

SOD mimetiki

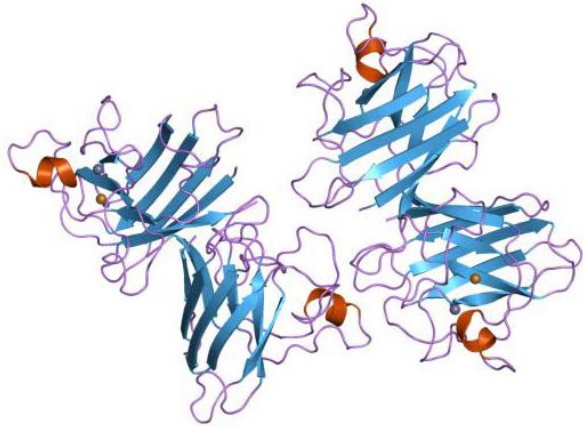
doc.dr. Janez Mravljak, mag.farm.



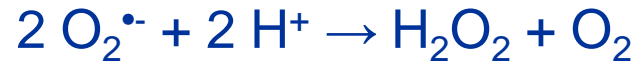
Priporočena literatura

- *Pregledni članek: A. Perdih, S. Pečar: **Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine; farm vestn 2006; 57, 24-29.***

Superoksidna dismutaza



Funkcija: odstranjuje $O_2^{\bullet -}$



$$k \sim 2-4 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$$

- Edini poznani encim, ki reagira s $O_2^{\bullet -}$, kinetično eden najhitrejših encimov v naravi – hitrost dismutacije je omejena le z difuzijo.
- Več oblik encima SOD: v aktivnem mestu lahko imajo Cu-Zn, Fe, Mn ali Ni (prokarionti)

Mehanizem delovanja SOD

SOD-katalizirano **dismutacijo** superoksidnega radikala lahko zapišemo s sledečima polovičnima reakcijama:

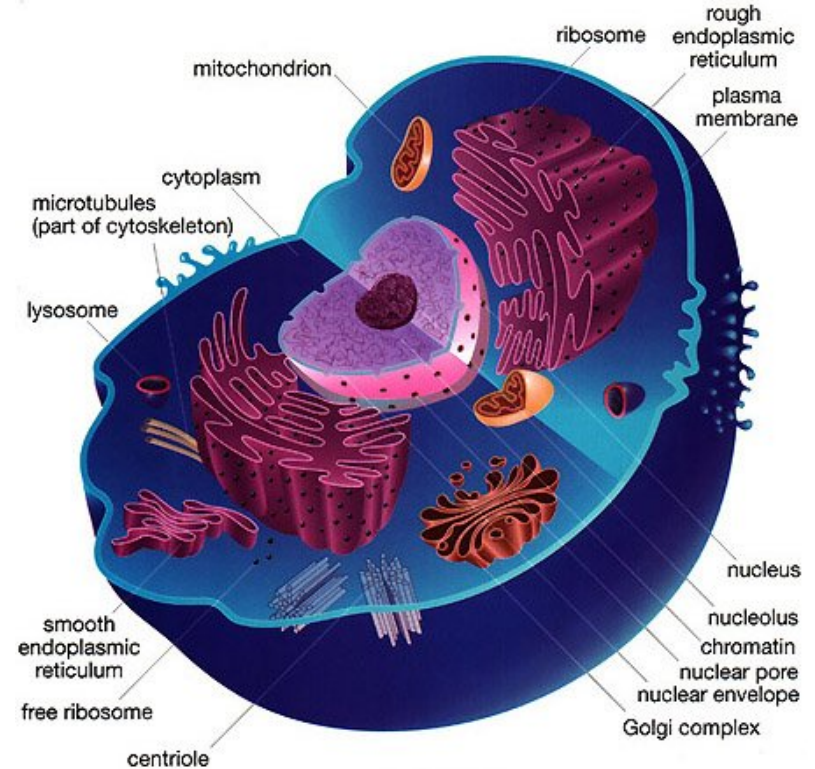


Kjer je $M = \text{Cu}$ ($n=1$) ; Mn ($n=2$) ; Fe ($n=2$) ; Ni ($n=2$).

- V tej reakciji oksidacijsko število kovinskega kationa oscilira med n in $n+1$. Aktivno mesto encima lahko naenkrat sprejme eno molekulo $O_2^{\bullet-}$, zato je produkt encimske redoks reakcije odvisen od oksidacijskega stanja iona kovin prehoda \Rightarrow “ping-pong” mehanizem

Lokacija SOD oblik v celici

- **CuZn-SOD (SOD1)**
 - Citoplazma, jedro, lizosomi
- **Mn-SOD (SOD2)**
 - Matriks mitohondrijev
- **EC-SOD [CuZn] (SOD3)**
 - Ekstracelularno, celična membrana
- **EC Mn-SOD**
 - Ekstracelularno, celična membrana
- **Fe-SOD** – samo pri prokariontih



Aktivnost izoencimov SOD



- So tkivno specifični.
- Največja encimska aktivnost SOD je v **jetrih**, kjer je obremenitev z radikali zaradi intenzivnega metabolizma visoka.
- Ekstracelularna aktivnost SOD pa je največja v **pljučih**, kar kaže na njeno fiziološko vlogo v medceličnih prostorih pljuč pri preprečevanju pljučnih obolenj
- Aktivnost SOD se z leti zmanjšuje (naglo po koncu rodne dobe)


→ STARANJE

IZJEMA: školjka vrste ***Arctica islandica*** doseže v naravi starost 400 let!

→ Aktivnost SOD ostane na visokem nivoju celo življenje.

Katalitični antioksidanti




- Širša opredelitev, vključuje tudi mimetike SOD
 - **Mimetiki SOD** selektivno oponašajo delovanje SOD (nimajo katalazne aktivnosti)
 - uvrščamo jih med umetne encime, saj so nadomestek nativnega encima. Primeren je tudi izraz **encimomimetiki** (ang. synzymes - sintezni encimi).
 - Prve potencialne učinkovine so v fazah kliničnega testiranja na ljudeh.
- 

Katalitični antioksidanti

- Na začetku razvoja so v terapiji poskusili uporabiti kar sam encim
→ ni bilo pričakovanih rezultatov
- Odkrili so več skupin kompleksov, ki vsebujejo ion kovin prehoda, največkrat mangan, koordinativno vezan v različna ciklična ogrodja, in s katerimi oponašajo delovanje encimskih antioksidantov
- Katalitične antioksidante delimo na selektivne in neselektivne:
selektivni so reakcijsko specifični za reakcijo s $O_2^{\bullet-}$ v *in vitro* pogojih. V to skupino uvrščamo **makrociklične** katalitične antioksidante.
- Skupino neselektivnih katalitičnih antioksidantov pa predstavljajo **saleni, metaloporfirini in nitroksidi**.

Selektivnost



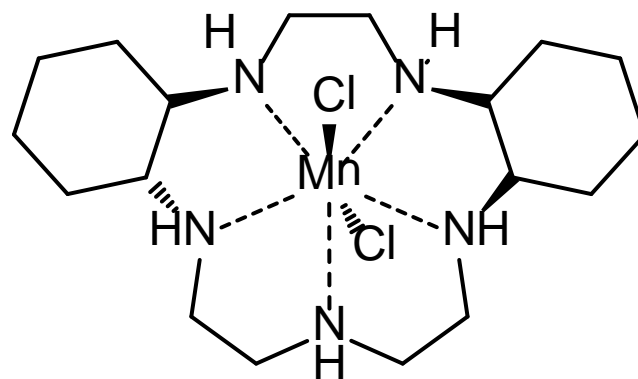
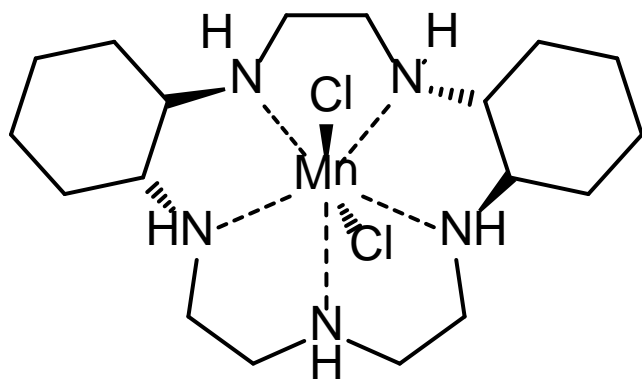
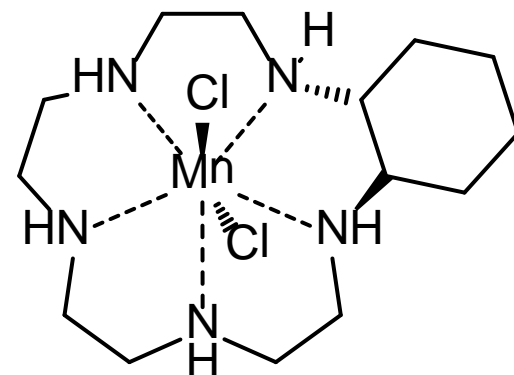
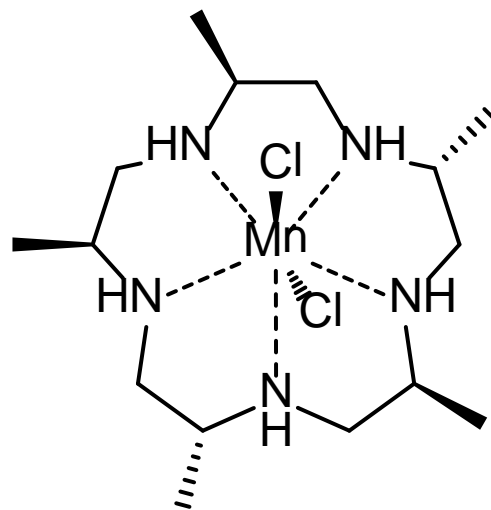
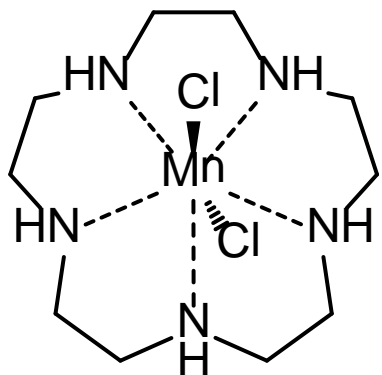
- Ker imajo ROS in RNS pomembno vlogo tudi v nekaterih fizioloških procesih, pri transdukciji signalov – **redoks signaliziranju**, izražanju genov in imunskem odgovoru, je zagotavljanje selektivnosti katalitičnih antioksidantov prav tako nujen pogoj za uspešen nadaljnji razvoj.
- 

Skupine učinkovin



- Makrociklični mimetiki SOD
 - Saleni
 - Metaloporfirini
 - Nitroksidi
- 

Makrociklični mimetiki SOD



Makrociklični mimetiki SOD

- Mn^{2+} je koordinativno vezan v center 15-členskega obroča s petimi dušiki (pentaaza makrocikel).
- Sistem omogoča prenos le enega elektrona v redoks reakciji, zato selektivni za odstranjevanje le $O_2^{\bullet-}$.
(Lovljenje $ONOO^-$ in H_2O_2 zahteva prenos dveh elektronov.)
- Spojine z večjim številom substituentov na makrocikličnem obroču so termodinamsko in kinetično **stabilnejše**.
- Stereokemija vezave dodatnih obročev vpliva na SOD aktivnost.

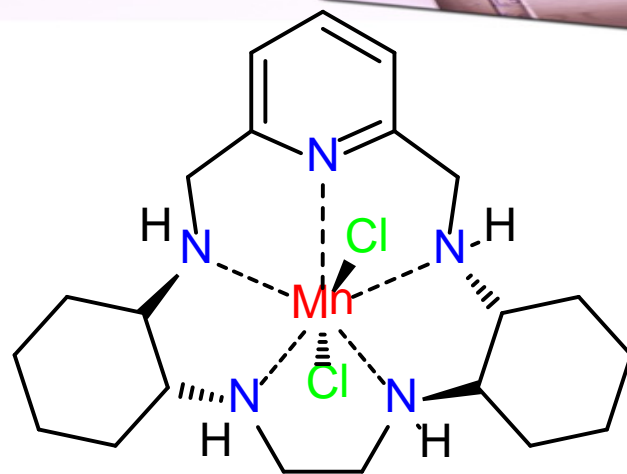
Mehanizem delovanja

Manganovi(II) pentaaza-makrociklični SOD-mimetični **sincimi**:



Obraten mehanizem kot pri SOD!

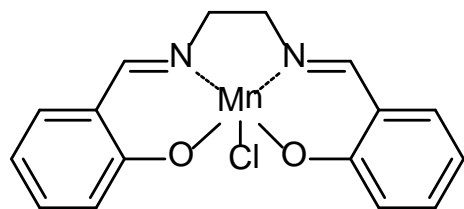
M40403 ali SC-72325



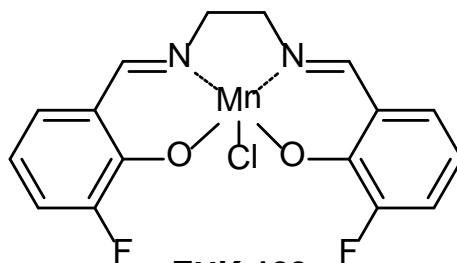
M40403

- Najuspešnejši makrociklični **antioksidant**, ki je učinkovit pri zdravljenju mnogih patoloških stanj.
- Ima katalitično aktivnost primerljivo s SOD, prehaja celične bariere in ne povzroča imunskih reakcij.
- Zaključuje II. fazo kliničnih testiranj kot potencialni **analgetik**
→ $O_2^{\bullet-}$ je namreč mediator bolečine na ravni centralnega in perifernega živčevja.

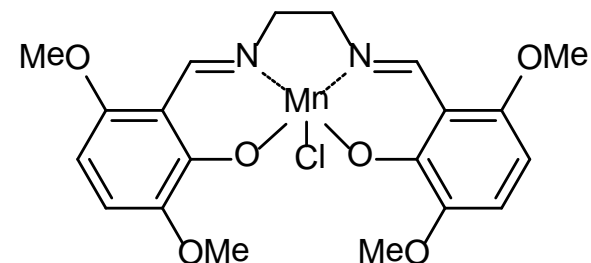
Saleni



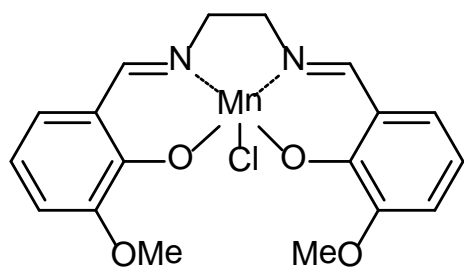
EUK-8



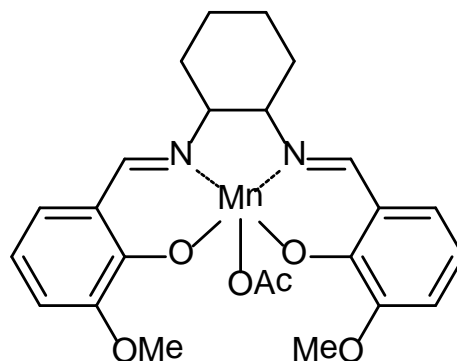
EUK-122



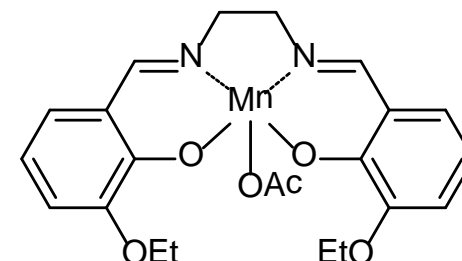
EUK-124



EUK-134



EUK-159



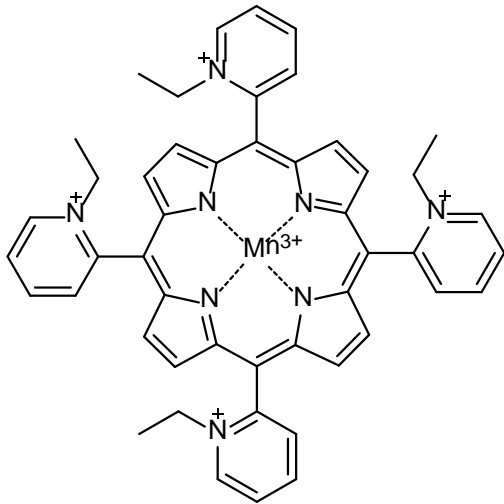
EUK-189

Saleni so substituirani aromatski *N,N* – bis(saliciliden)etilendiaminski kovinski kompleksi z Mn^{3+} .

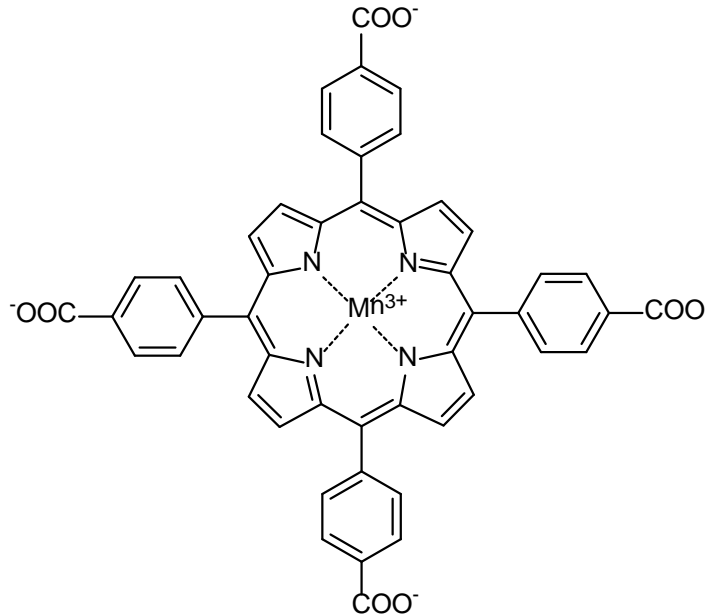
Saleni

- Lahko odstranjujejo tako $O_2^{\bullet-}$ kot tudi H_2O_2 .
- Reagirajo tudi s $ONOO^-$ in peroksidi v maščobah. Mangan(III) je v salenovih spojinah koordiniran s 4 aksialnimi ligandi: z dvema kisikovima in dvema dušikovima atomoma.
- To omogoča tvorbo več valenčnih stanj, ki vsa omogočajo odstranjevanje velikega števila ROS/RNS.
- Čeprav imajo le 1 % aktivnosti encima SOD, so še vedno učinkoviti pri preprečevanju oksidativnega stresa.
- Spojina EUK 189 je bila v *in vivo* študijah učinkovita pri zaščiti mikroglije pred poškodbami z β -amiloidom in je pomemben kandidat za zdravljenje **Alzheimerjeve bolezni**.
- Saleni so učinkoviti tudi pri terapiji **endotoksičnega šoka** in pri različnih **kardiovaskularnih zapletih**.

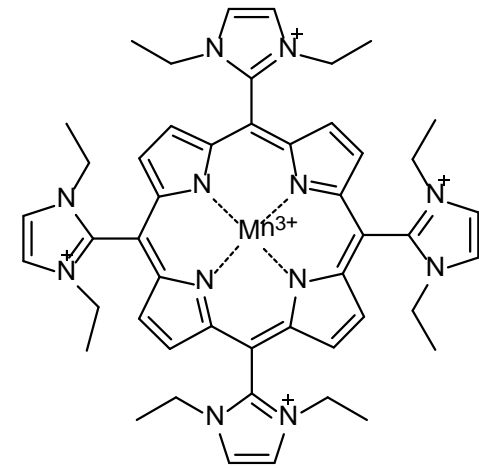
Metaloporfirini



AEOL 10113



AEOL 10201




AEOL 10150

Kemijsko jih uvrščamo v skupino mezo-substituiranih protoporfirinov z manganovim Mn^{3+} ali železovim Fe^{3+} ionom v sredini porfirinskega obroča, ki ga koordinirajo štirje aksialni dušikovi atomi.

Metaloporfirini



- So najbolj raziskovana skupina katalitičnih antioksidantov
 - Lahko odstranjujejo $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $ONOO^-$ in lipidne perokside.
 - Spojine so učinkovite *in vivo* v primeru mnogih bolezenskih stanj.
 - Ker so inhibitorji lipidne peroksidacije, lahko zaščitno delujejo v primeru endotoksičnega šoka ter akutne odpovedi ledvic. Učinkoviti so v primeru vnetja ter uspešno zavirajo apoptozo.
 - Metalopofirini (spojina AEOL–10113) zakasniijo klinično manifestacijo **sladkorne bolezni tipa 1**. Ni pomembno le katalitično odstranjevanje radikalov, ampak tudi **inhibicija avtoimune reakcije**, ki vodi do razvoja sladkorne bolezni.
 - Metaloporfirini preprečujejo aktivacijo T-celic imunskega sistema in so tudi potencialni **imunomodulatorji**.
- 

Mehanizem delovanja

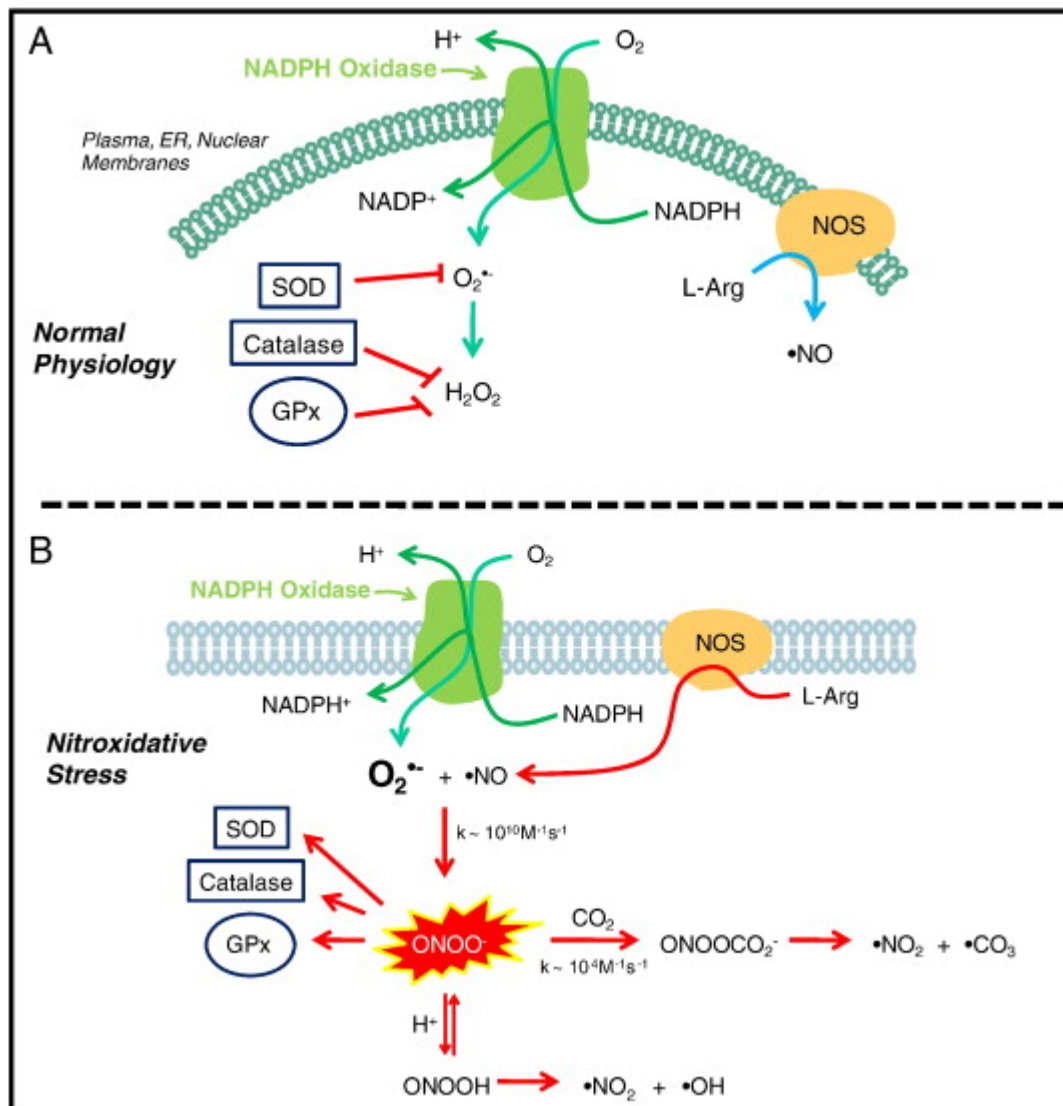
- Porfirinski kompleksi z manganom:



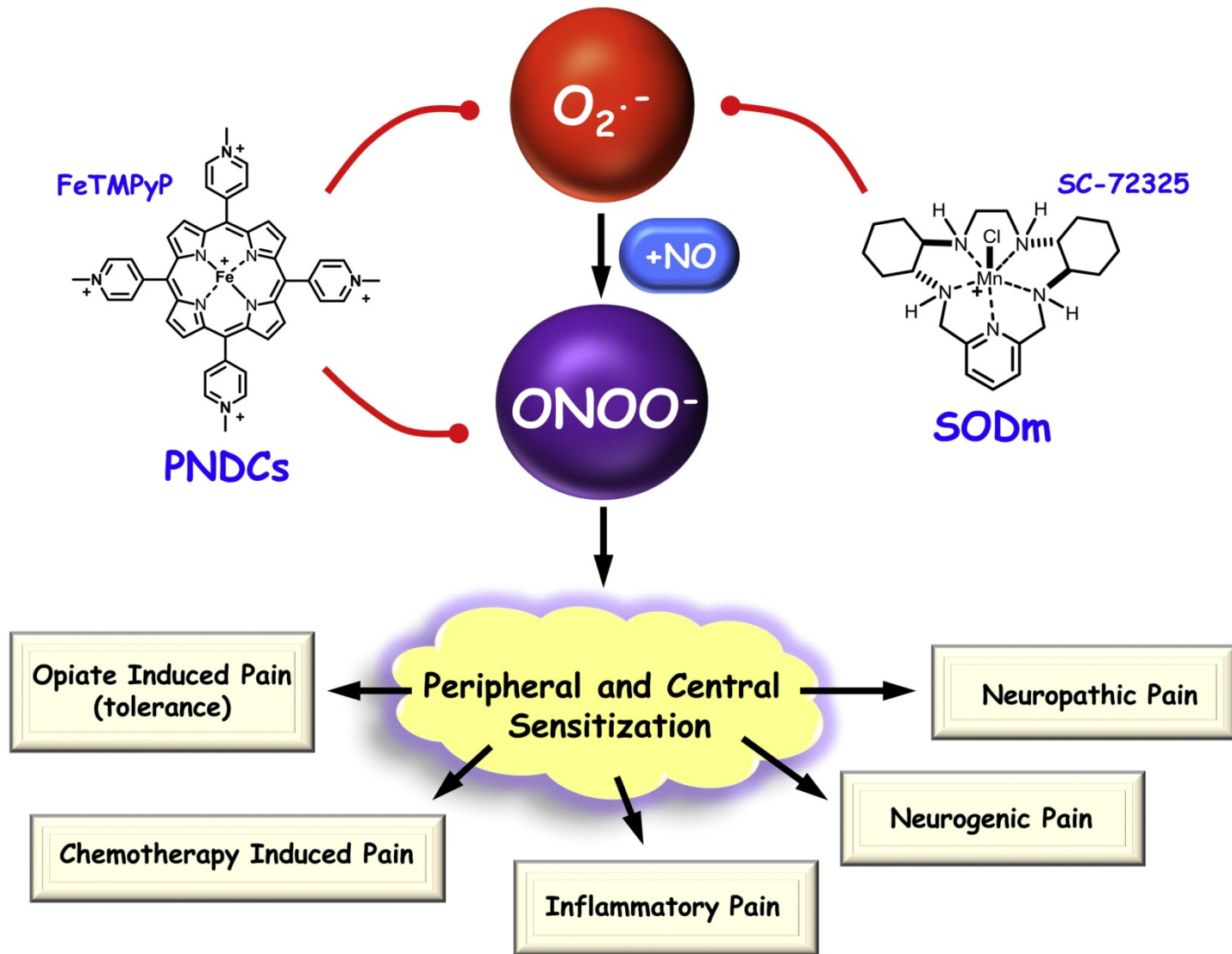
- Porfirinski kompleksi z železom:



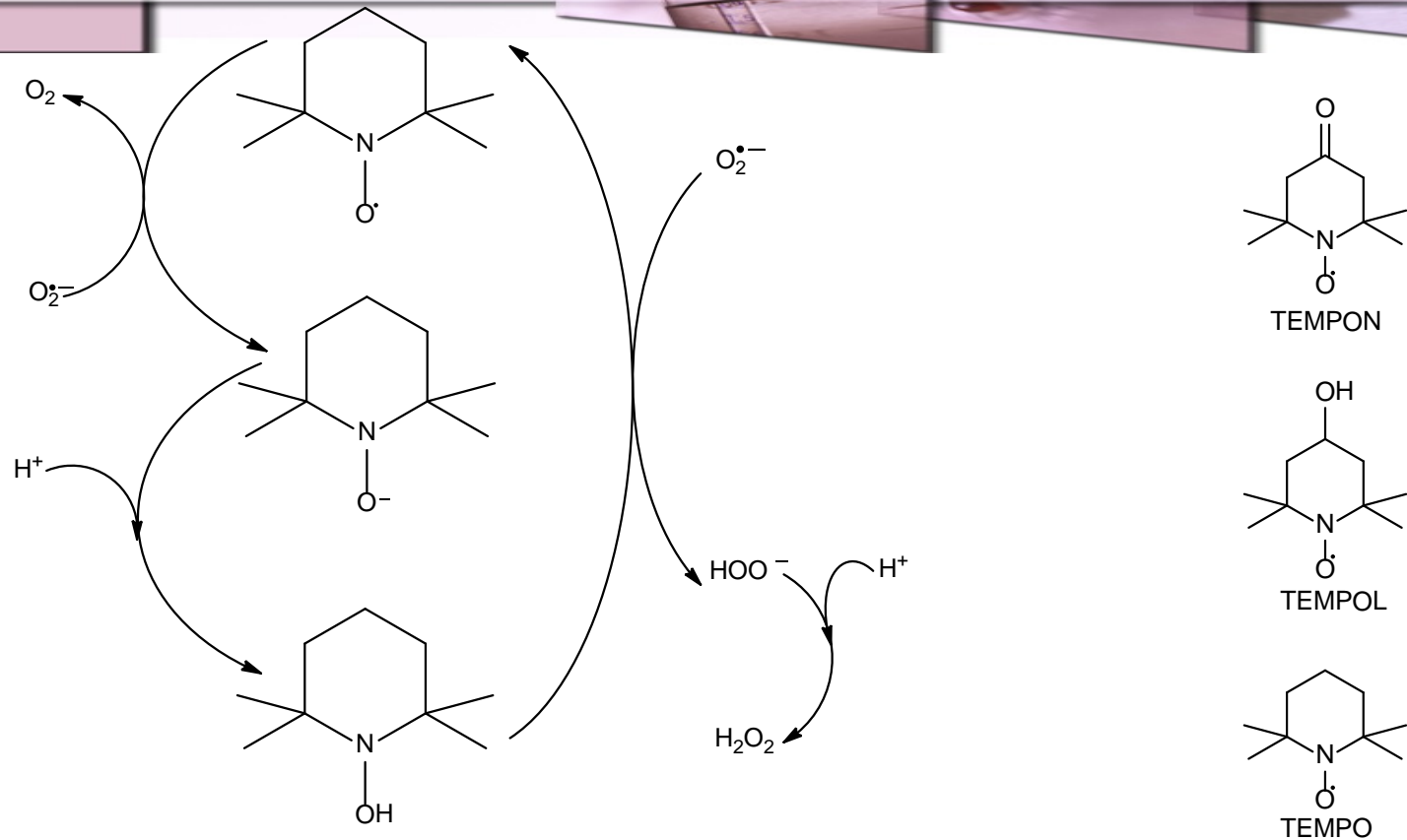
Vloga reaktivnih zvrsti pri bolečini



Analgetiki




Nitroksidi



- Nitroksidi oz. hidrosilamini (reducirana oblika) vstopajo v enoelektronske redoks reakcije s $\text{O}_2^{\bullet-}$. V kliničnem preizkušanju so učinkovine (tempol, tempon) kot antioksidanti za preprečevanje radikalskih poškodb po **ishemiji/reperfuziji**.

Sklep




- Pomen poznavanja vloge superoksidnega radikala pri nastanku in razvoju bolezenskega procesa ter v procesih signaliziranja.
 - Ni standardiziranih postopkov za kvantifikacijo količine antioksidantov v *in vivo* pogojih ter za oceno stopnje oksidativnega stresa.
 - SOD mimetiki še vedno v začetnih stopnjah razvoja.
 - Do “eliksirja mladosti” je še dolga pot!
- 

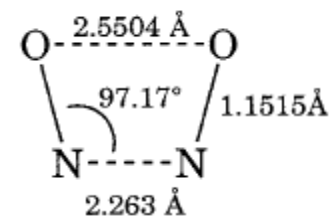
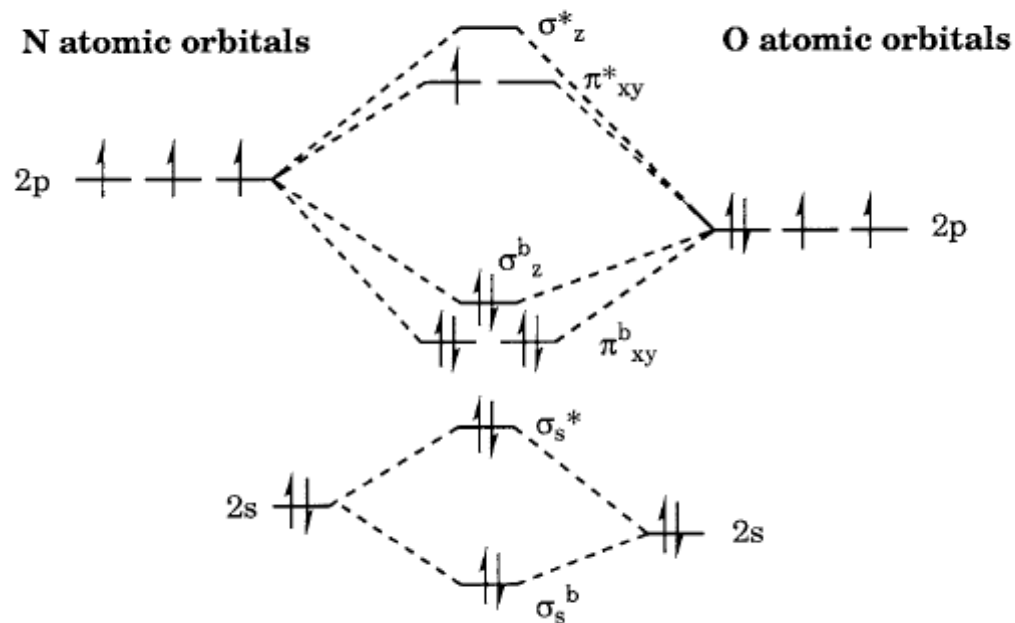
Donorji NO kot vazodilatatorji in antiaritmiki

doc.dr. Janez Mravljak, mag.farm.



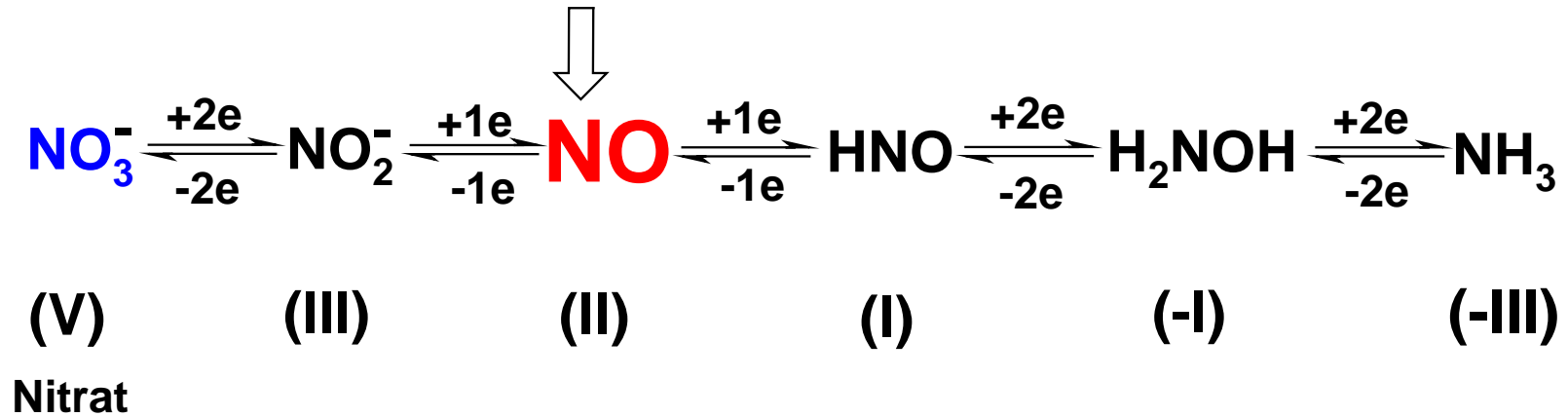
- *Pregledni članek:* J. Mravljak, B. Byrne Habič, S. Pečar: **Dušikov oksid II: biološki učinki in učinkovine, ki sproščajo NO**; *farm vestn* **2005**; 56, 11-16.
 - *Knjiga:* P. G. Wang, T. B. Cai, N. Taniguchi: **Nitric Oxide Donors**; Wiley, 2005.
- 

Dušikov oksid NO•



Razporeditev e⁻ po molekulskih orbitalah pri molekuli NO•

Oksidacijska stanja dušika



Nitrit

Dušikov oksid

Nitroksil

Hidroksilamin

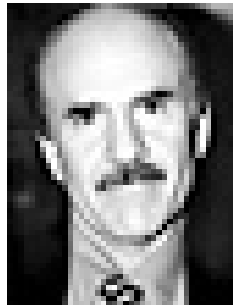
Amonijak

$t_{1/2} = 1-10 \text{ s (in vivo)}$



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998:

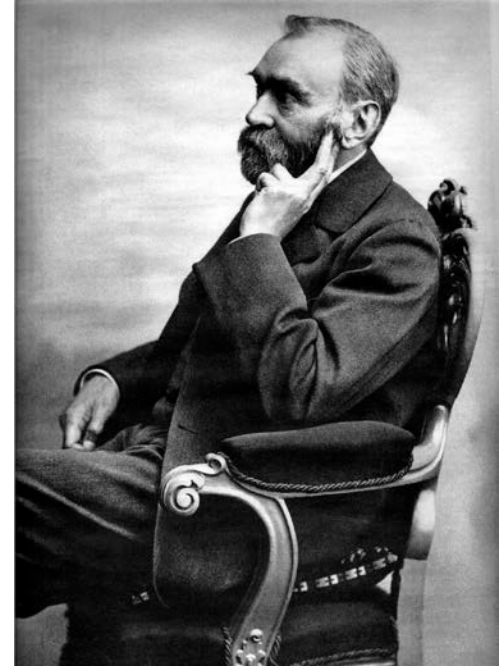
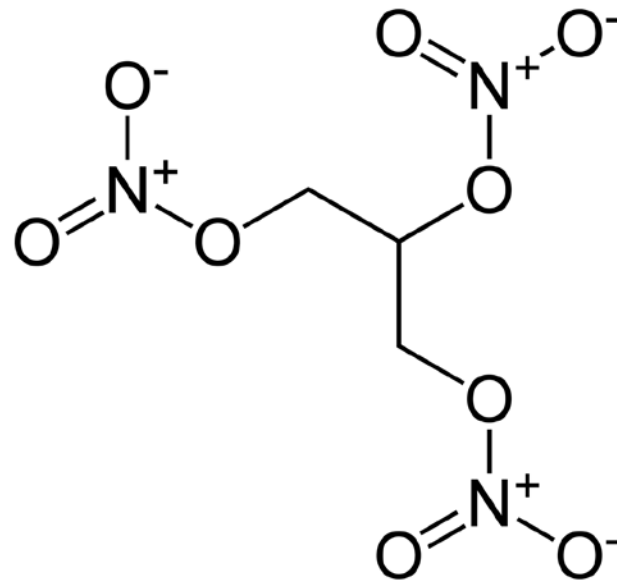
Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, Ferid Murad
for their discoveries concerning "nitric oxide as a
signalling molecule in the cardiovascular system".



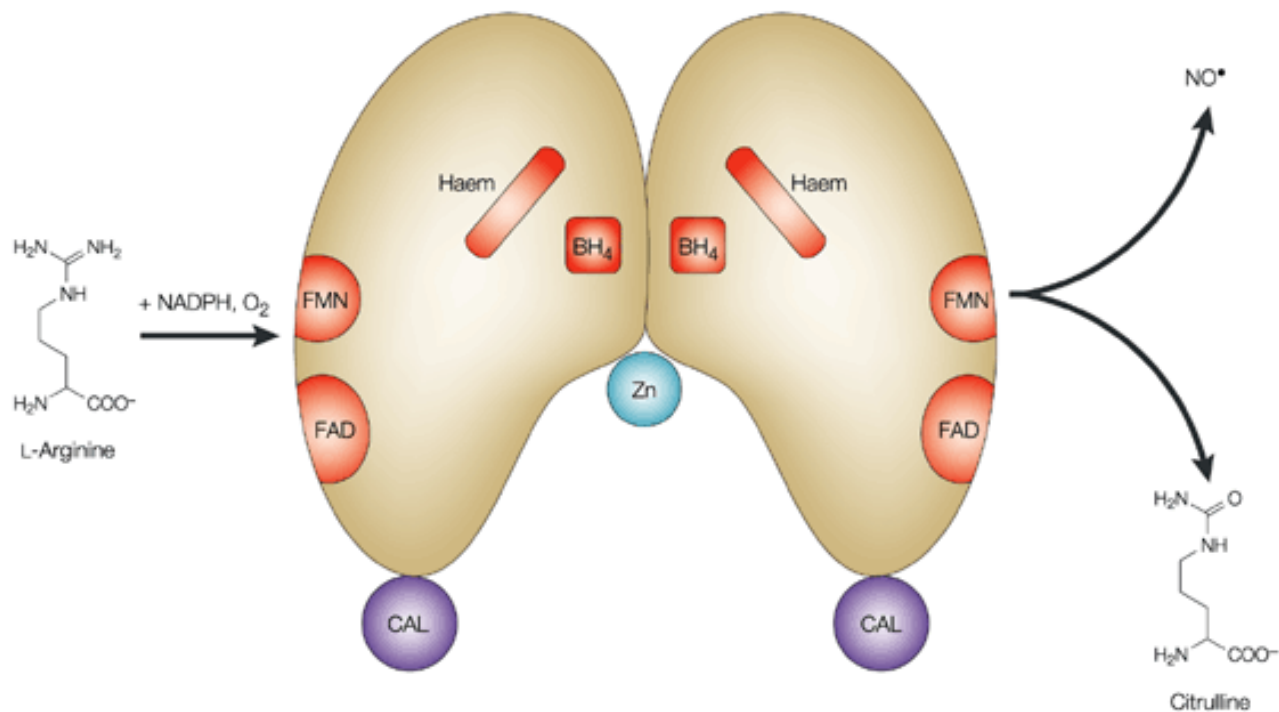
http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998

Alfred Nobel in NO•

- Dinamit
- Angina pectoris – vazodilatator (EDRF)



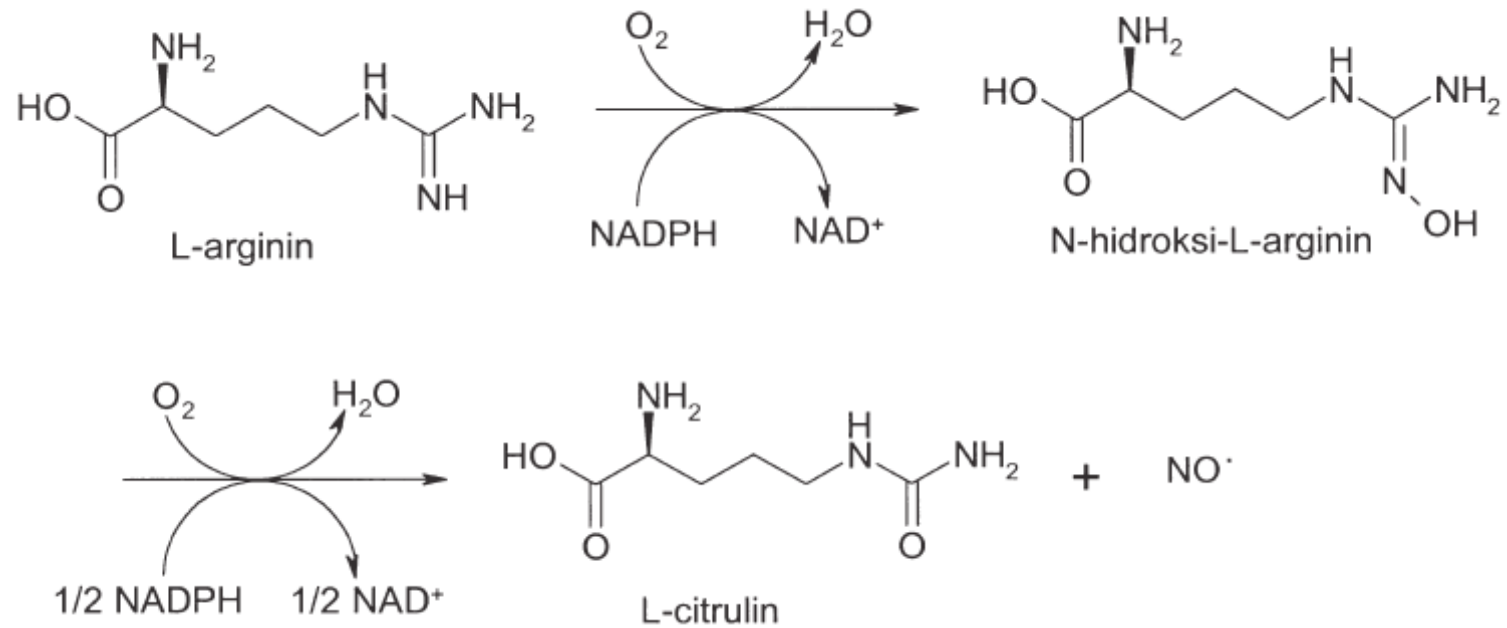
Tvorba NO *in vivo*



Nature Reviews | Drug Discovery

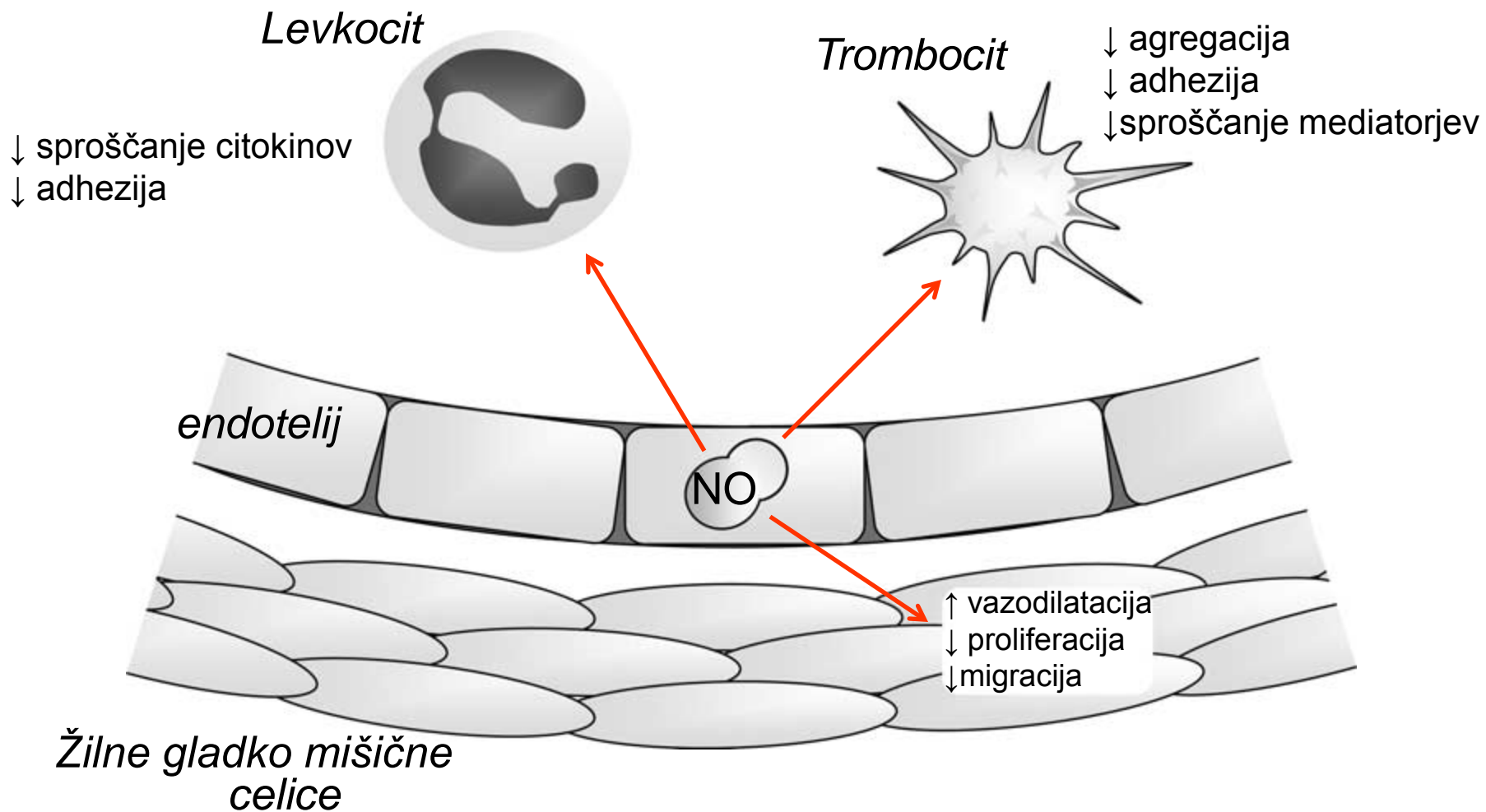
NO sintaza (dimer) s kofaktorji

Tvorba NO *in vivo*

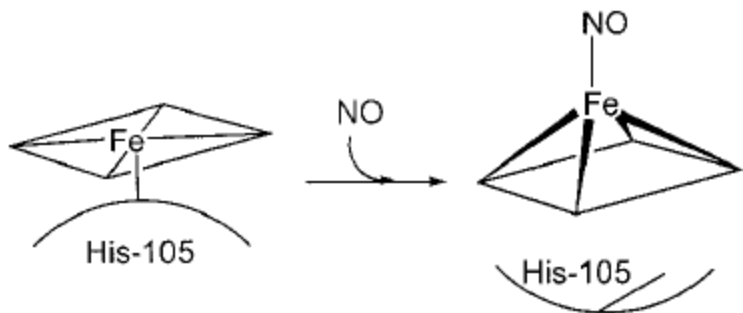
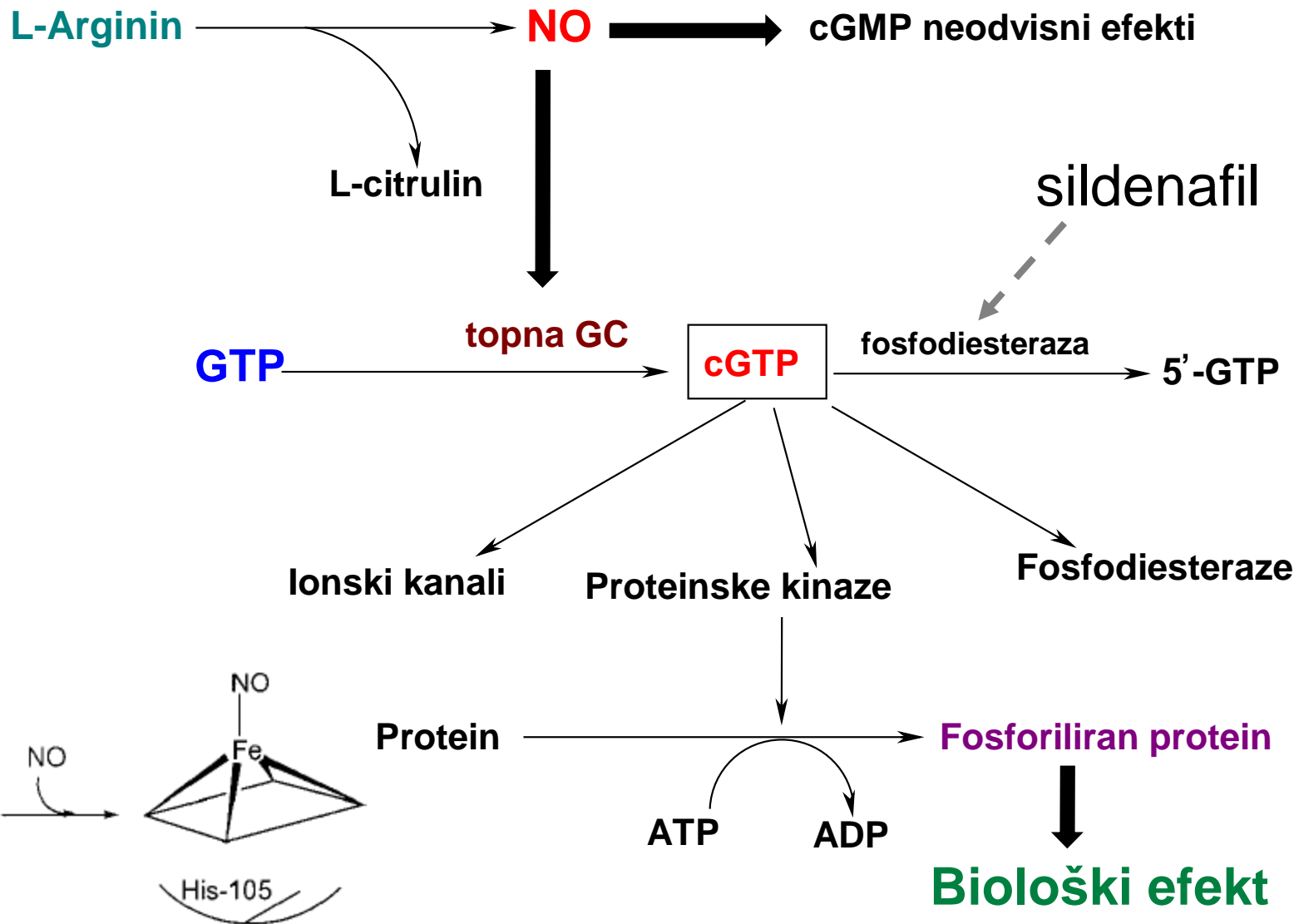


- Tri izoformne oblike encima NOS:
 - Endotelijska NOS (eNOS)
 - Neuronalna NOS (nNOS)
 - Inducibilna ali inflamatorna NOS (iNOS)

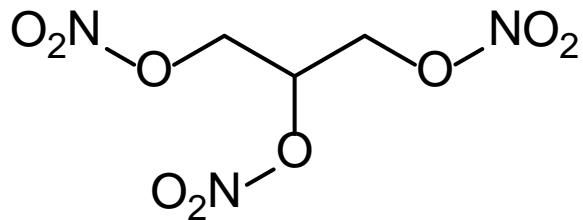
Učinki NO na kardiovaskularni sistem



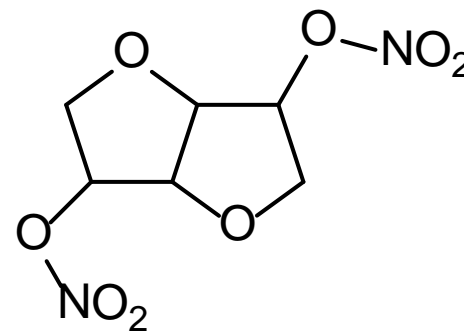
Prenos signala z NO



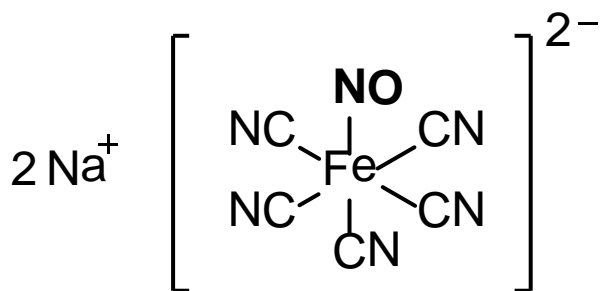
Donorji NO, ki se uporabljajo v terapiji



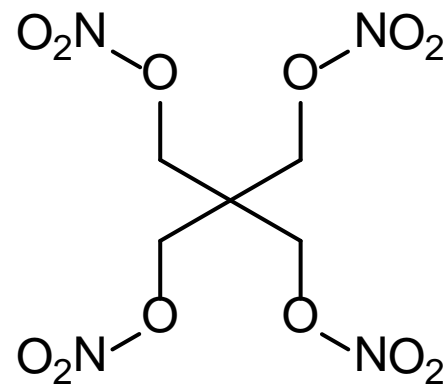
glicerol trinitrat



izosorbid dinitrat



natrijev nitroprusid



pentaeritritol tetranitrat

Učinkovine, ki se uporabljajo v terapiji

NO•

- dodajajo novorojencem v zrak za inhaliranje pri **pljučni hipertenziji**

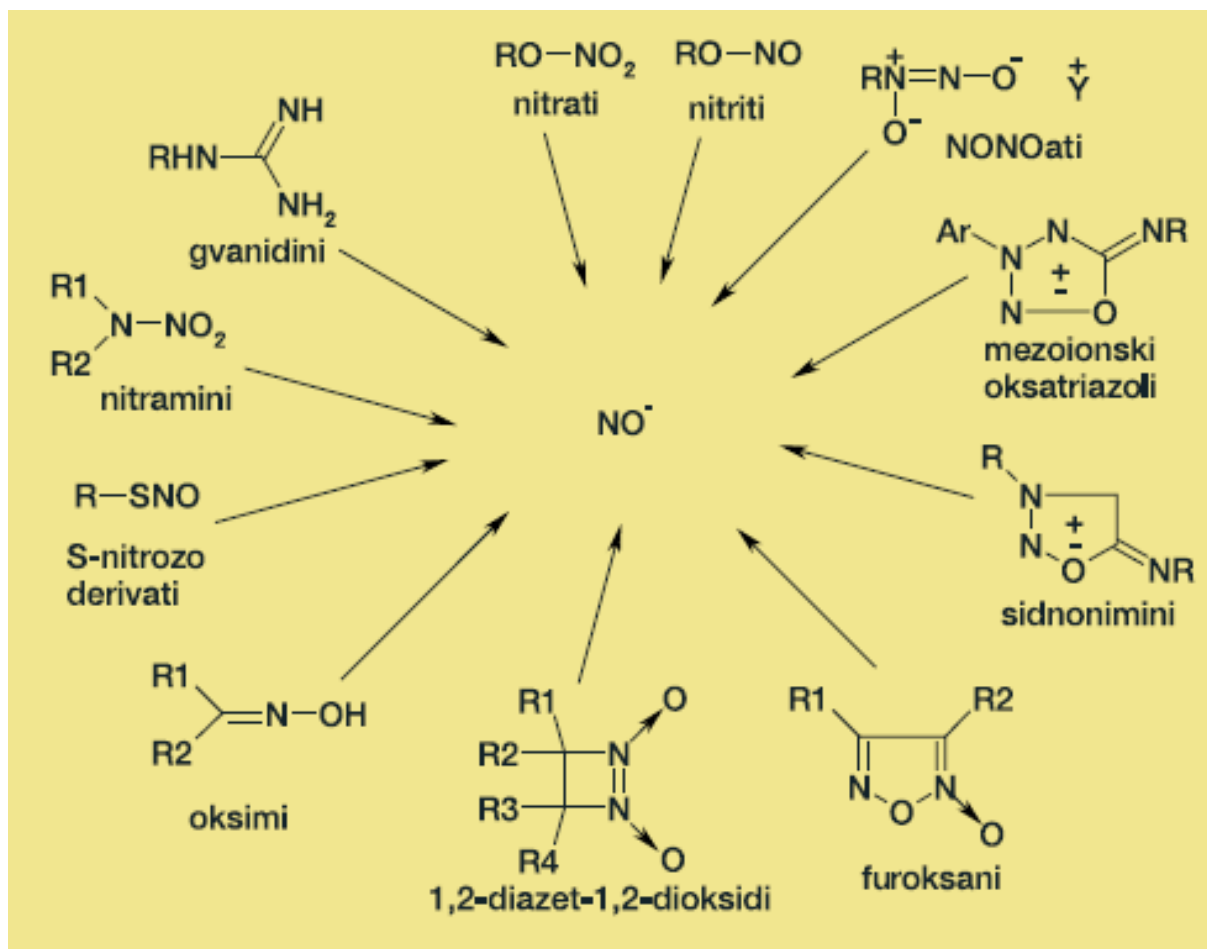
Glicerol trinitrat in drugi organski nitrati

- Uporablja se kot **vazodilatator** pri stabilni in nestabilni angini pectoris, koronarnem vazospazmu, srčni kapi in pri kronični kongestivni bolezni srca, zdravljenju **žolčnih kolik**, pri **izboljšanju prekrvavitve uterusa** pri nosečnicah, ki jim grozi **preeklampsija** povezana z zmanjšano produkcijo NO
- Metabolizira se pod vplivom encima **mitohondrijske aldehydne dehidrogenaze (mtADH)**, ki vsebuje sulfhidrilne (-SH) skupine v aktivnem mestu, **tvorba nitrozotiola kot intermediata** – sprošča se NO
- Pojav tolerance ob dolgotrajni uporabi

Natrijev nitroprusid:

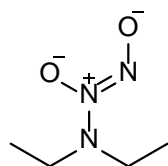
- Uporablja se v obliki intravenske infuzije **pri hipertenzivni krizi**
- Opisani primeri zastrupitve s cianidnimi ioni pri dolgotrajni uporabi
- Mehanizem sproščanja NO je kompleksen in še ni v celoti pojasnjen

Strukture, ki v *in vivo* pogojih sproščajo NO

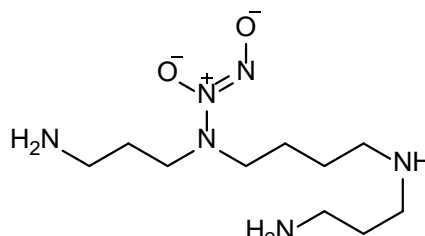


➔ Nove učinkovine, ki bi selektivno povečale koncentracije NO v določenih ciljnih tkivih

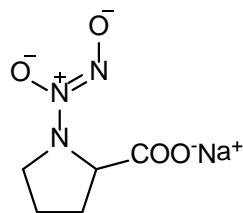
Diazenijevi diolati (NONOati)



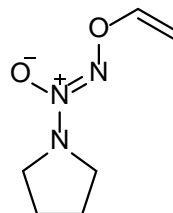
DEA/NO



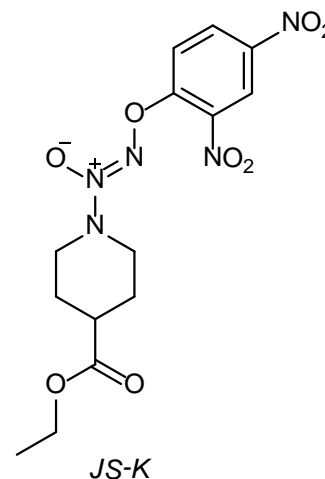
SPER/NO



PROLI/NO



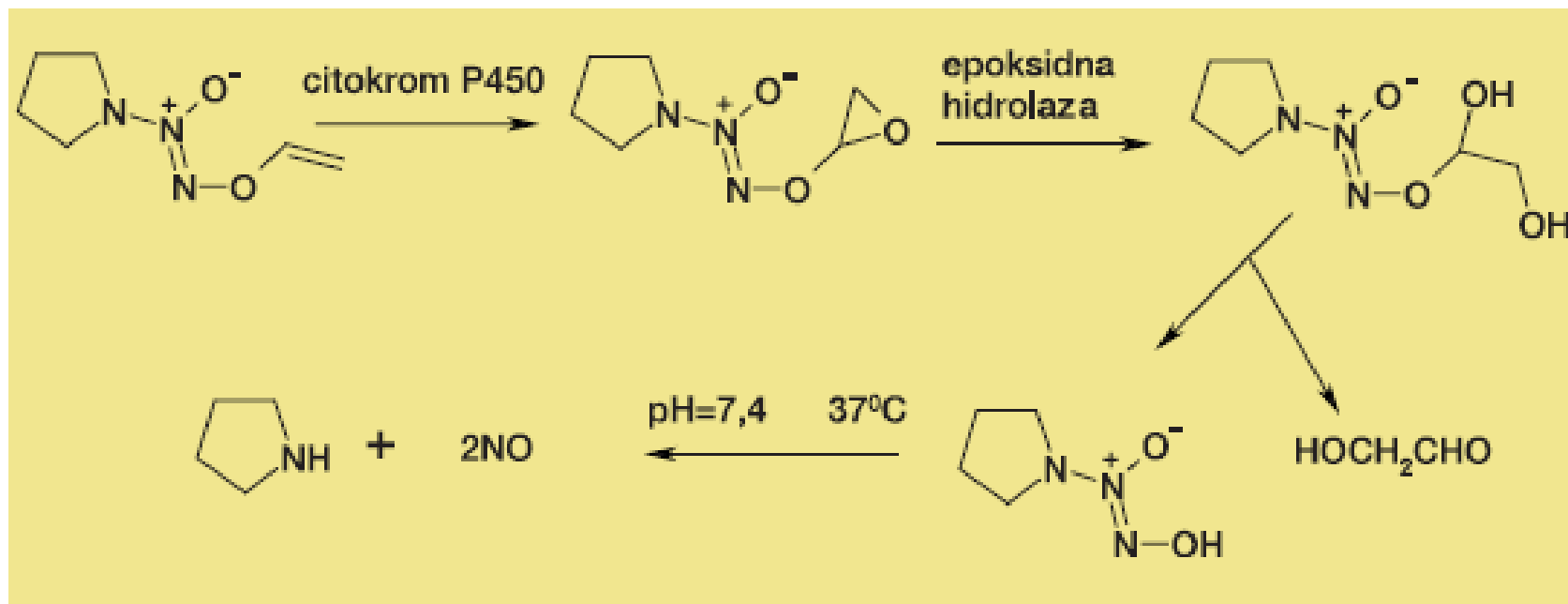
V-PYRRO/NO



JS-K

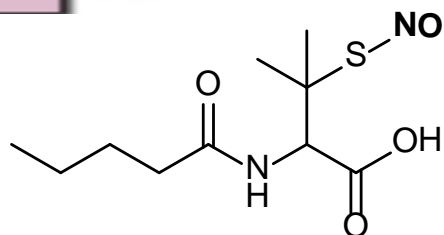
- Diolatna skupina $N(O^-)N=O$ je pripeta na nukleofil (primarni ali sekundarni amin)
- *In vivo* spontano hidrolizirajo in tvorijo 2 eqv. NO ($t_{1/2}$ = s do nekaj h)
- Preprečujejo **trombozo**, še niso v klinični uporabi

nastanek NO iz V-PYRRO/NO v jetrih

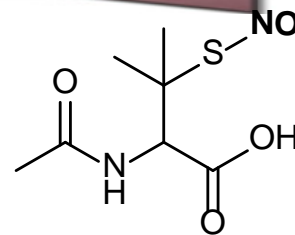


- Pri načrtovanju novih učinkovin izkoriščamo **tkivno specifičnost encimov**, ki lahko sodelujejo pri pretvorbi predzdravila (vinilni eter) v obliko, ki sprošča NO.

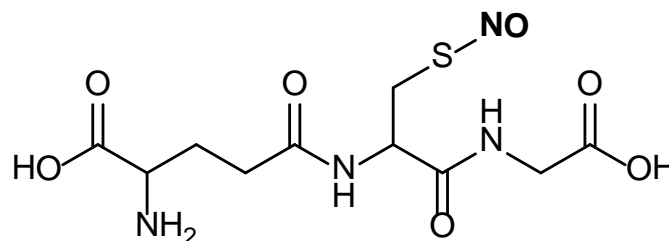
S-Nitrozotili



S-nitroso-N-valerilpenicilamin



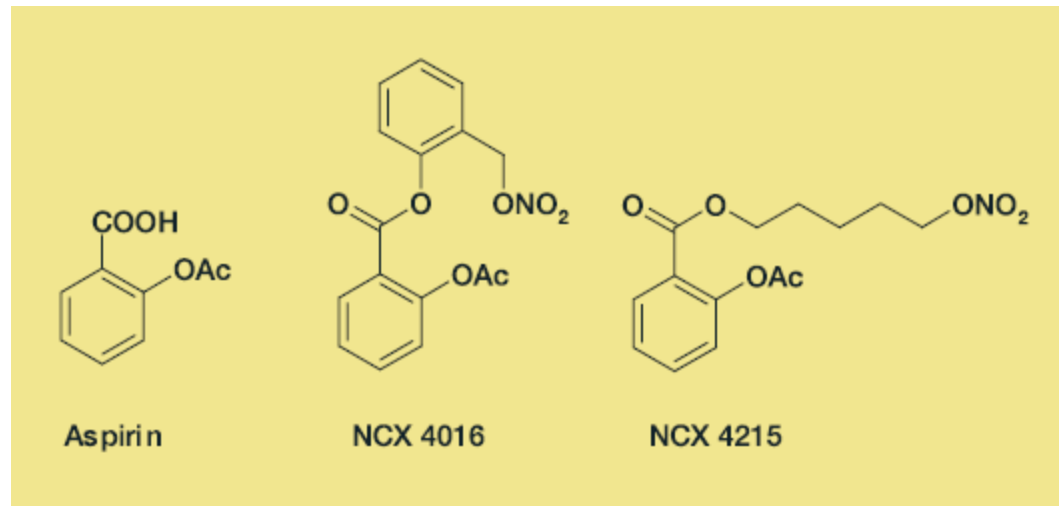
S-nitroso-N-acetilpenicilamin



S-nitroso-glutation

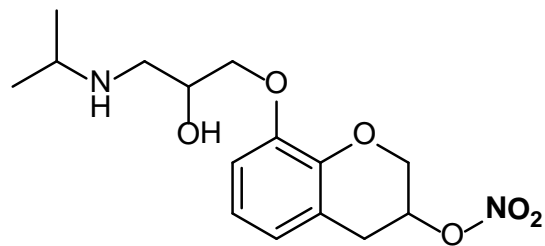
- Kompleksna kemija sproščanja NO; so tudi donorji nitrozil kationa: NO^+
- Preprečujejo trombozo
- So v kliničnih fazah testiranja

NO hibridne učinkovine

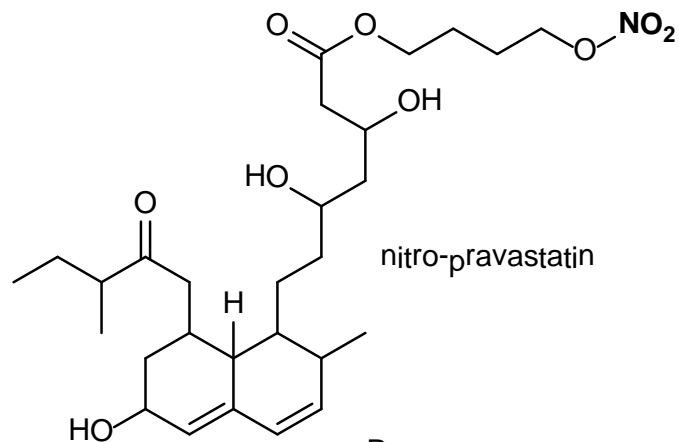


- “Nitroaspirini”
- Zmanjšani stranski učinki NSAID na želodčno sluznico
- “NO-Aspirini” bi bili tako posebej koristni v prvi fazi infarkta, ko se NO še ne sprošča iz poškodovanih celic.
- NO vpliva na vazodilatacijo koronark in izboljša funkcijo srca, tako da **zmanjša kontraktilnost**, kar pomeni varčevanje z energijo poškodovanega srca.

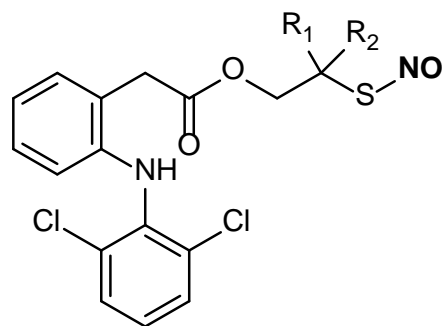
NO-hibridne učinkovine



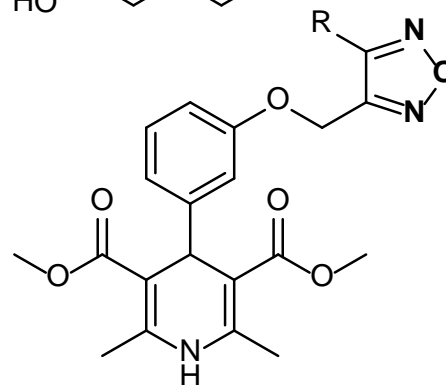
Nipradilol



nitro-pravastatin



SNO-diklofenak



furoksan pripet na 1,4-dihidropiridin

- Dodatni ugodni učinki ob sprostitvi NO