0,25 mM (krogi) in 0,5 mM (kvadrati).

Figure 6: Determination of the type of inhibition and inhibitory constant (K_i) for C1 towards horse serum butyrylcholinesterase (hsBChE). The concentrations of the substrate acetylthiocholine were 0.125 mM (triangles), 0.25 mM (circles) and 0.5 mM (squares).

4.3 Elektrofiziološka karakterizacija izbranih organorutenijevih(II) kompleksov

4.3.1 Meritve kontrakcije skeletnih mišic *in vitro*

4.3.1.1 Vpliv C1-Cl na kontrakcijo skeletnih mišic *in vitro*

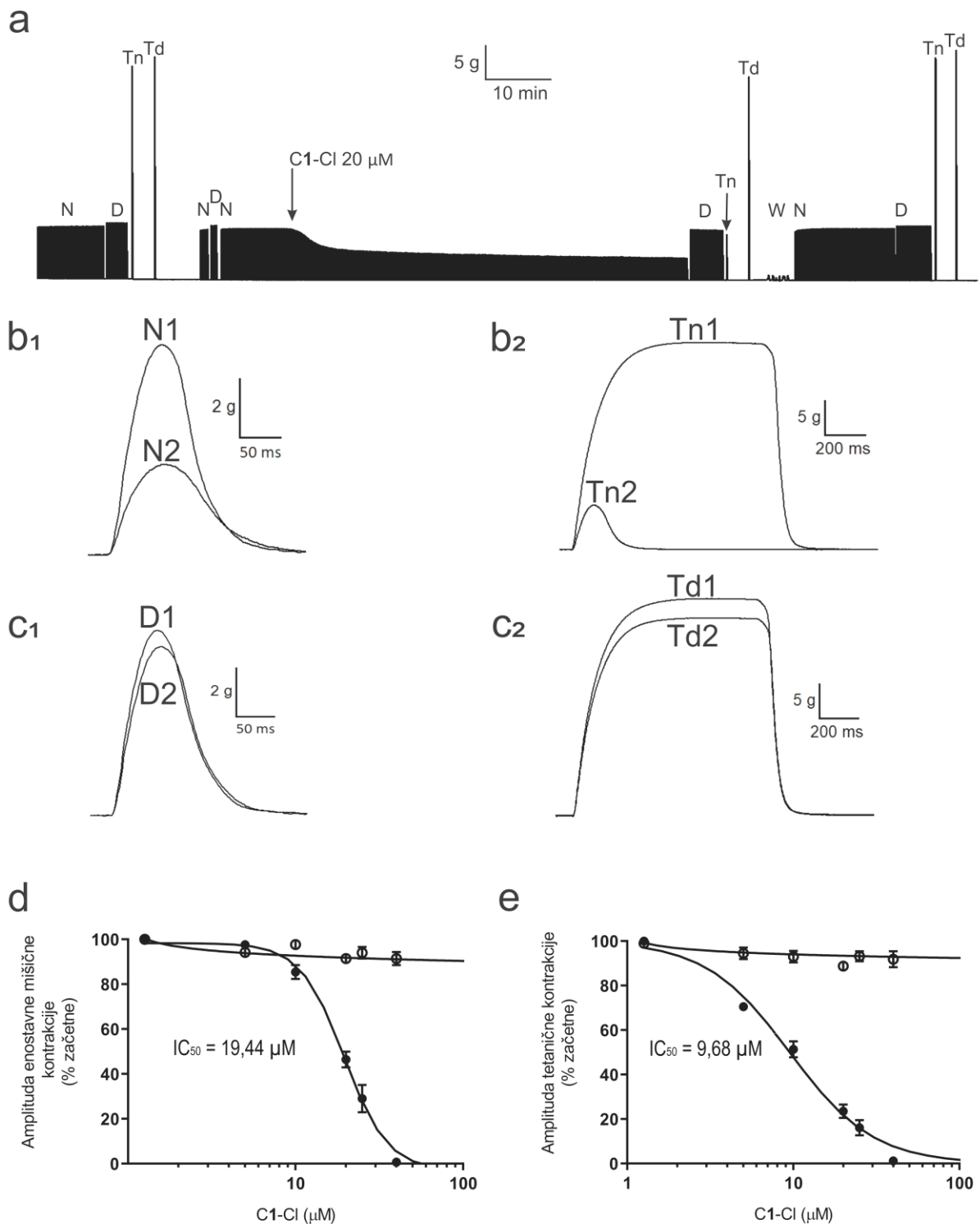
Vplive različnih koncentracij kompleksa C1-Cl (5–40 μM) na kontrakcijo skeletnih mišic smo proučevali z meritvami posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične kontrakcije na živčno-mišičnih preparatih hemidiafragem miši. Reprezentativne vplive kompleksa C1-Cl na posredno in neposredno izzvano enostavno in tetanično kontrakcijo in grafe, ki ponazarjajo razmerja med koncentracijo in učinkom, prikazuje slika 7.

Kompleks C1-Cl pri 20-μM koncentraciji zmanjša amplitudo posredno izzvane enostavne kontrakcije za približno 50 % ($IC_{50} = 19,44 \mu\text{M}$) (slike 7a, b₁ in d). Ta učinek je povraten, kajti 15 minut po zamenjavi medija v kopeli s K-R raztopino se amplituda posredno izzvane enostavne kontrakcije povrne na amplitudo pred aplikacijo kompleksa (slika 7a). V nasprotju z

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

vplivom na posredno izzvano kontrakcijo kompleks pri 20 μM in tudi pri najvišji uporabljeni koncentraciji (40 μM) ni vplival na amplitudo neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije (slike 7a, c₁, c₂, d in e). Kompleks C1-Cl zmanjša amplitudo posredno izzvane mišične kontrakcije v odvisnosti od koncentracije (sliki 7d in e). Iz krivulj, ki ponazarjajo odvisnost med koncentracijo in učinkom, so bile določene vrednosti IC₅₀ za posredno izzvano enostavno in tetanično kontrakcijo. IC₅₀ je pri prvi znašala 19,44 μM (slika 7d), pri drugi pa 9,68 μM (slika 7e). Kot negativno kontrolo smo uporabili topilo EtOH. Med 60-minutno izpostavljenostjo živčno-mišičnih preparatov 0,105-odstotnemu (v/v) EtOH smo opazili le (1–3-odstotno) zmanjšanje amplitude mišične kontrakcije (slika 8B). Prav tako se amplituda kontrakcije med 60-minutnimi kontrolnimi poskusi, pri katerih so bili živčno-mišični preparati izpostavljeni K-R raztopini, ni zmanjšala (slika 8A).



Slika 7: Učinki C1-Cl na amplitudo posredno in neposredno izzvano enostavne in tetanične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. (a) prikazuje časovni potek vpliva C1-Cl (20 µM, puščica) na prek živca izzvano krčljivost mišje hemidiafragme. Kompleks povzroči delni in reverzibilni blok posredno izzvano mišične kontrakcije, amplituda neposredno izzvano mišične kontrakcije pa ostane nespremenjena. N označuje posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo; D označuje neposredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo; Tn

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

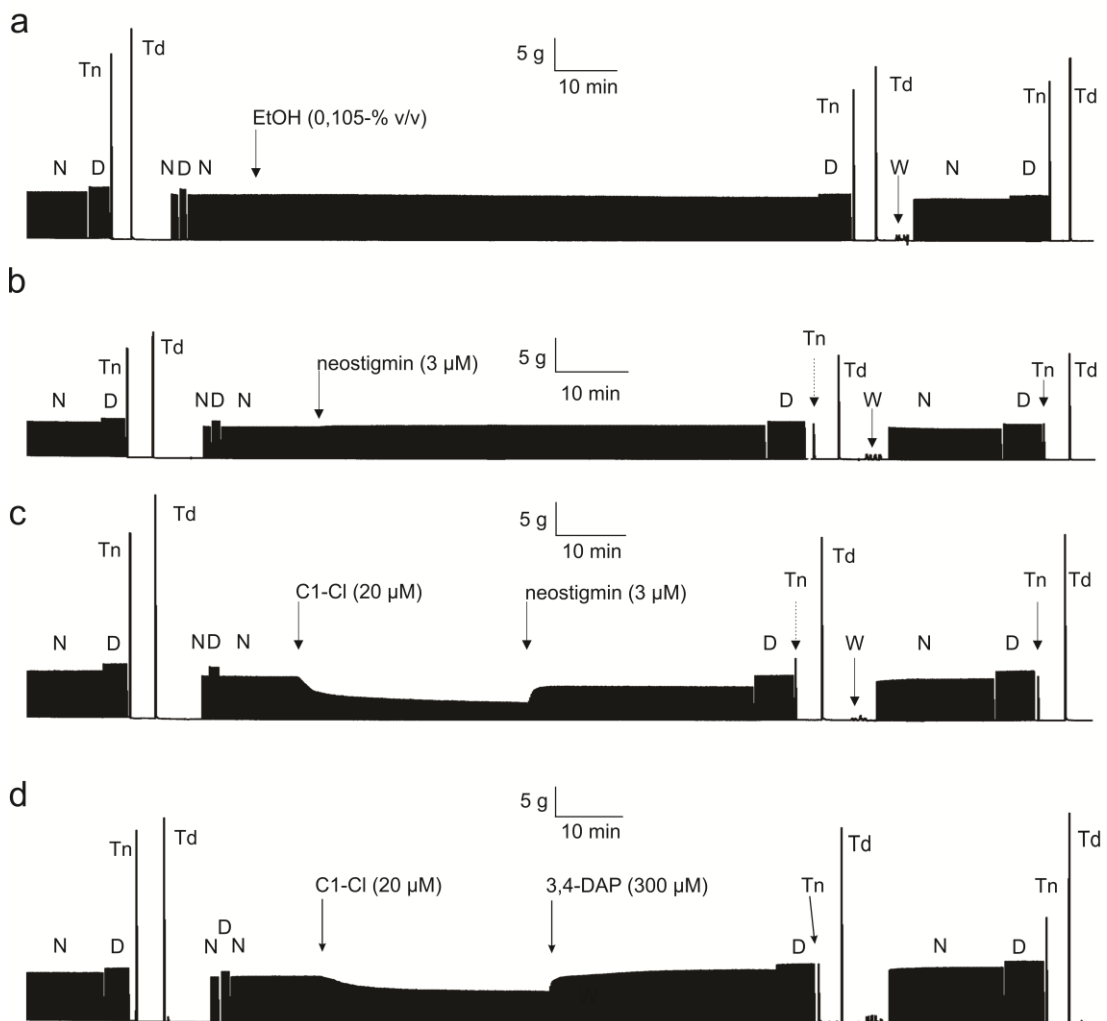
označuje posredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo; Td označuje neposredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo; W označuje zamenjavo medija v kopeli s K-R raztopino. (b1) prikazuje posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo pred aplikacijo 20 μM C1-Cl (N1) in 60 minut po njej (N2). (b2) prikazuje posredno izzvano tetanično kontrakcijo pred aplikacijo 20 μM C1-Cl (Tn1) in 60 minut po njej (Tn2). (c1) prikazuje neposredno izzvano enostavno kontrakcijo pred aplikacijo 20 μM C1-Cl (D1) in 60 minut po njej (D2). (c2) prikazuje neposredno izzvano tetanično kontrakcijo pred aplikacijo 20 μM C1-Cl (Td1) in 60 minut po njej (Td2). (d) krivulja prikazuje zaviranje posredno in neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije v odvisnosti od koncentracije C1-Cl. Amplitudo enostavne kontrakcije smo izrazili kot odstotek njene največje začetne vrednosti. Vsaka vrednost ponazarja povprečje \pm standardno napako (S. E.) amplitude kontrakcije, pridobljene iz od štirih do šestih hemidiafragm. Vrednosti IC_{50} in Hillovega koeficienta (n_H) za posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo sta bili določeni iz sigmoidnih nelinearnih regresij prek podatkovnih točk ($r^2 = 0,996$). Vrednost IC_{50} je znašala $19,44 \pm 1,05 \mu\text{M}$, vrednost n_H pa $3,3 \pm 0,5$. (e) prikazuje krivuljo inhibicije posredno in neposredno izzvane tetanične kontrakcije v odvisnosti od koncentracije C1-Cl. Amplituda tetanične kontrakcije je bila izražena kot odstotek njene največje začetne vrednosti. Vsaka vrednost ponazarja povprečje \pm S. E., pridobljeno iz od štirih do šestih poskusov. Vrednosti IC_{50} in n_H za posredno izzvano tetanično kontrakcijo sta bili določeni iz sigmoidnih nelinearnih regresij prek podatkovnih točk ($r^2 = 0,992$). Vrednost IC_{50} je znašala $9,68 \pm 1,14 \mu\text{M}$, vrednost n_H pa $1,6 \pm 0,3$.

Figure 7: Effects of C1-Cl on nerve-evoked and directly muscle-elicited single twitch and tetanic contraction of isolated mouse nerve-hemidiaphragm preparation. (a) Representative time-course of C1-Cl (20 μM , arrow) effects on muscle contraction showing the partial and reversible block of nerve-evoked and no change in contractile response of directly muscle-elicited twitch and tetanic contraction. N denotes nerve-evoked muscle single twitch; D denotes directly muscle-elicited single twitch; Tn denotes nerve-evoked muscle tetanic contraction; Td denotes directly muscle-elicited tetanic contraction; W denotes wash out. (b1) Traces of nerve-evoked twitch recorded before (N1) and 60 min after (N2) the application of 20 μM C1-Cl. (b2) Traces of tetanic contraction recorded before (Tn1) and 60 min after (Tn2) the application of 20 μM C1-Cl. (c1) Representative recordings of twitch elicited by direct muscle stimulation, before (D1) and 60 min after (D2) the application of 20 μM C1-Cl. (c2) Representative recordings of tetanic contraction elicited by direct muscle stimulation, before (Td1) and 60 min after (Td2) the application of 20 μM C1-Cl. (d) Concentration-response curves for the inhibition of directly muscle-elicited and nerve-evoked twitch by C1-Cl. Muscle twitch was expressed as a percentage of its maximal initial value. Each value represents the mean \pm S. E. obtained from four-six different muscles. The IC_{50} and n_H values, determined from typical sigmoid nonlinear regressions through data points ($r^2 = 0.996$), were $19.44 \pm 1.05 \mu\text{M}$ and 3.3 ± 0.5 , respectively, for nerve-evoked single twitches. (e) Concentration-response curves for the inhibition of directly muscle-elicited and nerve-evoked tetanic contraction by C1-Cl. The tetanic contraction was expressed as the percentage of its maximal initial value. Each value represents the mean \pm S. E. obtained from four–six different muscles. The IC_{50} and n_H values, determined from typical sigmoid nonlinear regressions through data points ($r^2 = 0.992$), were $9.68 \pm 1.14 \mu\text{M}$ and 1.6 ± 0.3 , respectively, for nerve-evoked tetanic contractions.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Po padcu amplitude posredno izzvané enostavne mišične kontrakcije v 30 minutah po izpostavitvi mišje hemidiafragme 20 μM C1-Cl za približno 50 % je sledila aplikacija 3 μM neostigmina, za katerega je znano, da 96-odstotno zavre delovanje AChE v živčno-mišičnem stiku mišje diafragme (Minic, Chatonnet in sod., 2003). Po aplikaciji neostigmina se je amplituda posredno izzvané enostavne kontrakcije hitro povrnila v bližino začetne ravni ($82,5 \pm 7,6 \%$) (slika 8C). Poleg tega smo po nastanku bloka posredno izzvané enostavne mišične kontrakcije, dobljenega v 30 minutah po izpostavljenosti mišje hemidiafragme 20 μM C1-Cl, aplicirali 300 μM 3,4-DAP, ki je zaviralec napetostno odvisnih kalijevih kanalov v živčnih končičih (Molgo, Lundh in sod., 1980). Po aplikaciji 3,4-DAP se je znatno povečala amplituda posredno izzvané enostavne kontrakcije na približno $114 \pm 1 \%$ njene začetne vrednosti (slika 8D).



T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Slika 8: Kinetika učinkov C1-Cl na enostavno in tetanično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši. (a) prikazuje zapis »negativne« kontrole – 0,105-odstotni (v/v) EtOH (puščica) (n = 4). (b) prikazuje zapis učinka neostigmina (3 μ M, puščica) (n = 4). (c) prikazuje zapis povratnega učinka neostigmina (3 μ M, puščica) na blokado posredno izzvane enostavne kontrakcije, ki jo povzroči 20 μ M C1-Cl (puščica) (n = 4). (d) prikazuje zapis povratnega učinka 3,4-diaminopiridina (300 μ M, puščica) na blokado posredno izzvane enostavne kontrakcije, ki jo povzroči 20 μ M C1-Cl (puščica) (n = 4). N označuje posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo; D označuje neposredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo; Tn označuje posredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo; Td označuje neposredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo; W označuje zamenjavo medija v kopeli s K-R raztopino.

Figure 8: Kinetics of C1-Cl effects on single twitch and tetanic contraction of isolated mouse nerve-hemidiaphragm preparation. (a) Representative »negative« control tracing using 0.105 % (v/v) EtOH (arrow) (n = 4). (b) Representative neostigmine tracing (3 μ M, arrow) (n = 4). (c) Reversal effects of neostigmine (3 μ M, arrow) on the blockade of nerve-evoked single twitches produced by C1-Cl (20 μ M, arrow) (n = 4). (d) Reversal effects of 3,4-diaminopyridine (300 μ M, arrow) on the blockade of nerve-evoked single twitches produced by C1-Cl (20 μ M, arrow) (n = 4). N denotes nerve-evoked muscle single twitch; D muscle-elicited single twitch; Tn denotes nerve-evoked muscle tetanic contraction; Td denotes directly muscle-elicited tetanic contraction; W denotes wash out.

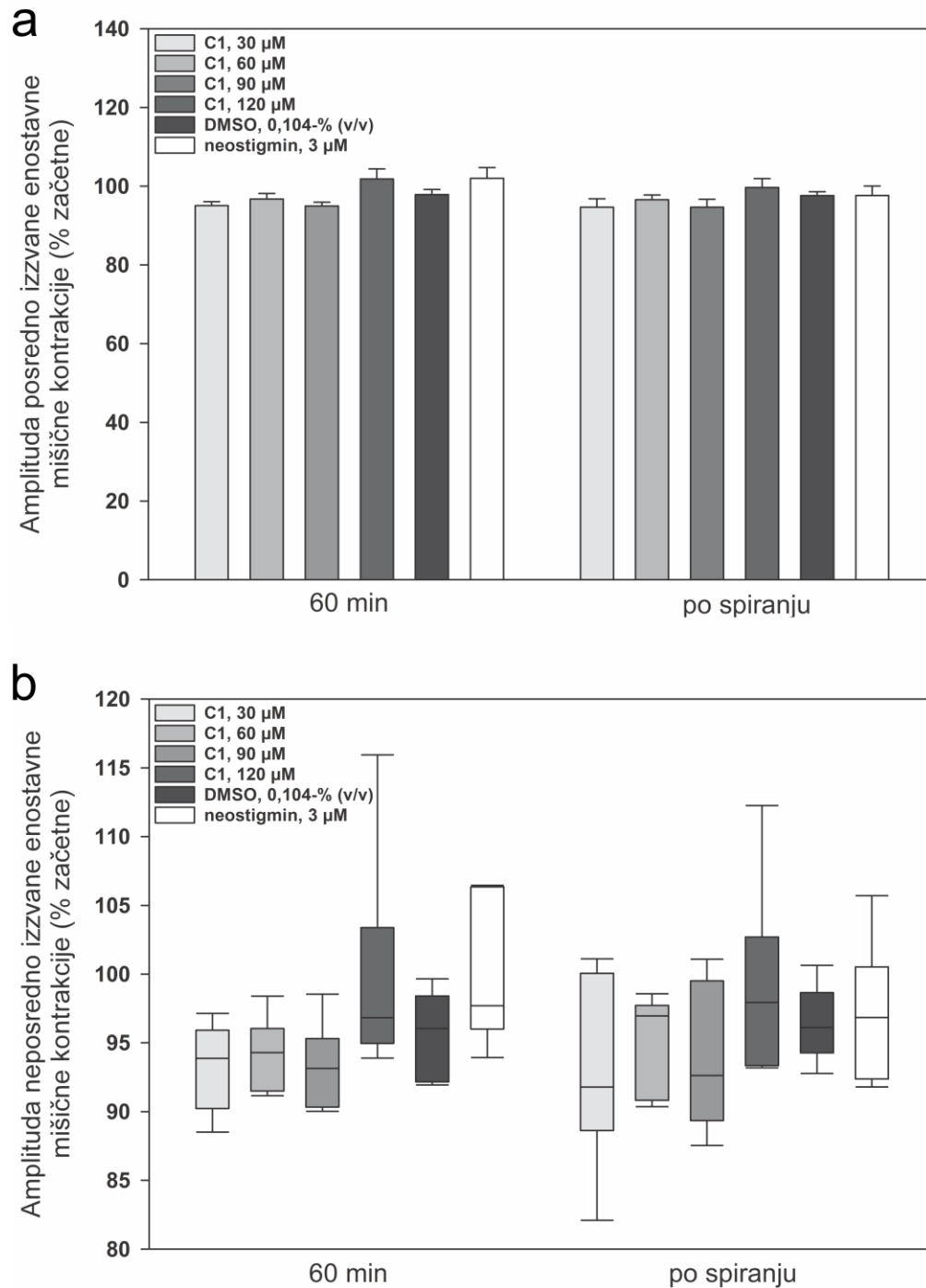
4.3.1.2 Vpliv C1 na kontrakcijo skeletnih mišic *in vitro*

Biokemična *in vitro* karakterizacija kompleksa C1 je pokazala, da je 3- μ M koncentracija C1 približno vrednost IC_{50} za hsBChE. Pri proučevanju morebitnih učinkov C1 na živčno-mišični prenos smo uporabili visoke, 30-, 60-, 90- in 120- μ M koncentracije kompleksa, ki ustrezajo 10-, 20-, 30- in 40-kratni vrednosti IC_{50} za hsBChE. Vplive različnih koncentracij kompleksa C1 na kontrakcijo skeletnih mišic (30–120 μ M) smo kot pri kompleksu C1-Cl proučevali z meritvami posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične kontrakcije na živčno-mišičnih preparatih hemidiafragem miši. Kot negativno kontrolo smo uporabili topilo (DMSO). Med 60-minutno izpostavljenostjo živčno-mišičnih preparatov 0,104-odstotnemu (v/v) DMSO nismo ugotovili značilnega vpliva na amplitudo kontrakcije. Vse preizkušene koncentracije C1 niso imele značilnega vpliva na amplitudo posredno in neposredno izzvanih enostavnih in tetaničnih kontrakcije (sliki 9 in 10). Pri najvišji testirani koncentraciji kompleksa C1 (120 μ M) smo opazili le neznačilno povečanje amplitude posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije (slika 9a) in neznačilno zmanjšanje amplitude posredno izzvane tetanične kontrakcije (slika 10a). Za primerjavo vpliva kompleksa C1 z znanim reverzibilnim zaviralcem holinesteraz smo uporabili 3 μ M neostigmina (pozitivna kontrola), ki povzroči 96-odstotno

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

zavrtje AChE v živčno-mišičnem stiku mišje diafragme. Neostigmin je pri posredni visoko frekvenčni stimulaciji živca preprečil nastanek tetanične kontrakcije, saj zavrtje holinesteraz (zlasti AChE) v živčno-mišičnem stiku povzroči depolarizacijski posinaptični blok. V primerjavi z neostigminom pri kompleksu C1 nismo zaznali značilnih vplivov na živčno-mišični prenos (sliki 9 in 10).

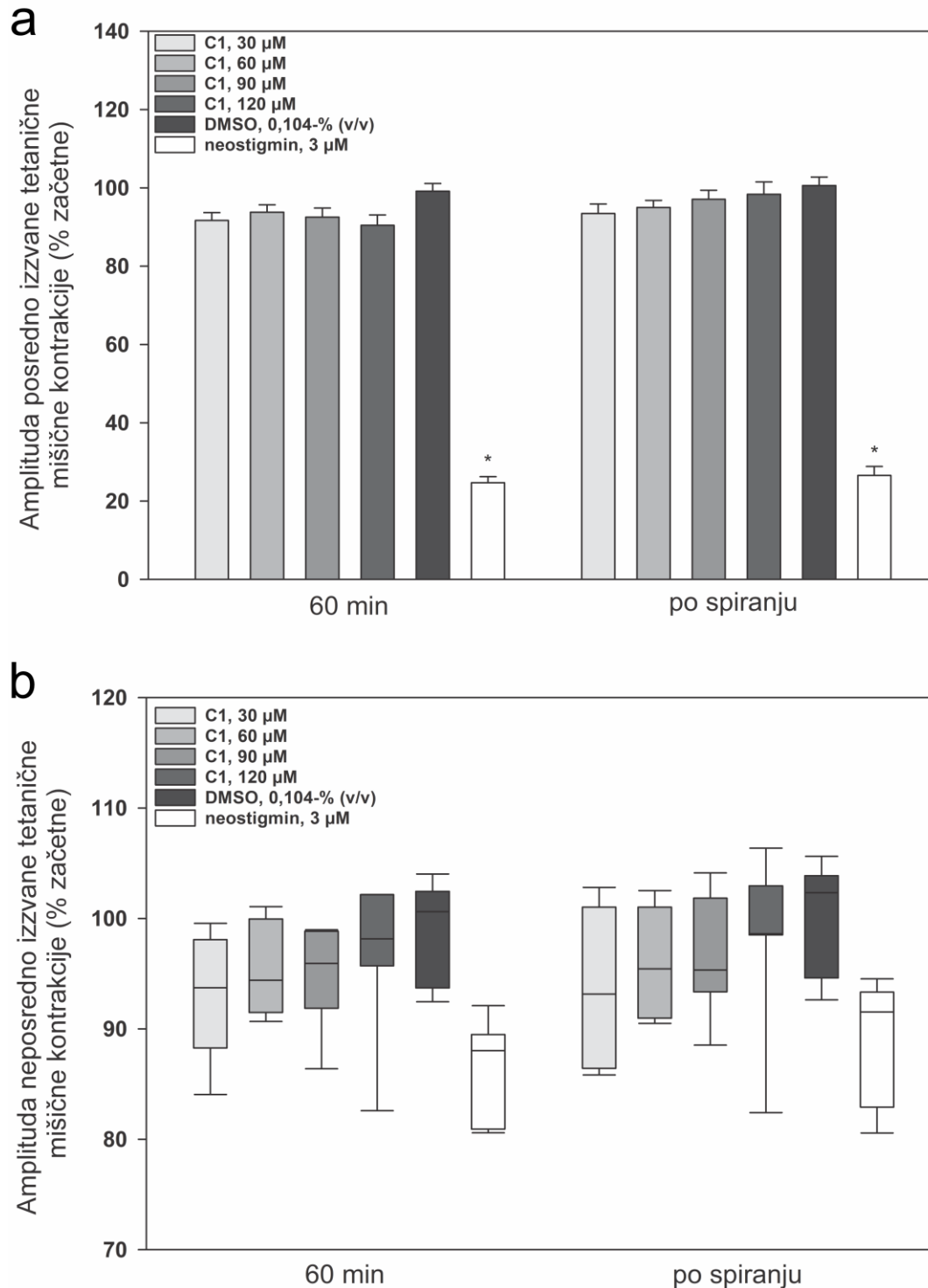


T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Slika 9: Učinek C1 na amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne kontrakcije izoliranih hemidifragem miši. Prikazan je vpliv različnih koncentracij kompleksa C1 (30, 60, 90 in 120 μM), 0,104-odstotnega (v/v) DMSO in 3 μM neostigmina (pozitivna kontrola) na neposredno in posredno izzvano enostavno kontrakcijo izoliranih hemidifragem miši 60 minut po aplikaciji C1 in zamenjavi medija v kopeli s K-R raztopino. Pri posredno izzvani mišični kontrakciji (a) vrednosti ponazarjajo srednjo vrednost deleža amplitude mišične kontrakcije \pm S. E. 6–7 različnih izoliranih hemidiafragem miši. Vrednosti pri neposredno izzvani mišični kontrakciji (b) so prikazane kot grafikoni kvartilov, označujejo mediano, izračunano z analizo meritev, pridobljenih iz 6–7 različnih hemidiafragem. Njihovi interkvartilni razmiki skupaj z ročaji in osamelci pa prikazujejo celoten obseg podatkov. * označuje značilno razliko v primerjavi z 0,104-odstotnim (v/v) DMSO ($p \leq 0,05$).

Figure 9: Effects of C1 on nerve-evoked and directly muscle-elicited single twitch of isolated mouse nerve-hemidiaphragm preparation. The effects of increasing concentrations of C1 (30, 60, 90, and 120 μM), 0.104 % (v/v) DMSO and 3 μM neostigmine (positive control) on nerve-evoked and directly muscle-elicited single twitch of isolated mouse nerve-hemidiaphragm preparation after 60 min of exposure and after wash-out. (a) values of nerve-evoked single twitch are expressed as mean \pm S. E. from 6–7 different hemidiaphragms. (b) Box plots indicate the median values of the directly muscle-elicited single twitch obtained from 6–7 different hemidiaphragms, as well as its IQR, with whiskers showing the entire range of data, and all outliers. * $p \leq 0.05$ versus control (0.104 % (v/v) DMSO)



Slika 10: Učinek C1 na amplitudo posredno in neposredno izzvano tetanične kontrakcije izoliranih hemidifragem miši. Prikazan je učinek različnih koncentracij kompleksa C1 (30, 60, 90 in 120 μM), 0,104-odstotnega (v/v) DMSO in 3 μM neostigmina (pozitivna kontrola) na neposredno in posredno izzvano tetanično kontrakcijo izoliranih hemidifragem miši 60 minut po aplikaciji in zamenjavi medija v kopeli s K-R

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

raztopino. Pri posredno izzvani tetanični kontrakciji (a) vrednosti ponazarjajo srednjo vrednost deleža amplitude mišične kontrakcije \pm S. E. 6–7 različnih izoliranih hemidiafragem miši. Vrednosti pri neposredno izzvani tetanični mišični kontrakciji (b) so prikazane kot grafikoni kvartilov, označujejo mediano, izračunano z analizo meritev, pridobljenih iz 6–7 različnih hemidiafragem. Njihovi interkvartilni razmiki skupaj z ročaji in osamelci pa prikazujejo celoten obseg podatkov. * označuje značilno razliko v primerjavi z 0,104-odstotnim (v/v) DMSO ($p \leq 0,05$).

Figure 10: Effects of C1 on nerve-evoked and directly muscle-elicited tetanic contraction of isolated mouse nerve-hemidiaphragm preparation. The effects of increasing concentrations of C1 (30, 60, 90 μ M, and 120 μ M), 0.104 % (v/v) DMSO and 3 μ M neostigmine (positive control) on nerve-evoked and directly muscle-elicited tetanic contraction of isolated mouse nerve-hemidiaphragm preparation after 60 min of exposure and after wash-out. (a) values of nerve-evoked tetanic contraction are expressed as mean \pm S. E. from 6–7 different hemidiaphragms. (b) Box plots indicate the median values of the directly muscle-elicited tetanic contraction obtained from 6–7 different hemidiaphragms, as well as its IQR, with whiskers showing the entire range of data, and all outliers. * $p \leq 0.05$ versus control (0.104 % (v/v) DMSO)

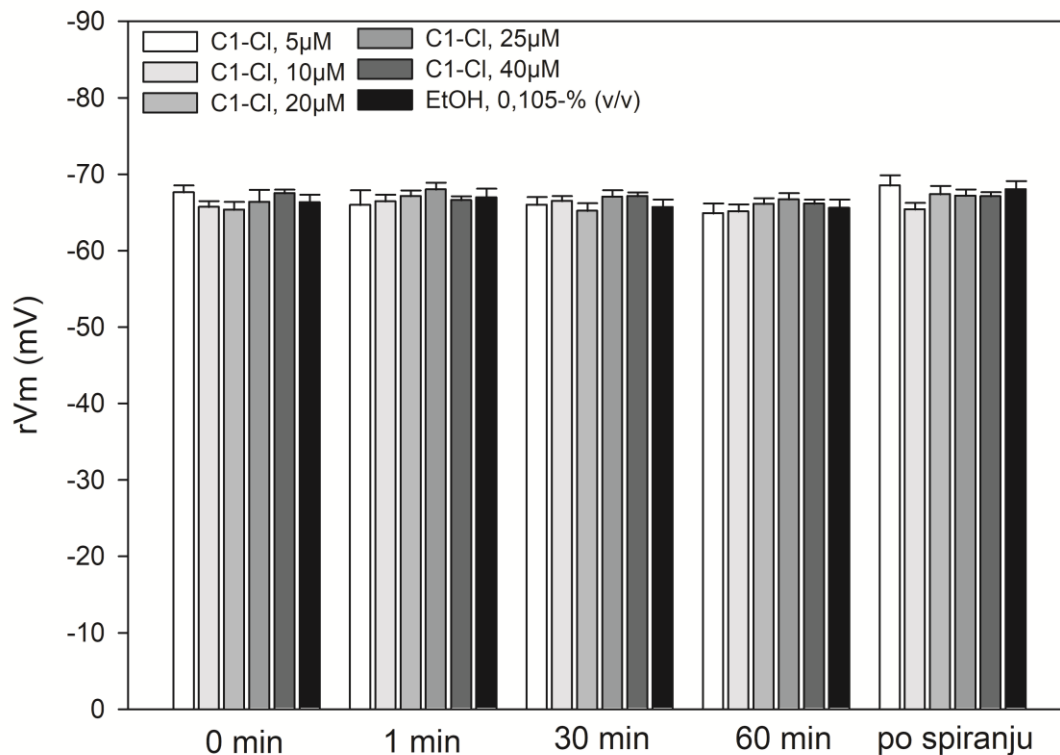
4.4 Meritve membranskih potencialov skeletnih mišičnih vlaken

4.4.1 Vpliv C1-Cl na membranske potenciale skeletnih mišičnih vlaken

Meritve rVm, PMP in MPMP so nam omogočile nadaljnje proučevanje mehanizma blokade posredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije, povzročene s kompleksom C1-Cl.

4.4.1.1 C1-Cl ne vpliva na mirovni membranski potencial skeletnih mišičnih vlaken

Kompleks C1-Cl pri uporabljenih koncentracijah (5–40 μ M), ki je delno ali popolno blokiral posredno izzvano enostavno in posredno izzvano tetanično kontrakcijo mišjih hemidiafragem (slika 7), v področju motorične ploščice površinskih skeletnih mišičnih vlaken ni vplival na rVm po 1-, 30- in 60-minutni izpostavljenosti kompleksu (slika 11). Povprečna vrednost rVm pri kontrolnih pogojih je bila $-67,5 \pm 0,5$ mV (tj. v času nič, tik pred aplikacijo C1-Cl), $-67,1 \pm 0,5$ mV po 30-minutni izpostavljenosti in $-66,1 \pm 0,6$ mV po 60-minutni izpostavljenosti najvišji uporabljeni koncentraciji C1-Cl (40 μ M).



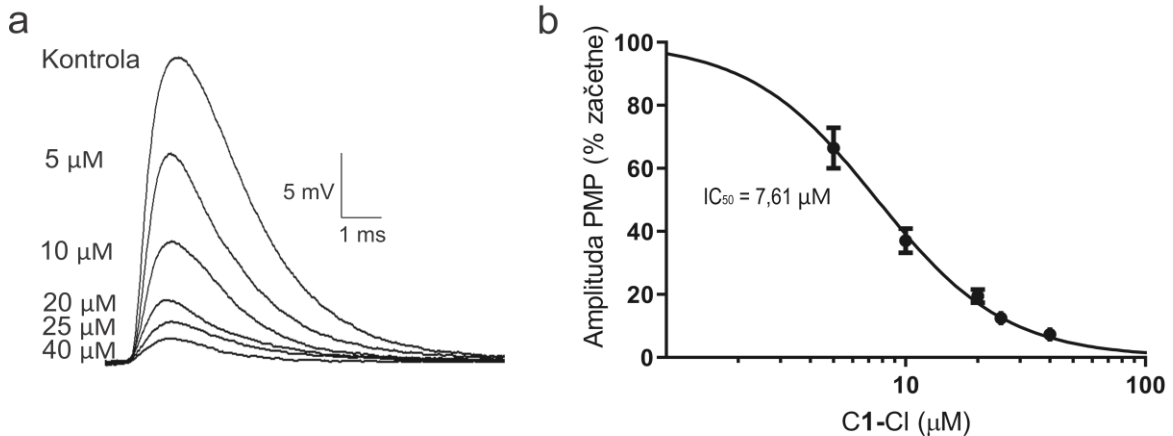
Slika 11: Koncentracijsko in časovno odvisen učinek C1-Cl na mirovni membranski potencial (rVm) površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Živčno-mišični preparati so bili izpostavljeni 0,105-odstotni (v/v) koncentraciji EtOH in 5–40- μ M koncentracijam C1-Cl. Meritve so bile izvedene pred aplikacijo (čas 0), 1 minuto, 30 in 60 minut po aplikaciji različnih koncentracij kompleksa C1-Cl in 15 minut po zamenjavi medija v kopeli s standardno K-R raztopino. Rezultati so predstavljeni kot srednje vrednosti \pm S. E. 4–8 različnih hemidiafragem ($n = 7–10$ vlaken vsake hemidiafragme).

Figure 11: Concentration- and time-dependent effect of C1-Cl on the resting membrane potential (rVm) of isolated mouse hemidiaphragm fibres. The neuromuscular preparations were exposed to 0.105 % (v/v) concentration of EtOH and 5–40 μ M concentrations of C1-Cl. Measurements were performed before (time 0), 1, 30 and 60 min after C1-Cl application, and after washing the preparation with a C1-Cl-free standard Krebs-Ringer physiological solution for about 15 min. Mean values \pm S. E. recorded from 4–8 different hemidiaphragms ($n = 7–10$ fibres from each).

4.4.1.2 C1-Cl zmanjša amplitudo PMP in MPMP

Elektrofiziološki zapisi PMP mišjih hemidiafragem, ki so bile 60 minut izpostavljene različnim koncentracijam kompleksa C1-Cl (5–40 μ M), so pokazali, da kompleks povzroči koncentracijsko odvisno zmanjšanje amplitude PMP (slika 12a). Vrednost IC_{50} za amplitudo PMP je znašala 7,61 μ M (slika 12b). Pomembno je poudariti, da med različnimi proučevanji

koncentracijami C1-Cl nismo opazili značilne spremembe v razpolovnem času PMP (ni prikazano).

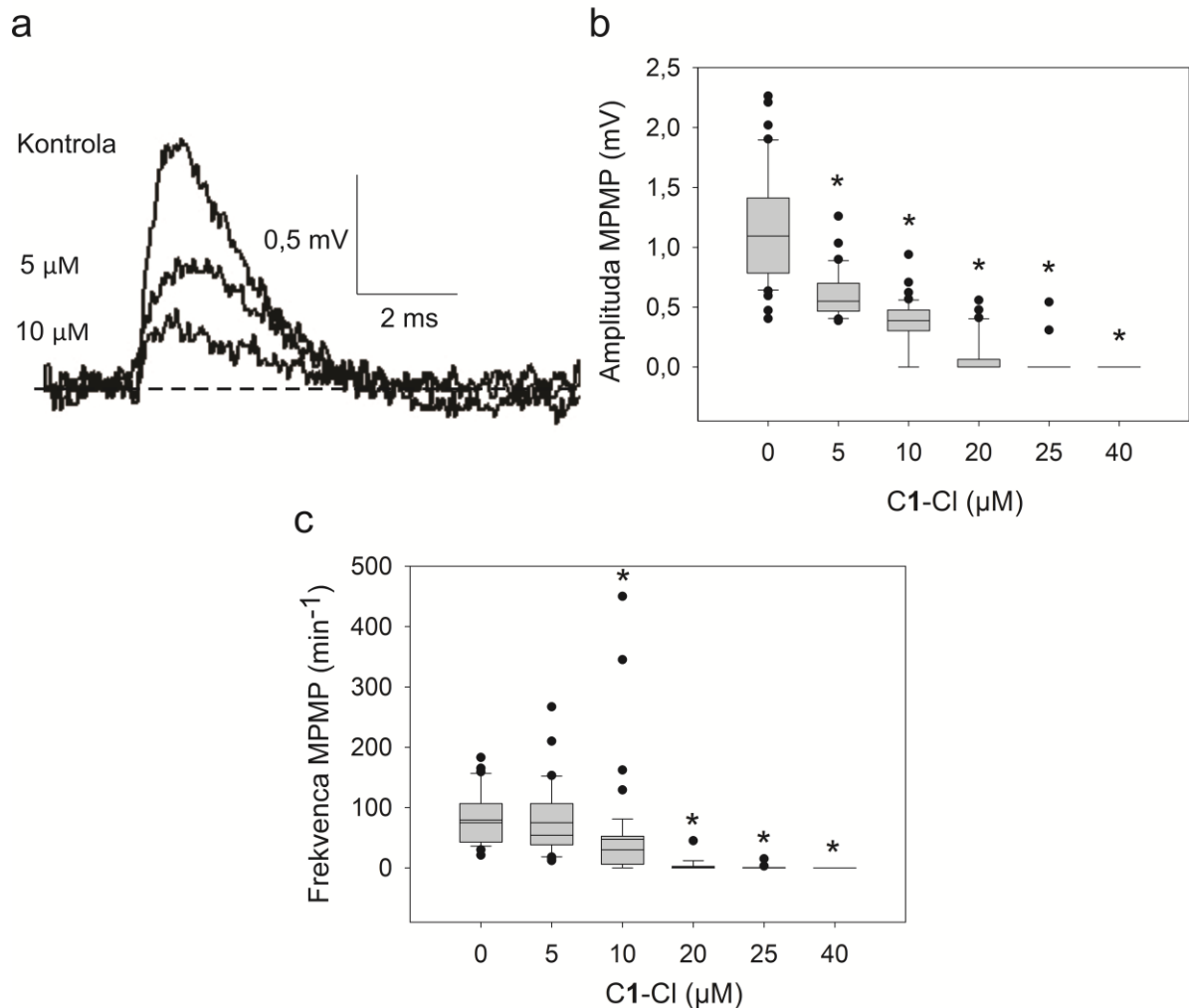


Slika 12: Učinek C1-Cl na amplitudo PMP površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Padec amplitude PMP, ki ga povzroči C1-Cl, je odvisen od njegove koncentracije. (a) prikazuje reprezentativne zapise PMP, posnete po 60 minutah v kontrolnih pogojih (0,105-odstotni (v/v) EtOH) in 60 minut po izpostavljenosti hemidiafragem različnim koncentracijam C1-Cl (5–40 μM). (b) prikazuje krivuljo zaviranja amplitude PMP v odvisnosti od koncentracije C1-Cl, ki je izražena kot odstotek njene največje začetne vrednosti. Vsaka vrednost ponazarja srednjo vrednost amplitud PMP ± S. E. 4–8 različnih hemidiafragem (n = 7–10 mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). Vrednosti IC₅₀ in n_H za amplitudo PMP sta bili določeni iz sigmoidnih nelinearnih regresij prek podatkovnih točk (r² = 0,999). Vrednost IC₅₀ je znašala 7,61 ± 1,04 μM, vrednost n_H pa 1,6 ± 0,1.

Figure 12: Effects of C1-Cl on EPP amplitude in mouse hemidiaphragm skeletal muscle fibres. C1-Cl blocked EPPs in a concentration-dependent manner. (a) Representative EPP traces recorded under control conditions (0.105 % (v/v) EtOH) and 60 min after exposure of muscle to various concentrations of C1-Cl (5–40 μM). (b) Concentration-response curve for the inhibition of EPP amplitude by C1-Cl, expressed as a percentage of its maximal initial value. Each value represents the mean values of EPP amplitude values ± S. E. recorded from 4–8 different hemidiaphragms (n = 7–10 muscle fibres from each). The IC₅₀ and n_H values, determined from typical sigmoid nonlinear regressions through data points (r² = 0.997), were 7.61 ± 1.04 μM and 1.6 ± 0.1, respectively.

Vplivi kompleksa C1-Cl na frekvenco in amplitudo MPMP so prikazani na sliki 13. Kompleks (5–40 μM) v odvisnosti od koncentracije značilno zmanjša amplitudo MPMP površinskih mišičnih vlaken mišje hemidiafragme (sliki 13a in b), brez vpliva na frekvenco pri nižjih koncentracijah C1-Cl (slika 13c). Poleg tega je najvišja uporabljena koncentracija C1-Cl (40 μM) popolnoma blokirala MPMP (slika 13b). Med proučevanimi koncentracijami nismo ugotovili značilnih sprememb v razpolovnem času MPMP (ni prikazano). Rezultati so pokazali,

da je amplituda MPMP pri 5- μM koncentraciji kompleksa C1-Cl zmanjšana za približno 45 %, vendar frekvenca MPMP ni bistveno spremenjena pri tem.



Slika 13: Vpliv kompleksa C1-Cl na amplitudo in frekvenco MPMP površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. (a) prikazuje reprezentativne zapise MPMP, posnete po 60-minutni izpostavljenosti hemidiafragem kontrolnim pogojem (0,105-odstotni (v/v) EtOH) in različnim koncentracijam kompleksa C1-Cl (5 in 10 μM). (b) prikazuje amplitudo MPMP po 60-minutni izpostavljenosti hemidiafragem kontrolnim pogojem (0,105-odstotni (v/v) EtOH) in različnim koncentracijam kompleksa C1-Cl. Pri najvišji koncentraciji je kompleks C1-Cl popolnoma zavrl MPMP. (c) prikazuje frekvenco MPMP po 60-minutni izpostavljenosti hemidiafragem kontrolnim pogojem (0,105-odstotni (v/v) EtOH) in različnim koncentracijam kompleksa C1-Cl. Grafikoni kvartilov označujejo srednje vrednosti podatkov (mediane), pridobljene iz 4–8 različnih hemidiafragem ($n = 7\text{--}10$ vlaken vsake hemidiafragme). Njihovi interkvartilni razmiki skupaj z ročaji in osamelci pa prikazujejo celoten obseg podatkov. * označuje značilno razliko ($p \leq 0,05$) v primerjavi s kontrolo.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

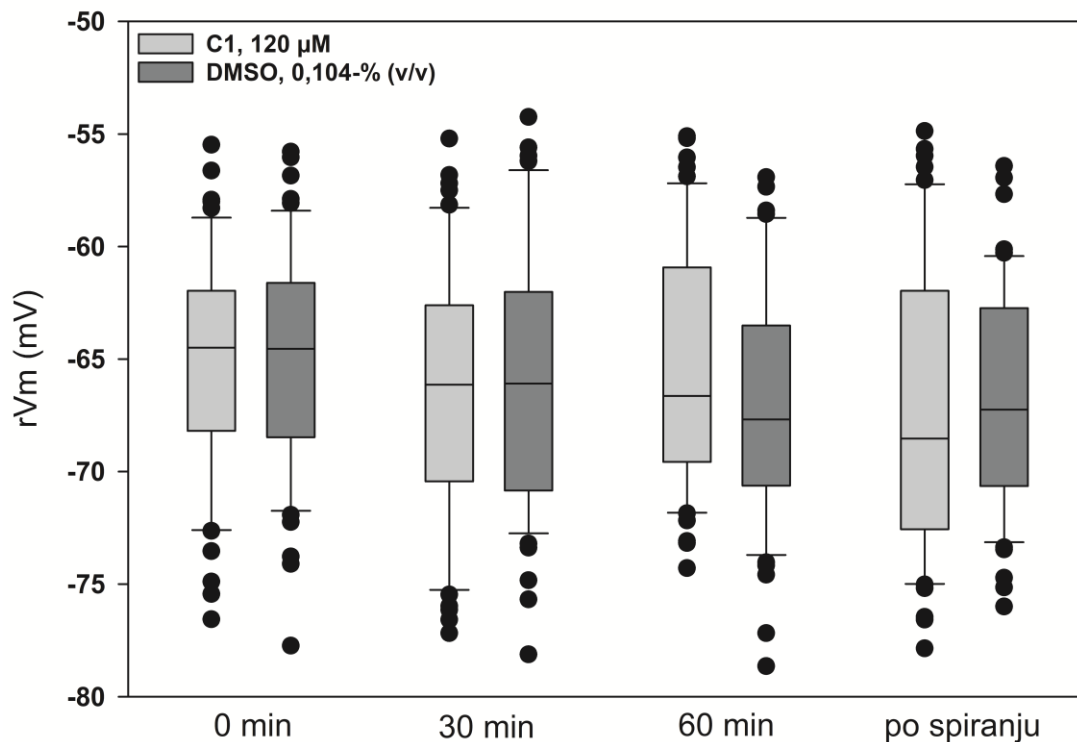
Figure 13: Effects of C1-Cl on the MEPP amplitude and frequency in the muscle fibres of isolated mouse hemidiaphragm. (a) MEPP traces recorded under control conditions (0.105 % (v/v) EtOH) and after the indicated concentrations of C1-Cl applied for 60 min. (b) MEPP amplitude recorded from mouse hemidiaphragms exposed for 60 min to control conditions (0.105 % (v/v) EtOH) and different C1-Cl concentrations. At 40 μ M, C1-Cl completely blocked MEPPs. (c) MEPP frequency in the same preparations exposed for 60 min to control conditions (0.105 % (v/v) EtOH) and different C1-Cl concentrations. Box plots indicate the median values of the data obtained from 4–8 different hemidiaphragms ($n = 7–10$ fibres from each), as well as its IQR, with whiskers showing the entire range of data, and all outliers. $*p \leq 0.05$ versus control.

4.4.2 Vpliv C1 na membranske potenciale skeletnih mišičnih vlaken

Za zanesljivejšo izključitev vpliva najvišje uporabljene koncentracije C1 (120 μ M) na živčno-mišični prenos v mišjih hemidiafragmah smo dodatno izvedli še meritve rVm, PMP in MPMP.

4.4.2.1 C1 ne učinkuje na rVm skeletnih mišičnih vlaken

Kompleks C1 pri 120- μ M koncentraciji ni spremenil rVm površinskih skeletnih mišičnih vlaken v področju motorične ploščice po 30 in 60 minutah (slika 14). Povprečna vrednost rVm pri kontrolnih pogojih je bila $-64,49$ (IQR: $68,19–61,96$) mV (tj. v času nič, tik pred aplikacijo C1-Cl), $-66,13$ (IQR: $70,44–62,60$) po 30-minutni izpostavljenosti in $-66,63$ (IQR: $69,57–60,92$) po 60-minutni izpostavljenosti najvišji uporabljeni koncentraciji kompleksa C1.

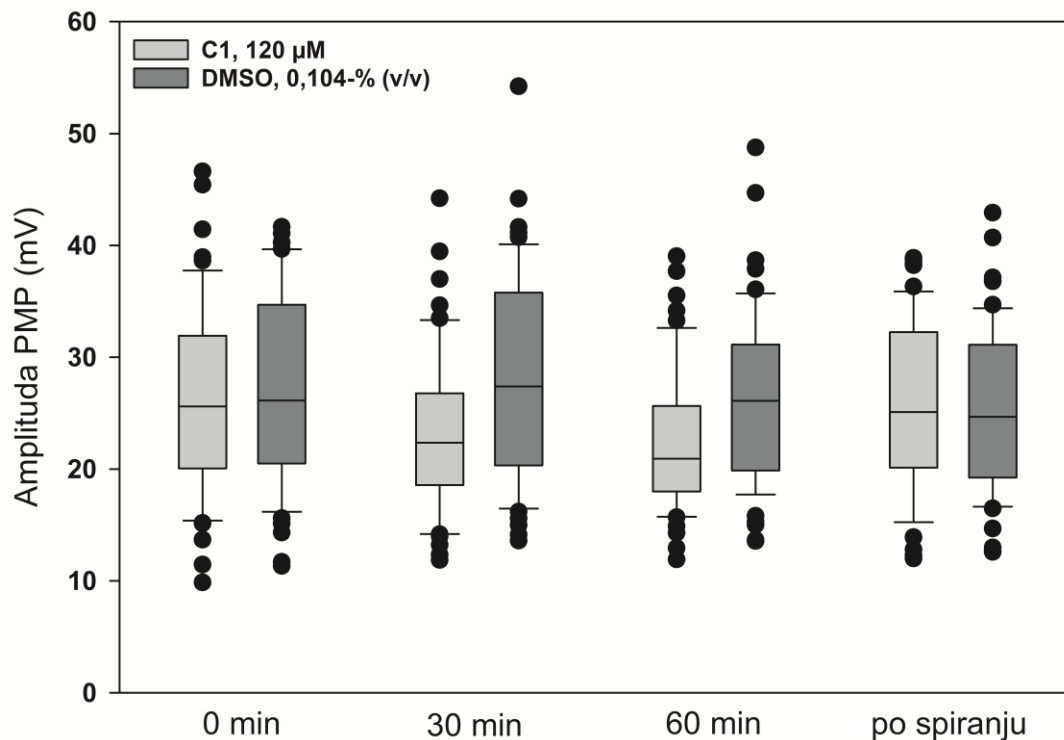


Slika 14: Časovno odvisen učinek 120- μ M kompleksa C1 na mirovni membranski potencial (rVm) površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Živčno-mišični preparati so bili izpostavljeni 0,104-odstotni (v/v) koncentraciji DMSO in najvišji koncentraciji kompleksa C1. Meritve so bile izvedene pred aplikacijo (čas 0), 30 in 60 minut po aplikaciji najvišje koncentracije kompleksa C1 ali 0,104-odstotni (v/v) koncentraciji DMSO in 15 minut po zamenjavi medija v kopeli s standardno K-R raztopino. Grafikoni kvartilov označujejo mediano, izračunano z analizo meritev, pridobljenih iz štirih različnih hemidiafragem ($n = 7-10$ vlaken vsake hemidiafragme). Njihovi interkvartilni razmiki skupaj z ročaji in osamelci pa prikazujejo celoten obseg podatkov.

Figure 14: Time-dependent effect of 120 μ M C1 on the resting membrane potential (rVm) of mouse hemidiaphragm fibres. The neuromuscular preparations were exposed to 0.104 % (v/v) DMSO concentration and highest C1 concentration. Measurements were performed before (time 0), 30 and 60 min after application of highest C1 concentration or 0.104 % (v/v) DMSO concentration, and after washing the preparation with standard Krebs-Ringer physiological solution for about 15 min. Box plots indicate the median values of the data obtained from 4 different hemidiaphragms ($n = 7-10$ fibres from each), as well as its IQR, with whiskers showing the entire range of data, and all outliers.

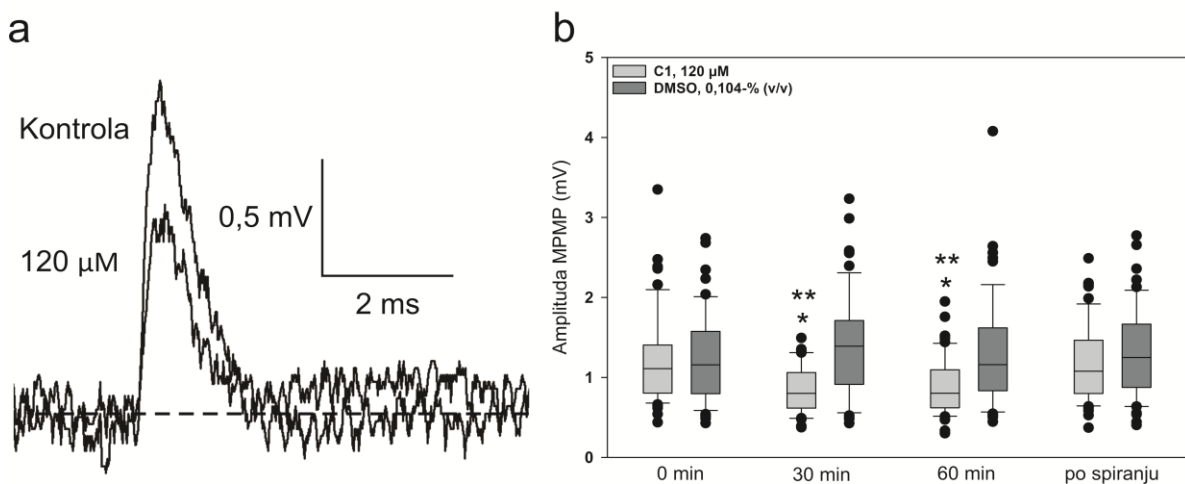
4.4.2.2 C1 zmanjša amplitudo MPMP, vendar ne vpliva na amplitudo PMP

Elektrofiziološki zapisi PMP in MPMP površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragme miši, izpostavljenih 120- μ M koncentraciji kompleksa C1 60 minut, so pokazali, da C1 značilno zmanjša amplitudo MPMP po 30 in 60 minutah (sliki 16 a in b), vendar ne vpliva značilno na amplitudo PMP v 60 minutah po aplikaciji (slika 15). Poleg tega smo ugotovili značilno zmanjšanje razpolovnega časa PMP in MPMP pri 120- μ M koncentraciji kompleksa C1 pri 60 minutni izpostavljenosti (ni prikazano).



Slika 15: Časovno odvisen učinek 120- μ M koncentracije kompleksa C1 na amplitudo potenciala motorične ploščice (PMP) površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Živčno-mišični preparati so bili izpostavljeni 0,104-odstotni (v/v) koncentraciji DMSO in najvišji koncentraciji kompleksa C1. Meritve so bile izvedene pred aplikacijo (čas 0), 30 in 60 minut po aplikaciji najvišje koncentracije kompleksa C1 ali 0,104-odstotne (v/v) koncentracije DMSO in 15 minut po zamenjavi medija v kopeli s standardno K-R raztopino. Grafikoni kvartilov označujejo mediano, izračunano iz meritev, dobljenih z analizo iz štirih različnih hemidiafragem ($n = 7-10$ vlaken vsake hemidiafragme). Njihovi interkvartilni razmiki skupaj z ročaji in osamelci pa prikazujejo celoten obseg podatkov.

Figure 15: Time-dependent effect of 120 μM C1 on the amplitude of end-plate potential of isolated mouse hemidiaphragm fibres. The neuromuscular preparations were exposed to 0.104 % (v/v) DMSO concentration and the highest C1 concentration. Measurements were performed before (time 0), 30 and 60 min after application of the highest C1 concentration or 0.104 % (v/v) DMSO concentration, and after washing the preparation with standard Krebs-Ringer physiological solution for about 15 min. Box plots show the median values of the data obtained from 4 different hemidiaphragms ($n = 7-10$ fibres from each), as well as its IQR, with whiskers showing the entire range of data, and all outliers.



Slika 16: Vpliv kompleksa C1 na amplitudo MPMP površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragam miši.

(a) prikazuje reprezentativna zapisa MPMP, posneta po 60-minutni izpostavljenosti hemidiafragam kontrolnim pogojem (0,104-odstotni (v/v) DMSO) in najvišji koncentraciji kompleksa C1. (b) prikazuje časovno odvisen učinek 0,104-odstotnega (v/v) DMSO in 120- μM koncentracije kompleksa C1 na amplitudo MPMP površinskih skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragam miši. Meritve so bile izvedene pred aplikacijo (čas 0), 30 in 60 minut po aplikaciji 0,104-odstotnega (v/v) DMSO ali najvišje koncentracije kompleksa C1 in po zamenjavi medija v kopeli s standardno K-R raztopino. Grafikoni kvartilov označujejo mediano, pridobljeno iz rezultatov analize štirih različnih hemidiafragam ($n = 7-10$ vlaken vsake hemidiafragme). Njihovi interkvartilni razmiki skupaj z ročaji in osamelci prikazujejo celoten obseg podatkov. * označuje značilno razliko ($p \leq 0,05$) v primerjavi s kontrolo v enakem časovnem obdobju; ** označuje značilno razliko ($p \leq 0,05$) v primerjavi z meritvijo pred aplikacijo kompleksa (čas 0).

Figure 16: Effect of C1 on the amplitude of miniature end-plate potential of isolated mouse hemidiaphragm fibres. (a) MEPP traces recorded under control conditions (0.104 % (v/v) DMSO) and after the highest concentration of C1 applied for 60 min. (b) Time-dependent effect of 0.104 % (v/v) DMSO and 120 μM C1 on amplitude of miniature end-plate potential of isolated mouse hemidiaphragm fibres. Measurements were performed before (time 0), 30 and 60 min after application of the highest C1 concentration or 0.104 % (v/v) DMSO concentration, and after washing the preparation with standard Krebs-Ringer physiological solution for about 15 min. Box plots indicate the median values of the data obtained from 4 different hemidiaphragms ($n = 7-10$ fibres

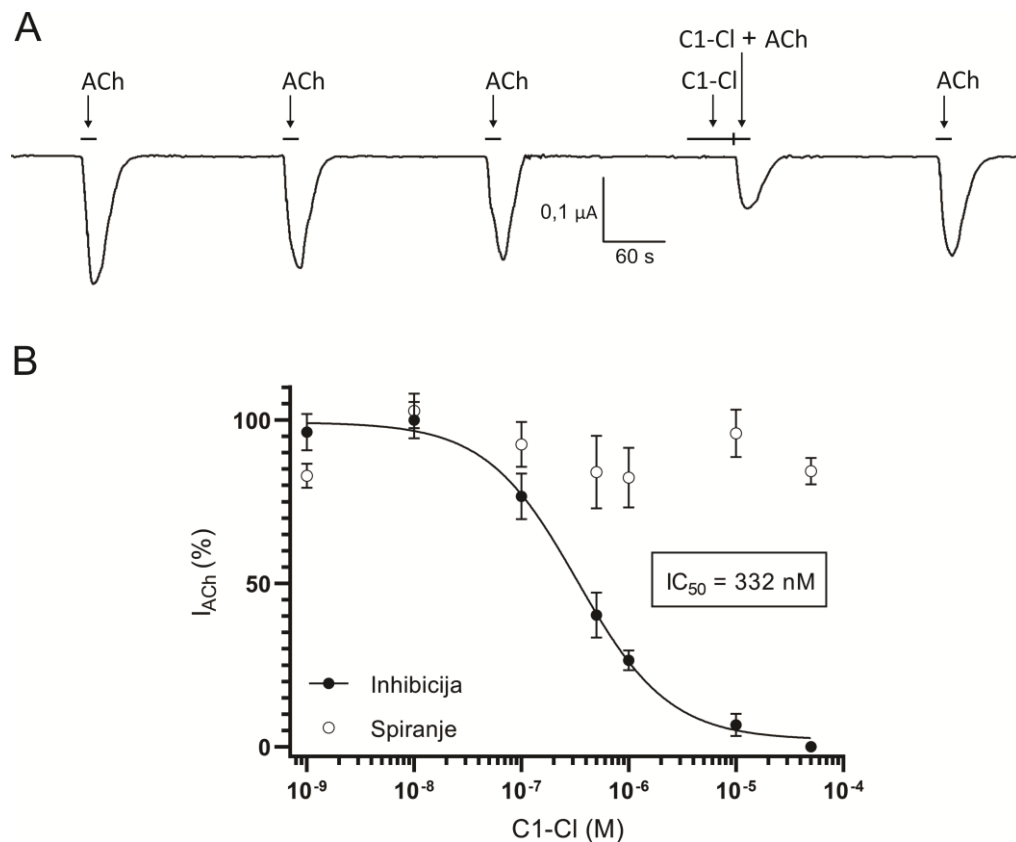
T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

from each), as well as its IQR, with whiskers showing the entire range of data, and all outliers. $*p \leq 0.05$ versus control; $**p \leq 0.05$ versus time 0.

4.5 Elektrofiziološke meritve na oocitih *Xenopus laevis* z vgrajenimi nAChR iz navadnega električnega skata

Kompleks C1-Cl pri uporabljenih koncentracijah (0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 10 in 50 μM) ni vplival na prevodnost membrane v mirovanju in membranski potencial oocitov *Xenopus laevis* z vgrajenimi nAChR iz navadnega električnega skata (mišični tip). Potrdili pa smo koncentracijsko odvisno povratno inhibicijo ionskega toka, povzročene z ACh ob dodatku mešanice 50 μM ACh in različnih koncentracij kompleksa C1-Cl pri vrednosti vzdrževanega membranskega potenciala -60 mV (sliki 17a in b). Zapisi tokov, ki jih povzroča ACh pred in med aplikacijo ter po aplikaciji 0,5- μM koncentracije kompleksa C1-Cl, so prikazani na sliki 17a. Vrednosti IC_{50} in n_{H} za inhibicijo toka prek nAChR iz navadnega električnega skata sta bili določeni na podlagi sigmoidnih nelinearnih regresij preko podatkovnih točk ($r^2 = 1,017$). Vrednost IC_{50} je znašala 0,332 μM (interval zaupanja (95 % IZ) = 0,208–0,529 μM) (slika 17b), vrednost n_{H} pa 1,02 (95 % IZ = 0,645–1,54). Hillov koeficient inhibicije toka kaže na stehiometrijo interakcije 1 : 1 med nAChR iz navadnega električnega skata in C1-Cl.



T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Slika 17: Zaviralni učinek različnih koncentracij kompleksa C1-Cl (50, 10, 1, 0,5, 0,1, 0,01 in 0,001 μM) na ionski tok skozi nAChR iz navadnega električnega skata, vgrajene v membrano oocitov žab *Xenopus laevis*.

A) prikazuje primer zapisa ionskega toka, izzvanega po treh aplikacijah 50 μM ACh, ionski tok po perfuziji oocitov z 0,5- μM kompleksom C1-Cl, ionski tok po perfuziji oocitov z 0,5- μM kompleksom C1-Cl skupaj s 50 μM ACh in po 150-sekundnem spiranju kompleksa ter ponovni aplikaciji 50 μM ACh. B) prikazuje krivuljo inhibicije ionskega toka skozi nAChR iz navadnega električnega skata, izzvanega s 50 μM ACh ob prisotnosti različnih koncentracij kompleksa C1-Cl (50, 10, 1, 0,5, 0,1, 0,01 in 0,001 μM) in po spiranju. Tokovi, izzvani z ACh ob prisotnosti različnih koncentracij C1-Cl, so izraženi kot odstotek njihove povprečne začetne vrednosti, registrirane brez prisotnosti C1-Cl. Vsaka vrednost ponazarja srednjo vrednost \pm S. E. maksimalne amplitude tokov, pridobljenih z meritvijo na 3–5 različnih oocitih žab *Xenopus laevis* z vgrajenimi nAChR iz navadnega električnega skata. Vrednosti IC_{50} in n_H za inhibicijo toka skozi nAChR sta bili določeni iz sigmoidnih nelinearnih regresij krivulj ($r^2 = 0,933$). Vrednost IC_{50} je znašala 0,332 μM (interval zaupanja (95 % IZ = 0,208–0,529 μM), vrednost n_H pa 1,02 (95 % IZ = 0,645–1,54).

Figure 17: Antagonistic effects of different C1-Cl concentrations (50, 10, 1, 0.5, 0.1, 0.01 and 0.001 μM) in *Xenopus laevis* oocytes microtransplanted with Torpedo membranes containing nAChR incorporated into their membranes. (A) Examples of ion currents after three applications of 50 μM ACh, during the action of 0.5 μM C1-Cl, during the action of 0.5 μM C1-Cl with 50 μM ACh, and after 150 s washout of C1-Cl and application of 50 μM ACh. (B) Concentration-dependent inhibition of ACh-evoked currents by C1-Cl in oocytes having incorporated the Torpedo nAChR. Amplitudes of the ACh current peak, recorded at a holding membrane potential of -60 mV in the presence of C1-Cl were normalized to control currents. Each point represents the mean \pm S. E. of data obtained from 3 to 5 different *Xenopus laevis* oocytes having incorporated Torpedo nAChR. IC_{50} and n_H values, determined from typical sigmoid nonlinear regressions through the data points ($r^2 = 0.933$). IC_{50} were 0.332 μM (95 % CI = 0.208–0.529 μM) and n_H 1.02 (95 % CI = 0.645–1.54), respectively.

5 RAZPRAVA

Literatura za rutenijeve komplekse opisuje številne različne potencialne biološke učinke, od protitumorskega, protibakterijskega, protivirusnega, protiparazitnega, protiglivičnega in vse do imunosupresivnega delovanja (Bastos in sod., 1998; Cetinkaya in sod., 1999; Costa in sod., 2017; Alessio in Messori, 2019; Munteanu in Uivarosi, 2021). Zavirajo tudi različne medicinsko pomembne encime, med katerimi so tudi holinesteraze (Dwyer in sod., 1952; Trobec in sod., 2021). V raziskavi smo proučevali organorutenijeve(II) arenske komplekse. Njihove fizikalno-kemične lastnosti in posledično biološke lastnosti so odvisne od ligandov na mestih X, Y in Z (slika 1) (Trobec in sod., 2021; Yousuf in sod., 2021). Arenski ligandi vplivajo na elektronsko porazdelitev kompleksa ter povečajo njegovo hidrofobnost, pri čemer elektronska porazdelitev vpliva na stabilnost kompleksa, hidrofobnost pa olajša prehod skozi lipidne membrane (Zeng in sod., 2017). Tridimenzionalna zgradba in dobro prileganje kompleksov v aktivna mesta encimov pa vplivata na njihovo selektivno delovanje (Kladnik, 2021). Namen naše raziskave je bil identificirati nove organorutenijeve(II) arenske komplekse z učinkovito antiholinesterazno aktivnostjo, saj je bila predhodno pri nekaterih kompleksih iz omenjene skupine ugotovljena učinkovita antiholinesterazna aktivnost (Ristovski in sod., 2018). Poleg tega smo v nadaljevanju želeli proučiti njihov morebitni vpliv oziroma interakcijo s holinergičnim sistemom sesalcev, s tem pa posledično ovrednotiti njihov potencial kot novih antiholinesteraznih učinkovin. Zaviralci holinesteraz se še vedno uporabljajo kot primarne terapevtske učinkovine za simptomatsko zdravljenje številnih nevroloških in degenerativnih stanj, ki so povezana s funkcionalnimi motnjami holinergičnega sistema, kot so Alzheimerjeva bolezen, miastenija gravis, glavkom, Parkinsonova demenca in travmatska poškodba možganov (Giacobini, 2004; Moodie in sod., 2019). Ob uporabi zaviralcev holinesteraz se lahko poleg želenih učinkov pojavijo tudi neželeni oziroma stranski učinki. Ti so lahko posledica aktivacije mAChR v osrednjem živčnem sistemu, mešane osrednje in periferne aktivacije mAChR, periferne aktivacije mAChR in/ali čezmerne stimulacije/zaviranja nAChR v živčno-mišičnem stiku (Gauthier, 2001). Za nekatere do zdaj ugotovljene snovi z zaviralnim učinkom na AChE je bilo opisano dvojno delovanje, in sicer da poleg AChE zavirajo tudi delovanje nAChR v živčno-mišičnem sistemu in s tem povzročijo paralizo skeletnih mišičnih vlaken (Okonjo in sod., 1991; Grandič in Frangež, 2014).

V raziskavi smo biokemično ovrednotili zaviralno aktivnost pripravljene knjižnice

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

organorutenijevih(II) arenskih kompleksov, prekursorjev in ligandov na holinesteraze in/ali GST sesalcev. Med proučevanimi kompleksi smo identificirali komplekse, ki i) zavirajo holinesteraze; ii) selektivno zavirajo BChE; iii) zavirajo holinesteraze in GST in iv) selektivno zavirajo GST (tabeli 3 in 4). Za nekatere komplekse smo ugotovili antiholinesterazno aktivnost v farmakološko zanimivih nizkih mikromolarnih koncentracijah (Soukup in sod., 2017).

Za nadaljnja predklinična preizkušanja smo identificirali pet potencialno zanimivih organorutenijevih(II) arenskih kompleksov z učinkovito antiholinesterazno aktivnostjo (C1, C1-Cl, C5, C6 in C11). Ugotovili smo, da Br⁻ (C5) in I⁻ (C6), analoga kompleksa C1a (Cl⁻) (Ristovski in sod., 2018; Trobec in sod., 2021), zavirata aktivnost holinesteraz pri skoraj enakih, farmakološko zanimivih nizkih mikromolarnih koncentracijah. Poleg tega lahko v kompleksih zaradi zamenjave Br⁻ ali I⁻ v zunajceličnih fizioloških tkivnih tekočinah s Cl⁻ (Wang in sod., 2005) zaradi visoke koncentracije Cl⁻ (~ 100 mM) nastane popolnoma enak organorutenijev(II) arenski kompleks, učinke katerega smo predhodno že opisali (Ristovski in sod., 2018). Zato smo se odločili proučiti vpliv dveh organorutenijevih(II) arenskih kompleksov na holinergični živčni sistem sesalcev, in sicer kompleksov C1 in C1-Cl. Omenjena kompleksa sta imela ugotovljeno holinesterazno zaviralno aktivnost v nizkem, mikromolarnem območju. S poskusi *in vitro* je bilo ugotovljeno, da kompleks C1-Cl zavira delovanje holinesteraz z vrednostjo IC₅₀ 26,2 μM za eeAChE, 24,2 μM za hrAChE in 16,1 μM za hsBChE (tabela 3) (Ristovski in sod., 2018; Trobec in sod., 2020). Ugotovili smo tudi, da kompleks C1-Cl kompetitivno povratno zavira vse uporabljene holinesterazne encime, kar kaže na vpliv kompleksa na aktivno mesto encima znotraj žepa (slika 5). Poleg tega je bila v poskusih inhibicije encimov ugotovljena tudi močna zaviralna aktivnosti njegovega liganda nitrofena (L3), ki je pri eeAChE in hsBChE imel celo boljšo zaviralno aktivnost od proučevanega kompleksa, vendar v nasprotju z njim ligand ni topen v fizioloških pogojih. Ta rezultat še dodatno podkrepi teorijo o pomembnem vplivu liganda na zaviralno aktivnost kompleksa (Barry in Sadler, 2014; Yousuf in sod., 2021). Zaradi prisotnosti holinergičnih komponent v perifernem živčno-mišičnem sistemu in njihovega pomena za normalno funkcijo tega smo želeli ugotoviti, ali kompleks C1-Cl v koncentracijah, ki zavirajo hrAChE v pogojih *in vitro* vpliva na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema. Da bi ugotovili vplive kompleksa C1-Cl na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema, smo naprej opravili poskuse, s katerimi smo proučili vpliv različnih koncentracij (5, 10, 20, 25 in 40 μM) na fiziologijo krčenja skeletne mišice na preparatih izoliranih hemidiafragem miši.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Proučevali smo vpliv kompleksa na posredno in neposredno izzvano enostavno in tetanično kontrakcijo. Znano je, da nekatere snovi, ki zavirajo holinesteraze, lahko poleg tega delujejo tudi kot antagonisti nAChR v perifernem živčno-mišičnem sistemu in tako povzročijo ohlapno paralizo skeletnih mišičnih vlaken. Ugotovili smo, da kompleks C1-Cl v odvisnosti od koncentracije značilno zmanjša amplitudo posredno izzvane enostavne in tetanične kontrakcije (sliki 7d in e), vrednost IC_{50} za posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo je znašala $19,44 \pm 1,05 \mu\text{M}$, za posredno izzvano tetanično kontrakcijo pa $9,68 \pm 1,14 \mu\text{M}$. Ob tem nismo ugotovili značilnega vpliva na amplitudo neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije. Ne glede na koncentracijo C1-Cl prav tako nismo ugotovili povečanja mišične tenzije v mirovanju, kar bi nakazovalo miotoksični učinek kompleksa. Oba rezultata potrjujeta, da C1-Cl verjetno ne vpliva neposredno na električne in mehanske dogodke, ki pripeljejo do krčenja mišičnega vlakna. Če bi bila AChE v motorični ploščici močno zavirana, bi pri posredno izzvani enostavni kontrakciji zaznali povečanje njene amplitude. Visokofrekvenčna stimulacija motoričnega živca pa bi pri posredno izzvani tetanični kontrakciji in kopičenju ACh v sinaptični špranji vodila v depolarizacijski blok, kot je bilo ugotovljeno pri neostigminu, kompetitivnem zaviralcu AChE (Katz in Miledi, 1973; Chang in sod., 1986). 3- μM koncentracija neostigmina (znanega zaviralca AChE) zavre 96 % aktivnosti AChE v motorični ploščici mišje hemidiafragme (Minic in sod., 2003). Iz navedenega je mogoče sklepati, da C1-Cl v koncentracijah, višjih od 5 μM , ne zavira AChE v motorični ploščici, temveč najverjetneje zavre nAChR, prisotne v motorični ploščici. Učinek je najbolj opazen pri najvišji proučevani koncentraciji. Pri vseh proučevanih koncentracijah je učinek povraten, saj amplituda kontrakcije po zamenjavi medija v kopeli s K-R raztopino povrne na začetno raven, poleg tega smo povratni učinek dokazali tudi z aplikacijo 3 μM neostigmina po nastanku delnega bloka amplitude kontrakcije z 20- μM koncentracijo kompleksa C1-Cl (slika 8C), kar kaže, da je mehanizem kompetitiven.

Dodaten dokaz, da kompleks C1-Cl deluje na posinaptične nAChR mišičnega tipa, je tudi povratni učinek 300 μM 3,4-DAP po ugotovljenem živčno-mišičnem bloku, ki je bil povzročen z 20- μM koncentracijo kompleksa C1-Cl (slika 8D). 3,4-DAP je dobro znan zaviralec presinaptičnih napetostno odvisnih kalijevih kanalov (Kv3 in Kv4), ki podaljša trajanje akcijskega potenciala, s čimer poveča tok Ca^{2+} v živčne končiče in sproščanje ACh iz motoričnih končičev. ACh tako skupaj z antagonistom nAChR tekmuje za vezavna mesta na

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

nAChR. Povečana koncentracija ACh v sinaptični špranji tako prepreči zaviralni učinek povratnega antagonista na AChR mišičnega tipa. (Molgo in sod., 1980; Molgo in sod., 1985; Hong in Chang, 1990). Nenazadnje pri proučevanih koncentracijah kompleksa nismo ugotovili miotoksičnega vpliva, ki bi se izražal s povečanjem bazalne mišične tenzije (kontrakturo) (Harvey in sod., 1994). Na podlagi integracije rezultatov izometrične mišične kontrakcije je mogoče sklepati, da C1-Cl v odvisnosti od koncentracije najverjetneje zavira delovanje posinaptičnih nAChR mišičnega tipa, saj povratno zmanjša amplitudo izometrične mišične kontrakcije. Za natančnejšo mehanistično opredelitev učinkov kompleksa C1-Cl na periferni živčno-mišični sistem smo poleg vpliva na izometrično mišično kontrakcijo dodatno proučili tudi njegov vpliv na elektrofiziološke parametre membranskih potencialov: rVm, PMP in MPMP. Analizirali smo amplitudo vseh potencialov, razpolovni čas padajoče faze PMP in MPMP ter frekvenco MPMP, da bi lažje pojasnili vpliv in mehanizem antagonističnega delovanja C1-Cl. Analiza rezultatov meritev rVm skeletnih mišičnih vlaken je pokazala, da kompleks C1-Cl ne vpliva na rVm skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od uporabljene koncentracije in časa izpostavljenosti (slika 11). Domnevo o zaviralnem učinku koncentracij C1-Cl na nAChR v motorični ploščici smo podprli z meritvami amplitud in razpolovnega časa padajoče faze PMP in MPMP. Ugotovili smo, da kompleks pri vseh koncentracijah (5, 10, 20, 25 in 40 μM) v odvisnosti od časa izpostavljenosti značilno zniža amplitudo (sliki 12a in b) in skrajša razpolovni čas padajoče faze PMP (ni prikazano). Vrednost IC_{50} za amplitudo PMP je znašala $7,61 \pm 1,04 \mu\text{M}$ (slika 12b) in se razlikuje od vrednosti za posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo (19,44 μM) (slika 7d), saj je lahko povezana z varnostnim pragom za živčno-mišični prenos (Wood in Slater, 2001). Po zamenjavi medija v kopeli s K-R raztopino se amplituda PMP popolnoma povrne na raven negativne kontrole pri 5- μM koncentraciji kompleksa C1-Cl, pri drugih koncentracijah pa se po zamenjavi medija v kopeli s K-R raztopino poveča, vendar se ne povrne popolnoma na raven negativne kontrole, kar potrjuje počasen povratni učinek. Amplituda PMP progresivno pada, kar posledično privede do zmanjšanja amplitude izometrične kontrakcije, to je razvidno s slike 7. Poleg že opisanih elektrofizioloških parametrov skeletnih mišičnih vlaken smo z rezultati meritev MPMP, podobno kot pri PMP, pri vseh uporabljenih koncentracijah ugotovili značilno zmanjšanje amplitude MPMP v odvisnosti od časa (sliki 13a in b). Pri 40- μM koncentraciji kompleksa C1-Cl 30 in 60 minut po aplikaciji pa smo ugotovili odsotnost MPMP. Pri vseh uporabljenih koncentracijah kompleksa smo opazili tudi značilno skrajšanje razpolovnega časa padajoče faze MPMP v odvisnosti od

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

časa (ni prikazano). Po zamenjavi medija v kopeli s K-R raztopino se amplituda MPMP poveča, vendar se tako kot pri PMP ne povrne popolnoma na raven negativne kontrole, kar prav tako potrjuje počasen povratni učinek. Ugotovili smo tudi značilno znižanje frekvence MPMP pri vseh koncentracijah kompleksa C1-Cl razen pri 5- μ M koncentracije kompleksa (slika 13c). Pri tej koncentraciji kompleksa smo ugotovili, da se amplituda MPMP zmanjša za približno 45 %, vendar pri tem frekvenca MPMP ni bistveno spremenjena (sliki 13a in b). Po zamenjavi medija v kopeli s K-R raztopino se frekvenca MPMP popolnoma povrne oziroma celo preseže raven negativne kontrole. Zmanjšanje amplitude in skrajšanje razpolovnega časa padajoče faze PMP in MPMP potrjuje zaviralni učinek kompleksa na nAChR, saj zaviralci nAChR zmanjšajo amplitudo in skrajšajo razpolovni čas padajoče faze PMP (Magleby in sod., 1981). Zaviralci AChE v nasprotju z našim primerom učinkujejo ravno obratno ter povzročijo dvig amplitude in podaljšanje razpolovnega časa padajoče faze PMP in MPMP (Kuba in Tomita, 1971; Ros in sod., 2001). Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da C1-Cl zmanjša število razpoložljivih nAChR mišičnega tipa na posinaptični membrani. Za neposredno potrditev zaviralnega delovanja C1-Cl na mišični tip nAChR smo izvedli poskuse na oocitih žabe *Xenopus laevis*, ki so v svoji membrani izražali mišični tip nAChR ($\alpha_1\beta_1\gamma\delta$) električnega skata *Torpedo marmorata*. Ugotovili smo, da C1-Cl učinkovito zavre ionski tok skozi mišični tip nAChR, kar potrjuje zaviralni učinek kompleksa na nAChR (sliki 17A in B). Med opisanimi mehanizmi antagonističnega delovanja na nAChR je v našem primeru najverjetnejši mehanizem kompetitiven, saj v odvisnosti od koncentracije kompetitivno prepreči vezavo ACh na nAChR, kot je bilo ugotovljeno za nizke koncentracije d-tubokurarina (Adams, 1976; Bowman, 2006; Rozman in sod., 2010). Vrednost IC_{50} za nAChR iz navadnega električnega skata znaša 0,332 μ M (slika 17B) ter je nižja kot vrednosti IC_{50} pri meritvah mišične kontrakcije in PMP, kar potrjuje možnost, da ima kompleks večjo afiniteto za vezavo na nAChR iz navadnega električnega skata kot za vezavo na mišje nAChR mišičnega tipa. Iz koncentracijsko odvisne krivulje za kompleks smo izračunali Hillov koeficient za nAChR navadnega električnega skata, ki znaša 1,02. To pomeni, da se C1-Cl na nAChR veže v molekularnem razmerju $\sim 1 : 1$ in ne vpliva na nAChR alosterično.

Iz vseh dobljenih rezultatov lahko povzamemo, da C1-Cl v nizkih mikromolarnih koncentracijah: i) zmanjša amplitudo prek živca izzvane kontrakcije; ii) nima učinka na neposredno izzvano izometrično enostavno in tetanično kontrakcijo; iii) ni miotoksičen, iv)

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

zniža amplitudo MPMP in PMP, nima pa učinka na rVm; v) deluje kot počasi disociirajoči kompetitivni antagonist nAChR mišičnega tipa. Zaradi tega je kompleks C1-C1 zanimiv za nadaljnja predklinična testiranja kot nov nedepolarizirajoč periferni miorelaksant za potencialno uporabo v veterinarski in humani medicini.

V zadnjem delu raziskave smo izvedli biokemično in elektrofiziološko karakterizacijo kompleksa C1. Izbrani kompleks ni zaviral AChE (eeAChE ali hrAChE), temveč je selektivno zaviral BChE (hsBChE) z vrednostjo IC_{50} 2,88 μ M (tabela 3). Ugotovili smo tudi, da kompleks C1 kompetitivno povratno zavre encim hsBChE (slika 6), kar potrjuje vezavo kompleksa v aktivno mesto encima znotraj žepa. Pri vključitvi hsBChE v raziskavo kot modelnega encima za encime BChE smo upoštevali dosedanja dognanja, da encim hsBChE, ki si s hBChE deli 90-odstotno identičnost aminokislinskega zaporedja, zagotavlja dober model človeškega encima v toksikoloških in farmakoloških testiranjih, zlasti zaradi svoje komercialne dostopnosti, podobnih biokemičnih in biofizikalnih lastnosti ter strukturne podobnosti s človeškim encimom. Ob ugotovitvi selektivnega delovanja na hsBChE smo želeli preveriti tudi zaviralno aktivnost kompleksa C1 za človeški in pasji encim, vendar taki encimi na tržišču niso komercialno dostopni. hBChE smo pozneje prejeli kot darilo, zaviralno aktivnost kompleksa za pasji encim pa smo preverili ob dodatku pasjega seruma. Z izvedbo poskusov inhibicije encimov smo ugotovili, da kompleks v farmacevtsko zanimivem koncentracijskem območju slabo zavira aktivnosti hBChE (IC_{50} = 144,2 μ M) in ne zavira aktivnosti dsBChE v preizkušenem koncentracijskem območju. Ligand L2 ni zaviral aktivnosti uporabljenih encimov, medtem ko meritev zaviralne aktivnosti zaradi obarvanja ob stiku s substratom pri ligandu L1 ni bilo mogoče izvesti (tabela 3). Iz rezultatov biokemične karakterizacije smo ugotovili, da je vrednost IC_{50} kompleksa C1 ~ 50-krat nižja za hsBChE v primerjavi s hBChE, in s tem tudi ovrgli splošno prepričanje, vsaj za testirani kompleks C1, da je hsBChE dober model človeškega encima. Najverjetnejši vzrok za nastalo razliko je primarna struktura hsBChE, ki se od človeške razlikuje v petnajstih aminokislinskih ostankih (Kovarik in Simeon-Rudolf, 2004; Bosak in sod., 2008). Za natančno pojasnitev vzroka bi bilo v prihodnosti treba uporabiti tehniko molekulskega modeliranja. Zato lahko sklepamo, da testiranje na hsBChE ne zagotavlja nujno zanesljive osnove za toksikološke in farmakološke raziskave pri ljudeh.

Biokemični karakterizaciji je sledila elektrofiziološka karakterizacija izbranega kompleksa. Znano je, da BChE ne vpliva na trajanje delovanja ACh na posinaptično membrano. Iz česar je

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

razvidno, da BChE ne deluje samo kot rezerva za AChE. Ugotovljeno je bilo, da zaviralci BChE zmanjšajo sproščanje ACh v sinaptično špranjo, kar potrjuje, da je BChE vključena v modulacijo presinaptičnega procesa sproščanja ACh in ima lahko konstitutivno fiziološko vlogo (Minic in sod., 2003). Za proučitev neželenih vplivov (zmanjšano presinaptično sproščanje ACh, zavrtje AChE in/ali nAChR in citotoksično delovanje) kompleksa v suprafarmakoloških koncentracijah (30, 60, 90 in 120 μM) na fiziologijo krčenja skeletne mišice smo izvedli meritve posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši s pripadajočim freničnim živcem. Ugotovili smo, da kompleks C1, odvisno od časa izpostavljenosti in koncentracije, značilno ne vpliva na amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične kontrakcije (sliki 9 in 10). Na podlagi dobljenih rezultatov je bilo mogoče sklepati, da kompleks C1 tudi v najvišji uporabljeni koncentraciji najverjetneje ne vpliva na AChE, nAChR in presinaptično sproščanje ACh v živčno-mišičnem stiku. Če bi bila AChE v motorični ploščici zavrta, bi pri posredno izzvani enostavni mišični kontrakciji zaznali rahlo povečanje amplitude, pri posredno izzvani tetanični mišični kontrakciji pa depolarizacijski blok, kot pri uporabljeni pozitivni kontroli, 3- μM neostigminu, kompetitivnem zaviralcu AChE (Chang in sod., 1986), ter padec amplitude posredno izzvane enostavne in tetanične kontrakcije pri zaviralcih nAChR. Prav tako nismo zaznali povečanja bazalne mišične tenzije, ki bi potrjevalo potencialno mitotoksično delovanje proučevanega kompleksa (Harvey in sod., 1994).

Pri proučevanju vpliva suprafarmakoloških koncentracij na fiziologijo krčenja hemidiafragem miši nismo zaznali značilnih sprememb, posledično smo pri proučevanju vpliva na elektrofiziološke parametre membranskih potencialov (rVm, PMP in MPMP) uporabili le najvišjo koncentracijo kompleksa (120 μM). Meritev rVm površinskih skeletnih mišičnih vlaken je pokazala, da kompleks C1 v 120- μM koncentraciji ne vpliva na rVm v odvisnosti od časa izpostavljenosti (slika 14). Da bi mehanistično izključili zaviralni učinek 120- μM koncentracije kompleksa na presinaptično sproščanje ACh, AChE ali nAChR v motorični ploščici, smo opravili meritve amplitud in razpolovnega časa padajoče faze PMP in MPMP ter frekvence MPMP. Ugotovili smo, kompleks C1 po 30 in 60 minutah po aplikaciji značilno zmanjša amplitudo MPMP (slika 16b), vendar ne vpliva na amplitudo PMP (slika 15). Poleg tega smo pri uporabljeni koncentraciji kompleksa ugotovili tudi značilno skrajšanje razpolovnega časa PMP in MPMP. Po zamenjavi medija v kopeli s K-R raztopino se amplituda

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

MPMP popolnoma povrne na raven negativne kontrole (slika 16b). Poleg tega pri 120- μ M koncentraciji nismo ugotovili znižanja frekvence MPMP, ki je značilno za zavrtje BChE v živčno-mišičnem stiku (Minic in sod., 2003). Zmanjšanje amplitude in skrajšanje razpolovnega časa padajoče faze MPMP potrjuje potencialni zaviralni učinek kompleksa na nAChR mišičnega tipa, saj je za zaviralce nAChR značilno zmanjšanje amplitude in skrajšanje razpolovnega časa padajoče faze MPMP (Magleby in sod., 1981). Integrirani rezultati meritev parametrov mišične kontrakcije in parametrov membranskih potencialov prikazujejo, da suprafarmakološka koncentracija kompleksa (120 μ M) ne vpliva pomembno na fiziologijo krčenja skeletnih mišičnih vlaken, hkrati pa zelo verjetno ne vpliva niti na sproščanja ACh iz končičev motoričnih nevronov.

6 SKLEPI

1. Identificirali smo nove organorutenijeve(II) arenske komplekse s potentnim zaviralnim delovanjem na holinesteraze in/ali GST sesalcev *in vitro*.
2. Kompleks C1-C1 *in vitro* v farmakološko zanimivih koncentracijah zavre AChE in *ex vivo* kot kompetitivni antagonist nAChR zavre živčno-mišični prenos.
3. Kompleks C1-C1 je primeren za nadaljnja predklinična testiranja kot nov nedepolarizirajoč miorelaksant za potencialno uporabo v veterinarski in humani medicini.
4. Kompleks C1 *in vitro* v farmakološko zanimivih koncentracijah zavira BChE, v zelo visokih koncentracijah pa *ex vivo* pomembno ne zavira AChE in nAChR, prisotnih v živčno-mišičnem stiku.
5. Testiranje proučevanih snovi na konjski BChE zaradi njene cenovne in komercialne dostopnosti, dobro proučenih biokemičnih in biofizikalnih lastnost in strukturne podobnosti s človeškim encimom ne zagotavlja nujno zanesljive osnove za toksikološke in farmakološke raziskave pri ljudeh.

7 POVZETEK

Zanimanje za biološke aktivnosti rutenijevih(II) arenskih kompleksov se je v zadnjem desetletju močno povečalo, saj ti kompleksi lahko vplivajo na delovanje različnih encimov kot terapevtskih tarč pri različnih patoloških stanjih ljudi in/ali živali. Med drugim je za rutenijeve komplekse ugotovljeno, da selektivno zavirajo holinesterazne encime. Zaviralci holinesteraz so učinkovine, ki upočasnijo oziroma popolnoma ustavijo aktivnost holinesteraznih encimov ter posledično razgradnjo ACh na acetat in holin, s čimer se podaljša razpoložljivosti in trajanje delovanja ACh v sinaptični špranji. Uporabljajo se kot pomembne terapevtske učinkovine za simptomatsko zdravljenje različnih bolezni, povezanih s funkcionalnimi motnjami holinergičnega sistema (Alzheimerjeva bolezen, miastenija gravis, glavkom, Parkinsonovi bolezni pridružena demenca in travmatska poškodba možganov).

Namen naše raziskave v okviru doktorske disertacije je bil identificirati organorutenijeve(II) arenske komplekse z najučinkovitejšo antiholinesterazno aktivnostjo, proučiti njihovo morebitno interakcijo s holinergičnim sistemom sesalcev in ugotoviti njihov potencial kot novih antiholinesteraznih učinkovin za nadaljnja predklinična testiranja.

V prvem delu raziskave smo za identifikacijo novih kompleksov z zaviralnim delovanjem na holinesteraze in/ali GST sesalcev *in vitro* uporabili knjižnico, ki je vsebovala 12 novih organorutenijevih(II) arenskih kompleksov, dva prekursorja in devet ligandov. Z uporabo testov zaviranja holinesteraznih encimov in GST-encimov smo za komplekse, prekursorja in ligande določili njihove vrednosti IC_{50} in K_i . Iz pripravljene knjižnice smo identificirali organorutenijeve(II) arenske komplekse, ki zavirajo: i) holinesteraze, ii) selektivno zavirajo BChE, iii) zavirajo holinesteraze in GST in iv) selektivno zavirajo GST. Poleg tega smo na osnovi rezultatov testiranja ovrgli splošno prepričanje, da testiranje na konjski BChE zaradi njene cenovne in komercialne dostopnosti, dobro proučenih biokemičnih in biofizikalnih lastnosti in strukturne podobnosti s človeškim encimom ne zagotavlja nujno zanesljive osnove za toksikološke in farmakološke raziskave pri ljudeh.

V drugem delu raziskave smo proučili interakcije dveh organorutenijevih(II) arenskih kompleksov (C1-Cl in C1) s holinergičnim živčnim sistemom sesalcev. Za kompleks C1-Cl, ki v zelo nizkih, mikromolarnih koncentracijah kompetitivno povratno zavre encime eeAChE ($IC_{50} = 26,2 \mu\text{M}$), hrAChE ($IC_{50} = 24,2 \mu\text{M}$) in hsBChE ($IC_{50} = 16,1 \mu\text{M}$), smo na podlagi rezultatov elektrofizioloških poskusov na izoliranih živčno-mišičnih preparatih hemidiafragem

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

miši ugotovili, da kompleks C1-C1 v nizkih, mikromolarnih koncentracijah ($IC_{50} = 19,44 \mu M$) povratno zavre posredno izzvano enostavno in tetanično izometrično kontrakcijo brez vpliva na neposredno izzvano enostavno in tetanično izometrično kontrakcijo. Poleg tega smo z meritvami membranskih potencialov skeletnih mišičnih vlaken ugotovili, da kompleks zmanjša amplitudo PMP ($IC_{50} = 7,6 \mu M$) in v odvisnosti od koncentracije zmanjša ali popolnoma zavre amplitudo MPMP, pri čemer se rVm skeletnih mišičnih vlaken ni spremenil. Rezultati poskusov so močno sugestivni v korist selektivnega in kompetitivnega zaviralnega delovanja kompleksa na posinaptične nAChR mišičnega tipa. Zadnje nam je uspelo potrditi z metodo vpete napetosti na oocitih *Xenopus laevis* z vgrajenimi nAChR iz navadnega električnega skata, saj smo ugotovili koncentracijsko odvisno povratno inhibicijo nAChR iz navadnega električnega skata v nanomolarnem območju ($IC_{50} = 332 \text{ nM}$). Sklepali smo, da kompleks C1-C1 *ex vivo* s povratno vezavo na posinaptične nAChR prek nedepolarizirajočega mehanizma zavre živčno-mišični prenos in je uporaben za nadaljnja predklinična testiranja kot nov nedepolarizirajoč periferni miorelaksant za potencialno uporabo v veterinarski in humani medicini.

Na podlagi rezultatov elektrofizioloških poskusov na izoliranih živčno-mišičnih preparatih hemidiafragem miši smo za kompleks C1, ki v zelo nizkih, mikromolarnih koncentracijah selektivno kompetitivno povratno zavre delovanje hsBChE ($IC_{50} = 2,88 \mu M$, $K_i = 1,33 \mu M$) in v mikromolarnem območju zavre aktivnost hBChE ($IC_{50} = 144,2 \mu M$), ugotovili, da v uporabljenih koncentracijah (30, 60, 90 in 120 μM) ne vpliva na amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične izometrične kontrakcije. Poleg tega z meritvami membranskih potencialov nismo ugotovili vpliva najvišje uporabljene koncentracije kompleksa C1 (120 μM) na rVm in amplitudo PMP površinskih skeletnih mišičnih vlaken. Ugotovili smo le značilno zmanjšanje amplitude in skrajšanje razpolovnega časa MPMP ter skrajšanje razpolovnega časa PMP. Razvidno je, da 120- μM koncentracija kompleksa C1 pomembno ne zavira AChE in nAChR, prisotnih v živčno-mišičnem stiku, s čimer ne vpliva na fiziologijo perifernega živčno-mišičnega sistema.

8 SUMMARY

Interest in the biological activities of ruthenium(II) arene complexes has increased in the last decade because these complexes can affect the activity of various enzymes as therapeutic targets in various pathological conditions in humans and/or animals. For example, ruthenium complexes have been described to selectively inhibit cholinesterase enzymes. Cholinesterase inhibitors are substances that slow down or completely inhibit the activity of cholinesterase enzymes and the subsequent degradation of acetylcholine into acetate and choline. This prolongs the availability and duration of action of acetylcholine in the synaptic cleft. Cholinesterase inhibitors are used as important therapeutic agents for treating the symptoms of various diseases associated with dysfunction of the cholinergic system (i.e., Alzheimer's disease, myasthenia gravis, glaucoma, dementia associated with Parkinson's disease, and traumatic brain injury).

The aim of the dissertation was to identify organoruthenium(II)arene complexes with the most effective anticholinesterase activity, to investigate their possible interaction with the mammalian cholinergic system and to determine their potential as new anticholinesterase agents for further preclinical testing.

In the first part of the study, we used a library of 12 new organoruthenium(II) arene complexes, 2 precursors and 9 ligands to identify new complexes with inhibitory activities on mammalian cholinesterases and/or GSTs *in vitro*. Using cholinesterase and GST enzyme inhibition assays, IC_{50} values and K_i were determined for the complexes, precursors, and ligands. From the prepared library, we identified organoruthenium(II) arene complexes that inhibit i) cholinesterases, ii) selectively inhibit BChE, iii) inhibit cholinesterases and GST, and iv) selectively inhibit GSTs. Moreover, based on the results, we refuted the common belief that equine BChE does not necessarily provide a reliable basis for toxicological and pharmacological studies in humans; this conclusion was based on the price and commercial availability of BChE, its well-studied biochemical and biophysical properties, and its structural similarity to the human enzyme.

In the second part of the study, we studied the interactions of two organoruthenium(II) arene complexes (C1-Cl and C1) with the mammalian cholinergic system. For complex C1-Cl, which competitively and reversibly inhibited the enzymes eeAChE ($IC_{50} = 26.2 \mu\text{M}$), hrAChE ($IC_{50} = 24.2 \mu\text{M}$), and hsBChE ($IC_{50} = 16.1 \mu\text{M}$) at low micromolar concentrations *in vitro*, we

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

performed electrophysiological experiments on isolated mouse neuromuscular preparations and found that at low micromolar concentrations, complex C1-C1 ($IC_{50} = 19.44 \mu\text{M}$) reversibly inhibited nerve-evoked single twitch and tetanic isometric contraction without affecting directly muscle-elicited single twitch and tetanic isometric muscle contraction. Furthermore, using the membrane potential measurements of skeletal muscle fibres, we found that the complex reduced EPP amplitudes ($IC_{50} = 7.6 \mu\text{M}$) and, depending on the concentration, reduced or completely blocked MEPPs without any significant change in the rVm of skeletal muscle fibres. The experimental results suggest that the complex exhibits a selective competitive inhibitory effect on postsynaptic muscle-type nAChRs. We confirmed this result by utilizing a two-electrode voltage clamp on *Xenopus laevis* oocytes with microimplanted *Torpedo* nAChRs, in which we found concentration-dependent inhibition of *Torpedo* nAChRs in the nanomolar range ($IC_{50} = 332 \text{ nM}$). We concluded that complex C1-C1 inhibits neuromuscular transmission *ex vivo* by a nondepolarizing mechanism through reversible binding to postsynaptic nAChRs and may be interesting for further preclinical testing as a new nondepolarizing peripheral myorelaxant to potentially use in veterinary and human medicine.

On the basis of the results of electrophysiological experiments on isolated neuromuscular preparations of mouse hemidiaphragms, we found that complex C1, which selectively, competitively, and reversibly inhibits the activity of hsBChE at low, micromolar concentrations ($IC_{50} = 2.88 \mu\text{M}$, $K_i = 1.33 \mu\text{M}$) and in the micromolar range, inhibited the activity of hBChE ($IC_{50} = 144.2 \mu\text{M}$), had no effect on the amplitudes of nerve-evoked and directly muscle-elicited single twitch and tetanic isometric contraction at the concentrations used (30, 60, 90, and 120 μM). Furthermore, we observed no effects for the highest concentration of complex C1 (120 μM) on rVm and the amplitudes of EPPs of superficial skeletal muscle fibres by membrane potential measurements. We found only a characteristic decrease in MEPP amplitude and a shortened half-decay time of MEPPs and EPPs. It is evident that a 120 μM concentration of complex C1 does not importantly inhibit the AChE and nAChR present in the neuromuscular junction and thus has no effect on the physiology of the peripheral neuromuscular system.

9 ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki so kakorkoli sodelovali ter mi pomagali pri nastajanju in oblikovanju doktorske disertacije, s čimer so prispevali svoj kamenček neprecenljive vrednosti k mozaiku končnega izdelka.

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Robertu Frangežu in somentorici doc. dr. Moniki C. Žužek, ki sta z menoj v preteklem obdobju nesebično delila svoje obširno znanje, veščine in izkušnje, me usmerjala pri raziskovalnem delu in podpirala pri vseh zastavljenih ciljih. Najlepše se Vama zahvaljujem za podporo, pomoč, potrpežljivost, razumevanje, spodbudne besede, nasvete pri pisanju in temeljit pregled doktorske disertacije.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Kristini Sepčić za predano obširno znanje, vse nasvete in usmeritve v povezavi z izvedbo spektrofotometričnih metod za določanje zaviralne aktivnosti snovi, ki sem jih opravil v njenem laboratoriju na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete. Ob tem bi se rad zahvalil tudi vsem drugim sodelavcem na katedri za pomoč, podporo in ne nazadnje tudi za nepozabna druženja.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Iztoku Turelu, dr. Jerneji Kladnik in drugim sodelavcem Oddelka za kemijo in biokemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo za sintezo kompleksov, predano znanje, nasvete in pomoč.

Iskreno se zahvaljujem dr. Evelyne Benoit, dr. Romulu Araozu in dr. Nicolasu Lamassiaudu inštituta Service d'Ingénierie Moléculaire pour la Santé za predano znanje in pomoč pri izvedbi metode vpete napetosti.

Iskreno se zahvaljujem Katarini Babnik, Boštjanu Drolcu za strokovno in tehnično podporo, nasvete, ustrežljivost in prijaznost.

Iskreno se zahvaljujem vsem sodelavcem Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete za pomoč, nasvete in podporo.

Zahvala gre tudi Stanki Ujc in Slavici Sekulić za skrben pregled seznama literature.

dr. Nina Novak Kerbler je pomagala pri jezikovnem urejanju besedila v slovenskem jeziku, American Journal Experts pa pri jezikovnem urejanju besedila v angleškem jeziku, za kar se vsem lepo zahvaljujem.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Delo je finančno podprto s sredstvi Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike (ARRS) Slovenije za mlade raziskovalce (Tomaž Trobec; 51852) in sredstvi ARRS raziskovalnega programa P4-0053. Za vso finančno podporo se iskreno zahvaljujem.

Ne nazadnje pa bi se rad iz srca zahvalil partnerici Tei, svoji družini in prijateljem, saj so me skozi vsa leta študija podpirali, spodbujali in razumeli mojo pogosto stisko s časom.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

10 LITERATURA

Adams PR. Drug blockade of open end-plate channels. *J Physiol* 1976; 260(3): 531–52.
doi: 10.1113/jphysiol.1976.sp011530

Adams RH. Neuromuscular blocking agents. In: Riviere JE, Papich MG, eds. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2009: 211–28.

Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 2009; 89(1): 73–120.
doi:10.1152/physrev.00015.2008

Alessio E, Messori L. The deceptively similar ruthenium(III) drug candidates KP1019 and NAMI-A have different actions. What did we learn in the past 30 years?
Met Ions Life Sci 2018; 18: 141–170.
doi: 10.1515/9783110470734-011

Alessio E, Messori L. NAMI-A and KP1019/1339, two iconic ruthenium anticancer drug candidates face-to-face: a case story in medicinal inorganic chemistry.
Molecules 2019; 24(10): e1995 (20 str.)
doi: 10.3390/molecules24101995

Ali HH, Savarese JJ. Monitoring of neuromuscular function. *Anesthesiology* 1976; 45(2): 216–49.
doi: 10.1097/00000542-197608000-00009

Barak D, Ordentlich A, Stein D, Yu Q-S, Greig NH, Shafferman A. Accommodation of physostigmine and its analogues by acetylcholinesterase is dominated by hydrophobic interactions. *Biochem J* 2009; 417(1): 213–22.
doi: 10.1042/BJ20081276

Barry NPE, Sadler PJ. 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure Appl Chem* 2014; 86(12): 1897–910.
doi: 10.1515/pac-2014-0504

Bastos CM, Gordon KA, Ocain TD. Synthesis and immunosuppressive activity of ruthenium complexes. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8(2): 147–50.
doi: 10.1016/s0960-894x(97)10205-0

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Bergamo A, Sava G. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton Trans* 2007; (13): 1267–72.

doi: 10.1039/b617769g

Bosak A, Gazić I, Vinković V, Kovarik Z. Stereoselective inhibition of human, mouse, and horse cholinesterases by bambuterol enantiomers. *Chem Biol Interact* 2008; 175(1/3): 192–5.

doi: 10.1016/j.cbi.2008.04.050

Bowman WC. Neuromuscular block. *Br J Pharmacol* 2006; 147 (suppl 1): 277–86.

doi: 10.1038/sj.bjp.0706404

Boyd ND. Two distinct kinetic phases of desensitization of acetylcholine receptors of clonal rat PC12 cells. *J Physiol* 1987; 389: 45–67.

doi: 10.1113/jphysiol.1987.sp016646

Brabec V, Kasparkova J. Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents. *Coord Chem Rev* 2018; 376: 75–94.

doi: 10.1016/j.ccr.2018.07.012

Burden SJ, Yumoto N, Zhang W. The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(5): e009167 (11 str.)

doi: 10.1101/cshperspect.a009167

Casini A, Gabbiani C, Sorrentino F, et al. Emerging protein targets for anticancer metallodrugs: inhibition of thioredoxin reductase and cathepsin B by antitumor ruthenium(II)-arene compounds. *J Med Chem* 2008; 51(21): 6773–81.

doi: 10.1021/jm8006678

Cetinkaya B, Ozdemir I, Binbaşıoğlu B, Durmaz R, Günel S. Antibacterial and antifungal activities of complexes of ruthenium (II). *Arzneimittelforschung* 1999, 49(6): 538–40.

doi: 10.1055/s-0031-1300457

Chakrapani S, Auerbach A. A speed limit for conformational change of an allosteric membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(1): 87–92.

doi: 10.1073/pnas.0406777102

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Chang CC, Hong SJ, Ko JL. Mechanisms of the inhibition by neostigmine of tetanic contraction in the mouse diaphragm. *Br J Pharmacol* 1986; 87(4): 757–62.

doi: 10.1111/j.1476-5381.1986.tb14594.x.

Chatterjee S, Mudher A. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: a critical assessment of the shared pathological traits. *Front Neurosci* 2018; 12: e383 (23 str.)

doi: 10.3389/fnins.2018.00383

Che C-M, Siu F-M. Metal complexes in medicine with a focus on enzyme inhibition.

Curr Opin Chem Biol 2010; 14(2): 255–61.

doi: 10.1016/j.cbpa.2009.11.015

Clarke MJ. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord Chem Rev* 2003; 236(1/2): 209–33.

doi: 10.1016/S0010-8545(02)00312-0

Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11(3): 315–35.

doi: 10.2174/1570159X11311030006

Costa MS, Goncalves YG, Nunes DCO, et al. Anti-Leishmania activity of new ruthenium(II) complexes: Effect on parasite-host interaction. *J Inorg Biochem* 2017; 175: 225–31.

doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.07.023

Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM, et al. Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 1985; 260(16): 9280–8.

doi: 10.1016/S0021-9258(17)39364-X

Dale LD, Tocher JH, Dyson TM, Edwards DI, Tocher DA. Studies on DNA damage and induction of SOS repair by novel multifunctional bio-reducible compounds. II. A metronidazole adduct of a ruthenium-arene compound.

Anticancer Drug Des 1992; 7(1): 3–14.

Dani JA. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor structure and function and response to nicotine. *Int Rev Neurobiol* 2015; 124: 3–19.

doi: 10.1016/bs.irn.2015.07.001

Darvesh S, Darvesh KV, McDonald RS, et al. Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

J Med Chem 2008; 51(14): 4200–12.

doi: 10.1021/jm8002075.

Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4(2): 131–8.

doi: 10.1038/nrn1035

Dos Santos Picanco LC, Ozela PF, de Fatima de Brito Brito M, et al. Alzheimer's disease: a review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. *Curr Med Chem* 2018; 25(26): 3141–59.

doi: 10.2174/0929867323666161213101126

Dutertre S, Nicke A, Tsetlin VI. Nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from snake and snail venoms. *Neuropharmacology* 2017; 127: 196–223.

doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.06.011

Dwyer FP, Gyarfás EC, Rogers WP, Koch JH. Biological activity of complex ions.

Nature 1952; 170 (4318): 190–1.

doi: 10.1038/170190a0.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88–95.

doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9

Fan L, Mao C, Hu X, et al. New insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease.

Front Neurol 2020; 10: e1312 (12str.)

doi: 10.3389/fneur.2019.01312

Faraone I, Rai DK, Russo D, et al. Antioxidant, antidiabetic, and anticholinesterase activities and phytochemical profile of *Azorella glabra* wedd. *Plants (Basel)* 2019; 8(8): e265 (14 str.)

doi: 10.3390/plants8080265

Felder CE, Botti SA, Lifson S, Silman I, Sussman JL. External and internal electrostatic potentials of cholinesterase models. *J Mol Graph Model* 1997; 15(5): 318–27, 335–7.

doi: 10.1016/s1093-3263(98)00005-9

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Fraga CG. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health.

Mol Aspects Med 2005; 26(4/5): 235–44.

doi: 10.1016/j.mam.2005.07.013

Gauthier S. Cholinergic adverse effects of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: epidemiology and management. Drugs Aging 2001; 18(11): 853–62.

doi: 10.2165/00002512-200118110-00006

Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives.

Pharmacol Res 2004; 50(4): 433–40.

doi: 10.1016/j.phrs.2003.11.017

Gilhus NE. Myasthenia gravis. N Engl J Med 2016; 375(26): 2570–81.

doi: 10.1056/NEJMra1602678

Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, Lazaridis K, Zisimopoulou P, Tzartos S. Myasthenia gravis - autoantibody characteristics and their implications for therapy.

Nat Rev Neurol 2016; 12(5): 259–68.

doi: 10.1038/nrneurol.2016.44

Gómez-Ruiz S, Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, Kaluđerović GN. On the discovery, biological effects, and use of Cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy.

Bioinorg Chem Appl 2012; 2012: e140284 (14 str.)

doi: 10.1155/2012/140284

Grandič M, Frangež R. Pathophysiological effects of synthetic derivatives of polymeric alkylpyridinium salts from the marine sponge, *Reniera sarai*.

Mar Drugs 2014; 12(5): 2408–21.

doi: 10.3390/md12052408.

Grandjean P. Paracelsus revisited: the dose concept in a complex world.

Basic Clin Pharmacol Toxicol 2016; 119(2): 126–32.

doi: 10.1111/bcpt.12622.

Greenblatt HM, Krygera G, Lewis T, Silman I, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. FEBS Lett 1999; 463(3): 321–6.

doi: 10.1016/s0014-5793(99)01637-3.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Greenblatt HM, Dvir H, Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 2003; 20(3): 369–83.

doi: 10.1385/JMN:20:3:369

Ha ZY, Mathew S, Yeong KY. Butyrylcholinesterase: a multifaceted pharmacological target and tool. *Curr Protein Pept Sci* 2020; 21(1): 99–109.

doi: 10.2174/1389203720666191107094949

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249(22): 7130–9.

doi: 10.1016/S0021-9258(19)42083-8

Haga K, Kruse AC, Asada H, et al. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 2012; 482(7386): 547–51.

doi: 10.1038/nature10753

Hager HH, Burns B. Succinylcholine chloride. In: StatPearls (online). Treasure Island: StatPearls Publishing 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499984/> (20. 04. 2022)

Hamulakova S, Janovec L, Soukup O, Jun D, Kuca K. Synthesis, in vitro acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking of new acridine-coumarin hybrids.

Int J Biol Macromol 2017; 104(Pt A): 333–8.

doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.006

Harel M, Sussman JL, Krejci E, et al. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(22): 10827–31.

doi: 10.1073/pnas.89.22.10827

Harvey AL, Barfaraz A, Thomson E, Faiz A, Preston S, Harris JB. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 1994; 32(3): 257–65.

doi: 10.1016/0041-0101(94)90078-7

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Ho TNT, Abraham N, Lewis RJ. Structure-function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from natural toxins. *Front Neurosci* 2020; 14: e609005 (23 str.)
doi: 10.3389/fnins.2020.609005

Hong SJ, Chang CC. Use of geographutoxin II (μ -conotoxin) for the study of neuromuscular transmission in mouse. *Br J Pharmacol* 1989; 97(3): 934–40.
doi: 10.1111/j.1476-5381.1989.tb12034.x

Hong SJ, Chang CC. Facilitation by 3,4-diaminopyridine of regenerative acetylcholine release from mouse motor nerve. *Br J Pharmacol* 1990; 101(4): 793–8.
doi: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb14159.x

Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Rep* 2006; 23(2): 181–99.
doi: 10.1039/b508966m

Huang YJ, Huang Y, Baldassarre H, et al. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(34): 13603–8.
doi: 10.1073/pnas.0702756104

Hulme EC, Kurtenbach E, Curtis CA. Muscarinic acetylcholine receptors: structure and function. *Biochem Soc Trans* 1991; 19(1): 133–8.
doi: 10.1042/bst0190133.

Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des* 2006; 12(28): 3573–81.
doi: 10.2174/138161206778522056

Jayam Trouth A, Dabi A, Solieman N, Kurukumbi M, Kalyanam J. Myasthenia gravis: a review. *Autoimmune Dis* 2012; 2012: e874680 (10 str.)
doi: 10.1155/2012/874680

Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, et al. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J* 2007; 274(15): 3799–845.
doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05935.x

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Kandiah N, Pai MC, Senanarong V, et al. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clin Interv Aging* 2017; 12: 697–707.

doi: 10.2147/CIA.S129145

Katz B, Miledi R. The binding of acetylcholine to receptors and its removal from the synaptic cleft. *J Physiol* 1973, 231(3): 549–74.

doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010248

Katz B, Thesleff S. A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 1957; 138(1): 63–80.

doi: 10.1113/jphysiol.1957.sp005838

Khorzad R, Whelan M, Sisson A, Shelton GD. Myasthenia gravis in dogs with an emphasis on treatment and critical care management.

J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 2011; 21(3): 193–208.

doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00636.x

Kitisripanya N, Saparpakorn P, Wolschann P, Hannongbua S. Binding of huperzine A and galanthamine to acetylcholinesterase, based on ONIOM method.

Nanomedicine 2011; 7(1): 60–8.

doi: 10.1016/j.nano.2010.08.004

Kladnik J. Sinteza in biološka aktivnost koordinacijskih spojin analogov piritiona. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2021. Doktorska disertacija.

Kleinz MJ, Spence I. The pharmacology of the autonomic nervous system. In: Maddison JE, Page SW, Churc DB eds. *Small animal clinical pharmacology*.

2nd ed. Edinburg: Saunders, 2008; 59–82.

Kljun J, Anko M, Traven K, et al. Pyridithione-based ruthenium complexes as inhibitors of aldo-keto reductase 1C enzymes and anticancer agents.

Dalton Trans 2016; 45(29): 11791–800.

doi: 10.1039/c6dt00668j

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers* 2021; 7(1): e33 (47 str.)

doi: 10.1038/s41572-021-00269-y

Kostova I. Ruthenium complexes as anticancer agents.

Curr Med Chem 2006; 13(9): 1085–107.

doi: 10.2174/092986706776360941

Kovarik Z, Simeon-Rudolf V. Interaction of human butyrylcholinesterase variants with bambuterol and terbutaline. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2004; 19(2): 113–7.

doi: 10.1080/14756360410001667300

Krieger F, Mourot A, Araoz R, et al. Fluorescent agonists for the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor. *Chembiochem* 2008; 9(7): 1146–53.

doi: 10.1002/cbic.200700757

Kuba K, Tomita T. Effect of prostigmine on the time course of the end-plate potential in the rat diaphragm. *J Physiol* 1971; 213(3): 533–44.

doi: 10.1113/jphysiol.1971.sp009398

Li Q, Yang H, Chen Y, Sun H. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease.

Eur J Med Chem 2017; 132: 294–309.

doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.062

Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther* 2019; 4: e29 (22 str.)

doi: 10.1038/s41392-019-0063-8

Maelicke A, Samochocki M, Jostock R, et al. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease.

Biol Psychiatry 2001; 49(3): 279–88.

doi: 10.1016/s0006-3223(00)01109-4

Magleby KL, Pallotta BS, Terrar DA. The effect of (+)-tubocurarine on neuromuscular transmission during repetitive stimulation in the rat, mouse, and frog.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

J Physiol 1981; 312: 97–113.

doi: 10.1113/jphysiol.1981.sp013618

Maia MA, Sousa E. BACE-1 and gamma-secretase as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals (Basel)* 2019; 12(1): e41 (31 str.)

doi: 10.3390/ph12010041

Masson P, Carletti E, Nachon F. Structure, activities and biomedical applications of human butyrylcholinesterase. *Protein Pept Lett* 2009; 16(10): 1215–24.

doi: 10.2174/092986609789071207

Masson P, Legrand P, Bartels CF, Froment MT, Schopfer LM, Lockridge O. Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* 1997; 36(8): 2266–77.

doi: 10.1021/bi962484a

Matthews GG. *Cellular physiology of nerve and muscle*. 4th ed. Oxford : Blackwell publishing, 2003: 110–29.

Maurer SV, Williams CL. The cholinergic system modulates memory and hippocampal plasticity via its interactions with non-neuronal cells. *Front Immunol* 2017; 8: e1489 (14 str.)

doi: 10.3389/fimmu.2017.01489

Minic J, Chatonnet A, Krejci E, Molgó J. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol* 2003; 138(1): 177–87.

doi: 10.1038/sj.bjp.0705010

Mitrović A, Kljun J, Sosič I, et al. Organoruthenated nitroxoline derivatives impair tumor cell invasion through inhibition of cathepsin B activity. *Inorg Chem* 2019; 58(18): 12334–47.

doi: 10.1021/acs.inorgchem.9b01882

Molgó J, Lemeignan M, Peradejordi F, Lechat P. Presynaptic effects of aminopyridines on the neuromuscular junction of vertebrates. *J Pharmacol* 1985; 16(suppl. 2): 109–44.

Molgó J, Lundh H, Thesleff S. Potency of 3,4-diaminopyridine and 4-aminopyridine on mammalian neuromuscular transmission and the effect of pH changes.

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Eur J Pharmacol 1980; 61(1): 25–34.

doi: 10.1016/0014-2999(80)90378-7

Moodie LWK, Sepčić K, Turk T, Frangež R, Svenson J. Natural cholinesterase inhibitors from marine organisms. Nat Prod Rep 2019; 36(8): 1053–92.

doi: 10.1039/c9np00010k

Munteanu AC, Uivarosi V. Ruthenium complexes in the fight against pathogenic microorganisms. An extensive review. Pharmaceutics 2021; 13(6): e874 (51 str.)

doi: 10.3390/pharmaceutics13060874

Mushtaq G, Greig NH, Khan JA, Kamal MA. Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus.

CNS Neurol Disord Drug Targets 2014; 13(8): 1432–9.

doi: 10.2174/1871527313666141023141545

Nachon F, Ehret-Sabatier L, Loew D, Colas C, van Dorsselaer A, Goeldner M. Trp82 and Tyr332 are involved in two quaternary ammonium binding domains of human butyrylcholinesterase as revealed by photoaffinity labeling with [3H]DDF. Biochemistry 1998; 37(29): 10507–13.

doi: 10.1021/bi980536l

Nazarov AA, Hartinger CG, Dyson PJ. Opening the lid on piano-stool complexes: an account of ruthenium(II)-arene complexes with medicinal applications.

J Organomet Chem 2014; 751: 251–60.

doi:10.1016/J.JORGANCHEM.2013.09.016

Okonjo KO, Kuhlmann J, Maelicke A. A second pathway of activation of the Torpedo acetylcholine receptor channel. Eur J Biochem 1991; 200(3): 671–7.

doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16231.x

Pilger C, Bartolucci C, Lamba D, Tropsha A, Fels G. Accurate prediction of the bound conformation of galanthamine in the active site of *Torpedo californica* acetylcholinesterase using molecular docking. J Mol Graph Model 2001; 19(3/4): 288–96, 374–8.

doi: 10.1016/s1093-3263(00)00056-5

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology.

Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2011; 155(3): 219–29.

doi: 10.5507/bp.2011.036

Puckett CA, Barton JK. Mechanism of cellular uptake of a ruthenium polypyridyl complex.

Biochemistry 2008; 47(45): 11711–6.

doi: 10.1021/bi800856t

Quick MW, Lester RA. Desensitization of neuronal nicotinic receptors.

J Neurobiol 2002; 53(4): 457–78.

doi: 10.1002/neu.10109

Radić Z, Pickering NA, Vellom DC, Camp S, Taylor P. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors.

Biochemistry 1993; 32(45): 12074–84.

doi: 10.1021/bi00096a018

Ristovski S, Uzelac M, Kljun J, et al. Organoruthenium prodrugs as a new class of cholinesterase and glutathione-S-transferase inhibitors.

ChemMedChem 2018; 13(20): 2166–76.

doi: 10.1002/cmdc.201800432

Ros E, Aleu J, Gomez de Aranda I, et al. Effects of bis(7)-tacrine on spontaneous synaptic activity and on the nicotinic ACh receptor of Torpedo electric organ.

J Neurophysiol 2001; 86(1): 183–9.

doi: 10.1152/jn.2001.86.1.183

Rosenberry TL, Brazzolotto X, Macdonald IR, et al. Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: a crystallographic, kinetic and calorimetric study. Molecules 2017; 22(12): e2098 (21 str.)

doi: 10.3390/molecules22122098.

Rozman KB, Araoz R, Sepčić K, Molgó J, Šuput D. Parazoanthoxanthin A blocks Torpedo nicotinic acetylcholine receptors. Chem Biol Interact 2010; 187(1/3): 384–7.

doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.016

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Safa N, Trobec T, Holland DC, et al. Spatial distribution and stability of cholinesterase inhibitory protoberberine alkaloids from *Papaver setiferum*. J Nat Prod 2022; 85(1): 215–24. doi: 10.1021/acs.jnatprod.1c00980

Saha P, Sen N. Tauopathy: a common mechanism for neurodegeneration and brain aging. Mech Ageing Dev 2019; 178: 72–9. doi: 10.1016/j.mad.2019.01.007

Saternos HC, Almarghalani DA, Gibson HM, et al. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. Physiol Genomics 2018; 50(1): 1–9. doi: 10.1152/physiolgenomics.00062.2017

Sava G, Capozzi I, Clerici K, Gagliardi G, Alessio E, Mestroni G. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. Clin Exp Metastasis 1998, 16(4): 371–9. doi: 10.1023/a:1006521715400

Sava G, Zorzet S, Turrin C, et al. Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. Clin Cancer Res 2003; 9(5): 1898–905.

Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). Mol Med Rep 2019; 20(2): 1479–87. doi: 10.3892/mmr.2019.10374

Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. Curr Opin Pharmacol 2005; 5(3): 293–302. doi: 10.1016/j.coph.2005.01.014

Silva MA, Kiametis AS, Treptow W. Donepezil inhibits acetylcholinesterase via multiple binding modes at room temperature. J Chem Inf Model 2020; 60(7): 3463–71. doi: 10.1021/acs.jcim.9b01073

Sine SM. End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease. Physiol Rev 2012; 92(3): 1189–234. doi: 10.1152/physrev.00015.2011

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection.

Eur J Med Chem 2013; 70: 165–88.

doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.050

Singh R, Sadiq NM. Cholinesterase Inhibitors. In: StatPearls (online). Treasure Island : StatPearls Publishing 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544336/> (20. 04. 2022)

Slater CR. The structure of human neuromuscular junctions: some unanswered molecular questions. Int J Mol Sci 2017; 18(10): e2183 (18 str.)

doi: 10.3390/ijms18102183

Sodhi RK, Paul S. Metal complexes in medicine: an overview and update from drug design perspective. Canc Therapy Oncol Int J 2019; 14(2): e555883 (8 str.)

doi: 10.19080/CTOIJ.2019.14.555883

Soukup O, Winder M, Killi UK, et al. Acetylcholinesterase inhibitors and drugs acting on muscarinic receptors- potential crosstalk of cholinergic mechanisms during pharmacological treatment. Curr Neuropharmacol 2017; 15(4): 637–53.

doi: 10.2174/1570159X14666160607212615

Sundaraneedi MK, Tedla BA, Eichenberger RM, et al. Polypyridylruthenium(II) complexes exert anti-schistosome activity and inhibit parasite acetylcholinesterases.

PLoS Negl Trop Dis 2017; 11(12): e0006134 (21 str.).

doi: 10.1371/journal.pntd.0006134

Sussman JL, Harel M, Frolov F, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. Science 1991; 253(5022): 872–9.

doi: 10.1126/science.1678899

Tansey EM. Henry Dale and the discovery of acetylcholine.

C R Biol 2006; 329(5/6): 419–25.

doi: 10.1016/j.crv.2006.03.012.

Taylor P, Radić Z. The cholinesterases: from genes to proteins.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 1994; 34: 281–320.

doi: 10.1146/annurev.pa.34.040194.001433

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Trobec T, Sepčić K, Žužek MC, et al. Fine tuning of cholinesterase and glutathione-S-transferase activities by organoruthenium(II) complexes.

Biomedicines 2021; 9(9): e1243 (16 str.)

doi: 10.3390/biomedicines9091243

Trobec T, Žužek MC, Sepčić K, et al. Structural and functional characterization of an organometallic ruthenium complex as a potential myorelaxant drug. Biomed Pharmacother 2020; 127: e110161 (11 str.)

doi: 10.1016/j.biopha.2020.110161

Trondl R, Heffeter P, Kowol CR, Jakupec MA, Berger W, Keppler BK. NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application.

Chem Sci 2014; 5(8): 2925–32.

doi: 10.1039/C3SC53243G

Tsim K, Soreq H. Acetylcholinesterase: old questions and new developments. Front Mol Neurosci 2012; 5: e101 (2 str.)

doi: 10.3389/fnmol.2012.00101

Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: insights from *Torpedo* postsynaptic membranes.

Q Rev Biophys 2013; 46(4): 283–322.

doi: 10.1017/S0033583513000061

Verschuuren JJ, Huijbers MG, Plomp JJ, et al. Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4. Autoimmun Rev 2013; 12(9): 918–23.

doi: 10.1016/j.autrev.2013.03.001

Viganor L, Howe O, McCarron P, McCann M, Devereux M. The antibacterial activity of metal complexes containing 1,10-phenanthroline: potential as alternative therapeutics in the era of antibiotic resistance. Curr Top Med Chem 2017; 17(11): 1280–302.

doi: 10.2174/1568026616666161003143333

Volpato D, Holzgrave U. Designing hybrids targeting the cholinergic system by modulating the muscarinic and nicotinic receptors: a concept to treat Alzheimer's disease. Molecules

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

2018; 23(12): e3230 (28 str.)

doi: 10.3390/molecules23123230

Vyas NA, Bhat SS, Kumbhar AS, et al. Ruthenium(II) polypyridyl complex as inhibitor of acetylcholinesterase and A β aggregation. *Eur J Med Chem* 2014; 75: 375–81.

doi: 10.1016/j.ejmech.2014.01.052

Wang F, Habtemariam A, van der Geer EP, et al. Controlling ligand substitution reactions of organometallic complexes: tuning cancer cell cytotoxicity.

Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(51): 18269–74.

doi: 10.1073/pnas.0505798102

Weiner L, Shnyrov VL, Konstantinovskii L, Roth E, Ashani Y, Silman I. Stabilization of *Torpedo californica* acetylcholinesterase by reversible inhibitors.

Biochemistry 2009; 48(3): 563–74.

doi: 10.1021/bi801196y

Witzemann V, Stein E, Barg B, et al. Primary structure and functional expression of the α -, β -, γ -, δ - and ϵ - subunits of the acetylcholine receptor from rat muscle.

Eur J Biochem 1990; 194(2): 437–48.

doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15637.x

Wood SJ, Slater CR. Safety factor at the neuromuscular junction.

Prog Neurobiol 2001; 64(4): 393–429.

doi: 10.1016/s0301-0082(00)00055-1

Yousuf I, Bashir M, Arjmand F, Tabassum S. Advancement of metal compounds as therapeutic and diagnostic metallodrugs: current frontiers and future perspectives. *Coord Chem Rev* 2021; 445: e214104 (30 str.)

doi: 10.1016/j.ccr.2021.214104

Zeglis BM, Pierre VC, Barton JK. Metallo-intercalators and metallo-insertors.

Chem Commun (Camb) 2007; (44): 4565–79.

doi: 10.1039/b710949k

T. Trobec: Interakcije novih rutenijevih organokovinskih kompleksov s sesalskim holinergičnim sistemom.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Zeng L, Gupta P, Chen Y, et al. The development of anticancer ruthenium(ii) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. *Chem Soc Rev* 2017; 46(19): 5771–804.
doi: 10.1039/c7cs00195a

Zoli M, Pucci S, Vilella A, Gotti C. Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol* 2018; 16(4): 338–49.
doi: 10.2174/1570159X15666170912110450

Zoroddu MA, Aaseth J, Crisponi G, Medici S, Peana M, Nurchi VM. The essential metals for humans: a brief overview. *J Inorg Biochem* 2019; 195: 120–9.
doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013