

НОВЫЙ ГИБРИД ДОНЕПЕЗИЛ–КОФЕЙНАЯ КИСЛОТА: СИНТЕЗ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ

© 2023 D. Kılıçaslan^{1*}, A. H. Kurt², M. Köse³,
M. Çeşme³, Ö. Güngör³, C. K. Oztabag⁴, A. Doganer⁵

¹ Afsin Vocational School, Department of Chemistry and Chemical Processing Technologies,
Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Kahramanmaraş, Turkey; E-mail: deryatrnc@ksu.edu.tr

² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Bolu Abant İzzet Baysal University, Bolu, Turkey

³ Department of Chemistry, Faculty of Art and Sciences, Kahramanmaraş Sutcu Imam University,
Kahramanmaraş, Turkey

⁴ Department of Interdisciplinary Neuroscience, Bolu Abant İzzet Baysal University, Institute of Health Sciences,
Bolu, Turkey

⁵ Department Biostatistics and Medical Informatics, Faculty of Medicine, Kahramanmaraş Sutcu Imam University,
Kahramanmaraş, Turkey

Поступила в редакцию 10.07.2022

После доработки 30.12.2022

Принята к публикации 04.01.2023

Была разработана, синтезирована и исследована с помощью молекулярного моделирования новая гибридная молекула донепезил–кофейная кислота (DP–CA). Биологическая активность этого соединения и его защитный эффект исследовали методами ИК-спектроскопии, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Было показано, что молекула DP–CA высоко активна против ацетилхолинэстеразы и ингибировала активность этого фермента в микромолярных концентрациях. С помощью методов флуоресцентной спектроскопии и спектрофотометрии в видимом свете и ближнем ультрафиолете было показано сильное связывание молекулы DP–CA с ДНК. Более того, DP–CA проявляла защитный эффект от индуцированной H₂O₂ токсичности в клетках глиобластомы U-118 MG. Наконец, молекулярный докинг показал высокое сродство к DP–CA во всех концентрациях, а в активном центре 4EY7 были обнаружены незаменимые аминокислотные остатки с полярными и неполярными контактами. В совокупности эти данные указывают на то, что DP–CA может быть перспективным многофункциональным агентом для лечения нейродегенеративных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: донепезил, кофейная кислота, гибридная молекула, ацетилхолинэстераза, молекулярный докинг, защитный эффект.

DOI: 10.31857/S0320972523020033, EDN: QFWADC

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) признана наиболее частой причиной деменции [1]. Текущие клинические испытания лекарственных препаратов сфокусированы на различных патологических путях, участвующих в развитии этого нейродегенеративного расстройства. Симптомы деменции у больных БА могут быть связаны с отсутствием нейротрансмиттеров ацетилхолина [2] в результате снижения синтеза и высвобождения ацетилхолина из-за гибели нейронов.

Поэтому считается, что когнитивные функции больных БА могут быть улучшены за счет повышения уровня ацетилхолина или торможения его катаболизма [3]. Используемые в настоящее время лекарства, одобренные Федеральным управлением по лекарственным средствам (FDA) в США, только облегчают симптомы. Они не препятствуют прогрессированию болезни, а просто в некоторой степени улучшают дефицит памяти у пациентов с БА [4], что побудило исследователей разработать новые методы лечения, влияющие на развитие этой болезни.

Принятые сокращения: АХЭ – ацетилхолинэстераза; БА – болезнь Альцгеймера; ДТНБ – 5,5-дителибис-(2-нитробензойная кислота); ЭБ – этидиумбромид; СА – кофейная кислота; DP – донепезил; DP–CA – донепезил–кофейная кислота; U-118 MG – клетки глиобластомы.

* Адресат для корреспонденции.

В последние годы разработка методов лечения БА связана с поиском новых, более эффективных ингибиторов ацетилхолинэстеразы (АХЭ), обладающих защитной и терапевтической активностью, а также меньшим количеством побочных эффектов. Одним из новых подходов является разработка, синтез и использование гибридных молекул лекарственных препаратов, состоящих из двух хорошо зарекомендовавших себя химических каркасов и обладающих сочетанием необходимых биологических активностей в одной молекуле. Для этого препараты, используемые для лечения БА, комбинируются с активными поддерживающими молекулами. Полученные соединения, которые облегчают лечение многофакторных заболеваний, считаются очень перспективными терапевтическими агентами, поскольку они снижают риск межлекарственных взаимодействий и стимулируют исследования фармакодинамики и фармакокинетики лекарств [5]. Так, в работах Minarini et al. [6], Galdeano et al. [7], Fernandez-Bachiller et al. [8] и Chen et al. [9] была подробно исследована новая гибридная молекула с ингибирующей активностью АХЭ и антиоксидантными свойствами. Установлено, что молекулы, сочетающие два и более различных фармакологических свойства, включая антиоксидантную активность, демонстрируют большую эффективность в лечении БА, чем препараты с одной мишенью, так как они воздействуют и на другие мишени нейродегенеративного процесса [10–13].

Mohsi и Ahmad [14] разработали новую серию многофункциональных гибридных молекул на основе каркаса донепезила и протестировали их в качестве потенциальных агентов против болезни Альцгеймера. Конъюгаты природных соединений, таких как феруловая кислота, куркумин и флавоноиды, с донепезилом ингибировали АХЭ, а также проявляли антиоксидантную активность [15–17]. В другом исследовании сообщалось об ингибировании бутирилхолинэстеразы и АХЭ гибридными молекулами, полученными в результате присоединения донепезила и такрина [18, 19]. Молекулы, образованные путем соединения донепезила и природных соединений, таких как флавоноиды, куркумин и кумарины, проявляют антиоксидантные свойства и ингибирующую активность в отношении моноаминоксидазы и холинэстеразы [17, 20–22].

Кофейная кислота (СА, 3,4-гидроксикоричная кислота) представляет собой фенольную кислоту, которая в избытке содержится во фруктах, овощах и отдельных растительных, включая чай и кофе [23, 24]. Недавние иссле-

дования выявили многочисленные фармацевтические свойства СА, такие как противораковая, антитромботическая, антигипертензивная, противовоспалительная, противовирусная и антифиброзная активности [25–28]. Однако в нескольких исследованиях изучалось потенциальное нейропротекторное действие СА против Аβ-индуцированной клеточной токсичности [29, 30]. Сравнение СА с препаратом Тролокс [31] показало, что кофейная кислота более эффективна против окислительного стресса за счет удаления пероксильного радикала.

Целью данного исследования было создание новой гибридной молекулы, сочетающей антиоксидантные и нейропротекторные свойства с ингибирующей активностью в отношении АХЭ, и проверка ее эффективности *in vitro* при лечении болезни Альцгеймера. Нами был разработан и синтезирован новый гибридный ингибитор АХЭ с улучшенным фармакологическим профилем с перспективой создания нового класса гибридных химических соединений в качестве многоцелевых продуктов для лечения неврологических заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и оборудование. В работе использовали следующие реактивы: кофейная кислота (СА), тионилхлорид, дихлорометан, тетрагидрофуран, триэтиламин, 5,6-диметокси(пиперидин-4-илметил)-2,3-дигидро-1Н-инден-1-он (DP) и растворители («Sigma-Aldrich», США) без дополнительной очистки (если не указано иное). Для мониторинга протекания реакции и оценки чистоты синтезированных продуктов реакции использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) на алюминевых пластинках, покрытых силикагелем 60 F254. Для визуализации пятен использовали УФ-лампу ($\lambda = 254$ нм). ИК-спектры соединений получали с помощью метода полного ослабления отражения (ATR, attenuated total reflectance) на инфракрасном спектрофотометре Perkin Elmer Spectrum 100 («Perkin Elmer», США) с Фурье-преобразованием (FT-IR). ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры с использованием изотопов ^1H и ^{13}C регистрировали на ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III 400 МГц («Bruker», США) в DMSO- d_6 . Значения химического сдвига (ppm) оценивали по шкале δ , используя в качестве контроля пик растворителя. Константы взаимодействия были представлены в герцах (Hz). Масс-спектры регистрировали на спектрометре Agilent LC/MS-TOF («Agilent Technologies», США) в метаноле (ч.д.а.).

Синтез хлорида кофейной кислоты. Для получения хлорида кофейной кислоты препарат кофейной кислоты (5,55 ммоль) в дихлорметане смешивали с 20 мл тионилхлорида и перемешивали в колбе с обратным холодильником в течение 8 ч [32]. Для осуществления контроля реакции использовали ТСХ. Чистоту полученного продукта определяли с помощью ИК- и УФ-освещения. Наблюдался сдвиг пика реакционной смеси от 1641 (карбоксильная группа) к 1715 (гидрохлорид). Выход продукта составлял 70%; температура плавления (т. пл.): 155–157 °С.

Синтез гибридов донепезила и кофейной кислоты (DP–CA). 5,6-Диметокси-(пиперидин-4-илметил)-2,3-дигидро-1H-инден-1-он (0,1 ммоль) растворяли в тетрагидрофуране (THF) и добавляли к препарату синтезированного гидрохлорида кофейной кислоты (0,1 ммоль) в щелочном триэтилаmine. Гибридную молекулу донепезила и кофейной кислоты (DP–CA) получали при перемешивании реакционной смеси с обратным холодильником в течение 8 ч. Течение реакции контролировали с помощью ТСХ. Органический слой отделяли, промывали и высушивали. Затем раствор упаривали, получая неочищенный продукт.

DP–CA. C₂₆H₂₉NO₆ MW: коричневая окраска (451,52 г/моль, выход – 86%). FT-IR (ATR см⁻¹):

- 3357 (O–H),
- 2938 (C–H),
- 1677 (C=O),
- 1630 (C=O),
- 1394–1588 (C=C)
- 1032 (C–O).

¹H-ЯМР (DMSO-d₆, ppm):

- 9,27–9,13 (O–H);
- 9,88 (CH_{ароматич.}, 1H, s);
- 7,09–7,04 (CH_{ароматич.}, 2H, s);
- 6,79 (CH_{ароматич.}, 1H, d);
- 6,27 (CH_{ароматич.}, 1H, d);
- 5,34 (C_{алифатич.}, 1H, s);
- 3,85 (OCH₃, 3H, s);
- 3,77 (OCH₃, 3H, s);
- 3,67–1,70 (C_{алифатич.}, 14H, m).

¹³C ЯМР (DMSO-d₆, ppm):

- 8 206,7 (C=O_{индол});
- 155,78 (C=O_{амид});
- 149–104,45 (C_{ароматич.});
- 56,45 и 56,13 (OCH₃);
- 52,54–28,25 (C_{алифатич.}).

HRMS (ESI) (m/z) [M + H]⁺: аналитически рассчитано для [C₂₆H₂₇NO₆] как 451,5; обнаружено 452,20.

Определение связывания с ДНК. Двухцепочечную ДНК спермы рыб («Sigma-Aldrich») использовали без дополнительной очистки.

Для приготовления маточного раствора ДНК растворяли в 20 mM Tris-HCl-буфере (pH 7,0), содержащем 20 mM NaCl. Концентрацию ДНК определяли по поглощению раствора при 260 нм (коэффициент молярной экстинкции = 6600 M⁻¹ см⁻¹) [33]. Исходный раствор DP–CA (1 × 10⁻³ M) готовили и хранили в DMSO, и перед использованием в экспериментах его разводили буфером. Связывание DP–CA с ДНК исследовали методом электронного абсорбционного титрования путем добавления ДНК возрастающих концентраций к постоянной концентрации CA и DP–CA (4,0 × 10⁻⁵ и 1,0 × 10⁻⁶ M соответственно).

Флуоресцентный анализ. Для изучения относительной способности новой гибридной молекулы связываться с двухцепочечной молекулой ДНК рыбы использовали регистрацию связывания этидиумбромид (ЭБ) с помощью метода флуоресцентной спектроскопии. Интенсивность флуоресценции связанного с ДНК этидиумбромида определяли при длине волны 610 нм после возбуждения при 526 нм в присутствии или при отсутствии CA и DP–CA (10–100 мкМ) в буфере Tris-HCl. ДНК-связывающую способность CA и DP–CA определяли по изменению флуоресценции ЭБ, связанного с ДНК. Константы связывания рассчитывали по углу наклона кривой зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации CA и DP–CA. Способность соединений тушить флуоресценцию определяли с использованием констант Штерна–Вольмера, как показано в уравнении (1):

$$F_0/F = K_{sv} [Q] + 1, \quad (1)$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции при отсутствии тушителя; F – интенсивность флуоресценции в присутствии тушителя; K_{sv} – константа тушения; и $[Q]$ – концентрация тушителя.

Значение K_{sv} определяли по углу наклона кривой зависимости значений F от $[Q]$. Для определения K (константа связывания) и n (количество сайтов связывания CA и DP–CA на молекуле ДНК) использовали уравнение (2) [33]:

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K + n \log[Q], \quad (2)$$

где K и n представляют константу связывания и количество точек связывания (п.н.). Для расчета значений K_{sv} использовали графики зависимости $\log[(F_0 - F)/F]$ от $\log[Q]$.

Ингибирование активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ). В работе использовали препараты ацетилхолинэстеразы (AChE, EC 3.1.1.7,

тип V-S, лиофилизированный порошок, из электрического угря; 1000 Ед.), ацетилтиохолиниодида (АТСІ) и 5,5-дитиобис-(2-нитробензойная кислоты (ДТНБ) («Sigma-Aldrich»). Активность АХЭ *in vitro* измеряли с использованием модифицированного метода Ellman et al. [34] на 96-луночном планшетном ридере BioTek EL × 808 («BioTek Instruments», США). Концентрация используемого раствора фермента была равна 0,22 Ед./мл. Растворы СА и DP-СА (1×10^{-3} и 1×10^{-7} М соответственно) готовили в смеси DMSO/метанол (1 : 1; v/v). В каждую из 96 лунок планшета добавляли по 100 мкл фосфатного буфера (рН 6,7). Затем в ячейки добавляли различные концентрации тестируемых соединений (20 мкл) и АХЭ (20 мкл/ячейка), и планшеты инкубировали при 25 °С в течение 10 мин. К смеси фермента и ингибитора добавляли хроматографический реагент ДТНБ (3 мМ, 50 мкл/ячейка) и субстрат АТСІ (3 мМ, 50 мкл/ячейка) и инкубировали в течение 10 мин. По поглощению при 412 нм регистрировали образование желтого продукта реакции (анион 2-нитро-5-тиобензойной кислоты). В качестве контроля использовали лунки, не содержащие фермент. Каждое измерение проводили 3 раза. Линейный регрессионный анализ концентрации образца и IC_{50} (концентрация ингибитора, вызывающая 50%-ное ингибирование деградации субстрата, ацетилхолина) был выполнен с использованием программы Excel. Контрольные реакции проводили в тех же условиях в реакционных смесях, содержащих ДТНБ, буфер, воду и субстрат, но без ингибитора [35].

Молекулярный докинг. Трехмерная структура DP-СА была создана с помощью программного обеспечения ChemDraw 20.0. Минимизацию энергии осуществляли с помощью программы Chem3D 20, используя алгоритм MM2. Картирование молекулярного электростатического потенциала и визуализацию соединений осуществляли с помощью программы Schrödinger Maestro Release 2021-1 [36]. Рентгеновские (X-ray) кристаллические структуры высокого разрешения рекомбинантного белка АХЭ человека в комплексе с донепезилом (PDB: 4EY7; 2,35 Å) и ДНК (PDB: 1BNA; 1,90 Å) были получены из базы данных RCSB. В экспериментах по молекулярному докингу *in silico* соединения стыковались с 4EY7 и 1BNA, а функция оценки стыковки выполнялась с помощью программного обеспечения для стыковки PyRx (Autodock Vina) (версия с академической лицензией 0.9.8). Гибкий лиганд: для анализа был выбран докинг жестких рецепторов [37, 38]. Сетка на лиганд-связывающем кармане распо-

лагалась в месте связывания 4EY7 с X: -14,108, Y: -43,832 и Z: 27,669 (размеры сетки: $25 \times 25 \times 25 \text{ Å}^3$ с $0,375 \text{ Å}$ соответственно) или 1BNA (X: 15, Y: 21 и Z: 10; размеры сетки $30 \times 25 \times 47 \text{ Å}^3$ с $0,375 \text{ Å}$ соответственно). Величину истощения (exhaustiveness) белков принимали за 100. Для каждого комплекса лиганд-белок оценивали десять различных поз. Последующие взаимодействия анализировали после того, как был проведен докинг синтетического соединения в активные центры белка, чтобы определить энергии связывания комплексов белок-лиганд. Энергии связывания и взаимодействия десяти связанных с белком структур соединения были записаны и проанализированы с помощью программного обеспечения Discovery Studio 2021 для дополнительной оценки и визуализации. Программное обеспечение определило и проанализировало оптимальные позиции стыковки и близость взаимодействий. Аффинности связывания (ккал/моль), полученные для докинговых структур, оценивали по комплексу наилучшего сопряжения белок-лиганд [39]. Материалы по валидации протокола молекулярного докинга приведены в Приложении.

Жизнеспособность и защита клеток. Клетки глиобластомы U-118 MG были получены из Американской коллекции типовых культур («АТСС», США). Клетки культивировали в стандартной среде, дополненной 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS, «Gibco/BRL», США). Клетки инкубировали при 37 °С в 5%-ной модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM, «Gibco/BRL»), содержащей 1% пенициллина и 1% L-глутамина («Sigma-Aldrich»), в увлажненном инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 . Смену среды проводили каждые 2–3 дня. Ежедневный контроль роста клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа; клетки пересевают, когда они достигали 70–80% слияния. В работе использовали препарат кофейной кислоты (HPLC, «Sigma-Aldrich») без дополнительной очистки.

Создание модели окислительного повреждения в клеточной линии глиобластомы U-118 MG. Оценку влияния H_2O_2 («Sigma-Aldrich») на жизнеспособность клеток U-118 MG проводили с использованием ХТТ (2,3-бис(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксианилид, внутренняя соль) («Sigma-Aldrich»). Клетки U-118 MG высевали в 96-луночные планшеты (1×10^4 клеток на лунку), культивировали в течение 24 ч, а затем в течение 20 ч инкубировали с различными концентрациями (62,5–1000 мкМ) H_2O_2 . Свежие растворы различных концентраций H_2O_2

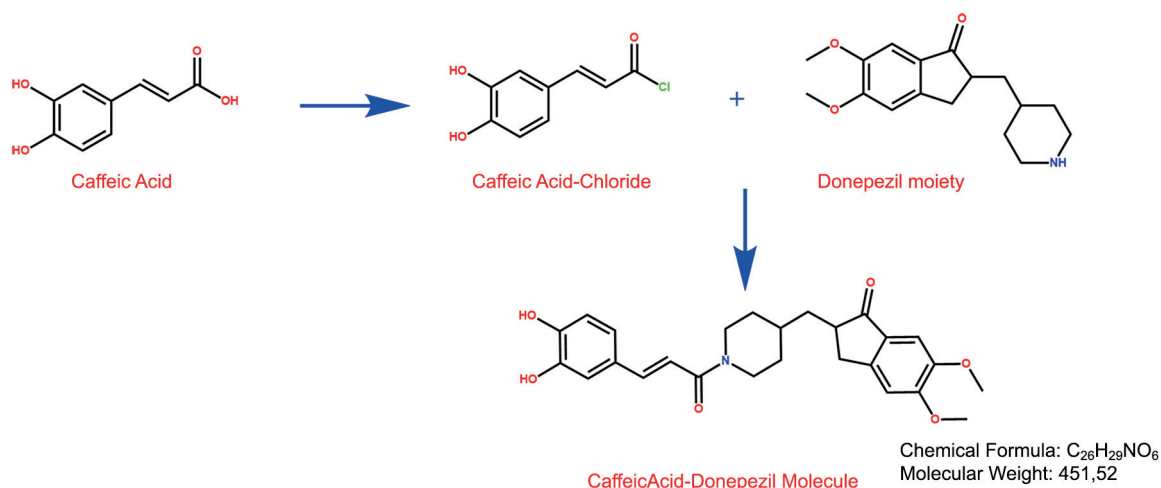


Схема 1. Схема синтеза молекулы DP–CA

готовили перед проведением каждого эксперимента путем разведения маточного 30%-ного раствора H_2O_2 в среде, не содержащей красный фенол («Sigma-Aldrich»). Клетки контрольной группы инкубировали при отсутствии H_2O_2 [40].

Влияние DP–CA на H_2O_2 -индуцированное повреждение клеток U-118 MG. Оценивали влияние различных концентраций (1, 3 и 9 мкМ) DP–CA и CA в отдельности и в сочетании с 250 мкМ H_2O_2 . Клетки U-118 MG высевали в 96-луночные планшеты (1×10^4 клеток на лунку) и культивировали в течение 24 ч в среде DMEM, дополненной 10%-ной FBS. Затем клетки предварительно обрабатывали 250 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч и подвергали воздействию с 1, 3 и 9 мкМ DP–CA и CA в течение 20 ч. После инкубации клетки обрабатывали раствором ХТТ (Cell Proliferation Kit II – ХТТ) в течение 4 ч и затем измеряли поглощение образцов при 450 нм с использованием ридера микропланшет. Величину поглощения в лунках, содержащих CA или DP–CA (контроли), принимали за 100%, и выживаемость клеток оценивали по величине поглощения в других образцах. При оценке данных переменные проверялись с точки зрения их соответствия или отклонения от нормального распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Различия в жизнеспособности клеток между группами изучали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и множественных сравнений с использованием теста Тамхейна T2, теста Тьюки и теста Даннета (статистическая значимость, $p < 0,05$; статистические параметры, среднее $\pm$ стандартное отклонение (mean $\pm$ SD)). Данные оценивали с помощью пакета программ SPSS версии 22 для Windows («IBM Corp.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химия. Гибридную молекулу DP–CA синтезировали по стратегии, представленной на схеме 1. Химическое строение всех синтезированных соединений подтверждено методами ИК-, ^{13}C -ЯМР-, 1H -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. На первом этапе был синтезирован хлорид кофейной кислоты (промежуточный продукт). Для этого раствор CA в диэтиловом эфире смешивали с тионилхлоридом и затем кипятили с обратным холодильником при перемешивании при 80 °C в течение 1–4 ч. Для контроля полноты реакции проводили ТСХ под контролем ИК- и УФ-освещения. Сдвиг пика от 1641 (карбоновая кислота) до 1715 (хлорангидрид) подтверждает образование хлорида кофейной кислоты. Спектральные данные CA и хлорида кофейной кислоты представлены на рис. S1 в Приложении. Затем был разработан и синтезирован другой гибрид DP–CA, отличающийся только связью между двумя единицами. В итоговой гибридной структуре сохранены инданоновый и пиперидиновый фрагменты, а бензильная группа заменена фрагментом кофейной кислоты.

Синтезированный DP–CA содержал 1-инданоновое кольцо, характерное для молекулы донепезила. В ИК-спектрах соединения видна полоса, соответствующая карбонильной группе ($C=O$) этого кольца при 1677 cm^{-1} . Помимо карбонильной полосы 1-инданона, в спектре присутствует полоса при 1588 cm^{-1} , соответствующая карбонилу группы $-NCOCH$. Полосы, соответствующие группам $C=C$ ароматической системы колец в DP–CA, наблюдаются в диапазоне 1394–1588 cm^{-1} . Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными [41, 42]. Полоса, соответствующая $C-O$

в синтезированном DP-CA, была обнаружена при 1032 см^{-1} (спектральные характеристики синтезированных соединений см. на рис. S2 в Приложении).

Как и ожидалось, алифатические и ароматические протоны в DP-CA дают пики в спектрах ^1H -ЯМР. Нами проанализированы спектры ^1H -ЯМР синтезированных соединений, содержащих метоксикарбонил в 5-м положении инданового кольца. Сигналы метоксипротонов, наблюдаемые при 3,85 ppm в исходных соединениях, существенно не изменились в электронном окружении из-за удаленности от модифицированных заместителей и достигли максимума при 3,85 или 3,77 ppm. Обнаружены синглетные, дублетные и в некоторых случаях мультиплетные ароматические протоны. Их значения химических сдвигов составили 9,88, 7,09–7,04, 6,79 и 6,27 ppm соответственно (рис. S3 в Приложении).

Общие для синтезированных соединений структурные фрагменты имеют ожидаемое количество пиков в ^{13}C -ЯМР-спектрах. Общее число атомов углерода определяли, рассматривая идентичные атомы углерода в соответствии с их электронным окружением. Сигналы карбонила индола и амида ($\text{C}=\text{O}$) от конкретных функциональных групп обнаружены при 206,7 и 155,78 ppm соответственно. Алифатические углероды, отличные от тех, которые

дают пики в диапазоне 52,54–28,25 ppm, и ароматические углероды дают пики в диапазоне 149,59–104,45 ppm, что согласуется с литературными данными [16, 17]. Синтезированное соединение содержало дизамещенную метоксигруппу в 5-м и 6-м положениях десятичольцевой системы 1-инданового кольца. Атомы углерода, принадлежащие к этой функциональной группе, обнаруживаются в виде сигналов при 56,45–56,13 ppm (рис. S4 в Приложении).

Масс-спектр DP-CA определяли методом положительной ионизации с использованием спектрометра LC/MS-TOF. Исследование спектра показало, что пик M^{+1} , полученный с молекулярной массой DP-CA, был совместим, как и ожидалось (рис. S5 в Приложении).

Связывание с ДНК. Изучение спектров поглощения УФ-видимой области (UV-Vis) является одним из самых основных методов, используемых для изучения взаимодействия различных соединений с ДНК. Мы записывали спектры поглощения UV-Vis в диапазоне 200–400 нм для растворов с постоянными концентрациями DP-CA или CA (4×10^{-5} и 1×10^{-5} М соответственно), которые также содержали различные количества ДНК ($4,3 \times 10^{-5}$ – $4,7 \times 10^{-6}$ М), и регистрировали изменения поглощения при 274 нм и 316 нм

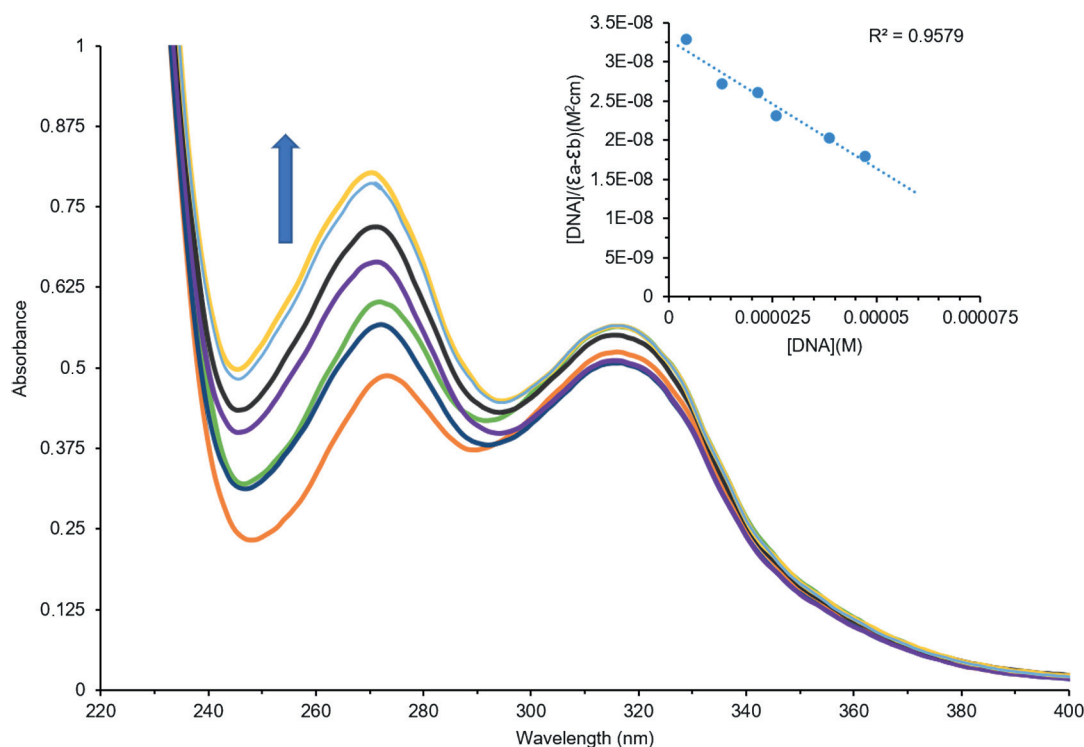


Рис. 1. УФ-спектры растворов DP-CA (4×10^{-5} М), содержащих различные количества двухцепочечной ДНК рыбы (изменения обозначены стрелкой). Вставка: $[\text{ДНК}/\epsilon_a - \epsilon_b]$ против $[\text{ДНК}]$.

(DP–CA) и при 282 нм и 315 нм (CA). Константы связывания (K_b) ДНК–соединений рассчитывали по уравнению (3) [43]:

$$\frac{[\text{ДНК}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)}{= [\text{ДНК}]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}, \quad (3)$$

где [ДНК] – концентрация ДНК; ε_a – кажущийся коэффициент экстинкции, рассчитанный на основе $A_{\text{obs}}/[\text{соединение}]$; ε_f – коэффициент экстинкции соединения в его свободной форме; ε_b соответствует коэффициенту экстинкции химического соединения в связанной форме; и K_b – константа связывания.

Зарегистрированные спектры поглощения показаны на рис. 1. Взаимодействия ДНК с другими молекулами могут вызывать изменения в спиральной структуре и приводить к гиперхромным или гипохромным эффектам в спектре поглощения ДНК (соответственно увеличению или уменьшению интенсивности полосы поглощения при увеличении концентрации ДНК). Гипохромный эффект обусловлен сжатием или укорочением ДНК вдоль оси спирали, тогда как гиперхромный эффект вызван изгибом спирали ДНК.

В некоторых случаях соединение может вызывать красный или синий сдвиг полосы поглощения ДНК в дополнение к гипер- или гипохромному эффекту. Гиперхромный эффект и красное смещение в спектрах поглощения свидетельствуют об устойчивости комплекса соединение–ДНК [44]. Изменения в полосах поглощения при 316 нм в случае DP–CA (рис. 1) и при 315 нм – для СА были минимальными и поэтому не учитывались. Мы также наблюдали гиперхромный эффект и синее смещение на 3 нм (гипсохромный эффект) для растворов DP–CA и СА. Взаимодействие молекулы ДНК с DP–CA и СА приводило как к гиперхромному, так и гипсохромному

эффектам, что в какой-то мере отражало взаимодействие и частичное связывание DP–CA и СА с бороздкой ДНК [45] (см. спектральные данные для СА на рис. S1 в Приложении).

Флуоресцентная спектроскопия. Вытеснение ЭБ, контролируемое с помощью флуоресцентной спектроскопии, представляет собой спектроскопический метод, используемый для исследования взаимодействия различных соединений с ДНК. Двумерные плоские молекулы ЭБ интеркалируют между парами оснований ДНК [46]. Хотя сам по себе ЭБ проявляет слабую флуоресценцию, интенсивность его излучения значительно возрастает, когда ЭБ связывается с ДНК. Измерения флуоресценции показали, что увеличение количества интеркалирующих соединений, добавляемых к растворам ДНК, приводило к значительному снижению интенсивности излучения [47]. Если соединения интеркалируют между парами оснований в молекуле ДНК, то они могут конкурировать с ЭБ. Это снижает интенсивность излучения комплексов ЭБ–ДНК, уменьшение сигнала флуоресценции, отражающее силу взаимодействия химического соединения с ДНК (соединение заменяет ЭБ в его комплексе с ДНК). Такие соединения называются гасителями эмиссии. На рис. 2 показано снижение интенсивности эмиссии, вызванное взаимодействием DP–CA с комплексами ЭБ–ДНК. Графики Штерна–Фольмера, представленные на рис. 2, были получены с использованием соответствующих данных по интенсивности флуоресценции. Значение K_{sv} DP–CA, рассчитанное по наклону графиков, составило $0,19 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (табл. 1). Значение K_{sv} , рассчитанное в случае добавления DP–CA к комплексу ЭБ–ДНК, составило $0,19 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, что указывает на то, что соединение было заменено бромистым этидием, локализованным в ДНК (рис. S1 в Приложении).

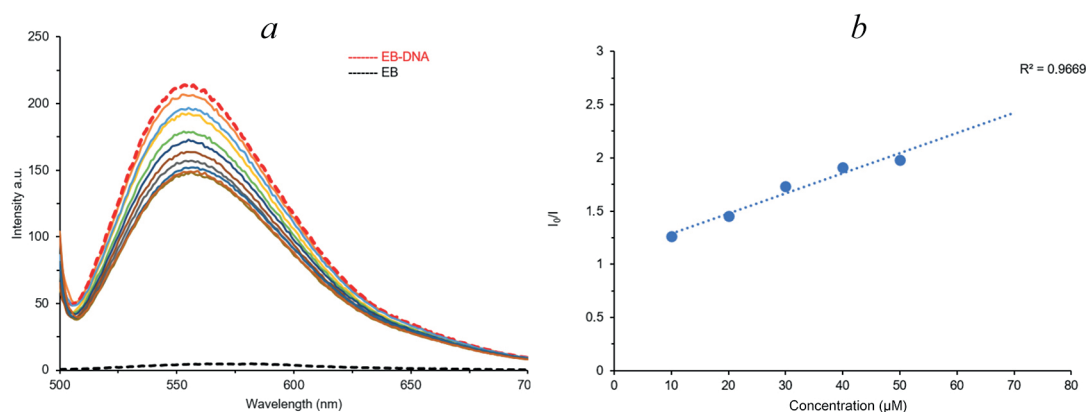


Рис. 2. Влияние DP–CA (30–90 мкМ) на интенсивность эмиссии (a) связанного с ДНК ЭБ (75 мкМ) в 2 мМ Tris–HCl–буфере (pH 7,1); b – график Штерна–Фольмера, показывающий флуоресцентное титрование комплексов ЭБ с ДНК

Таблица 1. Параметры взаимодействия DP–CA и CA с ДНК и комплексами ЭБ–ДНК

Соединение	$K_b \times 10^4$ (M ⁻¹)	$K_{sv} \times 10^4$ (M ⁻¹)	$K_q \times 10^{11}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	log K_a	$K_a \times 10^2$ (M ⁻¹)	n	$K_{app} \times 10^5$ (M ⁻¹)
CA	1	6,9	69,1	7,31	0,86	1,86	0,83
DP–CA	1	0,19	1,9	2,66	4,57	0,646	1

Примечание. K_b – константа связывания в УФ-видимом свете; K_{sv} – константы тушения Штерна–Фольмера; log K_a – логарифм константы связывания с ЭБ–ДНК; n – количество сайтов связывания; K_{app} – кажущаяся константа связывания.

Ингибирование ацетилхолинэстеразы препаратом DP–CA исследовали с помощью колориметрического метода, разработанного Ellman et al. [34] в 1961 г. Согласно этому методу, АХЭ гидролизует иодид ацетилтиохолина с образованием ацетата и тиохолина. Тиохоллин превращает специфический хромогенный субстрат ДТНБ в нитробензоат, который поглощает при 412 нм. Полученные результаты свидетельствуют о том, что DP–CA ингибирует АХЭ более эффективно, чем только DP или CA (табл. 2).

Защита клеток от повреждений, индуцируемых H₂O₂. Известно, что окислительный стресс, связанный с нейротоксичностью, влияет на патогенез и прогрессирование нейродегенеративных заболеваний. Поэтому мы оценили защитный эффект DP–CA против индуцированного перекисью водорода (H₂O₂) окислительного повреждения в клетках глиобластомы U-118 MG. Так как мы использовали несколько экспериментальных серий, наши исследования требовали большого количества клеток. Как правило, количество доступных первичных нейронов недостаточно для использования в моделях с высоким уровнем клеточной гибели (например, модели окислительного стресса), поэтому в исследованиях такого типа используют нейрональные раковые клеточные линии, и поэтому мы остановили выбор на клеточной линии глиобластомы U-118 MG.

Создание модели H₂O₂-индуцированного повреждения клеток на основе клеточной линии

глиобластомы U-118 MG. В предыдущем исследовании было показано, что H₂O₂ (62,5–1000 мкМ) значительно увеличивала гибель клеток U-118 MG в зависимости от концентрации. H₂O₂ в концентрации 250 мкМ снижала жизнеспособность клеток на 50–60%. Поэтому мы использовали 250 мкМ H₂O₂, чтобы индуцировать повреждения клеток в нашем эксперименте ($p < 0,001$).

Влияние DP–CA и CA на жизнеспособность клеток U-118 MG. Различия жизнеспособности клеток, обработанных 3 мкМ и 9 мкМ DP–CA, и контрольных клеток были незначительны, но статистически достоверны (рис. 3). В сравнении с контрольной группой, высокие концентрации CA существенно снижали жизнеспособность клеток U-118 MG.

Защитный эффект DP–CA против окислительных повреждений клеток U-118 MG. Клетки U-118 MG предварительно обрабатывали H₂O₂ в течение 1 ч. Затем, к этим клеткам добавляли DP–CA и инкубировали в течение 20 ч. Жизнеспособность клеток, инкубированных с различными концентрациями DP–CA, сравнивали с жизнеспособностью клеток, обработанных только перекисью водорода. Различия между группами сравнения оказались статистически достоверными ($p < 0,001$) (рис. 4).

Когда к клеткам U-118 MG добавляли или CA, или DP–CA не наблюдалось снижения жизнеспособности клеток по сравнению с контрольной группой. Однако введение DP–CA во всех испытанных концентрациях клеткам, подвергшимся H₂O₂-индуцированному окислительному повреждению, значительно повышало жизнеспособность клеток по сравнению с группой, получавшей H₂O₂.

Молекулярный докинг. Чтобы проверить результаты молекулярного докинга, мы использовали позиции связывания лиганда в кристаллической структуре белка 4EY7 (комплекс рекомбинантной АХЭ человека с донепезилом в качестве лиганда; E20-604). Позиция донепезила в структуре АХЭ была повторно состыкована в активный сайт АХЭ, чтобы проверить корректность использования

Таблица 2. Значения IC₅₀ для ингибирования АХЭ анализируемыми соединениями

Соединение	IC ₅₀ (мкМ)*
DP	248,19 ± 7,3
CA	150,41 ± 5,2
DP–CA	25,84 ± 2,1

Примечание. * – IC₅₀, концентрация ингибитора, при которой достигается 50%-ная инактивация АХЭ. Полученные данные представлены в виде среднего значения ± среднее квадратичное отклонение для трех независимых экспериментов.

для докинга программы AutoDock Vina для АХЭ. Десять новых конформаций сравнивали путем наложения позиций в кристалле. Рецепторная сетка была ограничена остатками, образующими взаимодействия в области, заполненной донепезилом. Мы обнаружили, что структуры лиганда и повторно стыкованного лиганда в кристаллической структуре АХЭ практически перекрываются. Более того, при повторном докинге лиганд имел такую же ориентацию и конформационное положение, как и в кристаллической структуре сайта связывания АХЭ. Результат докинга считался приемлемым, если среднее значение среднеквадратичного отклонения (RMSD) для позиций докинга было меньше порогового значения 2,0 Å. Между позами стыковки и конформацией кристалла среднее среднеквадратичное отклонение для донепезила в нашем исследовании составляло 0,9521 Å. Таким образом, мы продемонстрировали, что программное обеспечение AutoDock Vina правильно воспроизвела паттерны связывания в кристаллической структуре АХЭ.

Молекулярный электростатический потенциал (МЭП). Перед запуском процесса докинга необходимо определить первоначальную интерпретацию взаимодействия функциональных групп и атомов с белком-мишенью, что требует изучения электрофильных и нуклеофильных доменов соединения. Для подтверждения ингибирующего средства препаратов важно продемонстрировать существование молекулярного электростатического потенциала [48–50]. Мы использовали метод адаптивного растворителя Пуассона–Больцмана (APBS) для оценки карты МЭП синтезированного соединения (рис. 5). На рис. 5 большие области с отрицательным значением МЭП (красный цвет) являются предпочтительными областями для электрофильной атаки, поскольку отрицательно заряженные области притягивают электрофилы. Напротив, синие области будут насыщены в противоположном направлении [51]. Небольшие области перехода от красного цвета к синему внутри обширной зеленой области, представляющей большую часть поверхности

	Mean±SD	F	p
DP-CA 9 µM	97,385±1.971 ^c	4.765	0.008*
DP-CA 3 µM	96,645±2.127 ^c		
DP-CA 1 µM	98,065±2.346		
Control	100,000±0.000 ^{a,b}		

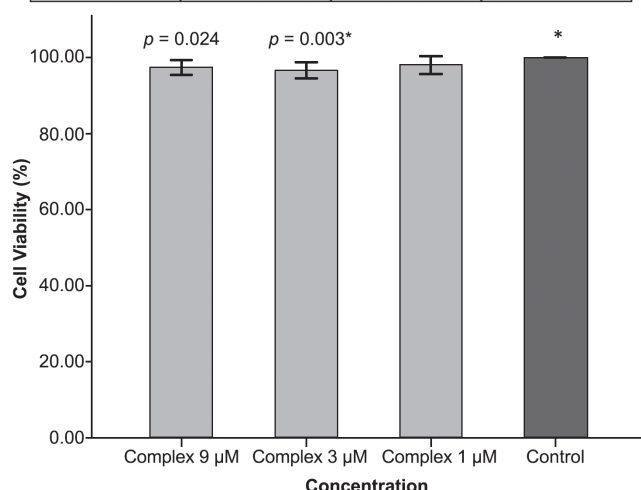


Рис. 3. Влияние DP–CA на жизнеспособность клеток U-118 MG. Таблица-вставка: статистические данные о влиянии DP–CA на жизнеспособность клеток. Метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA): $\alpha = 0,05$; *post-hoc*: тест Даннета, тест среднего взвешенного Тьюки, тест Тамхейна Т2. * Значительные статистические различия с: ^a – группа 9 мкМ DP–CA; ^b – группа 3 мкМ DP–CA; ^c – контрольная группа

	Mean±SD	F	p
H ₂ O ₂ +CA9 µM	55,267±3.025 ^{d,e}	292,875	p<0.001*
H ₂ O ₂ +CA3 µM	50,963±5.678 ^{d,e}		
H ₂ O ₂ +CA1 µM	52,687±4.041 ^{d,e}		
H ₂ O ₂	42,720±3.531 ^{a,b,c,e}		
Control	100,000±0.000 ^{a,b,c,d}		

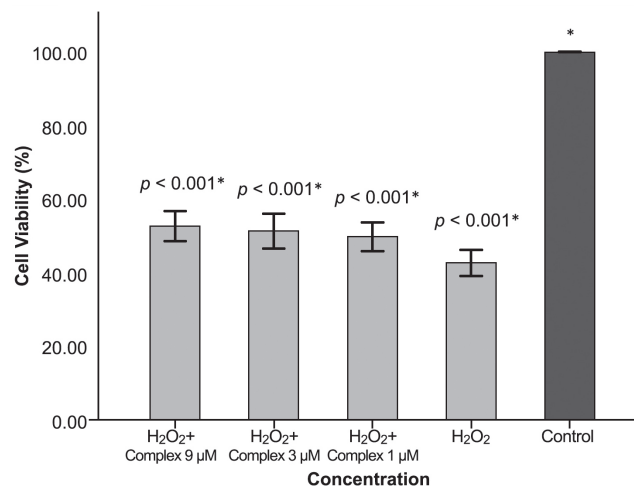


Рис. 4. Влияние DP–CA на жизнеспособность клеток U-118 MG, подвергшихся окислительным повреждениям в результате действия H₂O₂ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA: $\alpha = 0,05$; *post-hoc*: тест Даннета, тест среднего взвешенного Тьюки; тест Тамхейна Т2. * Значительные статистические различия с: ^a – H₂O₂ + 9 мкМ DP–CA; ^b – H₂O₂ + 3 мкМ DP–CA; ^c – H₂O₂ + 1 мкМ DP–CA; ^d – H₂O₂ и ^e – контрольные клетки

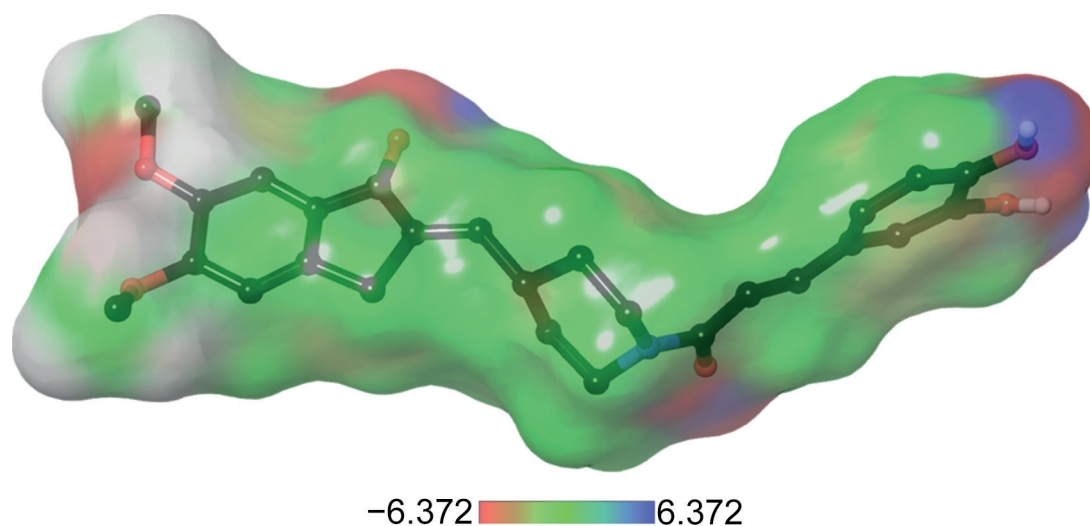


Рис. 5. Молекулярный электростатический потенциал поверхности молекулы DP-CA

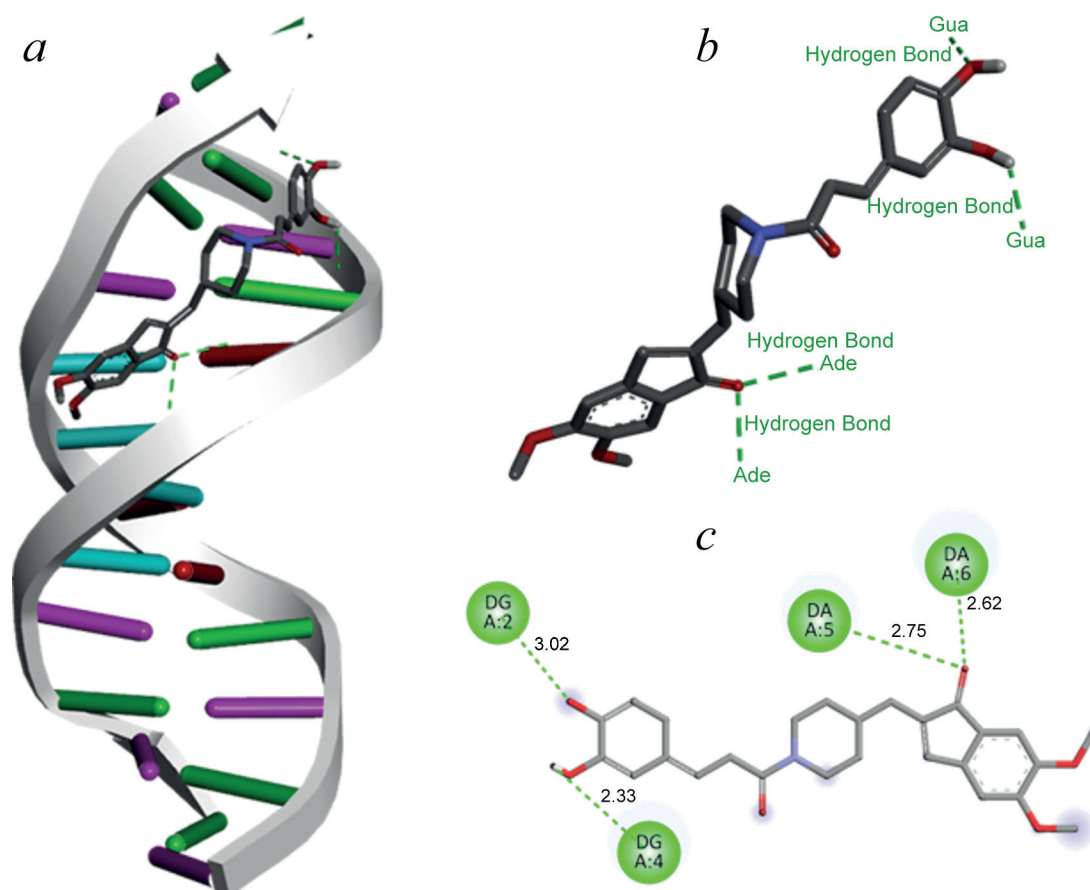


Рис. 6. Изображение взаимодействия IBNA и DP-CA в наилучшем ракурсе: 3D-изображение (a), типы связей (b), 2D-изображение (c)

молекулы, уравнивают гидрофильные и гидрофобные участки, необходимые для оптимального взаимодействия между белком и лигандом. Поскольку узнавание между рецепторами и лигандами происходит через поверхности их молекул, связывание лигандов с рецептором определяется в основном электростатическим потенциалом. Рассчитанный электростатиче-

ский потенциал DP-CA находится в диапазоне от $-6,372$ до $6,372$.

Результаты молекулярного докинга. Компьютерное моделирование, основанное на молекулярном докинге, является важным инструментом для предсказания аффинности связывания наиболее стабильных комплексов белок–лиганд и способа взаимодействия. Кроме

Табл. 3. Нуклеотидные основания, типы связей и длины связей в комплексе DP–CA с молекулой ДНК

	Показатель (ккал/моль)	Взаимодействия	Длина (Å)	Тип связи	От	До
DP–CA–ДНК	–9,2	:DPCA:H – A:DG4:O4'	2,33315	водородная связь	:DPCA:H	A:DG4:O4'
		A:DG2:H21 – :DPCA:O	3,0209	водородная связь	A:DG2:H21	:DPCA:O
		A:DA5:H3 – :DPCA:O	2,74616	водородная связь	A:DA5:H3	:DPCA:O
		A:DA6:H3 – :DPCA:O	2,61946	водородная связь	A:DA6:H3	:DPCA:O

того, молекулярный докинг может помочь в разработке новых эффективных соединений, обеспечивая информацией о механизме связывания лекарств и кандидатов в лекарства [37]. В настоящей работе мы провели молекулярный докинг, чтобы получить подробные данные о взаимодействиях в комплексах DP–CA–1BNA и DP–CA–4EY7. В соответствии с аффинностью связывания, полученной по результатам молекулярного докинга, DP–CA проявлял высокое сродство к 1BNA (–9,2 ккал/моль). На рис. 6 графически представлены взаимодействия между ДНК и DP–CA. Типы связей и взаимодействующие атомы и нуклеотидные основания показаны в табл. 3.

Изучение структуры, образованной DP–CA и ДНК, показало преобладание в этом комплексе водородных связей. Длина четырех водородных связей не превышала 3 Å. Три из них

образовались между адениновыми и гуаниновыми основаниями в А-цепи ДНК и атомами кислорода в функциональных группах DP–CA (табл. 3). Четвертая водородная связь образована с атомом кислорода карбонильной группы в бензилпиперидиновой области молекулы DP–CA. Отсутствие взаимодействий между образованными водородными связями и парами оснований ДНК указывает на то, что молекула DP–CA связывается в бороздке ДНК.

Второе исследование молекулярного докинга для DP–CA было проведено с АХЭ. Двумя основными сайтами связывания в кристаллической структуре АХЭ являются каталитический активный центр (CAS) и периферический анионный центр (PAS), при этом карман активного центра образован промежутком между этими двумя центрами (рис. 7). Если считать эту область воротами, то CAS располагается

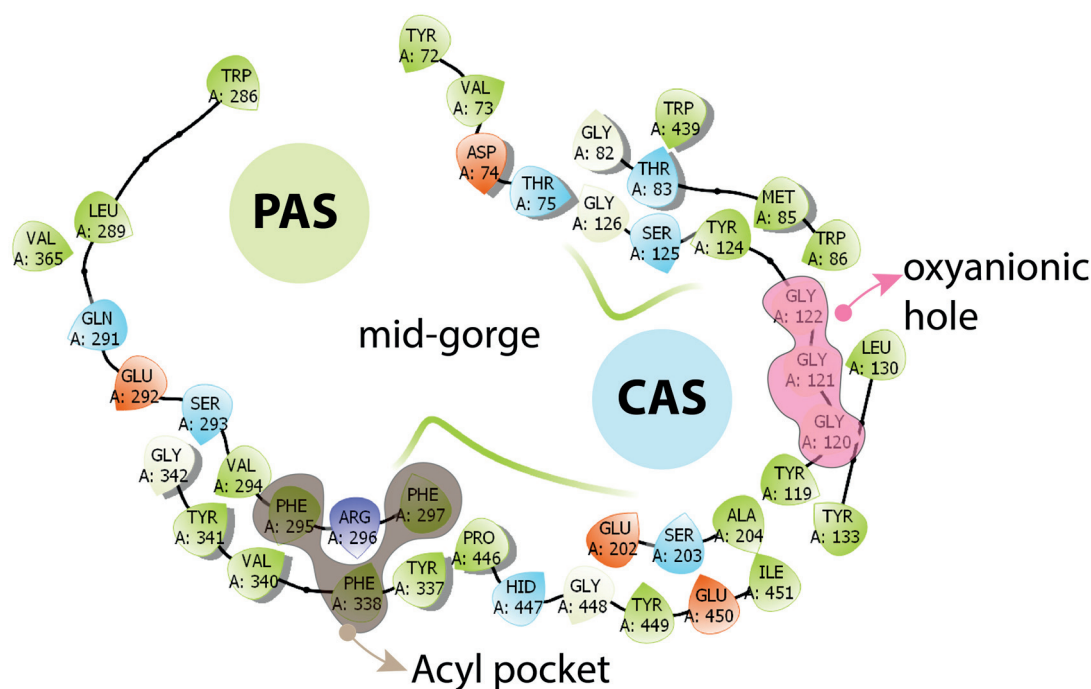


Рис. 7. PAS, CAS и расположенный между ними карман 4EY7

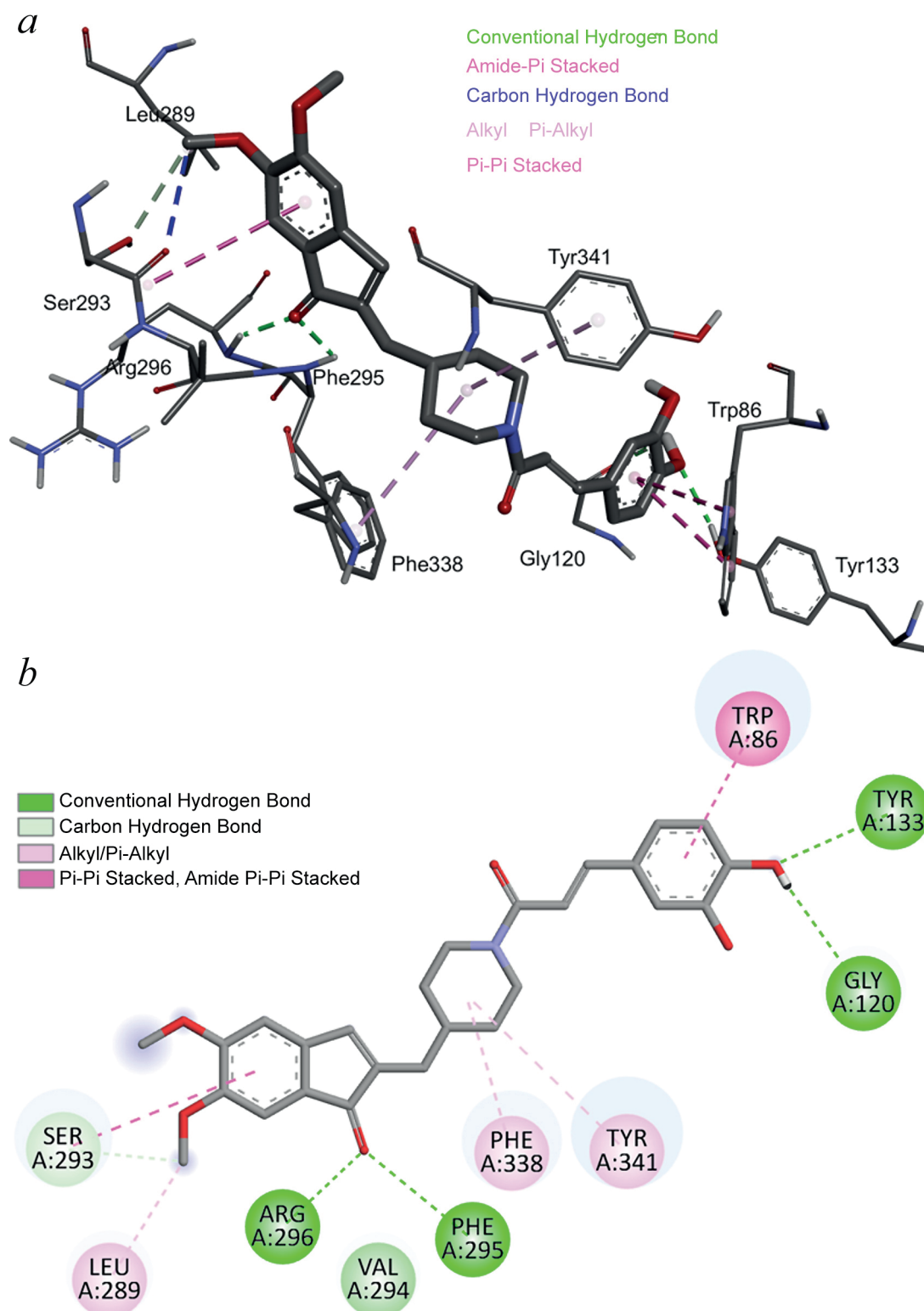


Рис. 8. Изображение взаимодействия между 4EY7 и DP-CA в наилучшем ракурсе: 3D-структура (*a*), 2D-структура (*b*)

в нижней части ворот, а PAS находится вблизи входа в ворота и на расстоянии примерно в 15 Å от CAS [52]. CAS-область содержит а.о. Trp86, Tyr133, Glu202, Ser203, Tyr337, Phe338 и His447. В PAS-области были идентифицированы следующие значимые а.о.: Tyr72, Asp74, Tyr124,

Trp286, Phe295 и Tyr341 [53]. В целом ингибиторы, взаимодействующие с а.о. в любой из этих областей, могут подавлять активность АХЭ. В кристаллической структуре 4EY7 ингибитор донепезил (E20-604) гармонично расположился на этом участке благодаря его взаимодействию

Табл. 4. Взаимодействия и аминокислотные остатки, задействованные в ингибировании 4EY7

	Показатель (ккал/моль)	Взаимодействия	Длина (Å)	Тип связи	От	До
DP-CA-4EY7	–11,6	A:TYR133:HN – :DPCA:O32	2,34646	водородная связь	A:TYR133:HN	:DPCA:O32
		A:PHE295:HN – :DPCA:O10	2,24204	водородная связь	A:PHE295:HN	:DPCA:O10
		A:ARG296:HN – :DPCA:O10	2,14378	водородная связь	A:ARG296:HN	:DPCA:O10
		:DPCA:H59 – A:GLY120:O	2,42199	водородная связь	:DPCA:H59	A:GLY120:O
		:DPCA:C19 – A:SER293:O	3,58661	водородная связь	:DPCA:C19	A:SER293:O
		:DPCA:C19 – A:SER293:OG	3,52283	водородная связь	:DPCA:C19	A:SER293:OG
		A:TRP86 – :DPCA	4,5967	гидрофобная	A:TRP86	:DPCA
		A:TRP86 – :DPCA	4,30224	гидрофобная	A:TRP86	:DPCA
		A:SER293:C,O;VAL294:N :DPCA	4,89815	гидрофобная	A:SER293:C,O; VAL294:N	:DPCA
		:DPCA:C19 – A:LEU289	4,80823	гидрофобная	:DPCA:C19	A:LEU289
		A:TRP286 – :DPCA:C21	4,50955	гидрофобная	A:TRP286	:DPCA:C21
		A:TRP286 – :DPCA:C21	4,94636	гидрофобная	A:TRP286	:DPCA:C21
		A:PHE338 – :DPCA	5,02035	гидрофобная	A:PHE338	:DPCA
		A:TYR341 – :DPCA	3,69428	гидрофобная	A:TYR341	:DPCA

с а.о., расположенными в областях CAS и PAS. При изучении взаимодействий в комплексе донепезил–АХЭ (три основных компонента донепезила вместе с активным центром АХЭ и бензильной группой) было показано, что пиперидин взаимодействует через азотные диметоксииндановые фрагменты. Аминокислоты, образующие области PAS, CAS, среднего ущелья и их окружение также образуют несколько небольших субобластей, включая оксианионную дырку, ацильный карман и каталитическую триаду (серин, гистидин и глутаминовая кислота). Аминокислоты в этих областях ответственны за субстратную селективность и стабильное связывание ингибитора в активном центре [52].

Молекулярное моделирование взаимодействий между DP-CA и 4EY7 показало, что в них в основном задействованы водородные связи и гидрофобные взаимодействия. Кроме того, атомы кислорода в функциональных группах гибридной молекулы DP-CA образуют

Н-связи с а.о. Tyr133, Phe295 и Arg296 активного центра 4EY7. С другой стороны, а.о. Gly120 и Ser293 взаимодействовали через гидроксильную группу, связанную с бензольным кольцом и метоксигруппой, и через бензольное кольцо, к которому эта группа была прикреплена соответственно. В гидрофобных взаимодействиях между DP-CA и белком участвуют а.о. Trp286, Phe338, Tyr341, Ser293, Val264 и Leu289. Поскольку образующиеся при докинге Н-связи и гидрофобные взаимодействия происходят по ароматическим кольцам лиганда и взаимодействующим аминокислотам, было высказано предположение, что молекула лиганда прочно расположена в активном центре 4EY7 (для получения подробной информации об этом взаимодействии см. табл. 4 и рис. 8).

В заключение, мы разработали и синтезировали новый многоцелевой лиганд против болезни Альцгеймера путем слияния фармакофоров донепезила и кофейной кислоты и провели

его предварительную биологическую оценку. Исследования связывания синтезированного DP–CA с молекулой ДНК, проведенные с использованием методов УФ-видимой и флуоресцентной спектроскопии, показали, что DP–CA прочно и нековалентно связывается с ДНК (путем интеркаляции и связывания с бороздкой ДНК). Исследования *in vitro* показали защитный эффект DP–CA при нейротоксичности, вызванной H₂O₂. Данные о ДНК/белок-связывающей активности DP–CA были подтверждены молекулярным докингом, который показал, что DP–CA обладает высокой аффинностью и образует как полярные, так и неполярные контакты с незаменимыми а.о. в активном центре 4EY7.

Наши результаты подтверждают идею о том, что использование стратегии направленных многоцелевых лигандов может быть альтернативой высокоэффективной терапии при лечении нейродегенеративных заболеваний, благодаря меньшему количеству побочных эффектов. Наблюдаемый защитный эффект может быть связан с ингибированием ключевого фермента холинергической системы, связанного с функцией памяти. Наши результаты могут быть полезны при изучении синтеза соединений с двумя разными каркасами, исследовании более широких взаимосвязей структура–активность, изучении кинетики ингибирования ацетилхолинэстеразы, изучении перехода через гематоэнцефалический барьер *in vivo* и т.д. В наших будущих работах будет проверено действие DP–CA на животных моделях.

Вклад авторов. D. Kiliçaslan – концептуализация, написание, исходная идея, руководство, ресурсы; A. N. Kurt – визуализация, работа с клеточными культурами, написание, обзор, редактирование; M. Köse – визуализация, изучение, написание, обзор, редактирование; M. Çeşme – выполнение работ по молекулярному докингу, обзор, редактирование; Ö. Güngör – эксперименты по ингибированию фермента; C. K. Oztabag – эксперименты с клеточными культурами; A. Doganer – статистическая обработка результатов культивирования клеток.

Финансирование. Авторы выражают благодарность научному отделу университета Кахраманмараш Сютчу Имам (Kahramanmaraş Sutcu Imam University Research Unit) (проект № 2019/3-21 М) за оказанную финансовую поддержку.

Благодарности. Авторы выражают благодарность отделу координации научно-исследовательских проектов университета Кахраманмараш Сютчу Имам за представленную Ö. Güngör стажировку в качестве постдока (DOSAP).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания исследований с участием человека или животных, выполненных кем-либо из авторов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте: <https://www.springer.com/journal/10541>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abeysinghe, A. A. D. T., Deshapriya, R. D. U. S., and Udawatte, C. (2020) Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions, *Life Sci.*, **256**, 117996, doi: 10.1016/j.lfs.2020.117996.
2. Davies, P., and Maloney, A. J. F. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease, *Lancet*, **308**, 1403, doi: 10.1016/S0140-6736(76)91936-X.
3. Corkin, S. (1981) Acetylcholine, aging and Alzheimer's disease. Implications for treatment, *Trends Neurosci.*, **4**, 287-290, doi: 10.1016/0166-2236(81)90090-4.
4. Seltzer, B. (2007) Is long-term treatment of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitor therapy justified? *Drugs Aging*, **24**, 881-890, doi: 10.2165/00002512-200724110-00001.
5. Schmitt, B., Bernhardt, T., Moeller, H. J., Heuser, I., and Frolich, L. (2004) Combination therapy in Alzheimer's disease: a review of current evidence, *CNS Drugs*, **18**, 827-844, doi: 10.2165/00023210-200418130-00001.
6. Minarini, A., Milelli, A., Tumiatti, V., Rosini, M., Simoni, E., Bolognesi, M. L., Andrisano, V., Bartolini, M., Motori, E., Angeloni, C., and Hrelia, S. (2012) Cystamine-tacrine dimer: a new multi-target-directed ligand as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease treatment, *Neuropharmacology*, **62**, 997-1003, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.10.007.
7. Galdeano, C., Viayna, E., Sola, I., Formosa, X., Camps, P., Badia, A., Clos, M. V., Relat, J., Ratia, M., Bartolini, M., Mancini, F., Andrisano, V., Salmona, M., Minguillon, C., Gonzalez-Munoz, G. C., Rodriguez Franco, M. I., Bidon-Chanal, A., Luque, F. J., and Munoz-Torrero, D. J. (2012) Huprine-tacrine heterodimers as anti-amyloidogenic compounds of potential interest against Alzheimer's and prion diseases, *Med. Chem.*, **55**, 661-669, doi: 10.1021/jm200840c.

8. Fernandez-Bachiller, M. I., Perez, C., Gonzalez-Munoz, G. C., Conde, S., Lopez, M. G., Villarroja, M., Garcia, A. G., and Rodriguez-Franco, M. I. (2010) Novel tacrine-8-hydroxyquinoline hybrids as multi-functional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties, *Med. Chem.*, **53**, 4927-4937, doi: 10.1021/jm100329q.
9. Chen, Y., Sun, J., Fang, L., Liu, M., Peng, S., Liao, H., Lehmann, J., and Zhang, Y. J. (2012) Tacrine-ferulic acid-nitric oxide (NO) donor trihybrids as potent, multifunctional acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors, *Med. Chem.*, **55**, 4309-4321, doi: 10.1021/jm300106z.
10. Bolognesi, M. L., Banzi, R., Bartolini, M., Cavalli, A., Tarozzi, A., Andrisano, V., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., Bergamini, C., Fato, R., Lenaz, G., Hrelia, P., Cattaneo, A., Recanatini, M., and Melchiorre, C. (2007) Novel class of quinone-bearing polyamines as multi-target-directed ligands to combat Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.*, **50**, 4882-4897, doi: 10.1021/jm070559a.
11. Bajda, M., Guzior, N., Ignasik, M., and Malawska, B. (2011) Multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease treatment, *Curr. Med. Chem.*, **18**, 4949-4975, doi: 10.2174/092986711797535245.
12. Bolognesi, M. L., Simoni, E., Rosini, M., Minarini, A., Tumiatti, V., and Melchiorre, C. (2011) Multi-target-directed ligands: innovative chemical probes and therapeutic tools against Alzheimer's disease, *Curr. Top Med. Chem.*, **11**, 2797-2806, doi: 10.2174/156802611798184373.
13. Bolognesi, M. L., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., and Melchiorre, C. (2008) From dual binding site acetylcholinesterase inhibitors to multi-target-directed ligands (MTDLs): a step forward in the treatment of Alzheimer's disease, *Mini Rev. Med. Chem.*, **8**, 960-967, doi: 10.2174/138955708785740652.
14. Mohsi, N. A., and Ahmad, M. (2020) Donepezil: a review of the recent structural modifications and their impact on anti-Alzheimer activity, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **56**, 1-16, doi: 10.1590/s2175-97902019000418325.
15. Benchekroun, M., Ismaili, L., Pudlo, M., Luzet, V., Gharbi, T., Refouvelet, B., and Marcj-Contelles, J. (2015) Donepezil-ferulic acid hybrids as anti-Alzheimer drugs, *Fut. Med. Chem.*, **7**, 15-21, doi: 10.4155/fmc.14.148.
16. Dias, K. S. T., de Paula, C. T., dos Santos, T., Souza, I. N., Boni, M. S., Guimarães, M. J., da Silva, F. M. R., Castro, N. G., Neves, G. A., Veloso, C. C., Coelho, M. M., de Melo, I. S. F., Giusti, F. C. V., Giusti-Paiva, A., da Silva, M. L., Dardenne, L. E., Guedes, I. A., Pruccoli, L., Morroni, F., Tarozzi, A., and Viegas, C. Jr. (2017) Design, synthesis and evaluation of novel feruloyl-donepezil hybrids as potential multitarget drugs for the treatment of Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.*, **130**, 440-457, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.02.043.
17. Yan, J., Hu, J., Liu, A., He, L., Li, X., and Wei, H. (2017), Design, synthesis, and evaluation of multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease based on the fusion of donepezil and curcumin, *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 2946-2955, doi: 10.1016/j.bmc.2017.02.048.
18. Alonso, D., Dorronsoro, I., Rubio, L., Munoz, P., García-Palomero, E., Del Monte, M., Bidon-Chanal, A., Orozco, M., Luque, F. J., Castro, A., Medina, M., and Martínez, A. (2005) Donepezil-tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 6588-6597, doi: 10.1016/j.bmc.2005.09.029.
19. Sepsova, V., Karasova, J. Z., Tobin, G., Jun, D., Korabecny, J., Cabelova, P., Janska, K., Krusek, J., Skrenkova, K., Kuca, K., and Soukup, O. (2015) Cholinergic properties of new 7-methoxytacrine-donepezil derivatives, *Gen. Physiol. Biophys.*, **34**, 189-200, doi: 10.4149/gpb_2014036.
20. Xie, S. S., Lan, J. S., Wang, X., Wang, Z. M., Jiang, N., Li, F., Wu, J.-J., Wang, J., and Kong, L.-Yi (2016) Design, synthesis and biological evaluation of novel donepezil-coumarin hybrids as multi-target agents for the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 1528-1539, doi: 10.1016/j.bmc.2016.02.023.
21. Shen, Y., Zhang, J., Sheng, Dong, R. X., He, Q., Yang, B., and Hu, Y. (2009) Synthesis and biological evaluation of novel flavonoid derivatives as dual binding acetylcholinesterase inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **24**, 372-380, doi: 10.1080/14756360802187885.
22. Rodríguez-Franco, M. I., Fernández-Bachiller, M. I., Pérez, C., Castro, A., and Martínez, A. (2005) Design and synthesis of N-benzylpiperidine-purine derivatives as new dual inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 6795-6802, doi: 10.1016/j.bmc.2005.07.019.
23. Moridani, M. Y., Scobie, H., Jamshidzadeh, A., Salehi, P., and O'Brien, P. J. (2001) Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation, *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1432-1439.
24. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45**, 287-306, doi: 10.1080/1040869059096.
25. Touaibia, M., Jean-François, J., and Doiron, J. (2011) Caffeic acid, a versatile pharmacophore: an overview, *Mini Rev. Med. Chem.*, **11**, 695-713, doi: 10.2174/138955711796268750.
26. Rehman, U. M., and Sultana, S. (2011) Attenuation of oxidative stress, inflammation and early markers of tumor promotion by caffeic acid in Fe-NTA exposed kidneys of Wistar rats, *Mol. Cell Biochem.*, **357**, 115-124, doi: 10.1007/s11010-011-0881-7.
27. Roos, T. U., Heiss, E. H., Schwaiberger, A. V., Schachner, D., Sroka, I. M., Oberan, T., Vollmar, A. M., and Dirsch, V. M. (2011) Caffeic acid phenethyl ester

- inhibits PDGF-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of p38 MAPK, HIF-1 α , and heme oxygenase-1, *J. Nat. Prod.*, **74**, 352-356, doi: 10.1021/np100724f.
28. Scapagnini, G., Vasto, S., Abraham, N. G., Caruso, C., Zella, D., and Fabio, G. (2011) Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders, *Mol. Neurobiol.*, **44**, 192-201, doi: 10.1007/s12035-011-8181-5.
 29. Eom, T. K., Ryu, B., Lee, J. K., Byun, H. G., Park, S. J., and Kim, S. K. (2013) β -secretase inhibitory activity of phenolic acid conjugated chitooligosaccharides, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **28**, 214-217, doi: 10.3109/14756366.2011.629197.
 30. Sul, D., Kim, H. S., Lee, D., Joo, S. S., Hwang, K. W., and Park, S. Y. (2009) Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation, *Life Sci.*, **84**, 257-262, doi: 10.1016/j.lfs.2008.12.001.
 31. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **39**, 44-84, doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
 32. Zhang, P., Tang, Y., Li, N. G., Zhu, Y., and Duan, J. A. (2014) Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives, *Molecules*, **19**, 16458-16476, doi: 10.3390/molecules191016458.
 33. Turgut, E., Gungor, O., Kirpik, H., Kose, A., Gungor, S. A., and Kose, M. (2021) Benzimidazole ligands with allyl, propargyl or allene groups, DNA binding properties, and molecular docking studies, *Appl. Organometallic Chem.*, **35**, e6323, doi: 10.1002/aoc.6323.
 34. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, Jr. V., and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88-95, doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
 35. Mohammadi-Khanaposhtani, M., Saeedi, M., Zafarghandi, N. S., Mahdavi, M., Sabourian, R., Razkenari, E. K., and Akbarzadeh, T. (2015) Potent acetylcholinesterase inhibitors: Design, synthesis, biological evaluation, and docking study of acridone linked to 1,2,3-triazole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, **92**, 799-806, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.01.044.
 36. Schrödinger Release 2021-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
 37. Isika, D., Çeşme, M., Osonga, F. J., and Sadik, O. A. (2020) Novel quercetin and apigenin-acetamide derivatives: Design, synthesis, characterization, biological evaluation and molecular docking studies, *RSC Adv.*, **10**, 25046-25058, doi: 10.1039/d0ra04559d.
 38. Adımcılar, V., Çeşme, M., Şenel, P., Danış, İ., Ünal, D., and Gölcü, A. (2021) Comparative study of cytotoxic activities, DNA binding and molecular docking interactions of anti-cancer agent epirubicin and its novel copper complex, *J. Mol. Struct.*, **1232**, 130072, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.130072.
 39. Onur, S., Çeşme, M., Köse, M., and Tümer, F. (2022) New imino-methoxy derivatives: design, synthesis, characterization, antimicrobial activity, DNA interaction and molecular docking studies, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **40**, 11082-11094, doi: 10.1080/07391102.2021.1955741.
 40. Ebru, U., Derya, K., Hakan, K. A., Bilge, A., and Adem, D. (2021) Melatonin metabolites protect human retinal pigment epithelial cells from death caused by oxidative stress, *Pharmaceut. Chem. J.*, **55**, 762-768, doi: 10.1016/j.exer.2004.02.003.
 41. Zurek, E., Szymanski, P., and Mikiciuk-Olasik, E. (2013) Synthesis and biological activity of new donepezil-hydrazinonicotinamide hybrids, *Drug Res.*, **63**, 137-144, doi: 10.1055/s-0033-1333735.
 42. Sugumaran, M., and Yokesk, K. M. (2012) Synthesis and biological activity of novel 2, 5-disubstituted benzimidazole derivatives, *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.*, **4**, 80-83.
 43. Pyle, A. M., Rehmann, J. P., Meshoyrer, R., Kumar, C. V., Turro, N. J., and Barton, J. K. (1989) Mixed-ligand complexes of ruthenium(II): factors governing binding to DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3051-3058, doi: 10.1021/ja00190a046.
 44. İçsel, C. (2013) Synthesis, crystal structures, spectroscopic, thermal and DNA binding properties of palladium (II) and platinum (II) complexes containing 2-(hydroxymethyl) pyridine and 2-(2-hydroxyethyl) pyridine ligands. PhD Thesis. Bursa Uludag University (Turkey).
 45. Rafique, B., Khalid, A. M., Akhtar, K., and Jabbar, A. (2013) Interaction of anti-cancer drug methotrexate with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biosensors Bioelectronics*, **44**, 21-26, doi: 10.1016/j.bios.2012.12.028.
 46. Meyer-Almes, F. J., and Porschke, D. (1993) Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium, *Biochemistry*, **32**, 4246-4253, doi: 10.1021/bi00067a012.
 47. Baguley, B. C., and LeBret, M. (1984) Quenching of DNA-ethidium fluorescence by amsacrine and other antitumor agents: a possible electron-transfer effect, *Biochemistry*, **23**, 937-943, doi: 10.1021/bi00300a022.
 48. Sagaama, A., and Issaoui, N. (2020) Design, molecular docking analysis of an anti-inflammatory drug, computational analysis and intermolecular interactions energy studies of 1-benzothiophene-2-carboxylic acid, *Comput. Biol. Chem.*, **88**, 107348, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2020.107348.
 49. Şahin, I., Çeşme, M., Özgeriş, F. B., Güngör, Ö., and Tümer, F. (2022) Design and synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles: biological evaluation, *in silico* molecular docking and ADME screening, *J. Mol. Struct.*, **1247**, 131344, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.131344.

50. Raghi, K. R., Sherin, D. R., Saumya, M. J., Arun, P. S., Sobha, V. N., and Manojkumar, T. K. (2018) Computational study of molecular electrostatic potential, docking and dynamics simulations of gallic acid derivatives as ABL inhibitors, *Comput. Biol. Chem.*, **74**, 239-246, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.04.001.
51. Sepay, N., Sepay, N., Al Hoque, A., Mondal, R., Halder, U. C., and Muddassir, M. (2020) *In silico* fight against novel coronavirus by finding chromone derivatives as inhibitor of coronavirus main proteases enzyme, *Struct. Chem.*, **31**, 1831-1840, doi: 10.1007/s11224-020-01537-5.
52. Akhoun, B. A., Choudhary, S., Tiwari, H., Kumar, A., Barik, M. R., Rathor, L., Pandey, R. and Nargotra, A. (2020) Discovery of a new donepezil-like acetylcholinesterase inhibitor for targeting Alzheimer's disease: computational studies with biological validation, *J. Chem. Inf. Model.*, **60**, 4717-4729, doi: 10.1021/acs.jcim.0c00496.
53. Sağlık, B. N., Osmaniye, D., Çevik, U. A., Levent, S., Çavuşoğlu, B. K., Özkay, Y., and Kaplancıklı, Z. A. (2020) Design, Synthesis, and structure–activity relationships of thiazole analogs as anticholinesterase agents for Alzheimer's disease, *Molecules*, **25**, 312, doi: 10.3390/molecules25184312.

A NOVEL DONEPEZIL–CAFFEIC ACID HYBRID: SYNTHESIS, BIOLOGICAL EVALUATION, AND MOLECULAR DOCKING STUDIES

D. Kılıçaslan^{1*}, A. H. Kurt², M. Köse³,
M. Çeşme³, Ö. Güngör³, C. K. Oztabag⁴, A. Doganer⁵

¹ Afsin Vocational School, Department of Chemistry and Chemical Processing Technologies,
Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Kahramanmaraş, Turkey; E-mail: deryatrnc@ksu.edu.tr

² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Bolu Abant İzzet Baysal University, Bolu, Turkey

³ Department of Chemistry, Faculty of Art and Sciences, Kahramanmaraş Sutcu Imam University,
Kahramanmaraş, Turkey

⁴ Department of Interdisciplinary Neuroscience, Bolu Abant İzzet Baysal University, Institute of Health Sciences,
Bolu, Turkey

⁵ Department Biostatistics and Medical Informatics, Faculty of Medicine, Kahramanmaraş Sutcu Imam University,
Kahramanmaraş, Turkey

A novel donepezil–caffeic acid (DP-CA) hybrid molecule was designed, synthesis, and investigated by molecular modeling. Its biological activity and protective effect were investigated by the IR spectroscopy, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, and mass spectrometry. DP-CA was highly active against acetylcholine esterase and inhibited it at the micromolar concentrations. Fluorescence and UV-Vis spectroscopy studies showed strong binding of DP-CA to DNA. Moreover, DP-CA exhibited protective effects against H₂O₂-induced toxicity in U-118 MG glioblastoma cells. Finally, molecular docking showed a high affinity of DP-CA in all concentrations, and the active 4EY7 site exhibited essential residues with polar and apolar contacts. Taken together, these findings indicate that DP-CA could be a prospective multifunctional agent for the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: donepezil, caffeic acid, hybrid molecule, acetylcholinesterase, molecular docking, protective effect