

UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

**VPLIV RUTENIJEVE SPOJINE C1a NA FUNKCIJO  
PERIFERNEGA ŽIVČNO-MIŠIČNEGA SISTEMA**  
**EFFECT OF RUTHENIUM COMPOUND C1a ON  
PERIPHERAL NEUROMUSCULAR SYSTEM  
FUNCTION**

Tomaž Trobec

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 577.15:612.741:546.95:591.181(043.2)

**VPLIV RUTENIJEVE SPOJINE C1a NA FUNKCIJO  
PERIFERNEGA ŽIVČNO-MIŠIČNEGA SISTEMA**  
**EFFECT OF RUTHENIUM COMPOUND C1a ON  
PERIPHERAL NEUROMUSCULAR SYSTEM FUNCTION**

Tomaž Trobec

Delo je bilo pripravljeno v skladu s pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom doc. dr. Monike C. Žužek na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2018

## IZVLEČEK

Ključne besede: Rutenij – kemija; organokovinske spojine; holinesterazni inhibitorji; nikotinski receptorji; membranski potenciali – fiziologija; mišična kontrakcija; živčno mišični stik; motorična ploščica; elektrofiziologija

Na živčno-mišičnih preparatih mišijih hemidiafragem smo z uporabo elektrofizioloških metod proučevali vpliv nove organorutenijeve spojine  $[(\eta^6-p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{pyrithionato})\text{Cl}]$  (C1a), sintetičnega zaviralca humane acetilholinesteraze (AChE), na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema. Želeli smo ugotoviti ali C1a v farmakoloških koncentracijah vpliva na živčno-mišični prenos v motorični ploščici, ki je holinergična sinapsa. C1a v 38  $\mu\text{M}$  koncentraciji, ki v pogojih *in vitro* popolnoma zavre humano AChE, ne vpliva na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema. Medtem ko v izredno visokih, suprafarmakoloških koncentracijah (113 in 227  $\mu\text{M}$ ), C1a značilno zmanjša tako posredno kot tudi neposredno izvano enostavno in tetanično mišično kontrakcijo. Pri teh koncentracijah deluje C1a tudi miotoksično. Opisani učinki C1a se pojavijo v odvisnosti od časa in koncentracije. Poleg opisanih učinkov C1a v suprafarmakoloških koncentracijah tudi značilno zmanjša membranski potencial v mirovanju, amplitudo potencialov motorične ploščice (PMP), amplitudo spontanih miniaturnih potencialov motorične ploščice (MPMP) in poveča frekvenco MPMP. C1a podaljša razpolovni čas padajoče faze PMP in skrajša razpolovni čas padajoče faze MPMP. Padec amplitude PMP in MPMP mišičnih vlaken je povezan z znatnim zmanjšanjem membranskega potenciala mišičnih vlaken v mirovanju. Dobljeni rezultati so pomembni, saj nekateri zaviralci AChE lahko vplivajo na živčno-mišični prenos in privedejo do neželenih stranskih učinkov. Iz rezultatov lahko sklepamo, da C1a v farmakoloških koncentracijah ne vpliva na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema. Zaradi zaviralne aktivnosti na AChE in širokega predkliničnega terapevtskega potenciala je spojina C1a zanimiva za nadaljnje raziskave, saj bi jo v terapevtske namene, kot zaviralca AChE, lahko uporabljali tako v veterinarski kot tudi humani medicini.

## ABSTRACT

**Keywords:** Ruthenium – chemistry; organometallic compounds; cholinesterase inhibitors; receptors, nicotinic; membrane potentials – physiology; muscle contraction; neuromuscular junction; motor endplate; electrophysiology

The effects of novel synthetic organoruthenium compound  $[(\eta^6-p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{pyrithionato})\text{Cl}]$  (C1a), a potent inhibitor of human acetylcholinesterase (AChE), were studied on isolated mouse phrenic nerve-hemidiaphragm muscle preparations using electrophysiological approaches in order to determine whether C1a interfere with cholinergic transmission in endplate. At concentration of 38  $\mu\text{M}$  that completely abolishes the activity of human AChE *in vitro*, C1a did not induce any undesirable response on the peripheral neuromuscular system. However, at suprapharmacological concentrations (113 and 227  $\mu\text{M}$ ), C1a significantly inhibited nerve-evoked and directly elicited single twitch contractions as well as tetanic muscle contractions. At these concentrations, C1a also appears to be myotoxic, as indicated by the development of muscle contracture. Neuromuscular blockade and contracture were concentration- and time-dependent. At the suprapharmacological concentrations, C1a markedly decreased resting membrane potentials, reduced the amplitude of endplate potentials (EPPs) and miniature endplate potentials (MEPPs), while the frequency of MEPPs was increased. C1a prolonged EPPs and shortened MEPPs half-decay time. Changes in the EPPs and MEPPs amplitudes were associated with considerable reduction of muscle fibres resting membrane potentials. This data is of great importance as the interference of therapeutic AChE drugs with the neuromuscular transmission can be problematic and lead to unwanted side effects. In conclusion, our results showed no undesirable effects of C1a on the peripheral neuromuscular system at pharmacologically relevant concentration. C1a compound with AChE-inhibiting properties and a wide preclinical therapeutic potential is therefore interesting for further studies and can potentially be applicable in veterinary and human medicine as an AChE- inhibiting drug.

## KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK.....	II
ABSTRACT .....	III
KAZALO VSEBINE.....	IV
KAZALO SLIK.....	VI
KAZALO TABEL.....	VII
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....	VIII
1    UVOD .....	1
1.1    Opredelitev problema .....	1
1.2    Cilj raziskovanja.....	2
1.3    Delovne hipoteze .....	3
2    PREGLED LITERATURE.....	4
2.1    Rutenijeve spojine .....	4
2.2    Zgradba in funkcija živčno-mišičnega stika potencialne tarče zaviralcev AChE .....	6
2.3    Acetilholinesteraza v motorični ploščici .....	10
2.4    Zaviralcji acetilholinesteraze .....	12
2.4.1    Nekateri zaviralcji AChE v klinični uporabi .....	13
2.4.1.1    Donepezil .....	13
2.4.1.2    Galantamin .....	13
2.4.1.3    Rivastigmin in neostigmin .....	14
2.4.1.4    Organofosfati .....	14
2.5    Nikotinski acetilholinski receptor (nAChR).....	15
2.5.1    Postsinaptični mehanizem živčno-mišičnega zaviranja.....	17
3    MATERIALI IN METODE .....	18
3.1    Materiali .....	18
3.2    Metode.....	19
3.2.1    Priprava živčno-mišičnega preparata.....	19
3.2.2    Meritve vpliva C1a na izometrično mišično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši.....	19
3.2.3    Meritve vpliva C1a na membranske potenciale mišičnih vlaken izoliranih hemidiafragem miši .....	21
3.2.4    Analize podatkov in statistika.....	22

4	REZULTATI.....	23
4.1	Vpliv C1a na izometrično mišično kontrakcijo izoliranih hemidifragem miši .....	23
4.1.1	Vpliv C1a na posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo.....	27
4.1.2	Vpliv C1a na neposredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo.....	29
4.2	Vpliv C1a na tetanično mišično kontrakcijo .....	30
4.2.1	Vpliv C1a na posredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo .....	30
4.2.2	Vpliv C1a na neposredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo.....	31
4.3	Vpliv C1a na elektrofiziološke parametre mišičnih vlaken .....	32
4.3.1	Vpliv C1a na membranski potencial v mirovanju .....	32
4.3.2	Vpliv C1a na amplitudo potenciala motorične ploščice in razpolovni čas padajoče faze potenciala motorične ploščice .....	34
4.3.2.1	Vpliv C1a na amplitudo potenciala motorične ploščice .....	34
4.3.2.2	Vpliv C1a na razpolovni čas padajoče faze potenciala motorične ploščice .....	35
4.3.3	Vpliv C1a na miniaturalni potencial motorične ploščice in razpolovni čas padajoče faze miniaturalnega potenciala motorične ploščice .....	36
4.3.3.1	Vpliv C1a na amplitudo miniaturalnih potencialov motorične ploščice .....	36
4.3.3.2	Vpliv C1a na razpolovni čas padajoče faze miniaturalnega potenciala motorične ploščice .....	37
4.3.3.3	Vpliv C1a na frekvenco miniaturalnih potencialov motorične ploščice.....	38
5	RAZPRAVA .....	40
6	SKLEPI .....	48
7	ZAHVALA .....	49
8	LITERATURA.....	50

## KAZALO SLIK

Slika 1: Motorična ploščica.....	10
Slika 2: Struktura sesalske AChE.....	12
Slika 3: Struktura mišičnega tipa nAChR.....	17
Slika 4: Rutenijeve spojina $[(\eta_6\text{-p-cymene})\text{Ru}(\text{pyrithionato})\text{Cl}]$ .....	18
Slika 5: Učinek EtOH (topila), 3 $\mu\text{M}$ neostigmina ter 113 in 227 $\mu\text{M}$ koncentracije C1a na izometrično mišično kontrakcijo in mišično tenzijo v mirovanju v odvisnosti od časa.....	25
Slika 6: Učinek C1a na posredno in neposredno izzvano enostavno in tetanično mišično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši.....	27
Slika 7: Učinek C1a na amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši.....	28
Slika 8: Učinek C1a na amplitudo neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidifragem miši.....	29
Slika 9: Učinek C1a na posredno izzvano tetanično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši.....	30
Slika 10: Učinek C1a na neposredno izzvano tetanično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši.....	31
Slika 11: Učinek C1a na membranski potencial v mirovanju ( $rV_m$ ) skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti časa in koncentracije.....	33
Slika 12: Učinek C1a na potencial motorične ploščice skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.....	34
Slika 13: Učinek C1a na razpolovni čas padajoče faze potenciala motorične ploščice skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.....	35
Slika 14: Učinek C1a na amplitudo miniaturalnih potencialov motorične ploščice skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.....	36
Slika 15: Učinek C1a na razpolovni čas padajoče faze miniaturalnega potenciala motorične ploščice skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.....	37
Slika 16: Učinek C1a na frekvenco miniaturalnih potencialov motorične ploščice skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.....	39

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Vpliv C1a na elektrofiziološke parametre motorične ploščice v mišji hemidiafragmi.

.....46

## SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AB - Alzheimerjeva bolezen

A $\beta$  - amiloid- $\beta$

AChE - acetilholinesteraza

ACh - acetilholin

AP - akcijski potencial

APL - alosterični potencirajoči ligand

AS - anionsko mesto katalitičnega anionskega mesta encima acetilholinesteraze

BCh - butirilholin

BuChE - butirilholinesteraza

CAS - katalitično anionsko mesto encima acetilholinesteraze

GST - glutation S-transferaza

hGST - človeška placentarna glutation S-transferaza

IC<sub>50</sub> - srednja zaviralna koncentracija

C1a - [( $\eta^6$ -*p*-cymene)Ru(pyrithionato)Cl]

KP1019 - imidazol-trans-bis(1H-imidazol)-tetraklororutenat

K-R - Krebs-Ringerjeva raztopina

MG - Miastenija gravis

MPMP - miniaturalni potencial motorične ploščice

MT - mišična tenzija v mirovanju

nAChR - nikotinski holinergični receptor

NAMI-A - imidazol-trans-dimetilsulfoksid-imidazol-tetraklororutenat; ImH[trans-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)Im]

NFP - nevrofibrilarne pentlje

PAS - periferno anionsko mesto encima acetilholinesteraze

PMP - potencial motorične ploščice

rV<sub>m</sub> - membranski potencial v mirovanju; *resting voltage membrane*

5-HT - nevrotransmiter 5-hidroksi triptamin

## 1 UVOD

### 1.1 Opredelitev problema

Nove rutenijeve spojine so se v zadnjih nekaj letih izkazale kot potencialno zelo zanimiva in učinkovita citotoksična zdravila za zdravljenje rakavih obolenj. Od obstoječih citotoksičnih zdravil se razlikujejo po svojem selektivnem protitumorskem delovanju in nizki sistemski toksičnosti. Nekatere izmed rutenijevih spojin delujejo tudi kot zaviralci acetilholinesteraze (AChE). Zaradi tega bi bile te spojine lahko potencialno uporabne za simptomatsko zdravljenje nekaterih nevrodegenerativnih bolezni kot je npr. Alzheimerjeva bolezen (AB), pri kateri, v nekaterih področjih v osrednjem živčevju zaradi progresivnega propada holinergičnih nevronov, obstaja pomanjkanje acetilholina (ACh). Molekule z zavirnim učinkom na AChE, ki ne prehajajo skozi krvno-možgansko bariero, pa so zanimive za simptomatsko zdravljenje avtoimune bolezni Miastenije gravis (MG) in lokalno zdravljenje povečanega intraokularnega tlaka (glavkoma). AB je najpogostejša oblika s starostjo povezane nevrodegenerativne demence, ki prizadene veliko število ljudi po vsem svetu. Nedavno je bilo ugotovljeno, da rutenijeva spojina  $[(\eta^6-p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{pyrithionato})\text{Cl}]$  (C1a) kompetitivno zavira človeško rekombinantno AChE ter iz električne jegulje izolirano AChE, ki hidrolizirata nevrotransmiter ACh v sinapsah osrednjega in perifernega živčnega sistema. Prav zato obstaja potencialna možnost njene uporabe v klinične namene za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, za katere je značilna zmanjšana sinteza in sproščanje ACh. Z uporabo zaviralcev AChE se pri pacientih z nevrodegenerativno boleznijo lahko omili znake bolezni in izboljša njihovo kognitivno sposobnost. Vendar pa imajo snovi z zavirnim učinkom na AChE lahko tudi dvojno delovanje, saj lahko hkrati zaviralno delujejo na nikotinske holinergične receptorje (nAChR) v osrednjem živčevju in perifernem živčno-mišičnem sistemu. Posledično lahko nastopi neželen učinek paralize skeletnih mišičnih vlaken. Zato je bil najpomembnejši cilj raziskave ugotoviti morebitne neželene učinke C1a na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema, ki bi lahko omejili njen potencialno uporabo v klinične namene.

## 1.2 Cilj raziskovanja

Cilj Prešernove naloge je bil z elektrofiziološkimi metodami (meritev membranskih potencialov skeletnih mišičnih vlaken in izometrične kontrakcije) proučiti morebitne fiziološke, farmakološke in toksikološke vplive C1a na periferni živčno-mišični sistem *in vitro*, tj. na izoliranih živčno-mišičnih preparatih hemidiafragem miši. Na podlagi analize rezultatov meritev smo ugotavljali njene učinke ter mehanizme ugotovljenih učinkov. Najpomembnejši cilj raziskave pa je bil poiskati odgovor na vprašanje ali C1a v farmakoloških koncentracijah vpliva na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema.

### 1.3 Delovne hipoteze

1. Rutenijeva spojina C1a zavira delovanje encima AChE v motorični ploščici *in vitro*.
2. C1a v odvisnosti od koncentracije vpliva na funkcijo skeletnih mišic.
3. C1a ima dvojno delovanje in hkrati zavira tudi nAChR mišičnega tipa.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 Rutenijeve spojine

Rutenijeve spojine uvrščamo v skupino kovinskih kompleksov (Barry in Sadler, 2014). Biološka aktivnost kovinskih kompleksov je odvisna i) od vrste kovine in njenega oksidacijskega stanja; ii) vrste in števila ligandov ter njihove koordinacijske geometrije (Barry in Sadler, 2014). Francis Dwyer je v 50-ih letih prejšnjega stoletja prvi opisal bakteriostatično in protivirusno delovanje celotne družine tris (polipiridil) rutenijevih kompleksov (Puckett in Barton, 2008). Z odkritjem protitumorskega zdravila cisplatina je na področju humane medicine naglo narasel razvoj in uporaba protitumorskih snovi na podlagi platine. Kljub njihovi dobrni učinkovitosti so se, zaradi sistemski toksičnosti in nespecifičnega delovanja, pojavili stranski učinki, ki so močno omejili njihovo uporabo kot protitumorska zdravila. Poleg tega se je razvila tudi odpornost tumorskih celic na zdravila, izdelana na podlagi platine (Kljun in sod., 2016). Zato so razvili spojine, ki v svoji strukturi vsebujejo druge kovine. Kot zelo obetavne so se pokazale rutenijeve in osmijeve spojine (Barry in Sadler, 2014). V zadnjem času je bilo sintetiziranih veliko novih rutenijevih spojin, ki so bile testirane za potencialno terapevtsko uporabo (Puckett in Barton, 2008). Rutenijeve spojine delujejo selektivno protitumorsko in imajo nizko sistemsko toksičnost (Kostova, 2006). NAMI-A (imidazol-trans-dimetilsulfoksido-imidazol-tetraklororutenat;  $\text{ImH}[\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})\text{Im}]$ ) in KP1019 (imidazol-trans-bis(1H-imidazol)-tetraklororutenat) sta rutenijevi protitumorski spojini, ki so ju tudi klinično preizkusili (Puckett in Barton, 2008). Mehanizem citotoksičnega delovanja temelji na njuni interakciji s celičnimi komponentami, ki privede do izgube malignosti celic ali pa sproži apoptozo (NAMI-A preprečuje invazijo celic in metastaziranje; KP1019 sproži apoptozo preko intrinzične mitohondrijske poti) (Bergamo in Sava, 2011). NAMI-A je rutenijev (III) kompleks, ki zavira razvoj metastaz solidnih tumorjev. Mehanizem temelji na njegovem antiangiogenem delovanju in zaviranju določenih metaloproteinaz (Kostova, 2006). V klinično preizkušanje prve stopnje snovi KP1019 je bilo vključenih 8 bolnikov z napredovalimi solidnimi tumorji brez terapevtskih možnosti, ki so snov prejemali intravensko v odmerkih od 25 do 600 mg dvakrat tedensko, v obdobju treh tednov. Zaradi neželenih dogodkov, ki niso bili posledica aplikacije preizkušane snovi, so iz študije izključili dva bolnika. Pri petih bolnikih, od preostalih

šestih, je bila opazna stabilizacija bolezni po 8-ih do 10-ih tednih ne glede na odmerek. V povezavi z zdravljenjem je bila opažena le blaga toksičnost (Hartinger in sod., 2008).

Nekatere rutenijeve spojine delujejo tudi kot zaviralci AChE in/ali zaviralci agregacije peptidov amiloida- $\beta$  ( $A\beta$ ) (Vyas in sod., 2014). Zaradi teh lastnosti bi lahko bile te spojine potencialno uporabne za simptomatsko zdravljenje AB, ki je najpogostejsa oblika s starostjo povezane nevrodegenerativne demence ter prizadene veliko število ljudi po vsem svetu. Zanjo je značilna nizka raven ACh, nastanek znotrajceličnih nevrofibrilarnih pentelj (NFP), nastanek in odlaganje zunajceličnih senilnih plakov, oksidativni stres in izguba holinergičnih nevronov v možganih (Palop in Mucke, 2010; Jagust, 2013; Singh in sod., 2013; Hayne in sod., 2014; Li in sod., 2017). Senilni plaki so sestavljeni iz netopnih skupkov peptida  $A\beta$ , dolžine od 39 do 42 aminokislinskih ostankov. Peptidi  $A\beta$  nastajajo s proteolizo amiloidnega prekurzorskega proteina (angl. *amyloid precursor protein*). Neuravnoteženost med proizvodnjo in odstranjevanjem peptida  $A\beta$  povzroči njegovo akumulacijo v obliki oligomerov, protofibril, fibril in zunajceličnih plakov  $A\beta$  v možganih. Amiloidna hipoteza pravi, da plaki  $A\beta$  in/ali njihovi predhodniki sprožijo kaskado dogodkov, ki pripeljejo do sinaptične disfunkcije, mikroglioze in izgube holinergičnih nevronov. Ker senilni plaki niso dosledno v korelaciji s kognitivno prizadetostjo, so nekateri mnenja, da so topni oligomeri  $A\beta$  odgovorni za odmiranje nevronov (Hayne in sod., 2014), medtem ko drugi menijo, da senilni plaki na nevrone delujejo toksično (Vyas in sod., 2014). Stopnja kognitivne prizadetosti korelira s količino oligomerov v možganih in ne s celokupno količino  $A\beta$ , kar potrjuje dejstvo, da so topni oligomeri za nevrone najbolj toksična oblika (Querfurth in LaFerla, 2010). Za nastanek znotrajceličnih NFP je odgovorna patološka oblika proteina tau. Protein tau je z mikrotubuli povezan protein, ki je v fizioloških pogojih dobro topen in ima ključno vlogo pri polimerizaciji in stabilizaciji mikrotubulov (Duan in sod., 2017). NFP sestavlja snopi hiperfosforiliranega proteina tau, ki se zaradi hiperfosforilacije odcepi od mikrotubulov (Hayne in sod., 2014). Post-translacijske modifikacije, zlasti hiperfosforilacija proteina tau, naj bi bile ključni dejavnik dimerizacije monomerov tau in nastanka oligomerov tau. To povzroči agregacijo proteina tau v parne spiralne filamente. NFP tako nastanejo z oblikovanjem snopov parnih spiralnih filamentov, ki se kopičijo v citoplazmi nevronov (Chong in sod., 2018). Znanstveni dokazi kažejo, da same NFP verjetno ne povzročijo nevrotoksičnosti, dokazano pa je, da so tau oligomeri najbolj toksična oblika proteina tau, ki imajo za posledico motnjo v delovanju sinapse pri AB (Fa in sod., 2016). Poleg tega so študije *in vivo* in *in vitro* pokazale, da so lahko opisane spremembe

prisotne v različnih področjih možganov (Clavaguera in sod., 2009). Hiperfosforilacija proteina tau se v končni fazi odraža z izgubo strukturne integritete mikrotubulov s sočasno motenim aksonalnim transportom, kar privede do motenj v delovanju sinapse (Hayne in sod., 2014). Število NFP je patološki označevalec stopnje AB. Nenazadnje je v patologiji AB pomembno dejstvo, da je periferno anionsko mesto (angl. *peripheral anionic site*; PAS) AChE vključeno v pospeševanje agregacije A $\beta$  (Vyas in sod., 2014). Pri pacientih z AB ima AChE torej dvojno vlogo. Njena zvišana aktivnost vodi do povečane razgradnje ACh, kar povzroči upad ravni ACh v možganih in posledično izgubo kognitivnih funkcij. Poleg tega pa je encim delno vključen tudi v nastajanje senilnih plakov in NFP. Dokazano je bilo, da AChE spodbuja agregacijo peptidov A $\beta$  in posledično nastanek senilnih plakov (Singh in sod., 2013). Uporaba zaviralcev AChE je eden izmed načinov, ki lahko delno upočasni napredovanje bolezni s podaljšanjem obstojnosti ACh v sinaptičnih špranjah. Zavirci AChE kot so galantamin, rivastigmin, takrin, donepezil ter še nekateri drugi, so najpogosteje uporabljene snovi za simptomatsko zdravljenje AB (Vyas in sod., 2014). Zavirci, ki kažejo dvojno vezavo z AChE, so nova terapevtska sredstva za simptomatsko zdravljenje AB (Singh in sod., 2013). Vežejo se tako na PAS, kot tudi na katalitično anionsko mesto (angl. *catalytic anionic site*; CAS) AChE in hkrati zavrejo njeno delovanje ter upočasnijo agregacijo A $\beta$  (Singh in sod., 2013; Vyas in sod., 2014; Hamulakova in sod., 2017). V to skupino spadata dva rutenijeva (II) polipiridil kompleksa: [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>(2+)</sup> in [Ru(phen)<sub>2</sub>(bxbg)]<sup>(2+)</sup> (Vyas in sod., 2014). Ključno pa je dejstvo, da z napredovanjem AB začne raven AChE v možganih upadati (55–67 odstotni upad normalnih vrednosti), vendar se to kompenzira s povečanjem ravni encima butirilholinesteraze (BuChE) (120 odstotno povečanje normalnih vrednosti), ki ima pomembno vlogo v poznejših fazah AB. Za učinkovito simptomatsko zdravljenje bolezni je zato ključen razvoj spojin, ki lahko hkrati zavirajo delovanje AChE in BuChE (Li in sod., 2017).

## 2.2 Zgradba in funkcija živčno-mišičnega stika, potencialne tarče zaviralcev AChE

Živčno-mišični stik ali motorična ploščica (angl. *neuromuscular junction*) je sinapsa med motoričnim nevronom in skeletno mišično celico (Slika 1) (Ali in Savarese, 1976). Je vedno ekscitatorna kemična sinapsa, v kateri se dražljaj z nevrona preko nevrotransmiterja ACh prenese na mišično celico (Matthews, 2003). Depolarizacija motoričnega nevrona sproži

eksocitozo nevrottransmiterja ACh iz živčnega končiča, ki se veže na nAChR mišičnega tipa na postsinaptični membrani. Ti receptorji so od liganda odvisni neselektivni kationski kanali. Vezava ACh na nAChR na postsinaptični membrani povzroči konformacijske spremembe in odpiranje por, ki so prepustne za natrijeve in kalijeve ione. Tok  $\text{Na}^+$  v celico, ki je bistveno večji kot tok  $\text{K}^+$  v nasprotni smeri, povzroči depolarizacijo postsinaptične membrane motorične ploščice oziroma potencial motorične ploščice (PMP), ta pa nastanek akcijskega potenciala (AP) mišične celice, ki aktivira njeno krčenje (Slater, 2017).

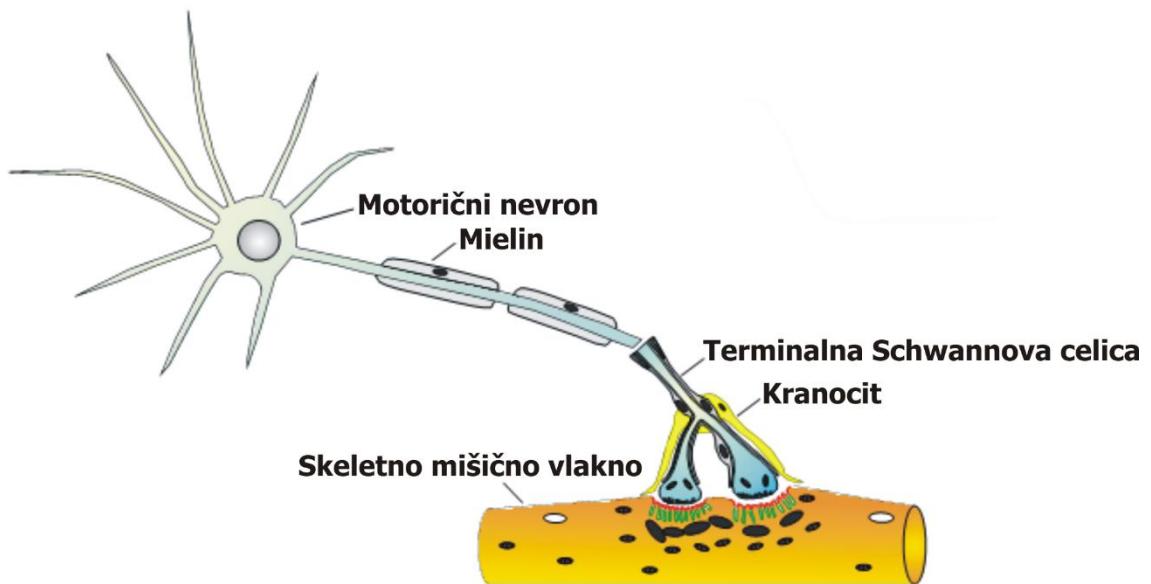
Motorična ploščica je zgrajena iz presinaptičnega dela, sinaptične špranje in postsinaptičnega dela (Matthews, 2003). V območju motorične ploščice najdemo tri tipe celic: motorični nevron, mišično celico in terminalno Schwannovo celico (Ghai in sod., 2006). Pri glodavcih lahko najdemo tako v prenatalnem kot tudi v postnatalnem obdobju še četrti tip celic, imenovan kranocit (Court in sod., 2008; Sugiura in Lin, 2011). Motorični nevrone izhajajo iz ventralnega roga hrbtenjače ali možganskega debla in potekajo po motoričnih živcih do mišice, ki jo oživčujejo in se v bližini mišičnih vlaken razvezijo do terminalnih vej (Hall in Sanes, 1993). Presinaptični del motorične ploščice je zgrajen iz betičasto zadebeljenega distalnega dela aksona motoričnega nevrona, ki ni mieliniziran, v njem pa se skladišči ACh (Ali in Savarese, 1976). Živčni terminal oz. končič je s strani prekrit s presinaptično Schwannovo celico, ki obdaja motorično ploščico ter jo s tem ločuje od zunajcelične tekočine, razteza pa se tudi naprej na mišično vlakno (Hall in Sanes, 1993; Ghai in sod., 2006). Terminalna Schwannova celica s tem, ko prekriva živčni končič, varuje živčni končič tako pred kemijskimi kot tudi mehanskimi dejavniki (Hall in Sanes, 1993). Ob poškodbah živčnega končiča sodeluje tudi pri fagocitozi in nato pri remodelirajuživčnega končiča (Birks in sod., 1960; Reynolds in Woolf, 1992). Odgovarja na AP aksona s prehodom kalcija v njeno notranjost, kar kaže tudi na to, da je občutljiva na električne signale. Prehod kalcija v terminalno Schwannovo celico vpliva na njeno funkcijo, npr. celica odgovori s fagocitozo pri denervirani motorični ploščici (Birks in sod., 1960; Jahromi in sod., 1992; Reist in Smith, 1992). Nenazadnje pa lahko tudi sintetizira in sprošča ACh, kar je bilo dokazano z denervacijo ter potrjuje dejstvo, da je zmožna prenosa signalov na mišično vlakno (Birks in sod., 1960). Vsako motorično ploščico odraslih glodavcev, poleg terminalne Schwannove celice, prekrivata eden ali dva kranocita. Njihova vloga pri nastajanju sinapse ni znana, dokazano pa je, da kranociti po denervaciji hitro proliferirajo in se razširijo na območje motorične ploščice, kar kaže, da imajo lahko vlogo pri preoblikovanju motorične ploščice ob poškodbah živca (Sugiura in Lin, 2011). Pomembno

dejstvo je, da pri sesalcih in večini višjih vretenčarjev posameznemu mišičnemu vlaknu pripada le ena motorična ploščica (Wood in Slater, 2001; Ghai in sod., 2006). Membrani živčnega končiča in mišičnega vlakna sta ločeni z ozko špranjo, imenovano sinaptična špranja. Ta je široka od približno 20 do 50 nm (Ghai in sod., 2006). Živčni končič vsebuje veliko število sinaptičnih mešičkov, ki vsebujejo nevrotransmiter ACh in se nahajajo okrog elektronsko gostih struktur presinaptične membrane. Ta mesta imenujemo aktivna področja (angl. *active zones*), ki predstavljajo mesto sproščanja nevrotransmiterja (Ghai in sod., 2006; Slater, 2017). V področju sinaptične špranje je postsinaptična membrana močno nagubana in oblikuje globoke invaginacije. To področje imenujemo tudi sinaptični žleb (angl. *synaptic gutter*) (Guyton in Hall, 2006). Postsinaptična membrana oblikuje primarne gube, znotraj katerih je večje število manjših sekundarnih gub (Haimovich in sod., 1987; Ghai in sod., 2006). Tako primarne kot sekundarne gube močno povečajo površino, na katero lahko deluje nevrotransmiter (Guyton in Hall, 2006). Vrhovi gub na postsinaptični membrani, ki mejijo na živčni končič, izražajo visoko raven nAChR, na katere se veže sproščeni ACh (Fertuck in Salpeter, 1974; Ghai in sod., 2006). V postsinaptični membrani, ki tvori dno gube, je veliko število od napetosti odvisnih natrijevih kanalov (Nav1s) (Haimovich in sod., 1987). Nevrotransmiter se v živčnem končiču sintetizira z acetilacijo holina ob prisotnosti encima holin-acetyltransferaze in acetil koencima A (Ali in Savarese, 1976). ACh se nahaja v citoplazmi v obliki manjših in večjih rezerv. Manjše rezerve predstavljajo mešički ACh, ki so membransko vezani in se lahko nemudoma sprostijo (angl. *immeadiatly available store* oz. IAS) (Ali in Savarese, 1976), njegove večje rezerve pa predstavljajo molekule ACh, ki se ne morejo direktno sprostiti in se nahajajo prosto v citoplazmi ali pa shranjene v prostih mešičkih (Ali in Savarese, 1976; Matthews, 2003). V živčnem končiču se število mešičkov ACh lahko močno zmanjša kot posledica dolgotrajne depolarizacije ali proženja velikega števila AP, kar povzroči sproščanje velikih količin ACh (Matthews, 2003). Vsak sinaptični mešiček vsebuje do 10000 molekul ACh, kar imenujemo tudi kvant (angl. *quantum*) (Ali in Savarese, 1976; Matthews, 2003; Ghai in sod., 2006; Slater, 2017).

Ko AP, ki se prevaja saltatorno vzdolž motoričnega nevrona, doseže živčni končič, depolarizira presinaptično membrano živčnega končiča. Posledica tega je odprtje od napetosti odvisnih kalcijevih kanalov, kar povzroči tok  $\text{Ca}^{2+}$  v živčni končič. Povečana raven  $\text{Ca}^{2+}$  v živčnem končiču sproži eksocitozo, pri čemer se sinaptični mešički zligejo s presinaptično membrano na mestih, ki jih imenujemo aktivna področja. Pri fuziji sinaptičnih mešičkov sodelujejo štirje

proteini: sinaptotagmin, sinaptobrevin, sintaksin in SNAP-25. Prva dva se nahajata na membrani sinaptičnega mešička, druga dva pa na citoplazemski strani membrane živčnega končiča. ACh, ki se pri tem sprosti v sinaptično špranjo, difundira do postsinaptične membrane, kjer se veže na nAChR (Matthews, 2003). Ob depolarizaciji živčnega končiča se sprosti med 200 in 400 kvantov ACh (Van der Kloot in Molgo, 1994), katerih učinki se seštevajo (Wood in Slater, 2001). Vezava ACh na  $\alpha$ -podenoti sproži konformacijsko spremembo nAChR. Ta omogoči tok  $\text{Na}^+$  v mišično vlakno in tok  $\text{K}^+$  iz njega v zunajcelični prostor ter nastanek PMP, ki ima amplitudo približno 35 mV in običajno preseže prag za nastanek AP. Odraz depolarizacije postsinaptične membrane je odpiranje Nav1s ter nastanek AP mišične celice. Ta se širi vzdolž sarkoleme in povzroči proženje dogodkov, ki privedejo do skrčenja mišičnega vlakna (Fatt in Katz, 1951; Wood in Slater, 2001; Matthews, 2003). Amplituda PMP je odvisna od števila sproščenih mešičkov ter s tem količine ACh. Od tega je odvisno tudi število aktiviranih nAChR. V prisotnosti snovi, ki zmanjšujejo sproščanje ACh, je zaradi tega amplituda PMP zmanjšana. Enako velja tudi za različne snovi, ki delujejo kot kompetitivni/nekompetitivni antagonisti nAChR. Nasprotno pa se ob prisotnosti zaviralcev AChE količina ACh znotraj sinaptične špranje poveča, zaradi česar se poveča amplituda PMP. Čez čas začne amplituda PMP, kot posledica desenzibilizacije nAChR, upadati (Katz in Thesleff, 1957a; Katz in Thesleff, 1957b). Poleg PMP pa se pojavljajo še spontane depolarizacije postsinaptične membrane amplitude  $\sim 1$  mV, ki nastanejo brez predhodnega presinaptičnega AP, in jih imenujemo miniaturni potenciali motorične ploščice (MPMP). V fizioloških pogojih se pri sesalskih motoričnih ploščicah pojavljajo z nizko frekvenco, približno 1 do 2-krat na sekundo (Matthews, 2003).

Samo nekatere izmed sproščenih ACh molekul se vežejo na nAChR, saj večino molekul nemudoma razgradi AChE, ki se, vezana na bazalno membrano postsinaptične membrane, nahaja v sinaptični špranji (Slater, 2017). AChE cepi estrsko vez ACh, zaradi česar nevrotransmiter razpade na acetat in holin. AChE ima zelo visoko aktivnost, saj ACh v sinaptični špranji razgradi v nekaj milisekundah (Silman in Sussman, 2005).



**Slika 1: Motorična ploščica.** Povzeto po Tintignac in sod., 2015

**Figure 1: Neuromuscular junction.** Adopted from Tintignac in sod., 2015

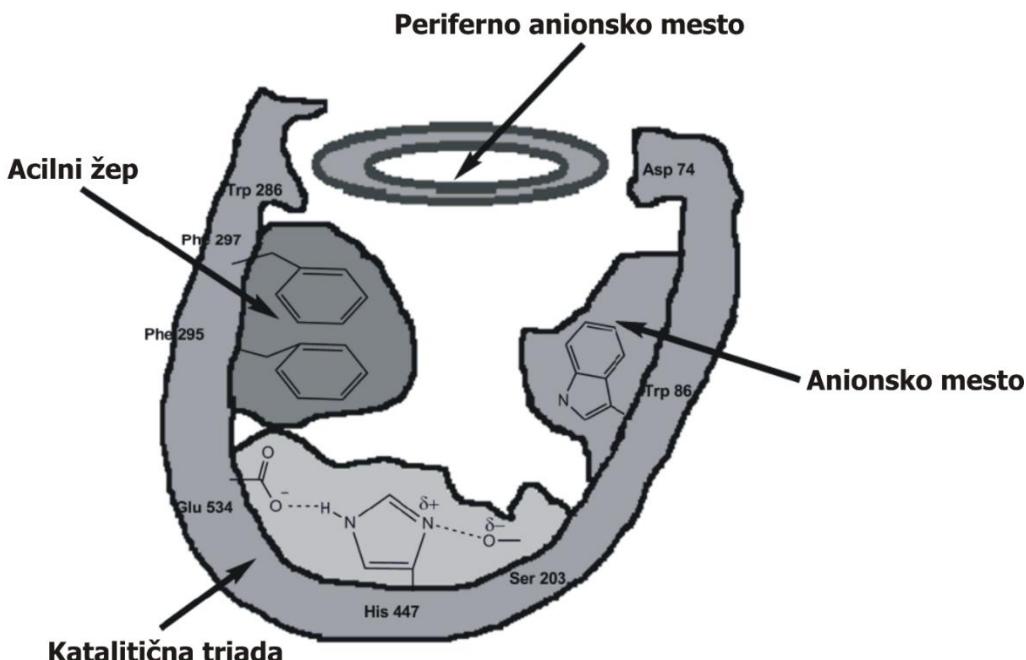
### 2.3 Acetilholinesteraza v motorični ploščici

AChE spada v družino serinskih esteraz. V to družino, poleg AChE, ki katalizira hidrolizo nevrotransmiterja ACh do acetata in holina (Bergmark, 1996; Darvesh in sod., 2008; Colović, in sod., 2013), spada tudi BuChE (Darvesh in sod., 2008; Colović in sod., 2013). AChE se nahaja v sinapsah osrednjega in perifernega živčnega sistema, tako v motoričnih kot tudi senzoričnih živčnih vlaknih. Nahaja se tudi v motorični ploščici ter holinergičnih sinapsah avtonomnega živčnega sistema (preganglionarna simpatična in parasimpatična vlakna ter postganglionarna parasimpatična vlakna). Nenazadnje je prisotna tudi v membranah eritrocitov (Colović in sod., 2013). Znano je, da je njena aktivnost večja v motoričnih, kot v senzoričnih nevronih (Massoulie in sod., 1993). BuChE pa se nahaja v krvni plazmi, jetrih in pankreasu (Colović, in sod., 2013). Zanjo je značilno, da hidrolizira umetni substrat butirilholin (BCh) hitreje kot ACh (Huang in sod., 2007), njena fiziološka funkcija pa še danes ni pojasnjena.

Encim AChE ima elipsoidno obliko  $45 \times 60 \times 65 \text{ \AA}$  (Colović in sod., 2013). V kristalizirani obliki ima obliko homodimera, v naravi pa ga najdemo v oblikih monomera, dimera in tetramera (Bergmark, 1996). Vsak monomer je sestavljen iz 12 strnjeneih beta-sodčkov, ki jih obdaja 14

alfa vijačnic (Bergmark, 1996; Colović in sod., 2013). AChE ima v svoji strukturi PAS in CAS (Slika 2). PAS gradi pet aminokislinskih ostankov pri vhodu v aktivni žep (angl. *active gorge*) in je obdan z desetimi kislimi aminokislinskimi ostanki, kar imenujemo obročasti elektrostatični motiv (Felder in sod., 1997). PAS služi kot vezno mesto za ACh (Szegletes in sod., 1999), ker domnevno povzroča konformacijske spremembe za lažji prehod ACh do CAS (Lawler, 1961). Ohranjeni aromatični aminokislinski ostanki PAS sodelujejo pri interakciji z kationi- $\pi$  s kvartarne skupine ACh (Greenblatt in sod., 2003; Houghton in sod., 2006), s čimer se poveča verjetnost, da se ACh pomakne proti CAS na dnu žepa (Silman in Sussman, 2008). Poleg tega PAS služi tudi kot vezno mesto kvartarnih ligandov, ki delujejo kot nekompetitivni zaviralci (npr. propidij) (Taylor in Lappi, 1975). Ko je ACh znotraj žepa, aromatski aminokislinski ostanki, ki pokrivajo približno 60 % površine lumna žepa (Sussman in sod., 1991), omogočijo njegovo drsenje proti CAS z zaporednimi kation- $\pi$  interakcijami (Quinn, 1987; Silman in Sussman, 2008). Znano je, da ima ACh pozitivni naboј, stene žepa pa imajo negativni naboј (Bergmark, 1996). Vhod v CAS je sestavljen iz aromatskih aminokislin, ki omogočajo večjo selektivnost za ACh (Pohanka, 2011). Na dnu ozkega in globokega žepa, 2 nm od površine encima, se nahaja CAS (Sussman in sod., 1991; Bergmark, 1996; Barak, in sod., 2009). CAS je sestavljen iz i) anionskega mesta (angl. *anionic site*; AS), katerega aminokislinski ostanki sodelujejo v kation- $\pi$  interakcijah s kvartarno skupino ACh, kar omogoča njegovo pravilno orientacijo; ii) estrskega mesta, kjer členi katalitične triade sodelujejo pri hidrolizi estrske vezi ACh; iii) oksianionske luknje, katere ostanki delujejo kot donorji H-vezi, s čimer stabilizira tetrahedralni intermedijat acetilholina in iv) acilnega žepa, ki vsebuje ostanke fenilalanina, ki imajo vlogo pri omejevanju dimenzije substratov, ki vstopajo v aktivno mesto (Sussman in sod., 1991; Greenblatt in sod., 2003; Houghton in sod., 2006). Podobno kot pri drugih serinskih hidrolazah, estrsko mesto sestavljajo členi katalitične triade. Pri sesalcih jo sestavlja aminokisline na položajih: Ser 203, His 447 in Glu 334 (Taylor, 2011). Pri AChE, prisotni v električnem organu skata, pa jo sestavlja Ser 200, His 440 in Glu 327. AS AChE, prisotne v električnem organu skata, sestavlja Trp 84, Tyr 121 in Phe 330 (Pohanka, 2011). Med interakcijo AS s kvartarnim dušikovim atomom molekule ACh, estrska podenota razcepi estrsko vez ACh, kar ima za posledico razcepitev molekule ACh na acetat in holin (Bergmark, 1996; Zimmerman in Soreq, 2006; Pohanka, 2011; Colović in sod., 2013). Temu sledi ponovni privzem holina s strani presinaptične membrane in ponovna uporaba

znotraj živčnega končiča za sintezo ACh, ki ga encim holin-acetyltransferaza sintetizira iz acetil koencima A in holina (Zimmerman in Soreq, 2006).



**Slika 2: Struktura sesalske AChE.** Povzeto po Colović in sod., 2013.

**Figure 2: Structure of mammal AChE.** Adopted from Colović in sod., 2013.

## 2.4 Zaviralci acetilholinesteraze

Zaviralci oz. inhibitorji encima AChE so snovi, ki upočasnijo oziroma popolnoma ustavijo njegovo delovanje (Bergmark, 1996). Zaradi tega pride do kopičenja ACh v sinaptični špranji (Macartney, 2013).

Zaviralce AChE lahko glede na način delovanja razdelimo v tri skupine (Barak in sod., 2009; Pohanka, 2011):

1. snovi, ki se vežejo na CAS in zavirajo AChE – bodisi estrsko mesto (karbamati, organofosfati) bodisi AS CAS (takrin, galantamin);
2. snovi, ki interagirajo z aromatskim žepom AChE (dekametonij, galantamin);
3. snovi, ki se vežejo na PAS in zavirajo AChE (huperzin, propidij, donepezil).

Poznamo naravne in sintetične zaviralce AChE. Glede na njihovo delovanje jih lahko razdelimo v dve skupini: tiste katerih delovanje je povratno (reverzibilni zaviralci AChE) in tiste katerih delovanje je nepovratno (ireverzibilni zaviralci AChE). Povratne zaviralce delimo na kompetitivne in nekompetitivne. Mesto vezave kompetitivnih zaviralcev je CAS (Weiner in sod., 2009), nekompetitivnih pa PAS (Weiner in sod., 2009; Colović in sod., 2013). Večina povratnih zaviralcev se uporablja v diagnostične in/ali terapevtske namene pri različnih boleznih, za katere je značilno pomanjkanje ACh: MG, AB, distenzija mehurja, po-operativni ileus, Parkinsonova bolezen in glavkom (Colović in sod., 2013). Nepovratni zaviralci, ki se kovalentno vežejo na serinski ostanek v estrskem mestu encima in tvorijo stabilne komplekse (Fukuto, 1990; Weiner in sod., 2009), so večinoma odgovorni za toksične učinke, v nekaterih primerih pa se lahko uporablajo tudi v terapevtske namene (Colović in sod., 2013). Nekatere organofosforne spojine se na primer uporablajo lokalno za zdravljenje kroničnega glavkoma, kjer zaradi dolgotrajno povišanega intraokularnega tlaka pride do poškodbe ganglijskih celic in glave optičnega živca. Nekateri zaviralci AChE delujejo, v odvisnosti od koncentracije, tudi na nAChR, ter modulirajo njihovo aktivnost (npr. galantamin) (Colović in sod., 2013).

## **2.4.1 Nekateri zaviralci AChE v klinični uporabi**

### **2.4.1.1 Donepezil**

Donepezil, piperidinski derivat (Liang in Tang, 2006) je selektivni povratni zaviralec AChE, katerega mehanizem delovanja je vezava na PAS (Pohanka, 2011; Colović in sod., 2013).

### **2.4.1.2 Galantamin**

Galantamin je naravni alkaloid izoliran iz zvončka (*Glanthus woronowii*). Deluje kot selektivni, kompetitivni, hitro reverzibilni zaviralec AChE z vezavo na AS znotraj CAS ter aromatični žep (Pilger in sod., 2001; Kitisripanya in sod., 2011; Pohanka, 2011). Poleg tega se veže tudi na nAChR, ločeno od veznih mest, kamor se vežejo ACh ter drugi nikotinski agonisti in antagonisti, ter deluje kot senzibilizator nAChR (Maelicke in sod., 2001; Colović in sod., 2013). Z alosterično vezavo na nAChR lahko galantamin potencira delovanje agonistov (npr. ACh) teh receptorjev (Colović in sod., 2013). Senzibilizatorje nAChR so poimenovali kot alosterične potencirajoče ligande (APL), ki so pozitivni alosterični modulatorji nAChR. V to

skupino so, poleg galantamina, uvrščeni še fizostigmin, kodein in nevrotransmiter 5-hidroksi triptamin (5-HT). Posebnost APL-jev je, da niso neposredno vključeni v procese živčno-mišičnega prenosa, na katere vplivajo, zato običajno ne inducirajo kompenzacijskih procesov kot agonisti in antagonistti (Maelicke in sod., 2001).

#### **2.4.1.3 Rivastigmin in neostigmin**

Karbamati so derivati karbamične kisline. Sodijo med organske spojine, ki povratno zavirajo AChE (največ je psevdo-ireverzibilnih zaviralcev AChE) (Colović in sod., 2013). Vežejo se s serinskim ostankom v CAS ter tvorijo kompleks AChE-karbamat, kar imenujemo karbamilacija serina (Pohanka, 2011). Vezava je lahko tako kovalentna kot tudi nekovalentna, kar je odvisno od vrste karbamata, ki se veže na encim in časa, po katerem postane vezava nepovratna in kompleks nepovraten (Barak in sod., 2009). Pri slabše stabilnih kompleksih pride do spontane dekarbamilacije v približno 30 minutah (Fukuto, 1990; Darvesh in sod., 2008; Colović in sod., 2013). Snovi, ki zavirajo AChE in v svoji strukturi vsebujejo karbamoilno estersko vez (neostigmin in fizostigmin), so razcepljene s strani AChE, vendar mnogo počasneje kot ACh (Taylor, 2011). Eden izmed karbamatnih zaviralcev je rivastigmin, ki zavira tako AChE kot tudi BuChE, zato njegovo delovanje ni strogo selektivno (Desai in Grossberg, 2005). Gre za močnega in počasi reverzibilnega zaviralec (psevdo-ireverzibilni zaviralec) AChE (Desai in Grossberg, 2005; Liang in Tang, 2006; Pohanka, 2011). Deluje tako, da se veže na estrsko mesto CAS (Desai in Grossberg, 2005; Pohanka, 2011). Neostigmin je prav tako karbamatni povratni zaviralec AChE, ki ob vezavi z AChE tvori kovalentno vez z estrskim mestom encima (Macartney, 2013).

#### **2.4.1.4 Organofosfati**

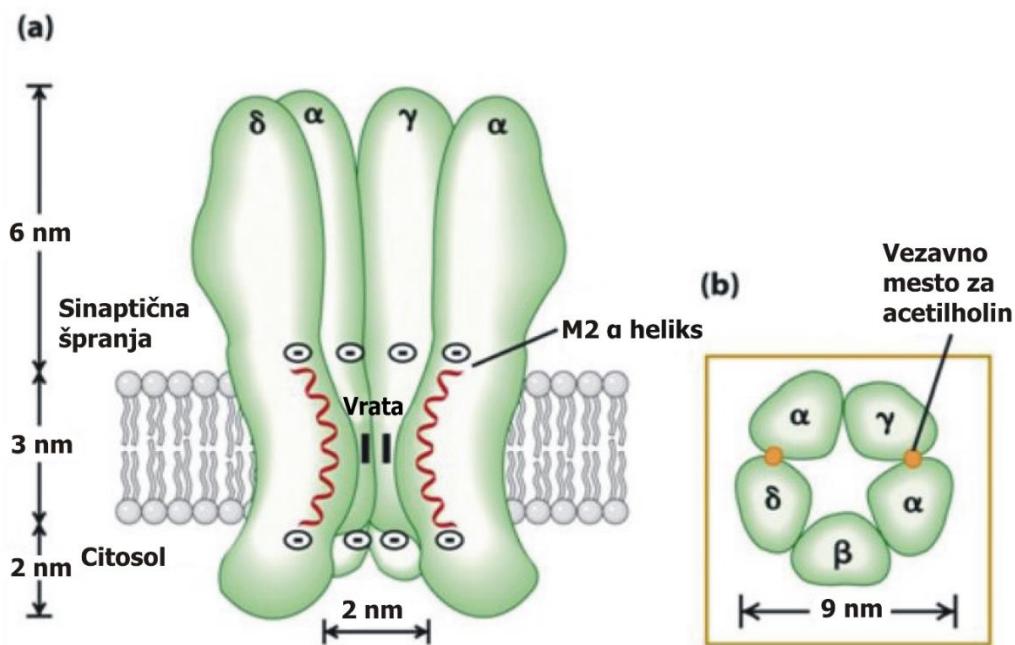
Organofosfati so nepovratni zaviralci AChE. Z encimom ob kovalentni vezavi tvorijo stabilne komplekse, saj nepovratno fosforilirajo serinski ostanek v estrskem mestu encima (Fukuto, 1990; Pohanka, 2011). Te snovi povzročijo akumulacijo ACh v motorični ploščici in prekomerno stimulacijo postsinaptičnih holinergičnih receptorjev. Ta učinek je lahko terapevtski pri motnjah/boleznih, pri katerih zmanjšan holinergični prenos privede do kliničnih znakov, npr. pri avtoimunem obolenju MG, zaradi zmanjšanja števila nAChR. V normalnih pogojih pa prekomerno zaviranje AChE vodi v prekomerno stimulacijo holinergičnih

receptorjev in nastanka znakov holinergične intoksikacije. Ta fenomen je podlaga za uporabo anti-AChE insekticidov in živčnih strupov.

## 2.5 Nikotinski acetilholinski receptor (nAChR)

nAChR delimo, glede na lokacijo, na mišični in živčni tip (Dutertre in sod., 2017). Mišični tip nAChR se nahaja v postsinaptični membrani motorične ploščice. Gre za heteromerne kationsko neselektivne ionske kanale, ki kemične signale pretvarjajo v električne z maksimalno hitrostjo in učinkovitostjo, kar omogoča prenos živčnih impulzov na mišično vlakno. Uvrščamo jih v skupino od liganda odvisnih ionskih kanalov. V fizioloških razmerah se nanje veže njihov agonist ACh. Vrhovi gub v postsinaptični membrani izražajo visoko raven nAChR (približno  $16000 \mu\text{m}^{-2}$ ) in ležijo nasproti aktivnih področij, od koder se sprosti ACh iz živčnega končiča (Unwin, 2013). Sestavljeni so iz 5 podenot: dveh  $\alpha$ 1 ter po ene  $\beta$ 1,  $\gamma$  in  $\delta$  podenote (Slika 3) (Westfall in Westfall, 2011; Unwin, 2013). Pri ljudeh in nekaterih sesalcih (govedo, podgane) tekom odraščanja  $\gamma$  podenoto zamenja homologna  $\epsilon$  podenota (Witzemann in sod., 1990; Unwin, 2013). Vsaka podenota je sestavljena iz N-terminalne zunajcelične domene, iz 4  $\alpha$ -vijačnic sestavljenega transmembranskega segmenta (M1–M4) ter znotrajcelične domene, ki jo sestavlja  $\alpha$ -vijačnica (Unwin, 2013). Podenote oblikujejo poro v obliki rozete. Kanal je dolg približno 14 nm in ima 3 nm širok zunanji vhod (Brisson in Unwin, 1985). Receptorji v postsinaptični membrani se nahajajo v dveh konformacijskih oblikah: odprtji in zaprti. Poleg teh dveh konformacij poznamo še desenzibilizirano konformacijsko obliko. Desenzibilizacija je izraz, ki se uporablja za zmanjšanje oziroma izgubo biološkega odgovora zaradi podaljšane ali ponavljajoče se stimulacije receptorjev (Ochoa in sod., 1989; Quick in Lester, 2002). V primeru nAChR, se desenzibilizacija pojavi ob nepreklenjeni vezavi ACh, kar se kaže s prenehanjem odzivnosti mišične celice na delovanje agonista (Quick in Lester, 2002). Nastanek desenzibilizacije je odvisen tako od časa izpostavljenosti kot tudi koncentracije agonista (Katz in Thesleff, 1957b). Do desenzibilizacije pride verjetno počasneje kot traja vrnitev v normalno stanje. Receptor ima v mirovanju in v stanju, v katerem se lahko aktivira, relativno nizko afiniteto za ACh, kar zahteva visoko koncentracijo agonista, da se veže v paru in povzroči odprtje receptorja. Desenzibilizacija se lahko pojavi tudi ob nizki koncentraciji agonista. Značilnost desenzibiliziranih receptorjev je visoka afiniteta za ACh in zaprt ionski kanal kljub stabilni vezavi ACh na  $\alpha$  podenotah receptorja. Funkcionalno se desenzibilizacija odraža kot

relativna izguba aktivnih receptorjev (Quick in Lester, 2002). Po odstranitvi agonista receptor lahko preide iz desenzibiliziranega stanja v normalno stanje, saj je to stanje potencialno popolnoma povratno, ni pa nujno. Predvsem pri kroničnem zdravljenju z agonisti lahko pride do dolgotrajnega kopičenja receptorjev v desenzibiliziranem stanju (Katz in Thesleff, 1957b) ali pa celo do trajne izgube funkcionalnih receptorjev (Boyd, 1987). V normalnih pogojih se ACh sprosti iz živčnega končiča, difundira preko sinaptične špranje in se veže na  $\alpha$  podenoti receptorja na stičišču z  $\gamma$  in  $\delta$  podenotami. ACh se veže na zunajcelično domeno, približno 50 Å stran od hidrofobnega vhoda, ki je centralno v pori (Unwin, 2013). Vezava ACh na  $\alpha$  podenoti receptorja spremeni njeno konformacijo v nekaj mikrosekundah (Maconochie in sod., 1995; Chakrapani in Auerbach, 2005). Ko so receptorji v odprttem stanju, poteka tok majhnih kationov v smeri koncentracijskega gradiента ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  in nekaj  $\text{Ca}^{2+}$ ). Predvsem gre za močan tok natrija v celico (približno 20000 ionov  $\text{ms}^{-1}$ ). Raziskave kažejo, da se receptorji vedno odzivajo po principu vse ali nič, vendar so odprti različno časovno obdobje (Unwin, 2013). Prehodno odprtje velikega števila nAChR povzroči naglo depolarizacijo postsinaptične membrane (Unwin, 2013), imenovane PMP (Westfall in Westfall, 2011). S tem pride do spremembe membranskega potenciala motorične ploščice iz vrednosti membranskega potenciala v mirovanju ( $rV_m$ ) -90 mV proti 0 mV. V primeru, da depolarizacija postsinaptične membrane doseže ali preseže prag za nastanek AP, pride do njegovega nastanka in širjenja vzdolž mišičnega vlakna, kar prek več stopanj povzroči kontrakcijo mišičnega vlakna. Po odprtju receptorjev, ki traja nekaj mikrosekund, v nekaj milisekundah količina ACh v sinaptični špranji, zaradi aktivnosti encima AChE, močno upade. Šibko vezan ACh se odpusti iz  $\alpha$  podenot nAChR, kar povzroči zaprtje receptorjev (Unwin, 2013).



**Slika 3: Struktura mišičnega tipa nAChR.** Povzeto po Lodish in sod., 2008

**Figure 3: Structure of muscle type nAChR.** Adopted from Lodish in sod., 2008

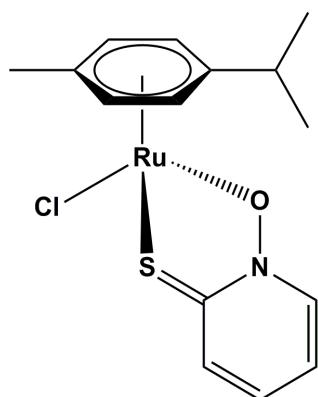
### 2.5.1 Postsinaptični mehanizem živčno-mišičnega zaviranja

Glede na postsinaptični mehanizem delovanja, delimo zaviralce živčno-mišičnega prenosa na kompetitivne oz. nedepolarizirajoče in depolarizirajoče snovi. Med nedepolarizirajoče spadajo d-Tubokurarin, benzilizokvinolini (atrakurij, mivakurij, doksakurij) in amino steroidi (pankuronij, pipekuronij, rokuronij, vekuronij). Nedepolarizirajoče snovi tekmujejo za vezna mesta na nAChR z ACh, ki je fiziološki agonist receptorjev. Z vezavo na nAChR ne povzročijo nastanka depolarizacije oz. PMP. Njihovo učinke lahko zavremo z zavirci AChE, ki zmanjšujejo aktivnost AChE in s tem preprečujejo razgradnjo ACh. Tako ostane v sinaptični šprani več ACh, ki lahko tekuje z zavircem nAChR za vezno mesto na nAChR mišičnega tipa in ga lahko tudi izpodrine. Med depolarizirajoče spada sukcinilholin, ki se kot edini kratko delujoč depolarizirajoči miorelaksant, uporablja v klinični praksi. Ta z vezavo na nAChR povzroči depolarizacijo postsinaptične membrane ter nastanek mišičnega AP. Njegova vezava na nAChR tako povzroči dalj časa trajajočo depolarizacijo postsinaptične membrane, prehodne kratkotrajne fascikulacije, čemur pri sesalcih sledi kratkotrajna ohlapna paraliza skeletnih mišic (Adams, 2009).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

Rutenijevo spojino C1a  $[(\eta^6-p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{pyrithionato})\text{Cl}]$  (slika 4) z molsko maso 396,9 g/mol, smo izbrali za nadaljnja testiranja, ker se je med novimi sintetiziranimi organorutenijevimi spojinami izkazala kot najbolj aktivna v testih inhibicije AChE in BuChE. Sintetizirali so jo na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo (Ljubljana, Slovenija) in je bila prijazno darilo prof. dr. Iztoka Turela. Spojino smo prejeli v liofilizirani obliki ter jo do uporabe hrаниli pri sobni temperaturi ( $20\text{--}24^\circ\text{C}$ ) v temnem prostoru (zaščiteno pred svetlobo). Pred uporabo smo pripravili osnovno raztopino testirane snovi s koncentracijo 2 mg/mL. Spojino smo raztopili v etanolu in Krebs-Ringerjevi raztopini v razmerju v/v 1:10. Poleg proučevane snovi smo za potrebe poskusov potrebovali še neostigmin metil sulfat (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Zwijndrecht, Belgija),  $\mu$ -conotoxin GIIIB (Bachem, Bubendorf, Švica), 96 % etanol za analize (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija). Kot fiziološko raztopino za organe smo pripravili Krebs-Ringerjevo (K-R) raztopino, sestavljeni iz: 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES pufra in 11 mM glukoze.



**Slika 4:** Rutenijeva spojina  $[(\eta^6\text{-p\text{-cymene}})\text{Ru}(\text{pyrithionato})\text{Cl}]$  (Ristovski in sod., 2018)

**Figure 4:** Structure of Ruthenium compound  $[(\eta^6\text{-p\text{-cymene}})\text{Ru}(\text{pyrithionato})\text{Cl}]$  (Ristovski in sod., 2018)

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprava živčno-mišičnega preparata

Delo na izoliranih organih je odobrila Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (številka dovoljenja: 34401-84/2008/6) in je potekalo v skladu z etičnimi standardi. Za izvedbo poskusov na živčno-mišičnem preparatu smo uporabljali mišjo diafragmo odraslih samcev (4–6 mesecev) linije BALB/C, telesne mase 22–30 g. Izolirane organe smo pridobili od 19 miši, ki izvirajo iz Centra za genomiko, dela Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete. Miši smo žrtvovali z metodo cervicalne dislokacije s takojšnjo izkrvavitvijo. Sledila je preparacija, s katero smo izolirali diafragmo, jo nato prepolovili in dobili dve hemidiafragmi s pripadajočima freničnima živcema (dva živčno-mišična preparata) ter ju do začetka poskusa inkubirali v oksigenirani K-R raztopini (pH 7,4 pri sobni temperaturi 22–24 °C). Pripravo preparata je izvedla doc. dr. Monika Žužek dr. vet. med., Veterinarska fakulteta v Ljubljani.

### 3.2.2 Meritve vpliva C1a na izometrično mišično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši

Lateralni del hemidiafragme smo s posebnimi entomološkimi iglami pričvrstili na dno s silikonsko prevleko prekrite kopeli za izolirane organe, napolnjene s 4 mL oksigenirane K-R raztopine. Tetivni del hemidiafragme smo povezali z ročico izometričnega mehano-električnega pretvornika (Grass FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI, USA). Prosti del freničnega živca smo s pomočjo podtlaka vsesali v lumen sukcijске elektrode. Priprava živčno-mišičnega preparata in poskusi so potekali pri sobni temperaturi (20–24 °C) ob stalni oksigenaciji K-R raztopine. Najprej smo pri delni raztegnitvi mišice določili supramaksimalno napetost dražljaja, tako za posredno kot tudi neposredno izvvane mišične kontrakcije. 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 bil med 15 in 30 minut. Mišična tenzija v mirovanju (MT), pri kateri je bila amplituda kontrakcije najvišja, je znašala od 1,4 do 2,2 g. Meritve smo začeli ob doseženi maksimalni amplitudi kontrakcije in stabilni MT. Za stimulacijo smo uporabljali

napetostni stimulator S-48 stimulator (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA). Pri posredni mišični stimulaciji smo frenični živec vzdražili prek sukcijске elektrode z 0,1 ms trajajočimi pravokotnimi dražljaji supramaksimalne napetosti (5 do 7 V) in frekvenco 0,1 Hz. Z v koppel vpetima elektrodama iz platine, postavljenima vzdolž hemidiafragme, smo izvedli neposredno stimulacijo mišice z 0,1 ms dražljaji supramaksimalne napetosti (50 do 70 V) in frekvenco 0,1 Hz. Tetanične mišične kontrakcije, tako posredne kot neposredne, smo izvali s supramaksimalnimi napetostnimi dražljaji frekvence 80 Hz in trajanjem stimulacije 1000 ms, razlika je bila le v napetosti. Izometrične mišične kontrakcije smo registrirali s pomočjo mehano-električnega pretvornika (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA). Električne signale smo ojačali z ojačevalnikom (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) in jih nato digitalizirali s 16 bitnim analogno-digitalnim pretvornikom, pri čemer je bila frekvenca vzorčenja signala 0,5 kHz (Digidata 1440A; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Za vizualizacijo registriranih sprememb in njihovo analizo smo uporabili program pClamp-Clampfit 10.7 (Molecular Devices, Union City, CA, USA), ki omogoča prikaz zapisov na ekranu monitorja v realnem času in shranjevanje zapisa na trdi disk računalnika.

Proučevali smo učinek 38 µM ( $\sim IC_{100}$  človeške rekombinantne AChE), 113 µM in 227 µM koncentracije spojine C1a na živčno-mišični prenos ter posledično njihov vpliv na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili znan zaviralec AChE, 3 µM neostigmin metil sulfat. K-R raztopino, ki smo ji dodali 96 % etanola v deležu 0,4 v/v %, smo uporabili kot negativno kontrolo. Poskuse z beleženjem izometrične kontrakcije smo na vsaki hemidiafragmi izvajali po sledečem protokolu:

1. 20 min kontrolnega zapisa, kjer smo registrirali posredno in neposredno izzvano enostavno in tetanično mišično kontrakcijo;
2. 15-minutni zapis posredno izzvane mišične kontrakcije;
3. aplikacija C1a v K-R raztopino v kopeli in 90-minutno registriranje zapisa posredno izzvane mišične kontrakcije;
4. sledi 5 min zapisa neposredno izzvane mišične kontrakcije in nato še obe posredno in neposredno izzvanih tetaničnih kontrakcij;
5. štirikratno spiranje z oksigenirano K-R raztopino;
6. 15-minutni zapis posredno izzvane mišične kontrakcije;
7. 5 min registracije zapisa neposredno izzvane mišične kontrakcije;
8. zapis registracije posredno in neposredno izzvanih tetaničnih kontrakcij.

Zapise smo analizirali s programom pClamp-Clampfit 10. Določali smo: i) amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije; ii) amplitudo neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije; iii) amplitudo posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije in iv) amplitudo neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije. Amplitudo mišične kontrakcije smo izrazili kot odstotek maksimalnega odgovora kontrakcije pred aplikacijo testirane snovi.

### **3.2.3 Meritve vpliva C1a na membranske potenciale mišičnih vlaken izoliranih hemidiafragem miši**

Pred izvedbo poskusov smo hemidiafragme 30 minut inkubirali v oksigenirani K-R raztopini z dodatkom 2  $\mu$ M  $\mu$ -konotoksina, ki v sarkolemi blokira od napetosti odvisne natrijeve kanale. Zato ob nastanku PMP ne nastane AP, kar posledično vpliva na to, da se mišično vlakno ne krči, kar nam omogoča mehansko stabilnost pri meritvah membranskih potencialov. Hemidiafragmo 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  $\mu$ -konotoksinom. Za meritve 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 z 3 M KCl in uporom od 10 do 20 M $\Omega$ . Za izdelavo mikroelektrod smo uporabili napravo 97 Flaming/Brown micropipette puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Mikroelektrodo smo uvedli v mišično vlakno v področju motorične ploščice, kar smo potrdili s prisotnostjo MPMP v registriranem zapisu. Za proženje PMP smo frenični živec prek sukcijске elektrode vzdražili z 0,1 ms supramaksimalnimi dražljaji napetosti 10 V pri frekvenci 0,1 Hz z uporabo stimulatorja S-48 (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA). Registrirali smo  $rV_m$ , spontane MPMP in posredno z električno stimulacijo izzvane PMP. Za registracijo in ojačanje merjenih signalov smo uporabili ojačevalnik (Axoclamp 900A, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA) in jih nato digitalizirali s 16 bitnim analogno-digitalnim pretvornikom, pri čemer je bila frekvenca vzorčenja signala 25 kHz (Digidata 1440A; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), krmiljenim s programskeim paketom pClamp 10. Meritve vseh potencialov so bile opravljene pred aplikacijo, 30, 60 in 90 min po aplikaciji testirane snovi ter 15 min po spiranju s K-R

raztopino. V vsakem časovnem obdobju smo opravili meritve na 6–10 mišičnih vlaknih na posamezni hemidiafragmi. Proučevali smo učinek izbrane rutenijeve spojine C1a pri 38 µM, 113 µM in 227 µM koncentraciji. Poleg tega smo izvedli tudi poskuse z negativno kontrolo z dodatkom etanola v deležu 0,4 v/v % v 2 mL K-R raztopine. Meritve smo analizirali s programom (pClamp-Clampfit 10, Molecular Devices, Union City, CA, USA). Določali smo: i)  $rV_m$ ; ii) amplitudo in razpolovni čas PMP; iii) amplitudo in razpolovni čas MPMP in iv) frekvenco MPMP. Uporabili smo absolutne vrednosti navedenih parametrov.

### 3.2.4 Analize podatkov in statistika

Parametre mišične kontrakcije in parametre membranskih potencialov smo analizirali s programom pClamp-Clampfit 10.7 (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Sledila je statistična analiza pridobljenih podatkov in izdelava grafov, za kar smo uporabili program SigmaPlot za Windows 11.0 (Systat Software Inc., Nemčija). Rezultati mišične kontrakcije so predstavljeni kot srednja vrednost deleža amplitude mišične kontrakcije  $\pm$  S.E. Rezultati  $rV_m$ , PMP, razpolovnega časa PMP, MPMP in razpolovnega časa MPMP pa kot srednja vrednost absolutnih vrednosti  $\pm$  S.E. Podatke smo najprej analizirali s testom normalnosti porazdelitve (Shapiro-Wilk) in enakovrednosti razlik za določanje parametrične ali neparametrične analize. Ker so bile vrednosti merjenih parametrov normalno porazdeljene, smo za statistično analizo podatkov uporabili parametrični Studentov t-test, pri čemer je  $p \leq 0,05$  štel za statistično značilen. Za potrditev dejanskih učinkov C1a je bila namreč pomembna samo primerjava vrednosti parametrov s kontrolo v isti časovni točki, zato je bil izbran Studentov t-test.

Za primerjavo razlik vpliva različnih koncentracij C1a na merjene elektrofiziološke parametre pozitivne in negativne kontrole, pri čemer je  $p \leq 0,05$  štel za statistično značilen, smo uporabili enosmerno analizo variance. S posthock testom Holm–Sidak, smo ugotavljali razlike znotraj skupin, pri čemer je bil  $p \leq 0,001$ . Zaradi boljše preglednosti smo statistično značilno razliko opisali samo v razpravi, zato primerjave različnih skupin v grafih niso označene.

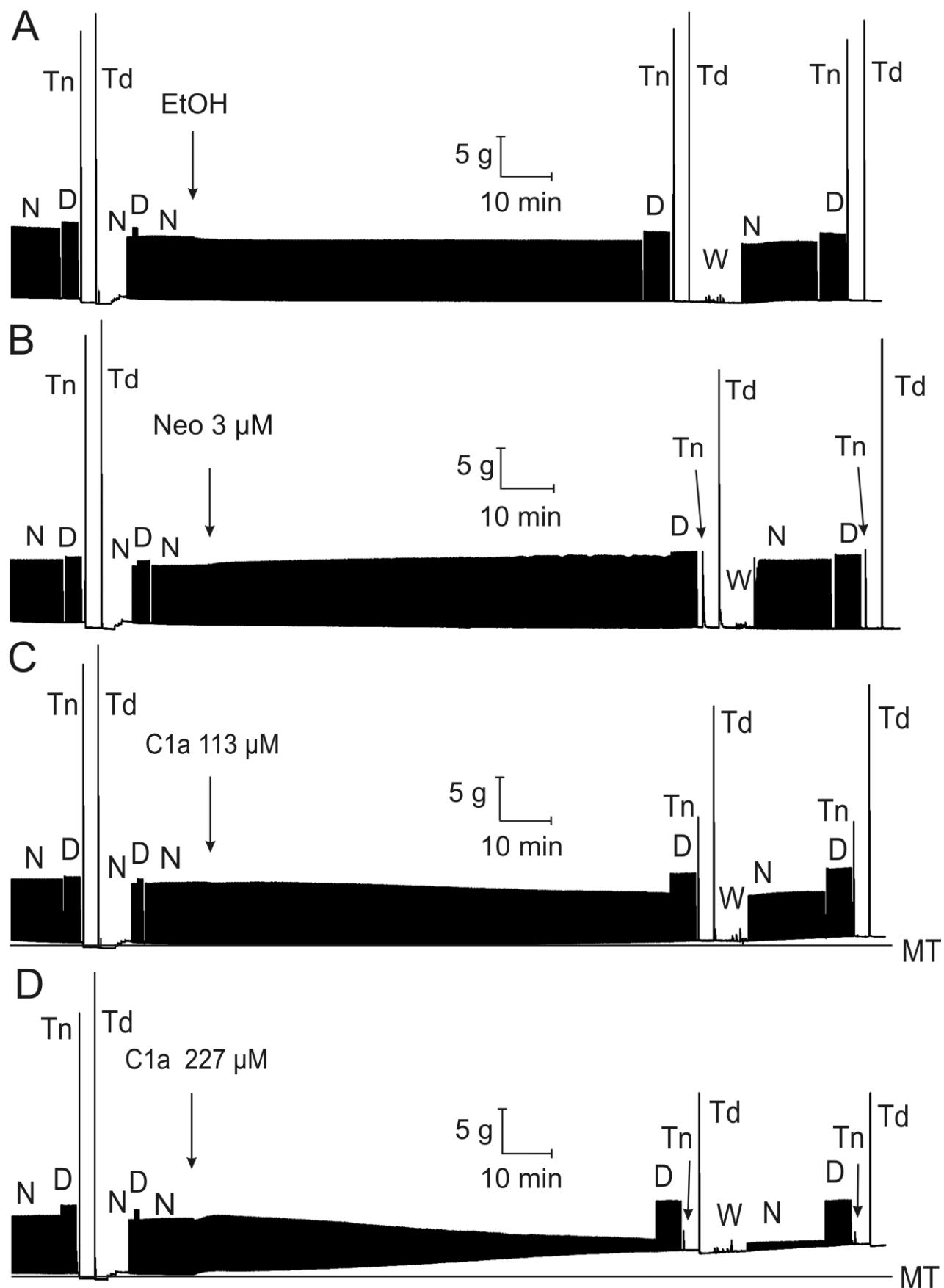
Ocenjeno IC<sub>50</sub> smo določili iz krivulje podatkov vrednosti meritev odziva posredno izvvane mišične kontrakcije pri različnih koncentracij C1a z uporabo modela nelinearne regresije s spremenljivim naklonom (angl. *log(inhibitor)* vs. *Normalized response-variable slope*) statističnega paketa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## 4 REZULTATI

Raziskave rutenijeve spojine C1a v pogojih *in vitro* so pokazale, da snov kompetitivno zavre delovanje AChE električne jegulje, človeške rekombinantne AChE, BuChE iz konjskega seruma, glutation S-transferaze (GST) iz konjskega seruma in človeške placentarne GST (hGST). Njena srednja inhibitorna koncentracija ( $IC_{50}$ ) je znašala  $5,0 \mu\text{M}$  pri AChE električne jegulje, pri človeški rekombinantni AChE  $25,1 \mu\text{M}$ , pri BuChE in iz konjskega seruma  $7,5 \mu\text{M}$  (Ristovski in sod., 2018). Zaradi ugotovljene zaviralne aktivnosti snovi na AChE kot potencialne terapevtske tarče, smo v raziskavi proučiti vpliv C1a na periferni živčno-mišični sistem *in vitro*, na izoliranih hemidiafragmah miši, kjer je holinergični sistem v motorični ploščici pomemben za njegovo normalno fiziološko funkcijo.

### 4.1 Vpliv C1a na izometrično mišično kontrakcijo izoliranih hemidifragem miši

Na sliki 5 so prikazani reprezentativni zapisi celotne meritve posredno in neposredno izzvane mišične kontrakcije: i) negativna kontrola (Slika 5A); ii) pozitivna kontrola (Slika 5B); iii) po aplikaciji  $113 \mu\text{M}$  C1a (Slika 5C); iv)  $227 \mu\text{M}$  C1a (Slika 5D). Kot negativna kontrola je bil pri poskusih dodan EtOH, da bi izključili vpliv topila pri poskusih. Kot pozitivna kontrola pa je bil uporabljen povratni zaviralec AChE neostigmin metilsulfat v  $3 \mu\text{M}$  koncentraciji, pri kateri zavre 96 % aktivnosti AChE (Minic in sod., 2003). C1a v koncentraciji  $113 \mu\text{M}$  povzroči zmeren padec moči tako posredno izzvane enostavne kot tudi posredno izzvane tetanične kontrakcije, učinek pa je nepovraten, saj se po spiranju amplituda posredno izzvane kontrakcije ne povrne (Slika 5C). Pri  $227 \mu\text{M}$  koncentraciji C1a opazimo izrazit padec moči posredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije ter zmeren padec neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije po aplikaciji, tendenca padanja moči kontrakcije pa se nadaljuje tudi po spiranju (Slika 5D). Opazen je minimalen dvig MT, ki se začne približno 50 minut po aplikaciji  $113 \mu\text{M}$  C1a (Slika 5C) in dvig MT takoj po aplikaciji  $227 \mu\text{M}$  C1a (Slika 5D).



**Slika 5: Učinek EtOH (topila), 3 µM neostigmina ter 113 in 227 µM koncentracije C1a na izometrično mišično kontrakcijo in mišično tenzijo v mirovanju v odvisnosti od časa.**

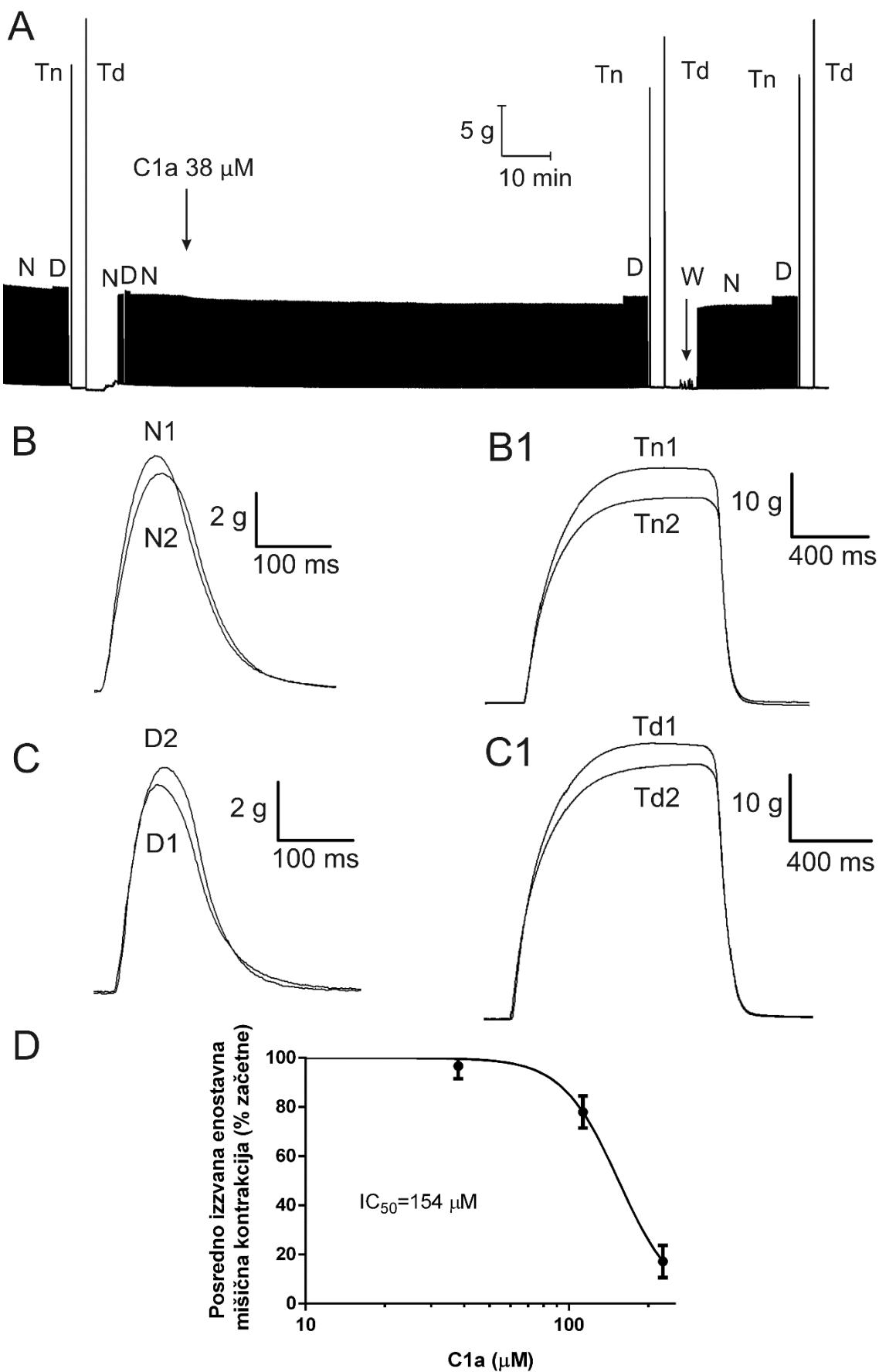
Zapis prikazuje vpliv dodanega topila EtOH (A), 3 µM neostigmina (B), 113 µM C1a (C) in 227 µM C1a (D) na izometrično mišično kontrakcijo v odvisnosti od časa. N - označuje posredno izvano enostavno mišično kontrakcijo; D - označuje neposredno izvano enostavno mišično kontrakcijo; Tn - označuje posredno izvano tetanično mišično kontrakcijo; Td - označuje neposredno izvano tetanično mišično kontrakcijo W - označuje spiranje hemidiafragem miši z K-R raztopino in MT - označuje potek mišične tenzije v mirovanju.

**Figure 5: Effects of EtOH (solvent), 3 µM neostigmine and C1a (113 in 227 µM) on isometric muscle contraction and resting muscle tension in time-dependent manner.**

Representative tracing of EtOH (A), of 3 µM neostigmine (B), of 113 µM C1a (C) and of 227 µM C1a (D) effect on isometric muscle contraction in time-dependent manner. N - denotes nerve-evoked muscle contraction; D - denotes directly-elicited muscle contraction; Tn - denotes nerve-evoked tetanic contraction; Td - denotes directly-elicited tetanic contraction; W - wash-out with K-R solution; MT - denotes resting muscle tension.

Slika 6 prikazuje vpliv 38 µM C1a na mišično kontrakcijo. Prikazan je reprezentativni zapis celotne meritve mišične kontrakcije (slika 6A), posamezni izseki posredno in neposredno izvane enostavne mišične kontrakcije (slika 6B in slika 6C) ter posamezni izseki posredno in neposredno izvane tetanične mišične kontrakcije (slika 6B1 in slika 6C1). Iz primerjave s sliko 5A (EtOH- kontrolni zapis) je razvidno, da C1a ne vpliva na amplitudo mišičnih kontrakcij.

Odnos med 38, 113 in 227 µM C1a in njihovim učinkom na posredno izvano enostavno mišično kontrakcijo 90 min po aplikaciji prikazuje slika 6D z ocenjeno IC<sub>50</sub>.



**Slika 6: Učinek C1a na posredno in neposredno izzvano enostavno in tetanično mišično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši.**

(A) Prikazuje celoten zapis vpliva 38 µM C1a na mišično kontrakcijo v odvisnosti od časa. 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 in W - označuje spiranje hemidiafragme miši z K-R raztopino. (B) Prikazuje zapis posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije pred (N1) in 90 minut po aplikaciji 38 µM C1a (N2). (B1) Prikazuje zapis posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije pred (Tn1) in 90 minut po aplikaciji 38 µM C1a (Tn2). (C) Prikazuje zapis neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije pred (D1) in 90 minut po aplikaciji 38 µM C1a (D2). (C1) Prikazuje zapis neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije pred (Td1) in 90 minut po aplikaciji 38 µM C1a (Td2). (D) Prikazuje krivuljo inhibicije posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije v odvisnosti od koncentracije C1a. Vsaka vrednost v krivulji predstavlja srednjo vrednost deleža moči posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije  $\pm$  S.E., 4 različnih izoliranih hemidiafragem miši 90 minut po aplikaciji C1a.

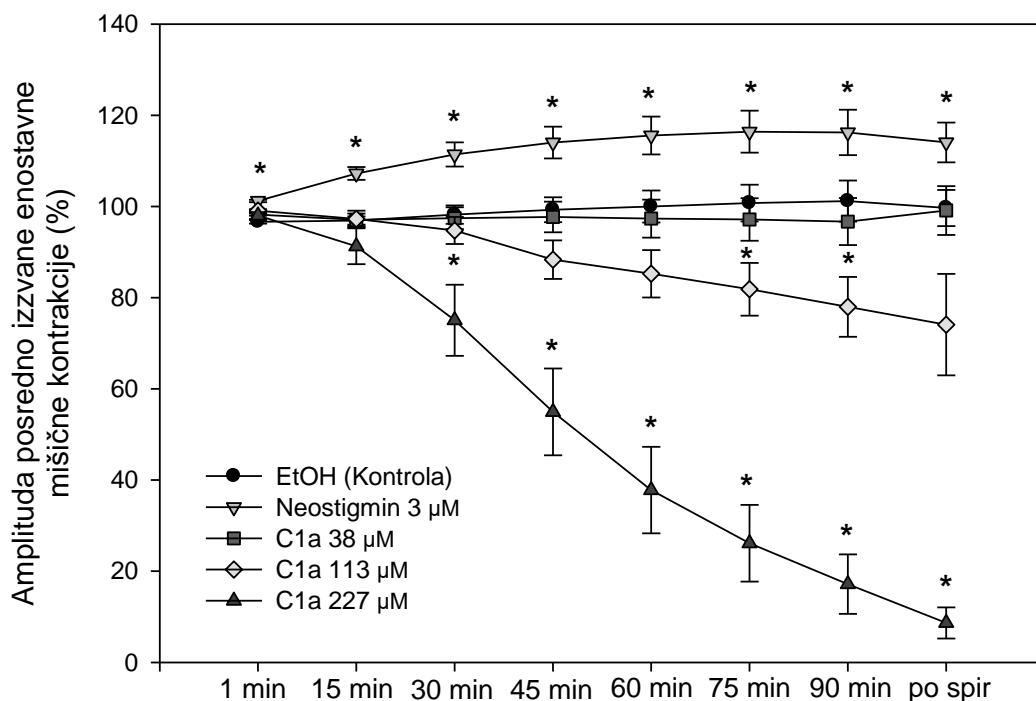
**Figure 6: Effects of C1a on both nerve-evoked or directly-elicited single twitch and tetanic contractions in isolated mouse hemidiaphragm.**

(A) Complete recording of C1a (38 µM) effect on muscle contraction in time-dependent manner. N - denotes nerve-evoked muscle contraction; D - denotes directly-elicited muscle contraction; Tn - denotes nerve-evoked tetanic contraction; Td - denotes directly-elicited tetanic contraction; W - wash-out with K-R solution. (B) Representative superimposed recordings of nerve-evoked single twitch before (N1), and 90 min after application of 38 µM C1a (N2). (B1) Representative recordings of tetanic contraction before (Tn1), and 90 min after application of 38 µM C1a (Tn2). (C) Representative superimposed recordings of single muscle twitch elicited by direct muscle stimulation before (D1), and 90 min after application of 38 µM C1a (D2). (C1) Representative superimposed recordings showing tetanic contractions elicited by direct muscle stimulation before (Td1), and 90 min after application of 38 µM C1a (Td2). (D) Concentration-dependent inhibition curve for nerve-evoked contraction for C1a in mouse hemidiaphragms, expressed as percent of the maximal twitch response 90 min after application of C1a. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n = 4 different muscles for each concentration).

#### **4.1.1 Vpliv C1a na posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo**

C1a v 113 in 227 µM koncentracijah povzroči zmanjšanje moči posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije v odvisnosti od koncentracije in časa izpostavljenosti (Slika 7). Padec amplitude moči posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije je značilen pri 113 µM koncentraciji C1a 75 in 90 minut po aplikaciji ( $18,2 \pm 5,8\%$  in  $22,0 \pm 6,6\%$ ) ter pri 227 µM koncentraciji C1a 30, 45, 60, 75, 90 minut po aplikaciji in po spiranju ( $24,9 \pm 7,8\%$ ,  $45,0 \pm 9,5\%$ ,  $62,2 \pm 9,5\%$ ,  $73,9 \pm 8,4\%$ ,  $82,8 \pm 6,5\%$  in  $91,3 \pm 3,4\%$ ) v primerjavi z negativno kontrolo. Povečanje amplitude moči posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije je bilo značilno

večje pri 3  $\mu\text{M}$  koncentraciji neostigmina, takoj po aplikacij, 15, 30, 45, 60, 75, 90 minut po aplikaciji in po spiranju ( $1,2 \pm 0,3\%$ ,  $7,2 \pm 1,4\%$ ,  $11,4 \pm 2,7\%$ ,  $14,0 \pm 3,5\%$ ,  $15,6 \pm 4,2\%$ ,  $16,4 \pm 4,6\%$ ,  $16,2 \pm 5,0\%$  in  $14,1 \pm 4,4\%$ ) v primerjavi z negativno kontrolo.



**Slika 7: Učinek C1a na amplitudo posredno izvvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši.**

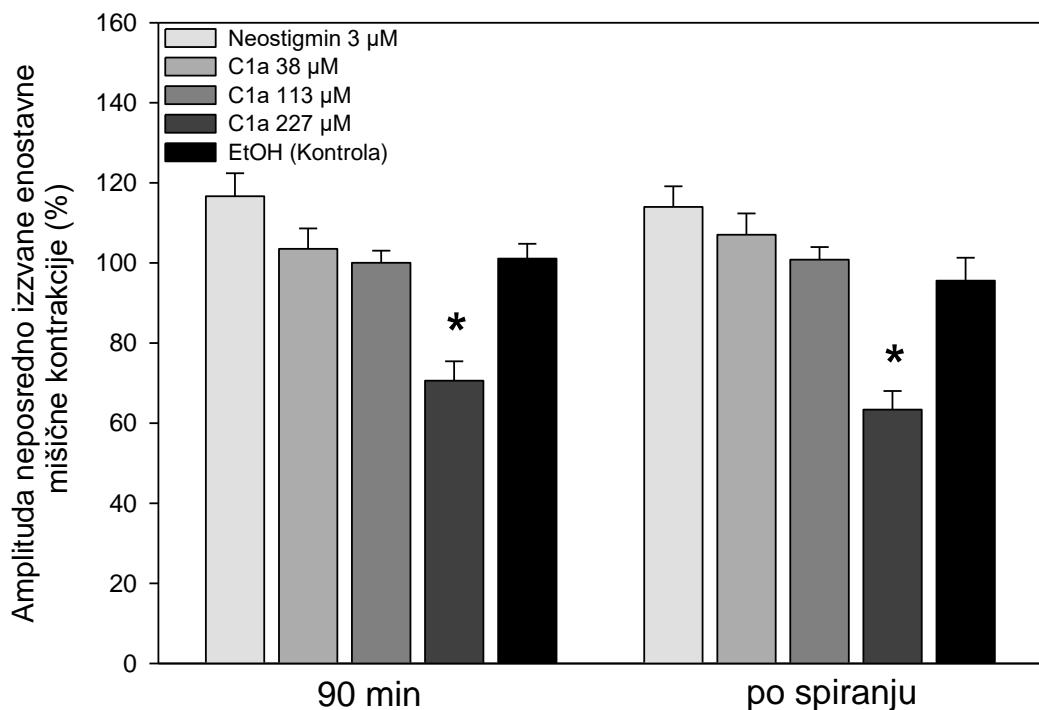
Prikazan je vpliv različnih koncentracij C1a (38  $\mu\text{M}$ , 113  $\mu\text{M}$ , 227  $\mu\text{M}$ ), EtOH (negativna kontrola) in neostigmina (pozitivna kontrola) na posredno izvano enostavno mišično kontrakcijo izoliranih hemidiaphragem miši takoj po aplikaciji, 15, 30, 45, 60, 75, 90 minut po aplikaciji ter po spiranju. Vrednosti predstavljajo srednjo vrednost deleža amplitude mišične kontrakcije  $\pm$  S.E., 4 različnih hemidiafragem miši. \* označuje značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 7: Effects of C1a on nerve-evoked single twitch in the isolated mouse hemidiaphragm preparation.**

The effects of different concentrations of C1a (38  $\mu\text{M}$ , 113  $\mu\text{M}$ , 227  $\mu\text{M}$ ), EtOH (negative control) and neostigmine (positive control) on nerve-evoked single twitch in the isolated mouse hemidiaphragm preparation right after the application, 15, 30, 45, 60, 75, 90 min of exposure and after wash-out. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from four different nerve muscle preparations. \* indicates statistically significant difference ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.2 Vpliv C1a na neposredno izзвано enostavno mišično kontrakcijo

C1a v visokih koncentracijah zmanjša moč neposredno izзванo tetanične mišične kontrakcije. Moč neposredno izзванo enostavne mišične kontrakcije je značilno zmanjšana pri 227 µM koncentraciji C1a 90 minut po aplikaciji in po spiranju ( $29,4 \pm 4,8\%$  in  $36,6 \pm 4,7\%$ ) v primerjavi z negativno kontrolo (Slika 8).



**Slika 8: Učinek C1a na amplitudo neposredno izзване enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidifragem miši.**

Prikazan je vpliv različnih koncentracij C1a (38 µM, 113 µM, 227 µM), negativne kontrole in neostigmina (pozitivna kontrola) na neposredno izзванo enostavno mišično kontrakcijo izoliranih hemidifragem miši 90 minut po aplikaciji ter po spiranju. Vrednosti predstavljajo srednjo vrednost deleža amplitude mišične kontrakcije  $\pm$  S.E., 4 različnih izoliranih hemidiafragem miši. \* označuje značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 8: Effects of C1a on directly elicited single twitch in the isolated mouse hemidiaphragm preparation.**

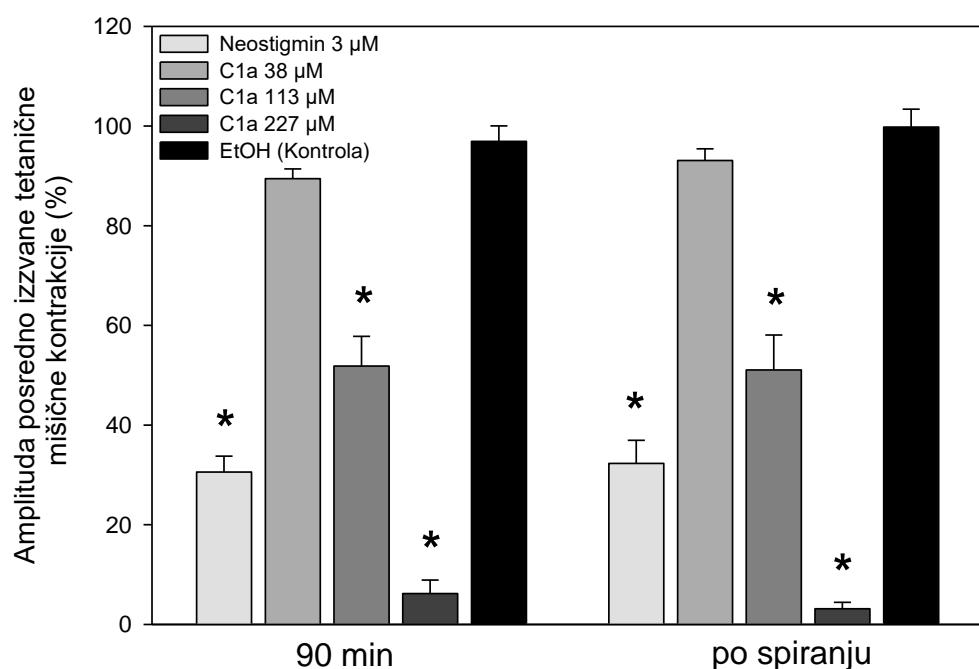
The effects of different concentrations of C1a (38 µM, 113 µM, 227 µM), negative control and neostigmine (positive control) on directly elicited single twitch in the isolated mouse hemidiaphragm preparation after 90 min of exposure and after wash-out. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from four different nerve muscle preparations. \* indicates statistically significant difference ( $p \leq 0,05$ ).

## 4.2 Vpliv C1a na tetanično mišično kontrakcijo

Zaviralci AChE v motorični ploščici povzročijo naglo zmanjšanje amplitude posredno izvvane tetanične mišične kontrakcije, ki jo povzroči visokofrekvenčna stimulacija motoričnega živca. Zaviranje AChE je torej povezano z nezmožnostjo vzdrževanja posredno izvvane popolne tetanične kontrakcije (Chang in sod., 1986). Zaradi tega je bil uporabljen za pozitivno kontrolo reverzibilni zaviralec AChE neostigmin metilsulfat ( $3\mu\text{M}$ ), ki pri tej koncentraciji zavre 96 % aktivnosti AChE v motorični ploščici mišje hemidiafragme (Minic in sod., 2003).

### 4.2.1 Vpliv C1a na posredno izvvano tetanično mišično kontrakcijo

C1a v visokih koncentracijah povzroči progresivno zmanjšanje moči posredno izvvane tetanične kontrakcije v odvisnosti od koncentracije (Slika 9). Moč posredno izvvane tetanične mišične kontrakcije je značilno zmanjšana pri  $113$  in  $227\ \mu\text{M}$  koncentraciji C1a ter  $3\ \mu\text{M}$  koncentraciji neostigmina 90 minut po aplikaciji ( $48,2 \pm 6,0\ %$ ,  $93,8 \pm 2,7\ %$  in  $69,4 \pm 3,2\ %$ ) in po spiranju ( $48,9 \pm 7,0\ %$ ,  $96,9 \pm 1,3\ %$  in  $67,7 \pm 4,6\ %$ ) v primerjavi z negativno kontolo.



Slika 9: Učinek C1a na posredno izvvano tetanično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši.

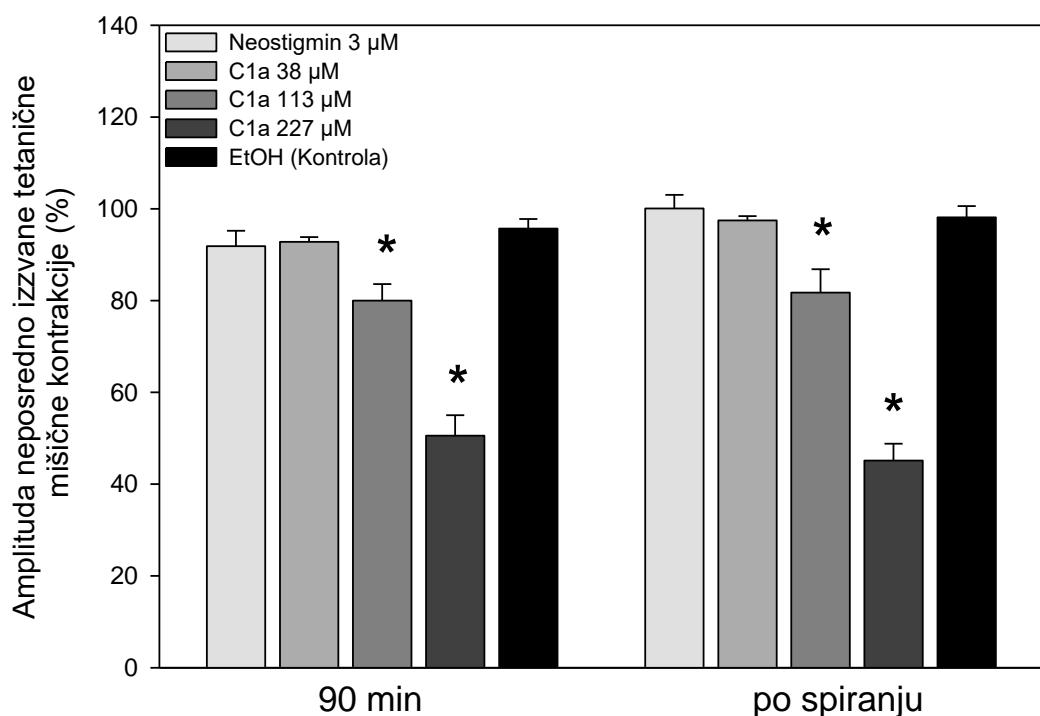
Prikazan je vpliv naraščajočih koncentracij C1a ( $38 \mu\text{M}$ ,  $113 \mu\text{M}$ ,  $227 \mu\text{M}$ ), EtOH (negativna kontrola) in neostigmina (pozitivna kontrola) na posredno izзванo tetanično mišično kontrakcijo izoliranih hemidifragem miši 90 minut po aplikaciji ter po spiranju. Vrednosti predstavljajo srednjo vrednost deleža amplitude mišične kontrakcije  $\pm$  S.E., 4 različnih izoliranih hemidiafragem miši. \* označuje značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 9: Effects of C1a on nerve-evoked tetanic contractions in the isolated mouse hemidiaphragm preparation.**

The effects of increasing concentrations of C1a ( $38 \mu\text{M}$ ,  $113 \mu\text{M}$ ,  $227 \mu\text{M}$ ), EtOH (negative control) and neostigmine (positive control) on directly elicited tetanic contraction in the isolated mouse hemidiaphragm preparation after 90 min of exposure and after wash-out. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM from four different nerve muscle preparations. \* indicates statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.2 Vpliv C1a na neposredno izзванo tetanično mišično kontrakcijo

C1a v visokih koncentracijah zmanjša moč neposredno izзвane tetanične mišične kontrakcije (Slika 10). Delež moči neposredno izзвane tetanične mišične kontrakcije je značilno zmanjšan pri  $113$  in  $227 \mu\text{M}$  koncentraciji C1a 90 minut po aplikaciji ( $20,0 \pm 3,6\%$  in  $49,4 \pm 4,5\%$ ) in po spiranju ( $18,3 \pm 5,1\%$  in  $54,9 \pm 3,7\%$ ) v primerjavi z negativno kontrolo.



**Slika 10: Učinek C1a na neposredno izзванo tetanično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši.**

Prikazan je vpliv naraščajočih koncentracij C1a ( $38 \mu\text{M}$ ,  $113 \mu\text{M}$ ,  $227 \mu\text{M}$ ), EtOH (negativna kontrola) in neostigmina (pozitivna kontrola) na neposredno izzvano tetanično kontrakcijo izoliranih hemidiaphragem miši 90 minut po aplikaciji ter po spiranju. Vrednosti predstavljajo srednjo vrednost deleža amplitude mišične kontrakcije  $\pm \text{S.E.}$ , 4 različnih izoliranih hemidiafragem miši. \* označuje značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 10: Effects of C1a on directly elicited tetanic contractions in the isolated mouse hemidiaphragm preparation.**

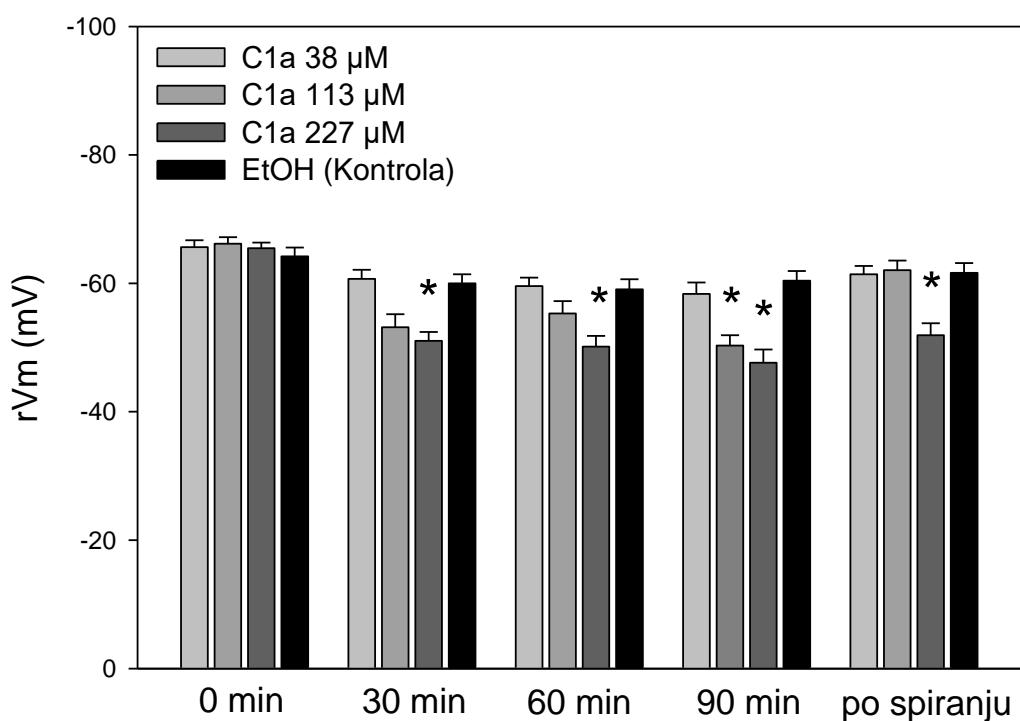
The effects of increasing concentrations of C1a ( $38 \mu\text{M}$ ,  $113 \mu\text{M}$ ,  $227 \mu\text{M}$ ), EtOH (negative control) and neostigmine (positive control) on directly elicited tetanic contraction in the isolated mouse hemidiaphragm preparation after 90 min of exposure and after wash-out. Values are expressed as mean  $\pm \text{SEM}$  from four different nerve muscle preparations. \* indicates statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

## 4.3 Vpliv C1a na elektrofiziološke parametre mišičnih vlaken

Proučevali smo vpliv C1a na  $rV_m$ , amplitudo PMP, razpolovni čas padajoče faze PMP, amplitudo MPMP in razpolovni čas padajoče faze MPMP.

### 4.3.1 Vpliv C1a na membranski potencial v mirovanju

C1a zmanjša vrednost  $rV_m$ , v odvisnosti od koncentracije in časa izpostavljenosti. Vrednost  $rV_m$  je zmanjšana pri  $113 \mu\text{M}$  koncentraciji C1a 90 minut po aplikaciji in pri  $227 \mu\text{M}$  koncentraciji C1a 30, 60 in 90 minut po aplikaciji v primerjavi z negativno kontollo. Pri najvišji uporabljeni koncentraciji ( $227 \mu\text{M}$ ) se vrednost  $rV_m$  tudi po spiranju ne povrne na vrednost pred aplikacijo C1a (Slika 11).



**Slika 11: Učinek C1a na membranski potencial v mirovanju ( $rV_m$ ) skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti časa in koncentracije.**

Prikazan je vpliv C1a na  $rV_m$  skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od koncentracije (38  $\mu\text{M}$ , 113  $\mu\text{M}$  in 227  $\mu\text{M}$ ) in časa izpostavljenosti (30, 60 in 90 minut) ter negativna kontrola. Čas 0 predstavlja vrednosti pred aplikacijo. Prikazane so tudi vrednosti 15 min po spiranju s K-R raztopino. Vrednosti predstavljajo srednjo vrednost absolutnih vrednosti  $rV_m \pm \text{S.E.}$ , 4–6 različnih izoliranih hemidiafragem ( $n = 7$ –10 skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). \* označuje značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ).

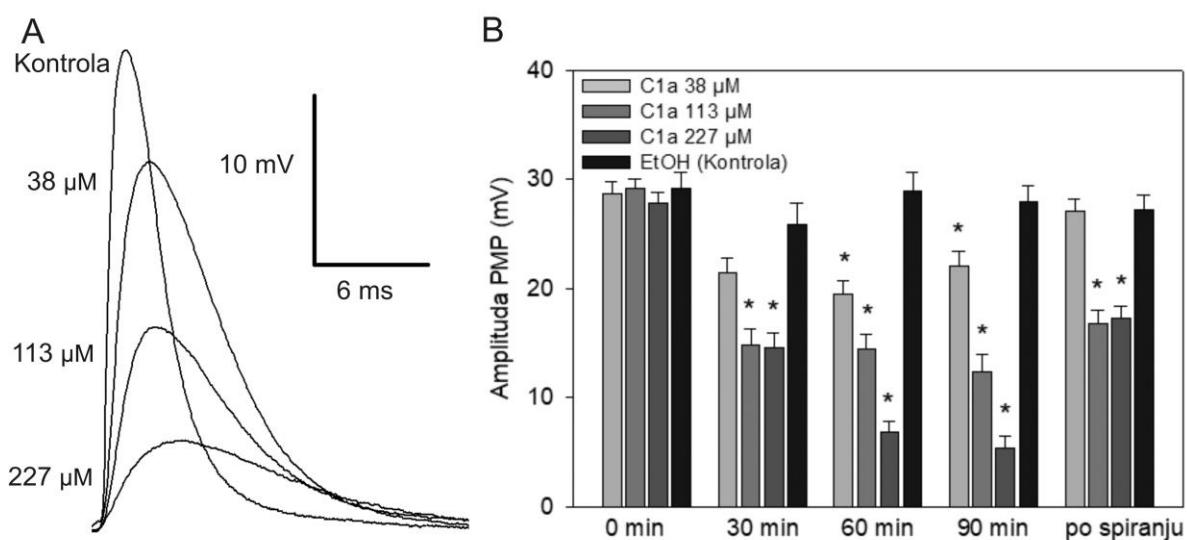
**Figure 11: Concentration- and time-dependent effect of C1a on the resting membrane potential ( $rV_m$ ) of isolated mouse hemidiaphragm muscle fibres.**

The effects on resting membrane potential of muscle fibres at different concentration of C1a (38  $\mu\text{M}$ , 113  $\mu\text{M}$  and 227  $\mu\text{M}$ ) and time of exposure (30, 60 and 90 min) vs. negative control. Time 0 shows values before application, po spiranju shows values 15 min after rinsing with K-R solution. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of resting membrane potential recorded from 4–6 hemidiaphragms ( $n = 7$ –10 fibres from each). \* indicates statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

### 4.3.2 Vpliv C1a na amplitudo potenciala motorične ploščice in razpolovni čas padajoče faze potenciala motorične ploščice

#### 4.3.2.1 Vpliv C1a na amplitudo potenciala motorične ploščice

C1a zmanjša amplitude PMP skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od koncentracije in časa izpostavljenosti. Amplituda PMP je značilno zmanjšana pri 38 µM koncentraciji C1a 60 in 90 minut po aplikaciji, pri 113 in 227 µM koncentraciji pa 30, 60, 90 minut po aplikaciji in po spiranju v primerjavi z negativno kontrolo (Slika 12).



Slika 12: Učinek C1a na potencial motorične ploščice skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.

(A) Prikazuje reprezentativne zapise PMP negativne kontrole in pri različnih koncentracijah C1a 90 min po aplikaciji (koncentracije so izpisane ob krivuljah). (B) Prikazuje vpliv C1a na PMP skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od koncentracije (38 µM, 113 µM in 227 µM) in časa izpostavljenosti (30, 60 in 90 min) ter negativno kontrolo. Čas 0 predstavlja vrednosti pred aplikacijo. Vrednosti po spiranju predstavljajo meritve 15 min po spiranju s K-R raztopino. Vrednosti predstavljajo srednjo vrednost absolutnih vrednosti PMP ± S.E., 4–6 različnih izoliranih hemidiafragem ( $n = 7$ –10 skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). \* označuje značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ).

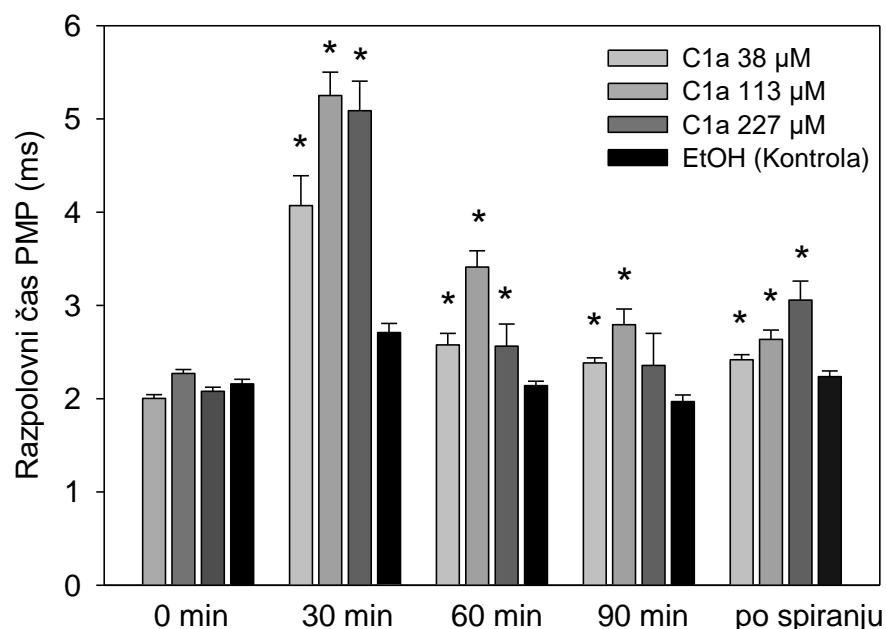
**Figure 12: Effects of C1a on the end-plate potential amplitudes of skeletal muscle fibres in nerve muscle preparation.**

(A) Examples of the end-plate potential tracings recorded under control conditions (EtOH) and different concentration of C1a 90 min after exposure (concentrations are indicated in front of the respective tracings). (B) Effects on end-plate potential amplitudes of muscle fibres at different concentration of C1a (38 µM, 113 µM and 227 µM) and time of exposure (30, 60 and 90 min) vs. negative control. Time 0 shows values before application,

po spiranju present values 15 min after rinsing with K-R solution. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of resting membrane potential recorded from 4–6 hemidiaphragms ( $n = 7$ –10 fibres from each). \* indicates statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3.2.2 Vpliv C1a na razpolovni čas padajoče faze potenciala motorične ploščice

C1a podaljša razpolovni čas PMP skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od koncentracije in časa izpostavljenosti. Razpolovni čas je značilno podaljšan pri 38  $\mu\text{M}$  in 113  $\mu\text{M}$  koncentraciji C1a 30, 60 in 90 minut po aplikaciji ter po spiranju ter pri 227  $\mu\text{M}$  koncentraciji 30 in 60 minut po aplikaciji ter po spiranju v primerjavi z negativno kontrolo (Slika 13).



**Slika 13: Učinek C1a na razpolovni čas padajoče faze potenciala motorične ploščice skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.**

Prikazan je vpliv C1a na razpolovni čas PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od koncentracije (38  $\mu\text{M}$ , 113  $\mu\text{M}$  in 227  $\mu\text{M}$ ) in časa izpostavljenosti (30, 60 in 90 min) ter negativno kontrolo. Čas 0 predstavlja vrednosti pred aplikacijo. Vrednosti po spiranju predstavljajo meritve 15 min po spiranju s K-R raztopino. Vrednosti predstavljajo srednjo vrednost absolutnih vrednosti razpolovnega časa padajoče faze PMP  $\pm$  S.E., 4–6 različnih izoliranih hemidiafragem ( $n = 7$ –10 skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). \* označuje značilno razliko ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 13: Effects of C1a on the half-decay time of end-plate potential amplitudes of skeletal muscle fibres.**

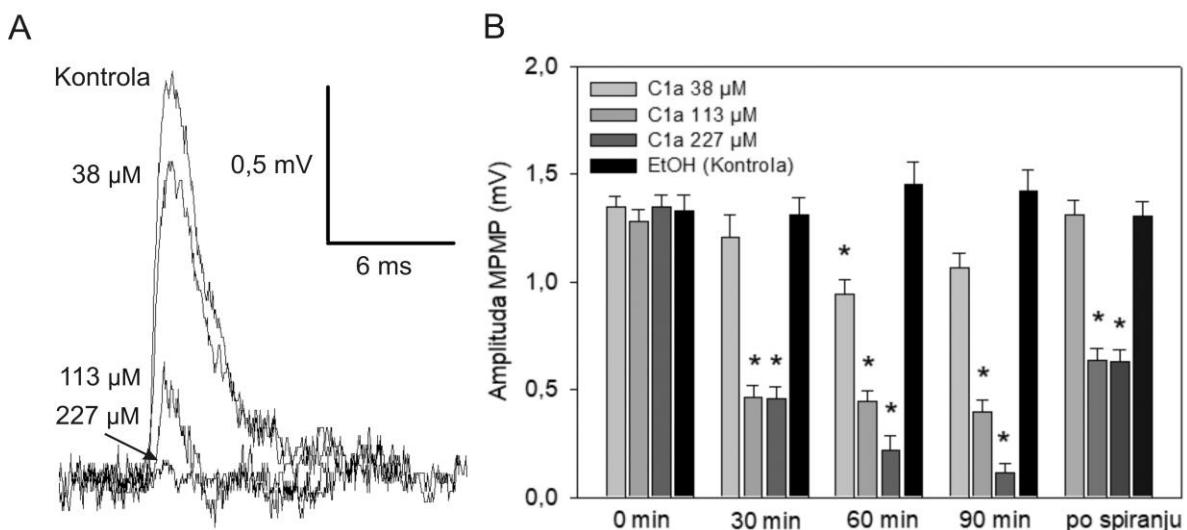
The effects of C1a on half-decay time of end-plate potential amplitudes of muscle fibres at different concentration (38  $\mu\text{M}$ , 113  $\mu\text{M}$  and 227  $\mu\text{M}$ ) and time of exposure (30, 60 and 90 min) vs. negative control. Time 0 shows values

before application, po spiranju present values 15 min after rinsing with K-R solution. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of resting membrane potential recorded from 4–6 hemidiaphragms ( $n = 7$ – $10$  fibres from each). \* indicates statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

### 4.3.3 Vpliv C1a na miniaturalni potencial motorične ploščice in razpolovni čas padajoče faze miniaturalnega potenciala motorične ploščice

#### 4.3.3.1 Vpliv C1a na amplitudo miniaturalnih potencialov motorične ploščice

C1a zmanjša amplitudo MPMP skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od koncentracije in časa izpostavljenosti. Amplituda MPMP je značilno zmanjšana pri  $38 \mu\text{M}$  koncentraciji C1a 60 minut po aplikaciji, pri  $113 \mu\text{M}$  in  $227 \mu\text{M}$  koncentraciji pa 30, 60 in 90 minut po aplikaciji ter po spiranju v primerjavi z negativno kontrolo (Slika 14).



**Slika 14:** Učinek C1a na amplitudo miniaturalnih potencialov motorične ploščice skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragmem miši.

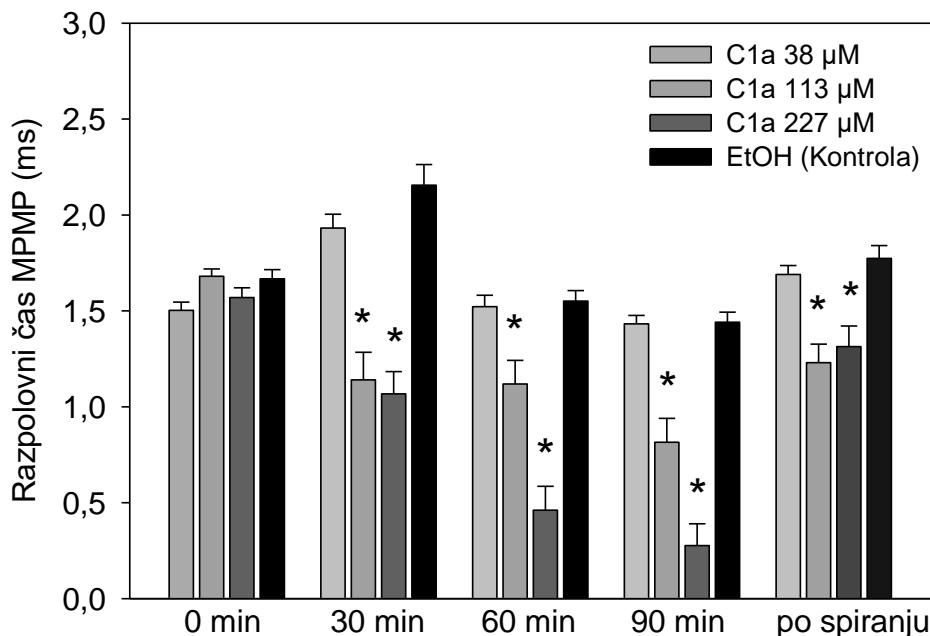
(A) prikazuje reprezentativne zapise MPMP negativne kontrole in pri različnih koncentracijah C1a. po 90 min (B) prikazuje vpliv C1a na MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragmem miši v odvisnosti od koncentracije ( $38 \mu\text{M}$ ,  $113 \mu\text{M}$  in  $227 \mu\text{M}$ ) in časa izpostavljenosti (30, 60 in 90 min) ter negativno kontrolo. Čas 0 predstavlja vrednosti pred aplikacijo. Vrednosti po spiranju predstavljajo meritve 15 min po spiranju s K-R raztopino. Vrednosti predstavljajo srednjo vrednost absolutnih vrednosti MPMP  $\pm$  S.E., 4–6 različnih izoliranih hemidiafragem ( $n = 7$ – $10$  skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). \* označuje značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 14: Effects of C1a on the miniature end-plate potential amplitudes of skeletal muscle fibres in nerve muscle preparation.**

(A) Examples of the miniature end-plate potential tracings recorded under control conditions (EtOH) and different concentration of C1a 90 min after exposure (concentrations are indicated in front of the respective tracings). (B) Effects on miniature end-plate potential amplitudes of muscle fibres at different concentration of C1a (38 µM, 113 µM and 227 µM) and time of exposure (30, 60 and 90 min) vs. negative control. Time 0 shows values before application, po spiranju present values 15 min after rinsing with K-R solution. Each value represents the mean ± S.E. of resting membrane potential recorded from 4–6 hemidiaphragms ( $n = 7$ –10 fibres from each). \* indicates statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3.3.2 Vpliv C1a na razpolovni čas padajoče faze miniaturnega potenciala motorične ploščice

C1a skrajša razpolovni čas MPMP skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od koncentracije in časa izpostavljenosti. Razpolovni čas padajoče faze MPMP je značilno krajši pri 113 in 227 µM koncentraciji C1a 30, 60 in 90 minut po aplikaciji ter po spiranju v primerjavi z negativno kontrolo (Slika 15).



**Slika 15: Učinek C1a na razpolovni čas padajoče faze miniaturnega potenciala motorične ploščice skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragmem miši.**

Prikazan je vpliv C1a na razpolovni čas padajoče faze MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragmem miši v odvisnosti od koncentracije (38 µM, 113 µM in 227 µM) in časa izpostavljenosti (30, 60 in 90 min) ter negativno kontrolo. Čas 0 predstavlja vrednosti pred aplikacijo. Vrednosti po spiranju predstavljajo meritve 15 min po

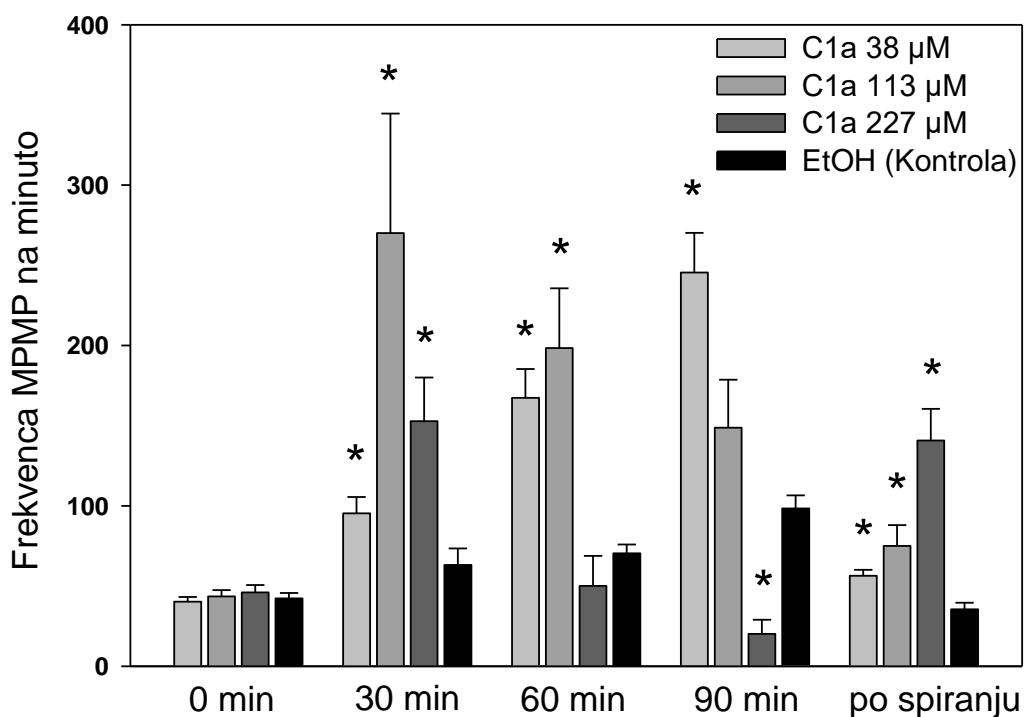
spiranju s K-R raztopino. Vrednosti predstavljajo srednjo vrednost absolutnih vrednosti razpolovnega časa padajoče faze MPMP  $\pm$  S.E., 4–6 različnih izoliranih hemidiafragem ( $n = 7\text{--}10$  skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). \* označuje značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 15: Effects of C1a on the half-decay time of miniature end-plate potential amplitudes of skeletal muscle fibres.**

The effects of C1a on half-decay time of miniature end-plate potential amplitudes of muscle fibres at different concentration (38  $\mu\text{M}$ , 113  $\mu\text{M}$  and 227  $\mu\text{M}$ ) and time of exposure (30, 60 and 90 min) vs. negative control. Time 0 shows values before application, po spiranju present values 15 min after rinsing with K-R solution. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of resting membrane potential recorded from 4–6 hemidiaphragms ( $n = 7\text{--}10$  fibres from each). \* indicates statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3.3.3 Vpliv C1a na frekvenco miniaturnih potencialov motorične ploščice

Analiza števila MPMP je pokazala, da C1a v 38  $\mu\text{M}$  koncentraciji povzroča postopno naraščanje frekvence MPMP v odvisnosti od časa in je značilno večja v primerjavi s kontrolo po 30, 60 in 90 minutah, med tem, ko izpostavitev hemidiafragm višjim koncentracijah C1a najprej po 30 min. povzroči povišanje frekvence, nato pa postopno nižanje sicer začetnih statistično značilnih visokih frekvenc MPMP v 30 min (113 in 227  $\mu\text{M}$ ), 60 min (113  $\mu\text{M}$ ) v statistično značilno znižanje frekvence MPMP 90 min (227  $\mu\text{M}$ ) v primerjavi s frekvenco MPMP pri negativni kontroli (Slika 16).



**Slika 16: Učinek C1a na frekvenco miniaturalnih potencialov motorične ploščice skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.**

Prikazan je vpliv C1a na frekvenco MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od koncentracije (38  $\mu\text{M}$ , 113  $\mu\text{M}$  in 227  $\mu\text{M}$ ) in časa izpostavljenosti (30, 60 in 90 min) ter negativno kontrolo. Čas 0 predstavlja vrednosti pred aplikacijo. Vrednosti po spiranju predstavljajo meritve 15 min po spiranju s K-R raztopino. Vrednosti predstavljajo srednjo vrednost vrednosti frekvence MPMP  $\pm$  S.E., 4–6 različnih izoliranih hemidiafragem ( $n = 7$ –10 skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). \* označuje značilno razliko ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 16: Effects of C1a on frequency of miniature end-plate potential amplitudes of skeletal muscle fibres.**

The effects on frequency of miniature end-plate potential amplitudes of muscle fibres at different concentration of C1a (38  $\mu\text{M}$ , 113  $\mu\text{M}$  and 227  $\mu\text{M}$ ) and time of exposure (30, 60 and 90 min) vs. negative control. Time 0 shows values before application, po spiranju present values 15 min after rinsing with K-R solution. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of resting membrane potential recorded from 4–6 hemidiaphragms ( $n = 7$ –10 fibres from each). \* indicates statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

## 5 RAZPRAVA

Že v 50-ih letih prejšnjega stoletja so raziskovalci opisali, da rutenijeve spojine celotne skupine tris (polipiridil) rutenijevih kompleksov delujejo bakteriostatično in protivirusno (Kljun in sod., 2016). Poleg tega so se rutenijeve spojine izkazale kot zelo obetavna citotoksična zdravila (Barry in Sadler, 2014), saj delujejo selektivno protitumorsko in imajo nizko sistemsko toksičnost (Kostova, 2006). Opisane biološke aktivnosti rutenijevih spojin, ki jih uvrščamo v skupino kovinskih kompleksov so odvisne i) od oksidacijskega stanja rutenija; ii) vrste in števila ligandov ter njihove koordinacijske geometrije (Barry in Sadler, 2014). Zaradi tega je bilo v zadnjem času sintetiziranih veliko novih rutenijevih spojin, ki so bile testirane za potencialno terapevtsko uporabo. Dve izmed njih, spojini NAMI-A in KP1019, sta bili tudi klinično preizkušani (Puckett in Barton, 2008). Poleg že opisanih bioloških učinkov je bilo ugotovljeno, da nekatere rutenijeve spojine delujejo kot zaviralci AChE in/ali agregacije peptidov A $\beta$  (Vyas in sod., 2014). Zaradi teh lastnosti bi bile lahko te spojine potencialno uporabne za simptomatsko zdravljenje AB, ki je najpogostejša oblika s starostjo povezane nevrodegenerativne demence in prizadene veliko število ljudi po vsem svetu (Palop in Mucke, 2010; Jagust, 2013). Zaviralci, ki se vežejo tako na PAS kot tudi na CAS AChE, so potencialne terapevtske učinkovine za simptomatsko zdravljenje AB (Singh in sod., 2013; Vyas in sod., 2014; Hamulakova in sod., 2017). V zadnjem času so raziskovalci s Fakultete za kemijo pod vodstvom prof. dr. Iztoka Turela sintetizirali številne nove rutenijeve spojine, ki učinkovito zavirajo encim AChE. Med vsemi na novo sintetiziranimi snovmi smo spojino, ki se je v testih *in vitro* izkazala kot najbolj učinkovit zaviralec človeške AChE in tudi učinkovit zaviralec BuChE, uporabili za nadaljnja preizkušanja, saj je zaradi svojih lastnosti zelo zanimiva kot potencialna učinkovina za simptomatsko zdravljenje AB. S poskusi *in vitro* smo pokazali, da njena IC<sub>50</sub> za AChE električne jegulje znaša 5,01  $\mu$ M, za človeško rekombinantno AChE pa 25,06  $\mu$ M (Ristovski in sod., 2018). Zaradi prisotnosti holinergičnega sistema v perifernem živčno-mišičnem sistemu in njegovega pomena za normalno funkcijo le-tega, je bil naš namen ugotoviti ali ima C1a v koncentracijah, ki popolnoma zavrejo človeško rekombinantno AChE v pogojih *in vitro* kakršenkoli vpliv na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema. Da bi ugotovili vplive C1a na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema, ki bi lahko preprečili uporabo te snovi, kot potencialnega zaviralca AChE, smo naprej opravili poskuse, s katerimi smo proučili vpliv različnih koncentracij (38  $\mu$ M, 113  $\mu$ M in 227  $\mu$ M) C1a na fiziologijo krčenja

skeletne mišice na preparatih izoliranih hemidiafragem miši. Zanimalo nas je, ali ima C1a v koncentraciji, ki skoraj popolnoma zavre človeško rekombinantno AChE (koncentracija snovi, ki povzroči zavrtje encima AChE za več kot 50 %, je farmakološko zanimiva za simptomatsko zdravljenje AB (Moss in sod., 2017), vpliva na posredno in neposredno izvano enostavno in tetanično kontrakcijo, saj bi kakršenkoli vpliv na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema omejil morebitno uporabo C1a v klinične namene. V poskusih smo merili vpliv C1a na posredno izvano mišično kontrakcijo ter ugotovili, da v 38 µM (~ IC<sub>100</sub> za človeško AChE) koncentraciji ne vpliva na amplitudo ter časovni potek posredno izvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije (Slika 6, Slika 7 in Slika 9). Če bi bila AChE v motorični ploščici močno zavrta, bi visokofrekvenčna stimulacija zaradi hitrega sproščanja in kopiranja ACh v sinaptični špranji, vodila v depolarizacijski blok, kot je bilo ugotovljeno pri neostigminu, kompetitivnem zaviralcu AChE (Chang in sod., 1986). Iz slike 9 je razviden učinek 3 µM koncentracije neostigmina, znanega zaviralca AChE, ki smo ga v poskusih uporabili kot pozitivno kontrolo. Neostigmin v navedeni koncentraciji zavre 96 % aktivnosti AChE v motorični ploščici mišje hemidiafragme (Minic in sod., 2003). V poskusih *in vitro* smo za človeško rekombinantno AChE pri 38 µM koncentraciji C1a ugotovili, da je stopnja inhibicije praktično enaka, torej skoraj popolna (Ristovski in sod., 2018). Po pričakovanjih se pri posredno izvani visokofrekvenčni stimulaciji (80 Hz) ob prisotnosti neostigmina hemidiafragma ne odzove s tetanično kontrakcijo, medtem ko se pri 38 µM C1a odzove s popolno tetanično kontrakcijo (Slika 9). C1a v 38 µM koncentraciji ne vpliva na posredno izvano enostavno mišično kontrakcijo (Slika 7), medtem ko neostigmin poveča amplitudo moči posredno izvane enostavne mišične kontrakcije (Slika 7). Torej lahko sklepamo, da C1a v 38 µM koncentraciji ne zavira AChE v motorični ploščici. V višjih, 113 in 227 µM koncentracijah, C1a v odvisnosti od časa izpostavljenosti značilno zmanjša amplitudo posredno izvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije (Slika 5). Ta učinek je najbolj opazen pri najvišji proučevani 227 µM koncentraciji. Pri obeh koncentracijah je učinek nepovraten, saj amplituda kontrakcije pada tudi po spiranju hemidiafragem (Slika 7 in Slika 9). Glede na to, da vse uporabljene koncentracije C1a in neostigmina praktično popolnoma zavrejo delovanje AChE v motorični ploščici, v našem primeru pa je učinek višjih koncentracij C1a na amplitudo posredno izvane tetanične kontrakcije progresiven ( $p \leq 0,001$ ) v odvisnosti od koncentracije (Slika 9), so lahko mehanizmi učinkov ali kombinacija le-teh različnih i) zaviralni vpliv C1a na sproščanje nevrotransmiterja

ACh iz živčnega končiča; ii) zaviranje encima AChE; iii) zaviranje nAChR na postsinaptični membrani in iv) neposredni vpliv C1a na vzdražnost/krčljivost mišičnega vlakna.

Vpliv višjih ( $113$  in  $227 \mu\text{M}$ ) koncentracij C1a na posredno izzvano enostavno in tetanično mišično kontrakcijo bi lahko bil posledica zaviralnega delovanja na nAChR, saj je učinek C1a v višjih koncentracijah, kjer v odvisnosti od časa povzroči znižanje amplitude posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije, podoben učinku, ki ga opazimo pri zaviralcih nAChR (Nguyen-Huu in sod., 2005), kot na primer pri d-tubokurarino (Vizi in sod., 1987). Neposreden vpliv C1a na nAChR bo potrebno potrditi z elektrofiziološkimi meritvami, kar pa je presegalo obseg te raziskave.

Da bi ugotovili ali je zmanjšana amplituda posledica postsinaptičnega delovanja C1a ali njenega neposrednega učinka na mišično vlakno, smo hkrati proučevali tudi vplive C1a na neposredno enostavno in tetanično mišično kontrakcijo. Značilno znižanje amplitude smo ugotovili pri neposredno izzvani mišični kontrakciji, in sicer znižanje amplitude enostavne mišične kontrakcije pri  $227 \mu\text{M}$  C1a (Slika 8) ter znižanje amplitude tetanične kontrakcije pri  $113$  in  $227 \mu\text{M}$  C1a (Slika 10). V obeh navedenih koncentracijah je učinek nepovraten, saj se amplituda kontrakcije po odstranitvi C1a ne povrne (Slika 10). C1a v  $38 \mu\text{M}$  koncentraciji, za razliko od višjih koncentracij, ne vpliva na neposredno izzvano enostavno in tetanično mišično kontrakcijo (Slika 8 in Slika 10). Ugotovljen zaviralni učinek na neposredno izzvano mišično kontrakcijo lahko nakazuje tudi morebitno miotoksično delovanje. Ugotovili smo izrazitejši vpliv C1a na posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo, v primerjavi z neposredno, pri  $227 \mu\text{M}$  koncentraciji ( $p \leq 0,001$ ), medtem ko je bil pri posredno izzvani tetanični mišični kontrakciji, v primerjavi z neposredno, vpliv izrazitejši tako pri  $113$  kot tudi pri  $227 \mu\text{M}$  koncentraciji C1a ( $p \leq 0,001$ ).

Glede na to, da je inhibicija posredno izzvane tetanične kontrakcije pri istih koncentracijah C1a večja kot pri neposredno izzvani tetanični kontrakciji, je mogoče sklepati, da C1a v visokih ( $113$  in  $227 \mu\text{M}$ ) koncentracijah lahko deluje kot zaviralec AChE v motorični ploščici. Namreč C1a povzroči značilno zmanjšanje amplitude posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije, podobno kot  $3 \mu\text{M}$  neostigmin, zaviranje AChE v motorični ploščici pa zaradi depolarizacijskega bloka prepreči razvoj tetanične kontrakcije (Chang in sod., 1986). Vendar v našem primeru domnevamo, da je vpliv višjih koncentracij C1a na posredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo najverjetneje posledica zaviralnega delovanja C1a na nAChR, oziroma je morebitni zaviralni učinek C1a na AChE prekrit z njenim domnevnim zaviralnim učinkom na

nAChR. Domnevo potrjuje tudi dejstvo, da se amplituda posredno izvvane enostavne mišične kontrakcije zmanjša, v nasprotju z delovanjem neostigmina, ki povzroči značilno povečanje amplitude.

Neposredni vpliv C1a smo funkcionalno ovrednotili na podlagi pojava porasta MT (v času odsotnosti električne stimulacije), ki se pri 113 µM koncentraciji pojavi približno 50 minut po aplikaciji (Slika 5C) in pri 227 µM koncentraciji takoj po aplikaciji C1a (Slika 5D). Porast MT nakazuje miotoksičen učinek testirane snovi (Harvey in sod., 1994), saj je podoben učinku, ki ga povzročijo nekateri toksini (Harvey in sod., 1994; Žužek in sod., 2016). Trditev še dodatno podkrepi sočasen padec amplitude neposredno izvvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije pri višjih koncentracijah C1a. Iz integracije vseh rezultatov izometrične mišične kontrakcije je mogoče sklepati, da C1a v odvisnosti od časa, v 113 in 227 µM koncentraciji, najverjetnejso sočasno zavira delovanje nAChR in deluje miotoksično, saj nepovratno zmanjša amplitudo izometrične mišične kontrakcije in povzroči porast MT.

Da bi bolje opredelili mehanizme učinkov C1a na periferno živčno-mišični sistem, smo poleg vpliva na izometrično mišično kontrاكijo, proučili tudi njegov vpliv na naslednje elektrofiziološke parametre membranskih potencialov i) membranski potencial v mirovanju mišičnih vlaken; ii) potenciale motorične ploščice in iii) miniaturne potenciale motorične ploščice. Analizirali smo amplitudo vseh potencialov, razpolovni čas padajoče faze PMP in MPMP ter frekvenco MPMP, da bi lažje pojasnili vpliv in mehanizem delovanja navedene snovi. Rezultati meritev  $rV_m$  skeletnih mišičnih vlaken so pokazali, da C1a pri najnižji (38 µM) koncentraciji ne vpliva na  $rV_m$ . Pri 113 µM koncentraciji smo ta vpliv na mišična vlakna ugotovili šele 90 minut po izpostavljenosti C1a, ki pa je bil povraten, saj se je vrednost  $rV_m$  po spiranju povrnila na začetno stanje (Slika 11). Pri najvišji koncentraciji C1a pa smo ugotovili značilen padec vrednosti  $rV_m$  že 30 minut po izpostavitvi. Vrednosti so na to ostale značilno znižane in se niso povrnile tudi po spiranju oziroma odstranitvi C1a.

Meritve  $rV_m$  torej potrjujejo, da C1a v 113 µM koncentraciji 90 minut po aplikaciji in 227 µM koncentraciji 30, 60 in 90 minut po aplikaciji povzroči padec  $rV_m$  skeletnih mišičnih vlaken. Vzrok za padec  $rV_m$  bi v našem primeru lahko bil posledica morebitnega miotoksičnega delovanja C1a, kar potrjuje tudi dejstvo, da se pri 227 µM koncentraciji po spiranju hemidiafragem s K-R raztopino  $rV_m$  ne povrne na raven negativne kontrole. Da bi podprli ali ovrgli domnevo o zaviralnem učinku visokih koncentracij C1a na AChE in morebiten učinek

na nAChR v motorični ploščici, smo poleg meritev  $rV_m$  analizirali tudi amplitudo in razpolovni čas padajoče faze PMP.

Ugotovili smo, da C1a pri vseh koncentracijah (38, 113 in 227  $\mu\text{M}$ ) v odvisnosti od časa izpostavljenosti značilno zniža amplitudo in podaljša razpolovni čas padajoče faze PMP. Pri 38  $\mu\text{M}$  koncentraciji 30 minut po aplikaciji C1a ne zmanjša amplitude PMP, vendar pa se, za razliko od višjih koncentracij C1a, po spiranju hemidiafragem amplituda PMP popolnoma povrne na raven negativne kontrole (Slika 12). Kljub temu, da je amplituda PMP pri 38  $\mu\text{M}$  koncentraciji C1a 60 in 90 minut po aplikaciji značilno zmanjšana, to ne vpliva na fiziologijo izometrične mišične kontrakcije, kar je razvidno iz slike 6A. Ker je pri 113 in 227  $\mu\text{M}$  koncentraciji C1a zmanjšanje amplitude PMP progresivno večje ( $p \leq 0,001$ ), to povezujemo z zmanjšanjem amplitude izometrične kontrakcije, kar je razvidno iz slik 5C, 5D in 12. Kot je razvidno iz slike 11, se pri 38  $\mu\text{M}$  C1a  $rV_m$  ne spremeni, kar pomeni, da amplituda PMP ni zmanjšana zaradi spremembe  $rV_m$ . To prav tako velja tudi za 113  $\mu\text{M}$  koncentracijo C1a 30 in 60 min po izpostavitvi, kjer za padec amplitude kontrakcije ni odgovorna sprememba vrednosti  $rV_m$ . Pri daljši izpostavitvi (90 minut) ter najvišji koncentraciji, C1a povzroči značilen, vendar relativno majhen padec  $rV_m$ , ki pa bi lahko bil odgovoren za znižanje amplitude PMP.

Iz slike 13 je razvidno, da se pri vseh koncentracijah C1a (38, 113 in 227  $\mu\text{M}$ ) razpolovni čas padajoče faze PMP 30 minut po aplikaciji močno podaljša, čemur sledi zmeren upad razpolovnega časa padajoče faze, ki pa je še vedno značilno podaljšan. Učinek je nepovraten, saj je značilno podaljšanje prisotno tudi po spiranju hemidiafragem. Znano je, da zaviralci AChE povzročijo dvig amplitude in podaljšanje razpolovnega časa padajoče faze PMP (Kuba in Tomita, 1971). Obraten učinek, torej zmanjšanje amplitude PMP, pa zaznamo pri zaviralcih nAChR (Magleby in sod., 1981). Padec amplitude PMP in podaljšanje razpolovnega časa padajoče faze PMP lahko torej nakazujeta sočasen zaviralni učinek C1a na AChE in nAChR, zlasti 30 minut po aplikaciji pri 113 in 227  $\mu\text{M}$  koncentraciji, kjer se amplituda PMP zmanjša in razpolovni čas padajoče faze močno podaljša (Slika 12 in Slika 13). Dvojno zaviralno delovanje (na AChE in nAChR) v odvisnosti od koncentracije je znano za nekatere zaviralce AChE, kot na primer APS 12-2 (Grandič in Frangež, 2014), kar pa bo potrebno v primeru C1a še funkcionalno potrditi z elektrofiziološko raziskavo neposredno na nAChR.

Poleg že opisanih elektrofizioloških parametrov skeletnih mišičnih vlaken smo z rezultati meritev MPMP, podobno kot pri PMP, ugotovili značilno zmanjšanje amplitude MPMP pri 113 in 227  $\mu\text{M}$  koncentraciji v odvisnosti od časa. Pri navedenih koncentracijah se značilno

zmanjšanje amplitude pojavi 30 minut po aplikaciji C1a in traja tudi po spiranju hemidiafragem. Značilno zmanjšanje amplitude MPMP lahko opazimo tudi pri 38 µM koncentraciji 60 minut po aplikaciji (Slika 14). Zmanjšanje amplitude MPMP lahko nakazuje zaviralni učinek snovi na nAChR, kajti zaviralci nAChR zmanjšajo amplitudo MPMP (Dobelis in sod., 1999) za razliko od zaviralcov AChE, kjer se amplituda MPMP poveča (Ros in sod., 2001). Poleg tega C1a v odvisnosti od časa pri 113 in 227 µM koncentraciji povzroči značilno skrajšanje razpolovnega časa padajoče faze MPMP. Značilno skrajšanje se pojavi pri navedenih koncentracijah 30 minut po aplikaciji in traja tudi po spiranju hemidiafragem (Slika 15). Skrajšanje razpolovnega časa padajoče faze MPMP ob sočasnem upadu amplitude najverjetneje nakazuje zaviralni vpliv C1a na nAChR.

Meritve vpliva C1a na frekvenco MPMP so pokazale, da je vpliv snovi vezan predvsem na njeno koncentracijo in čas izpostavljenosti. Pri 38 µM koncentraciji se frekvence MPMP 30 minut po aplikaciji značilno poveča in narašča vse do 90 minut po aplikaciji. Učinek je počasi povraten, saj po spiranju in odstranitvi C1a sledi upad frekvence MPMP, ki pa je po 15 min še vedno značilno povečana v primerjavi z negativno kontrolo. Pri 113 µM koncentraciji C1a 30 minut po aplikaciji opazimo značilno povečanje frekvence MPMP, sledi njen upad, vendar je 60 minut po aplikaciji še vedno značilno povečana, po spiranju pa frekvence MPMP ponovno značilno naraste. C1a pri 227 µM koncentraciji 30 minut po aplikaciji povzroči porast frekvence MPMP, sledi znižanje frekvence, ki je 90 minut po aplikaciji še značilno znižana. Po spiranju hemidiafragem pri navedeni koncentraciji pa sledi močan porast frekvence MPMP (Slika 16). Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da C1a verjetno deluje tudi presinaptično. Eden izmed možnih mehanizmov je zaviranje AChE, ki povzroči kopiranje ACh v sinaptični špranji in posledično privede do presinaptične stimulacije nAChR živčnega tipa. Znano je, da lahko nekateri zaviralci AChE nekajkrat povečajo frekvenco MPMP, ki je posledica zgoraj opisanega mehanizma (Bois in sod., 1980).

V tabeli 1 so pregledno povzeti vsi ugotovljeni vplivi C1a na merjene elektrofiziološke parametre motorične ploščice, ki v danem obsegu omogočajo hiter pregled učinkov in mehanizmov njihovega nastanka.

**Tabela 1: Vpliv C1a na elektrofiziološke parametre motorične ploščice v mišji hemidiafragmi.****Table 1: Effects of C1a on electrophysiological parameters on neuromuscular junction in mouse hemidiaphragm preparation.**

Protokol stimulacije	Proučevani parametri	C1a			Pričakovani rezultati inhibicije nAChR	Pričakovani rezultati inhibicije AChE
		38 µM	113 µM	227 µM		
Živec (posredno)	Amplituda enostavne mišične kontrakcije	↗	↘	↘	↘	↗
	Amplituda tetanične mišične kontrakcije	↗	↘	↘	↘	↘
	Amplituda PMP	↘	↘	↘	↘	↗
	Razpolovni čas PMP	↗	↗	↗	→	↗
Mišica (neposredno)	Amplituda enostavne mišične kontrakcije	↗	↗	↘	→	→
	Amplituda tetanične mišične kontrakcije	↗	↘	↘	→	→
Brez stimulacije	Amplituda MPMP	↗	↘	↘	↘	↗
	Frekvenca MPMP	↗	↗	↗ ↘	↘	↗
	Razpolovni čas MPMP	↗	↘	↘	→	↗
	Membranski potencial v mirovanju	↗	↘	↘	→	↘

Legenda: → nespremenjeno; ↗ zvišanje/podaljšanje; ↘ znižanje/skrajšanje

Če na kratko povzamemo, C1a pri 38 µM koncentraciji, pri kateri popolnoma zavre aktivnost človeške AChE, sicer značilno zmanjša amplitudo PMP, poveča frekvenco MPMP in podaljša razpolovni čas PMP. Ta učinek je relativno majhen in biološko nepomemben, saj ne vpliva na fiziologijo krčenja mišice. Pri suprafarmakoloških koncentracijah C1a (113 in 227 µM) zmanjšana amplituda posredno izvvane mišične kontrakcije, podaljšan razpolovni čas PMP in zmanjšan  $rV_m$  nakazujejo, da C1a lahko deluje kot zaviralec AChE v motorični ploščici (Tabela 1). Del padca amplitude posredno izvvane mišične kontrakcije lahko pripisemo tudi miotoksičnemu učinku C1a, ki smo ga zaznali pri suprafarmakoloških koncentracijah kot dvig MT in verjetno delne depolarizacije mišičnih vlaken. Potrebno je poudariti, da je padec amplitude posredno izvvane mišične kontrakcije bistveno večji kot neposredno izvvane, kar lahko poleg miotoksičnega učinka nakazuje tudi na antiholinesterazni vpliv C1a. Večina ostalih rezultatov pa v suprafarmakoloških koncentracijah C1a nakazuje tudi blokado nAChR na postsinaptični membrani. Zaradi razjasnitve mehanizmov delovanja proučevane snovi (C1a) bo pri suprafarmakoloških koncentracijah potrebno proučiti njen neposredni vpliv na nAChR mišičnega tipa. Zaradi zaviralne aktivnosti C1a na AChE v farmakoloških koncentracijah in

Tomaž Trobec: Vpliv rutenijeve spojine C1a na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2018. Raziskovalna naloga

---

širokega predkliničnega terapevtskega potenciala je spojina C1a vsekakor zanimiva za nadaljnje raziskave.

## 6 SKLEPI

1. Rutenijeva spojina C1a v farmakološki koncentraciji ( $38 \mu\text{M}$ ), pri kateri je človeška AChE skoraj popolnoma zavrta, ne vpliva na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema, iz česar lahko sklepamo, da ne zavira delovanja AChE v motorični ploščici *in vitro*.
2. Medtem ko rutenijeva spojina C1a v farmakoloških koncentracijah nima vpliva na mišično kontrakcijo, pri višjih koncentracijah značilno zmanjša amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije, kar dokazuje, da ima vpliv na funkcijo skeletnih mišic.
3. Ker rutenijeva spojina C1a pri visokih koncentracijah povzroči spremembo elektrofizioloških parametrov, ki govorijo v prid tako inhibicije AChE kot blokade nAChR, lahko sklepamo, da gre za dvojno delovanje, kar je že bilo ugotovljeno za nekatere zaviralce AChE.
4. C1a v visokih, nefarmakoloških koncentracijah deluje miotoksično, saj povzroči značilno znižanje amplitude neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije, hkrati pa porast mišične tenzije v mirovanju (kontrakturo).
5. Ker v farmakoloških koncentracijah rutenijeva spojina C1a ne vpliva na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema, je zanimiva za nadaljnje raziskave kot potencialno nova terapevtska učinkovina z zaviralnim učinkom na AChE.

## 7 ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so kakorkoli sodelovali in mi pomagali pri nastajanju ter oblikovanju Prešernove raziskovalne naloge, s čimer so prispevali svoj kamenček neprecenljive vrednosti k mozaiku končnega izdelka.

Iskreno se zahvaljujem mentorici, doc. dr. Moniki Žužek ter prof. dr. Robertu Frangežu, ki sta me navdušila za raziskovalno delo in izdelavo Prešernove raziskovalne naloge ter mi s svojim obširnim znanjem in strokovnimi nasveti ves čas stala ob strani. Hvala za pomoč, spodbudo, prijaznost, potrpežljivost, razumevanje in znanje, ki sta ga delila z mano.

Zahvala velja tudi Katarini Babnik in Boštjanu Drolcu za tehnično pomoč, nasvete, ustrežljivost in prijaznost.

mag. Gita Greč-Smole in Stanka Ujc sta skrbno pregledali seznam literature, Barbara Burjak pa je pomagala pri jezikovnem urejanju besedila, za kar se jim lepo zahvaljujem.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in prijateljem za vso podporo in strpnost.

## 8 LITERATURA

- Adams RH. Neuromuscular blocking agents. In: Riviere JE, Papich MG, Adams RH, eds. Veterinary pharmacology and therapeutics. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2009: 211–28.
- Ali HH, Savarese JJ. Monitoring of neuromuscular function. *Anesthesiology* 1976; 45(2): 216–49.
- Barak D, Ordentlich A, Stein D, Yu QS, Greig NH, Shafferman A. Accommodation of physostigmine and its analogues by acetylcholinesterase is dominated by hydrophobic interactions. *Biochem J* 2009; 417(1): 213–22.
- Barry NPE, Sadler PJ. 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure Appl Chem* 2014; 86(12): 1897–910.
- Bergamo A, Sava G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalton Trans* 2011; 40(31): 7817–23.
- Bergmark D. Inhibitors of acetylcholinesterase. Ithaca: Chornell Theory Center, 1996 (Chem 204, Fall 1996: 1–20).
- Birks R, Katz B, Miledi R. Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration. *J Physiol* 1960;150(1): 145–68.
- Bois RT, Hummel RG, Dettbarn WD, Laskowski MB. Presynaptic and postsynaptic neuromuscular effects of a specific inhibitor of acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;215(1):53–9.
- Boyd ND. Two distinct kinetic phases of desensitization of acetylcholine receptors of clonal rat PC12 cells. *J Physiol* 1987; 389: 45–67.
- Brisson A, Unwin PN. Quaternary structure of the acetylcholine receptor. *Nature* 1985; 315(6019): 474–7.
- 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.
- Chang CC, Hong S.J, Ko JL. Mechanisms of the inhibition by neostigmine of tetanic contraction in the mouse diaphragm. *Br J Pharmacol* 1986; 87(4): 757–62.
- Chong FP, Ng KY, Koh RY, Chye SM. Tau proteins and tauopathies in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol* 2018; 38(5): 965–80.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 2009; 11(7): 909–13.
- Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11(3): 315–35.

Court FA, Gillingwater TH, Melrose S, et al. Identity, developmental restriction and reactivity of extralaminar cells capping mammalian neuromuscular junctions. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 23): 3901–11.

Darvesh S, Darvesh KV, McDonald RS, et al. Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J Med Chem* 2008; 51(14): 4200–12.

Desai AK, Grossberg GT. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 2005; 5(5): 563–80.

Dobelis P, Madl JE, Pfister JA, Manners GD, Walrond JP. Effects of Delphinium alkaloids on neuromuscular transmission. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291(2): 538–46.

Duan AR, Jonasson EM, Alberico EO, et al. Interactions between Tau and different conformations of tubulin: implications for Tau function and mechanism. *J Mol Biol* 2017; 429(9): 1424–38.

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

Fa M, Puzzo D, Piacentini R, et al. Extracellular Tau oligomers produce an immediate impairment of LTP and memory. *Sci Rep* 2016; 6:e19393, 1–15.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4726138/> (5. dec. 2017)

Fatt P, Katz B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol* 1951; 115(3): 320–70.

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.

Fertuck HC, Salpeter MM. Localization of acetylcholine receptor by <sup>125</sup>I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71(4): 1376–8.

Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect* 1990; 87: 245–54.

Ghai B, Makkar JK, Wig J. Neuromuscular monitoring : a review. *J Anaesth Clin Pharmacol* 2006; 22(4): 347–56.

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.

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.

Guyton CA, Hall JE. Text book of medical physiology. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006: 85–90.

Haimovich B, Schotland DL, Fieles WE, Barchi RL. Localization of sodium channel subtypes in adult rat skeletal muscle using channel-specific monoclonal antibodies. *J Neurosci* 1987; 7(9): 2957–66.

Hall ZW, Sanes JR. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* 1993; 72 (Suppl): 99–121.

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.

Hartinger CG, Jakupc MA, Zorbas-Seifried S, et al. KP1019, a new redox-active anticancer agent: preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem Biodivers* 2008; 5(10): 2140–55.

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.

Hayne DJ, Lim S, Donnelly PS. Metal complexes designed to bind to amyloid-beta for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Chem Soc Rev* 2014; 43(19): 6701–15.

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

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.

Jagust W. Vulnerable neural systems and the borderland of brain aging and neurodegeneration. *Neuron* 2013; 77(2): 219–34.

Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells *in situ*. *Neuron* 1992; 8(6): 1069–77.

Katz B, Thesleff S. On the factors which determine the amplitude of the miniature end-plate potential. *J Physiol* 1957a; 137(2): 267–78.

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

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.

Kljun J, Anko M, Traven K, et al. Pyrithione-based ruthenium complexes as inhibitors of aldo-keto reductase 1C enzymes and anticancer agents. *Dalton Trans* 2016; 45(29): 11791–800.

Kostova I. Ruthenium complexes as anticancer agents. *Curr Med Chem* 2006; 13(9): 1085–107.

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

Lawler HC. Turnover time of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 1961; 236: 2296–301.

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.

Liang, YQ, Tang XC. Comparative studies of huperzine A, donepezil, and rivastigmine on brain acetylcholine, dopamine, norepinephrine, and 5-hydroxytryptamine levels in freely-moving rats. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(9): 1127–36.

Lodish HF, Berk A, Kaiser CA, et al. Molecular and cell biology. 6th ed. New York: WH Freeman and Company, 2008: 1025.

Macartney DH. Cucurbit[n]uril type hosts for the reversal of steroid neuromuscular blocking agents. *Future Med Chem* 2013; 5(17): 2075–89.

Maconochie DJ, Fletcher GH, Steinbach JH. The conductance of the muscle nicotinic receptor channel changes rapidly upon gating. *Biophys J* 1995; 68(2): 483–90.

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.

Magleby KL, Pallotta BS, Terrar DA. The effect of (+)-tubocurarine on neuromuscular transmission during repetitive stimulation in the rat, mouse, and frog. *J Physiol* 1981; 312: 97–113.

Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 1993; 41(1): 31–91.

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

Minic J, Chatonnet A, Krejci E, Molgo 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.

Moss DE, Perez RG, Kobayashi H. Cholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease: the limits and tolerability of irreversible CNS-selective acetylcholinesterase inhibition in primates. *J Alzheimers Dis* 2017; 55(3): 1285–94.

Nguyen-Huu T, Dobbertin A, Barbier J, et al. Cholinesterases and the resistance of the mouse diaphragm to the effect of tubocurarine. *Anesthesiology* 2005; 103(4): 788–95.

Ochoa ELM, Chattopadhyay A, Mcnamee MG. Desensitization of the nicotinic acetylcholinereceptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell Mol Neurobiol* 1989; 9(2): 141–78.

- Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 2010; 13(7): 812–8.
- 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.
- Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011; 155(3): 219–29.
- Puckett CA, Barton JK. Mechanism of cellular uptake of a ruthenium polypyridyl complex. *Biochemistry* 2008; 47(45): 11711–6.
- Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2010; 362(4): 329–44.
- Quick MW, Lester RA. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 2002; 53(4): 457–78.
- Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem Rev* 1987; 87(5): 955–79.
- Reist NE, Smith SJ. Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(16): 7625–9.
- Reynolds ML, Woolf CJ. Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol* 1992; 21(1): 50–66.
- 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.
- Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5(3): 293–302.
- Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: how is structure related to function? *Chem Biol Interact* 2008; 175(1/3): 3–10.
- 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.
- Slater CR. The structure of human neuromuscular junctions: some unanswered molecular questions. *Int J Mol Sci* 2017;18(10): e2183, 1–15.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666864/> (1. dec. 2017)
- Sugiura Y, Lin W. Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function. *Biosci Rep* 2011; 31(5): 295–302.
- Sussman JL, Harel M, Frolow F, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991; 253(5022): 872–9.

Szegletes T, Mallender WD, Thomas PJ, Rosenberry TL. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry* 1999; 38(1): 122–33.

Ristovski S, Uzelac M, Kljun J, et al. Organoruthenium prodrugs as a new class of cholinesterase and glutathione-S-transferase inhibitors. *ChemMedChem*, 2018. In press. doi: 10.1002/cmdc.201800432.

Taylor P, Lappi S. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry* 1975; 14(9): 1989–97.

Taylor P. Anticholinesterase agents. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC, eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 12 th ed. New York: McGraw-Hill, 2011: 239–54.

Tintignac LA, Brenner HR, Rüegg MA. Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting. *Physiol Rev* 2015; 95(3): 809–52.

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.

Van der Kloot W, Molgo J. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev* 1994; 74(4): 899–991.

Vizi ES, Somogyi GT, Nagashima H, et al. Tubocurarine and pancuronium inhibit evoked release of acetylcholine from the mouse hemidiaphragm preparation. *Br J Anaesth* 1987; 59(2): 226–31.

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

Westfall TC, Westfall DP. Agents acting in neuromuscular junction and autonomic ganglia. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC, eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 12 th ed. New York: McGraw-Hill, 2011: 171–218.

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.

Witzemann V, Stein E, Barg B, et al. Primary structure and functional expression of the alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-subunits of the acetylcholine receptor from rat muscle. *Eur J Biochem* 1990; 194(2): 437–48.

Wood SJ, Slater CR. Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol* 2001; 64(4): 393–429.

Zimmerman G, Soreq H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res* 2006; 326(2): 655–69.

Tomaž Trobec: Vpliv rutenijeve spojine C1a na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2018. Raziskovalna naloga

---

Žužek MC, Grandič M, Jakovac Strajn B, Frangež R. Beauvericin inhibits neuromuscular transmission and skeletal muscle contractility in mouse hemidiaphragm preparation. *Toxicol Sci* 2016; 150(2): 283–91.