

---

Pavle Kravljanac

# Izolovanje i inhibicija monoamin oksidaze (MAO) derivatima 8-(3-arilpropoksi)kofeina

---

*Inhibitori monoamin oksidaze (MAO) produžavaju aktivnost dopamina u mozgu, što ih čini pogodnim izborom bilo kao monoterapija u ranim fazama Parkinsonove bolesti ili kao dodatna terapija kod bolesnika koji se već leče levodopom. Dosadašnja istraživanja pokazala su da se 8-alkiloksi derivati kofeina ponašaju kao veoma dobri inibitori ljudske monoamin oksidaze. U cilju pronalaženja novih inhibitora, sintetisana su dva nova jedinjenja ovog tipa: 8-(3-(4-metoksifenil)propoksi)kofein (jedinjenje 4a) i 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofein (jedinjenje 4b). Delimično je prečišćena goveđa monoamin oksidaza iz goveđe jetre i određena je njena ukupna i specifična enzimaska aktivnost i Mikaelisova konstanta za benzilamin kao supstrat. Ispitivan je mehanizam inhibicije ovog enzima i određene su konstante inhibicije za kofein, jedinjenje 4a i jedinjenje 4b i njihove vrednosti redom iznose 0.197, 0.027 i 0.092 M. Pokazalo se da je najbolji inhibitor jedinjenje 4a, sa oko 7 puta boljom inhibicijom u poređenju sa kofeinom.*

---

## Uvod

Monoamin oksidaza (MAO) je enzim koji kao kofaktor sadrži flavinadenin dinukleotid (FAD), kovalentno vezan za enzim, i katalizuje oksidativnu deaminaciju biogenih amina. Nalazi se vezan za spoljašnju membranu mitohondrija u ćelijama nervnog i perifernog tkiva (placenta, jetra, trombociti, srce i pluća). Javlja se u obliku dva izoenzima, MAO A i MAO B, koji imaju 70% homologije sekvenci i različitu selektivnost za supstrate i inhibitore. MAO A uglavnom deluje na serotonin, melatonin, norepinefrin i epinefrin. MAO B uglavnom deluje na fenetilamine i benzilamine. Oba enzima skoro podjednako deluju na dopamin, tiramin i triptamin (Anderson 1997).

Jedna od najvažnijih vrsta antidepresiva su inhibitori monoamin oksidaze (MAOI). Međutim, zbog mogućih neželjenih efekata, ireverzibilni inhibitori monoamin oksidaze su ranije bili rezervisani kao poslednja linija

---

*Pavle Kravljanac,  
Beograd, Dečanska 2,  
učenik 3. razreda Prve  
beogradske gimnazije*

*MENTORI:*

*Jelica Milošević,  
Hemijski fakultet  
Univerziteta u  
Beogradu*

*Filip Opinčal,  
Hemijski fakultet  
Univerziteta u  
Beogradu*

tretmana i korišćeni su samo kada drugi antidepressivi nisu bili uspešni (Nowakowska i Chodera 1997). Svi lekovi koji su umešani u regulaciju serotonina mogu izazvati „serotoninski sindrom” (višak serotonina koji izaziva uznemirenost, emocionalnu labilnost, nesаницe i konfuziju). Ako se MAOI uzimaju zajedno sa hranom koja sadrži visok nivo tiramina (sir, razne vrste mesa, čokolada itd.), može se izazvati hipertenzivna kriza, a u manjim dozama jaka glavobolja zbog povišenog krvnog pritiska (Volz *et al.* 1996). Kao odgovor na ove neželjene efekte razvijeni su selektivni MAO A inhibitori koji smanjuju razlaganje serotonina, norepinefrina i dopamina, istovremeno dopuštajući da tiramin bude metabolizovan od strane MAO B (Nowakowska i Chodera 1997). Prvi MAOI, razvijeni 50-ih godina 20. veka, bili su ireverzibilni, tj. kovalentno su se vezivali za enzim i trajno blokirali njegovu aktivnost. Reverzibilni inhibitori monoamin oksidaze A (RIMA) razvijeni su tek 1990-ih godina (Volz *et al.* 1996) i koriste se kao prva linija tretmana antidepressivima (Swinkels i De Jonghe 1995).

Parkinsonova bolest je degenerativni poremećaj centralnog nervnog sistema. Motorni simptomi Parkinsonove bolesti posledica su odumiranja ćelija srednjeg mozga koje stvaraju dopamin. Levodopa je lek koji se najšire upotrebljava u lečenju simptoma Parkinsonove bolesti već više od 30 godina (Parkinson's 2006). Levodopa u organizmu prelazi u dopamin pomoću DOPA dekarboksilaze. Međutim, samo 5-10% levodope prolazi kroz krvno-moždanu barijeru, a ostatak se metabolizuje na drugom mestu u organizmu izazivajući mnoge neželjene efekte (mučnina, diskinezija itd.). Početak tretmana levodopom može biti odložen korišćenjem selektivnih MAO B inhibitora i na taj način mogu se izbegnuti neželjeni efekti korišćenja Levodope u ranoj fazi bolesti. Takođe se inhibitori MAO B mogu uzimati zajedno sa levodopom i tako omogućiti zadržavanje, tj. veći nivo levodope u mozgu (Swinkels i De Jonghe 1995).

Kofein se pokazao kao slab inhibitor ljudske MAO B, ali uvođenjem različitih supstituenata na poziciji C8 u prstenu, dobijaju se jedinjenja sa značajno boljom inhibitornom aktivnošću (Petzer *et al.* 2003; Van der Walt *et al.* 2009; Pretorius *et al.* 2008). Sintetisana je serija analoga 8-aril- i alkiloksikofeina koji se ponašaju kao efikasni MAO A i MAO B inhibitori (Strydom *et al.* 2010; Strydom *et al.* 2011).

Na osnovu datih rezultata dosadašnjih istraživanja, a u cilju pronalazjenja novih inhibitora, u ovom radu predložena je sinteza dva nova derivata kofeina (slika 1): 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofein i 8-(3-(4-metoksi-fenil)propoksi)kofein.

Kako je MAO B iz mozga teško izolovati zbog heterogenosti tkiva i visokog sadržaja lipida, većina procedura koristi bubreg ili jetru pacova, svinje ili goveda kao polazni material (Erwin i Hellerman 1967; Hollunger i Orelanđ 1970; Youdim i Sourkes 1966; Kearney *et al.* 1971). Prema istraživanju Salach-a (1979) utvrđeno je da se monoamin oksidaza mitohondrija goveđe jetre nalazi isključivo kao B-izoforna. U ovom radu sintetisana su ova dva jedinjenja, izolovana je goveđa MAO B iz goveđe jetre i određena je konstanta disocijacije enzim-inhibitor kompleksa (konstanta inhibicije,  $K_i$ ) za goveđu MAO B.

## Materijali i metode

Monoamin oksidaza je izolovana iz sveže dobijene teleće jetre po modifikovanim procedurama iz literature (Schneider i Hogeboom 1950; McCauley i Racker 1973; Pearce i Roth 1984). Ukupna koncentracija proteina određivana je Bredford-ovim esejem (Vujčić 2002). Enzimska aktivnost praćena je spektrofotometrijski. MAO B inhibitori sintetisani su prema reakcionoj šemi (slika 1) iz 8-bromkofeina koji je dobijen bromovanjem kofeina i 3-aril-1-propanola (3), dobijenog redukcijom odgovarajuće supstituisane cimetine kiseline (2) litijum aluminijum hidridom. Supstituisana cimetna kiselina (2) dobijena je iz odgovarajućeg aldehida (1) Debnerovom modifikacijom Knevenagelove kondenzacije. Određene su konstante inhibicije za kofein, jedinjenje 4a i 4b i ispitan je mehanizam inhibicije jedinjenja 4a.

Enzimska aktivnost određena je spektrofotometrijski sa benzilaminom kao supstratom. U kvarcnoj kivetu od 1 mL pomešano je 100  $\mu$ L fosfatnog pufera (1.0 M, pH 7.27; fin. konc. 100 mM), 100  $\mu$ L rastvora benzilamina (50 mM; fin. konc. 5 mM), 100  $\mu$ L uzorka i 700  $\mu$ L vode. Promena apsorbance benzaldehida (250 nm) praćena je 30 min na 25°C. Mikaelisova konstanta  $K_m$ , odnosno mera afiniteta enzima prema supstratu, određena je iz Mikaelis-Mentenine jednačine ( $v = v_{\max} [S] / (K_m + [S])$ ). Vrednosti inhibitorskih konstanti ( $K_i$ ) dobijene su iz eksperimentalno određenih IC<sub>50</sub> vrednosti pomoću Čeng-Prusof jednačine ( $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [S] / K_m)$ ); Yung-Chi i Prusoff 1973). Mehanizam inhibicije određivan je primenom Direct linear plot tehnike (Eisenthal i Cornish-Bowden 1974).

Sve supstance korišćene u sintezama su p. a. čistoće. Za potrebe enzimskog esejja korišćen je Thermo Scientific Evolution 60S UV-Vis spektrofotometar. Infracrveni spektri su snimljeni Thermo Scientific Nicolet iS10 spektrometrom Diamond ATR tehnikom sa 32 snimanja u opsegu 500–4000  $\text{cm}^{-1}$ , rezolucije 4  $\text{cm}^{-1}$ .

**Sinteza 8-bromkofeina.** 8-bromkofein sintetisan je po modifikovanoj proceduri (Soltani Rad *et al.* 2012). U  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 mL) dodat je kofein (10.0 g, 0.05 mol) i N-bromsukcinimid (NBS; 25.0 g, 0.14 mol). Kada su se supstance rastvorile, dodata je voda (100 mL) i takva smeša je ostavljena da se meša na sobnoj temperaturi jedan i po dan. Reakcija je praćena tankoslojnom hromatografijom, a kao eluent korišćen je toluen/acetone 7:3. Nakon što je ustanovljeno da je početno jedinjenje u potpunosti reagovalo, reakciona smeša je prebaćena u levak za odvajanje. Odbačen je vodeni sloj, a brom iz organskog sloja je ekstrahovan više puta 2 M rastvorom NaOH do obezbojavanja smeše. Organska faza je odvojena, isprana zasićenim rastvorom NaCl (100 mL), osušena iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirana i uparena do suva. Dobijeno je 5.62 g (40%) 8-bromkofeina u obliku svetloroze praha. Tačka topljenja 209°C. IR 2980, 1700, 1652, 1340, 1034, 745  $\text{cm}^{-1}$ .

**Sinteza para-supstituisane cimetine kiseline.** Supstituisana cimetna kiselina sintetisana (2) je iz odgovarajućeg aldehida (1) (slika 1) po sledećoj proceduri (Ferjančić i Bihelović 2012). U balon opremljen magnetnom mešalicom i povratnim kondenzatorom odmereni su aldehyd (1) (0.10 mol),

malonska kiselina (17.3 g, 0.16 mol), piperidin (1.3 mL) i piridin (32 mL). Reakciona smeša je mešana i refluktovana na uljanom kupatilu tokom 2h, a zatim ohlađena do sobne temperature i izlivena u smešu koncentrovane hlorovodonične kiseline (100 g) i leda (100 g). Izdvojeni kristali su procedeni, isprani hladnom vodom i sušeni na vazduhu. Sirova kiselina je prekrystalisana iz vodenog etanola (v/v = 1 : 1).

4-metoksicimetna kiselina (2a). Prinos: 78%. T.t: 171°C. IR 2980, 1671, 1315, 1172, 1027  $\text{cm}^{-1}$ . EI-MS 178 ( $\text{M}^+$ ), 161, 147, 133, 132, 77 m/z.

4-metilcimetna kiselina (2b). Prinos: 82%. T.t: 250°C. IR 2980, 1671, 1311, 1177, 808  $\text{cm}^{-1}$ . EI-MS 162 ( $\text{M}^+$ ), 147, 117, 115, 91 m/z.

**Sinteza para-supstituisanih 3-fenilpropil alkohola.** Alkoholi (3) su sintetisani po modifikovanoj proceduri iz literature (Duarte *et al.* 2004). Korišćen je sveže destilovani THF, osušen iznad natrijuma. U suspenziju  $\text{LiAlH}_4$  (0.228 g, 6 mmol) u THF-u (20 mL), na ledenom kupatilu, pod inertnom atmosferom, ukapavan je rastvor odgovarajuće kiseline (2 mmol) u THF-u (20 mL). Dobijena smeša je mešana dok nije dostigla sobnu temperaturu, a zatim je refluktovana 4h. Nakon završetka reakcije i hlađenja do sobne temperature, u reakcionu smešu je dodato redom 300  $\mu\text{L}$  vode, 300  $\mu\text{L}$  20% NaOH i 900  $\mu\text{L}$  vode. Smeša je filtrirana, osušena iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i uparena do suva. Dobijeni sirovi proizvod je prečišćen korišćenjem gravitacione hromatografije sa silika-gelom kao stacionarnom fazom koristeći petroletar: etil-acetat 7 : 3 kao eluent.

3-(4-metoksifenil)propan-1-ol (3a). Dobijeno je 134.3 mg u vidu žute tečnosti. Prinos: 40%. EI-MS 166 ( $\text{M}^+$ ), 147, 121, 91, 77 m/z.

3-(4-metilfenil)propan-1-ol (3b). Dobijeno je 41,6 mg u vidu žute tečnosti. Prinos: 14 %. EI-MS 150 ( $\text{M}^+$ ), 132, 117, 115, 105, 91 m/z.

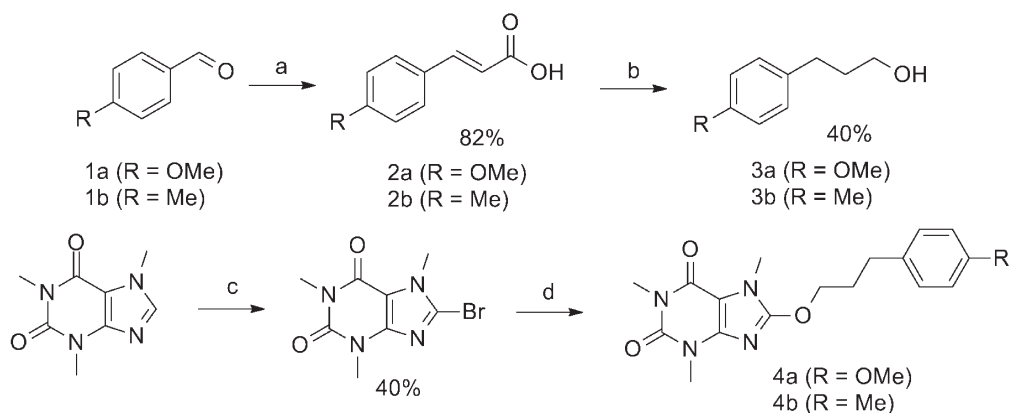
Za karakterizaciju sintetisanih jedinjenja korišćen je Agilent Technologies 7890A gasni hromatograf sa 240 Ion Trap masenim spektrometrom (EI jonizacija, sa energijom elektrona od 70 eV, u opsegu 40-1000 m/z). Korišćena je VF5MS kolona (30 m  $\times$  250  $\mu\text{m}$   $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ) i helijum kao noseći gas pri protoku od 1 mL/min. Početna temperatura iznosila je 40°C, a zatim je povećana na 310°C brzinom od 7°C/min i na toj temperaturi je zadržana 10 min.

Korišćen je Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC sistem sa binarnom pumpom i DAD (na talasnim dužinama 254, 220, 280 i 272 nm, kao i snimanje spektra u opsegu 190-400 nm, sa korakom od 2 nm). Razdvajanje je vršeno na Zorbax Eclipse XDB-C18 koloni (4.6  $\times$  50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) na temperaturi od 25°C, pri protoku od 0.4 mL/min. Kao mobilna faza korišćeni su voda (A) i acetonitril (B) uz gradijentno eluiranje: 0 min, 10% B; 2 min, 50% B; 7 min, 100% B; 9 min, 100% B; 11 min, 10% B.

## Izolovanje enzima i sinteza inhibitora

### Sinteza 8-(3-arilpropoksi)kofeina

Predloženi derivati kofeina – 8-(3-(4-metoksifenil)propoksi)kofein (4a) i 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofein (4b) sintetisani su prema reakci-



Slika 1. Reakciona šema za sintezu derivata kofeina. Uslovi: a) malonska kis. (1.6 ekv.), piridin, piperidin, refluks, 2h; b)  $\text{LiAlH}_4$  (3 ekv.), THF, refluks, 4 h; c) NBS (3 ekv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 1.5 d; d) Na, (3), toluen, refluks, 24 h.

Figure 1. Reaction scheme for synthesis of caffeine derivatives. Conditions: a) malonic acid (1.6 eq), pyridine, piperidine, reflux, 2 h; b)  $\text{LiAlH}_4$  (3 eq), THF, reflux, 4 h; c) NBS (3 eq),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 1.5 d; d) Na, (3), toluene, reflux, 24 h.

onoj šemi datoj na slici 1. U hladnu suspenziju ( $0^\circ\text{C}$ ) natrijuma (4 ekv) u toluenu dodat je uz mešanje sav alkohol (3) (1 ekv) dobijen iz prethodne reakcije). Mešanje je nastavljeno dok sav natrijum nije reagovao. Dobijeni rastvor je zatim ukapavan u rastvor 8-bromkofeina (2.67 ekv) u toluenu. Reakciona smeša je refluksirana 24 h, a zatim filtrirana i, nakon uparavanja rastvarača, svetlo žuti ostatak je rastvoren u  $\text{CHCl}_3$ , ispran zasićenim rastvorom  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i uparen do suva. Tankoslojnom hromatografijom utvrđeno je nastajanje proizvoda koji je prečišćen pomoću HPLC-a i dobijeno je dovoljno supstance da bi se izvršila dalja ispitivanja.

## Izolovanje MAO B

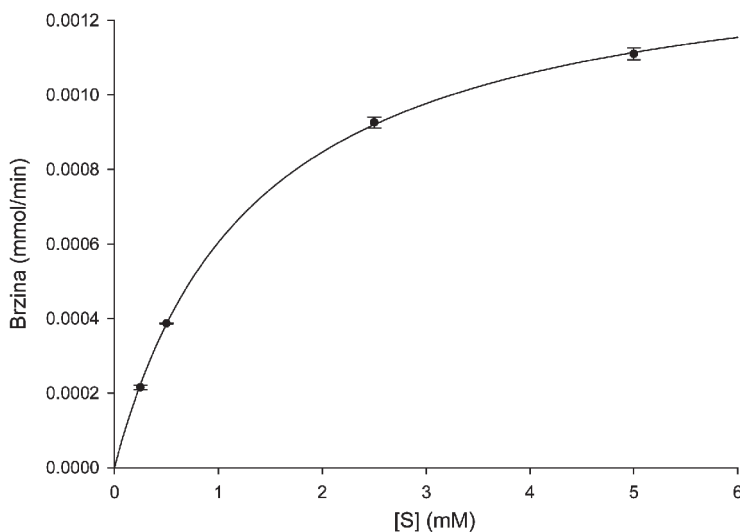
Svi postupci izvođeni su na temperaturi  $0-4^\circ\text{C}$ , ukoliko drugačije nije naglašeno. Oko 400 g jetre je usitnjeno i ispirano izotoničnim 0.25 M rastvorom saharoze, a zatim homogenizovano u blenderu i suspendovano u oko  $0.5 \text{ dm}^3$  0.25 M rastvora saharoze. Homogenat je centrifugiran (700 g, 10 min) da bi se istaložila jedra i nelizirane ćelije. Talog je resuspendovan u 0.25 M rastvoru saharoze i ponovo centrifugiran na istoj brzini. Supernatanti su spojeni i centrifugirani dva puta na 4000 g i jednom na 5000 g po 10 minuta kako bi se istaložile mitohondrije. Spojeni talozi su isprani resuspendovanjem u 0.25 M rastvoru saharoze i centrifugiranjem 10 min na 24000 g. Talog je resuspendovan u istom rastvoru i zaostale nečistoće su staložene centrifugiranjem na 850 g 10 min, a zatim je supernatant centrifugiran 10 min na 24000 g da bi se istaložile mitohondrije.

Staložene mitohondrije su resuspendovane u 35 mL 50 mM fosfatnog pufera (pH 7.4). Esejem je potvrđena aktivnost enzima u resuspendovanom talogu. U dobijenu smešu dodat je 10% (w/v) rastvor Triton X-100 do koncentracije 0.5% (w/v) i smeša je ostavljena da se meša oko 30 min na 4°C, nakon čega je centrifugirana (40000 g, 10 min). Talog je resuspendovan u istom puferu i u njega je dodat 10% (w/v) rastvor Triton X-100 do koncentracije 1.5% (w/v). Smeša je ostavljena da se meša 45 min na 4°C, nakon čega je centrifugirana 10 min na 40000 g. Supernatanti su spojeni i njihova zapremina iznosila je 49 mL (20 mL posle prvog i 29 mL posle drugog centrifugiranja)

U dobijeni ekstrakt je, uz mešanje u toku 45 min, dodato 14.26 g fino spraćenog amonijum-sulfata. Nakon što je smeša centrifugirana (10000 g, 20 min), izdvojila su se tri sloja: plutajući žuti sloj, supernatant i talog. Samo je u talogu zadržana enzimska aktivnost i on je resuspendovan u 10 mM fosfatnom puferu (pH 8.0).

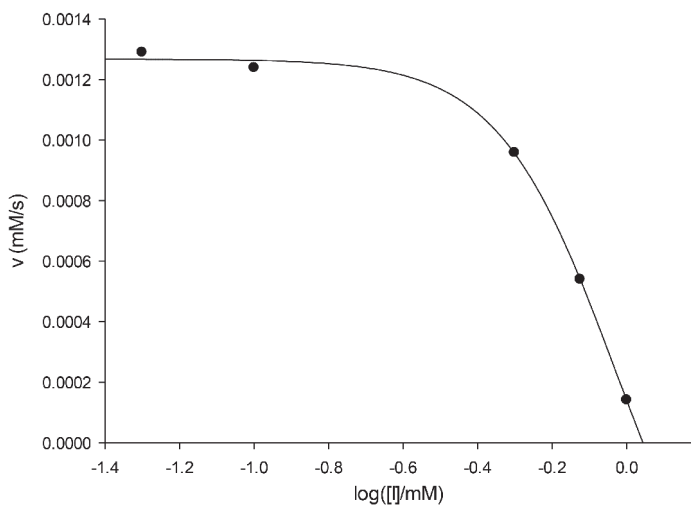
Tako dobijeni rastvor nanet je na Sephadex G25 kolonu (prethodno ekvilibrisanu 10 mM fosfatnim puferom pH 8.0). Sakupljene su tri frakcije koje su se razlikovale po intenzitetu boje, od kojih su samo dve pokazivale enzimsku aktivnost i one su sjedinjene. Njihova zapremina iznosila je 38 mL. One su čuvane u 0.25% Triton X-100 i 10% glicerolu u frižideru preko noći, a kasnije i zamrznute na nekoliko meseci.

Bradford-ovim esejem određena ukupna koncentracija proteina iznosila je 5.6 mg/mL. Enzimska aktivnost izražena u enzimskim jedinicama ( $[U] = [\mu\text{mol}/\text{min}]$ ) iznosila je 1.45 U, a specifična aktivnost iznosila je 2.59 U/mg.



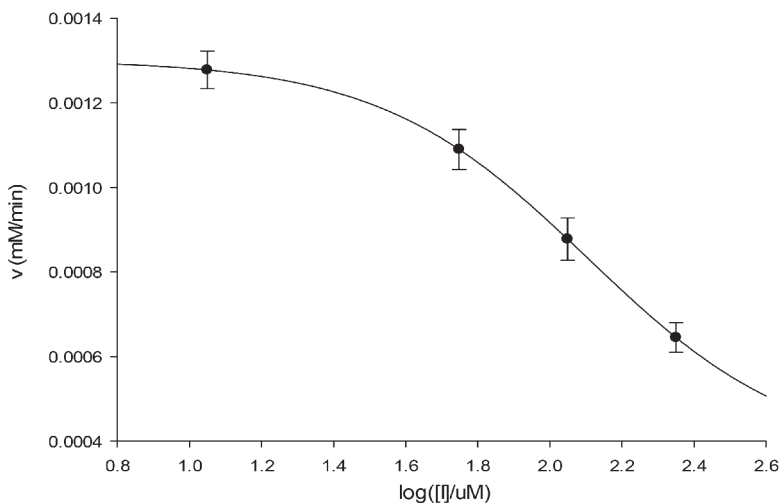
Slika 2. Mikaelis-Menten kriva zasićenja. Merenja su izvršena u triplikatima.

Figure 2. Michaelis-Menten curve of saturation. Measurements were done in triplicates.



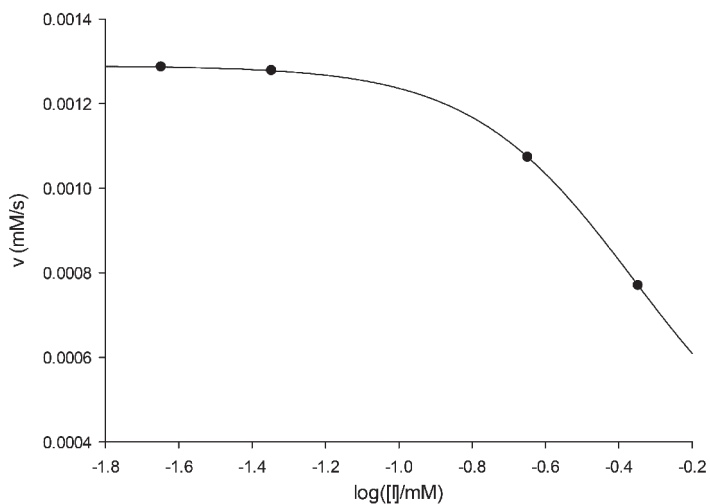
Slika 3.  
Kriva dozno-zavisnog odgovora za kofein. Koncentracija supstrata bila je 5 mM.

Figure 3.  
Dose-response curve for caffeine. The concentration of substrate used was 5 mM.



Slika 4.  
Kriva dozno-zavisnog odgovora za jedinjenje 4a. Koncentracija supstrata bila je 5 mM. Merenja su rađena u duplikatu.

Figure 4.  
Dose-response curve for compound 4a. The concentration of substrate used was 5 mM. Measurements were done in duplicates.



Slika 5.  
Kriva dozno-zavisnog odgovora za jedinjenje 4b. Koncentracija supstrata bila je 5 mM.

Figure 5.  
Dose-response curve for compound 4b. The concentration of substrate used was 5 mM.

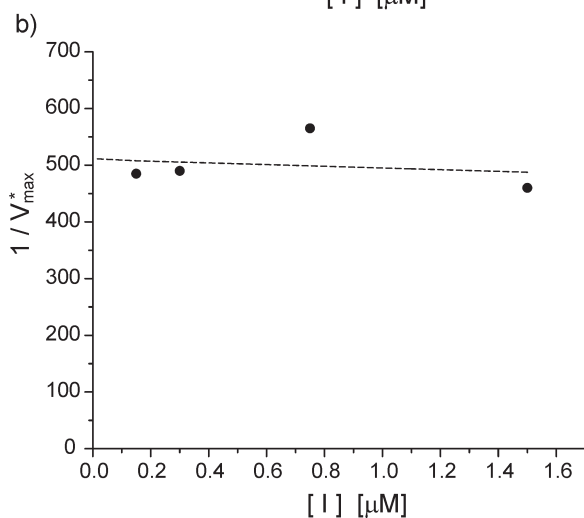
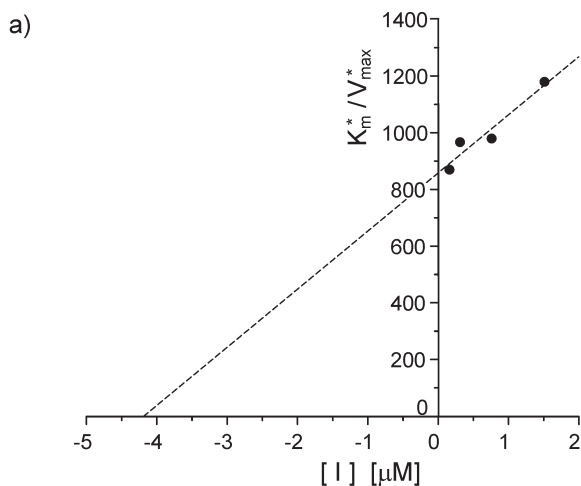
## Ispitivanje inhibicije

Kriva zasićenja (slika 2) prikazuje zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije supstrata. Iz Mikaelis-Menten jednačine dobijeni su parametri  $K_m = (1.33 \pm 0.06)$  mM i  $v_{max} = (1.41 \pm 0.02)$   $\mu$ M/s.

Sigmoidalna kriva dozno-zavisnog odgovora konstruisana je iz zavisnosti brzine oksidacije benzilamina (5 mM) od logaritma koncentracije ispitivanog inhibitora (slike 3-5).

Tabela 1. Vrednosti  $\log IC_{50}$  i  $K_i$  za svaki ispitivani inhibitor

Jedinjenje	$\log IC_{50}$	$K_i$ (mM)
Kofein	$-0.03 \pm 0.13$	$0.20 \pm 0.06$
4a	$2.1 \pm 0.3$	$0.027 \pm 0.016$
4b	$-0.36 \pm 0.00$	$0.092 \pm 0.003$



Slika 6.

a) Zavisnost odnosa prividnih vrednosti  $K_m/v_{max}$  od koncentracije inhibitora;

b) Zavisnost recipročne prividne vrednosti  $v_{max}$  od koncentracije inhibitora.

Figure 6.

a) Relationship between apparent  $K_m/v_{max}$  ratio and inhibitor concentration;

b) Relationship between reciprocal apparent  $v_{max}$  and inhibitor concentration.



Vrednosti parametara  $\log IC_{50}$ , dobijenih iz krivih sa grafika (slike 3-5), kao i vrednosti konstanti inhibicije ( $K_i$ ), izračunatih korišćenjem Čeng-Prusof jednačine, prikazane su u tabeli za svaki ispitivani inhibitor (tabela 1). Iz tabele 1 se vidi da je najbolji inhibitor 4a. Na slici 6 su prikazani rezultati ispitivanja mehanizma inhibicije za 4a. Na koordinatnim osama  $K_m^*$  i  $v_{max}^*$  predstavljaju prividnu Mikaelisovu konstantu i prividnu maksimalnu brzinu reakcije, tj.  $K_m$  i  $v_{max}$  za različite koncentracije prisutnog inhibitora. Veličina  $1/v_{max}^*$  ostaje relativno nepromenjena sa promenom koncentracije inhibitora (slika 6b), a odnos  $K_m^*/v_{max}^*$  se linearno povećava sa povećanjem koncentracije inhibitora (slika 6a). Drugim rečima, sa povećanjem koncentracije inhibitora  $K_m^*$  i  $v_{max}^*$  rastu sa istom proporcijom, što znači da ovom inhibitoru najbolje odgovara kompetitivni mod inhibicije (Eisenthal i Cornish-Bowden 1974).

Pokazalo se da je najbolji inhibitor jedinjenje 4a, odnosno 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofein, sa oko 7 puta boljom inhibicijom od kofeina. Poredeći  $K_i$  vrednosti kofeina i 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofeina i 8-(3-(4-metoksifenil)propoksi)kofeina, može se videti da se inhibicija značajno poboljšava uvođenjem supstituenata na C8 atomu u prstenu kofeina.

Interesanto je da se uvođenjem metoksi umesto metil grupe na benzenovom prstenu vezivanje inhibitora za enzim pojačava, što nije slučaj i sa analognim 8-ariloksikofeinima, gde metil derivat ima bolju inhibiciju od metoksi derivata za ljudsku i majmunsku monoamin oksidazu. Zanimljivo je primetiti i to da je kofein mnogo bolji inhibitor goveđe MAO B ( $K_i = 0.197$  mM) u poređenju sa ljudskom ( $K_i = 3.6$  mM, Petzer *et al.* 2003).

## Zaključak

Sintetisana su dva nova jedinjenja: 8-(3-(4-metoksifenil)propoksi)kofein (4a) i 8-(3-(4-metilfenil)propoksi)kofein (4b). Brzo i efikasno je delimično prečišćena goveđa monoamin oksidaza B i određena je njena ukupna i specifična enzimaska aktivnost i Mikaelisova konstanta za benzilamin kao supstrat. Ispitivan je mehanizam inhibicije ovog enzima i određene su konstante inhibicije za kofein, 4a i 4b. Pokazalo se da je najbolji inhibitor jedinjenje 4a, sa oko 7 puta boljom inhibicijom u poređenju sa kofeinom i kompetitivnim mehanizmom inhibicije.

## Literatura

- Anderson J. 1997. Color Atlas of Muscle Pathology. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 63(4): 557.
- Duarte C., Verli H., Araújo-Júnior J., Medeiros I., Barreiro E., Fraga C. 2004. New optimized piperamide analogues with potent *in vivo* hypotensive properties. *European journal of pharmaceutical sciences*, 23 (4-5): 363.

- Eisenthal R., Cornish-Bowden A. 1974. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochemical journal*, **139** (3): 715.
- Erwin V., Hellerman L. 1967. Mitochondrial Monoamine Oxidase: I. Purification and characterization of the bovine kidney enzyme. *Journal of biological chemistry*, **242**: 4230.
- Ferjančić Z., Bihelović F. 2012. *Preparativna organska hemija*. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet.
- Hollunger G., Orelan L. 1970. Preparation of soluble monoamine oxidase from pig liver mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*, **139** (2): 320.
- Kearney E., Salach J., Walker W., Seng R., Kenney W., Zeszotek E., Singer T. 1971. The Covalently-Bound Flavin of Hepatic Monoamine Oxidase. 1. Isolation and Sequence of a Flavin Peptide and Evidence for Binding at the 8 $\alpha$  Position. *European journal of biochemistry*, **24** (2): 321.
- McCaughey R., Racker E. 1973. Separation of two monoamine oxidases from bovine brain. *Molecular and cellular biochemistry*, **1** (1): 73.
- Nagatsu T., Sawada M. 2006. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells. *Journal of neural transmission supplementa*, **71** (71): 53.
- Nowakowska E., Chodera A. 1997. Inhibitory monoamine oxidases of the new generation. *Polski merkurusz lekarski*, **3** (13): 1.
- Parkinson's 2006. The National Collaborating Centre for Chronic Conditions, ur. "Symptomatic pharmacological therapy in Parkinson's disease", Parkinson's Disease, London: Royal College of Physicians
- Pearce L., Roth J. 1984. Monoamine oxidase: separation of the type A and B activities. *Biochemical pharmacology*, **33** (11): 1809.
- Petzer J., Steyn S., Castagnoli K., Chen J., Schwarzschild M., Van der Schyf C., Castagnoli N. (2003). Inhibition of monoamine oxidase B by selective adenosine A2A receptor antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **11** (7): 1299.
- Pretorius J., Malan S., Castagnoli N., Bergh J., Petzer J. 2008. Dual inhibition of monoamine oxidase B and antagonism of the adenosine A2A receptor by (E,E)-8-(4-phenylbutadien-1-yl)caffeine analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **16** (18): 8676.
- Salach J. 1979. Monoamine oxidase from beef liver mitochondria: Simplified isolation procedure, properties, and determination of its cysteinyl flavin content. *Archives of biochemistry and biophysics*, **192** (1): 128.
- Sathyanarayana R., Yeregani V. 2009. Hypertensive crises and cheese. *Indian journal of psychiatry*, **51** (1): 65.

- Schneider W., Hogeboom G. 1950. Intracellular distribution of enzymes: V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. *Journal of biological chemistry*, **183**: 123.
- Soltani Rad M., Behrouz S., Nekoei A. 2012. 8-Bromocaffeine (8-BC): A New Versatile Reagent for Conversion of Aldoximes into Nitriles. *Synlett*, **23** (08): 1191.
- Strydom B., Bergh J., Petzer J. 2011. 8-Aryl- and alkyloxycaffeine analogues as inhibitors of monoamine oxidase. *European journal of medicinal chemistry*, **46** (8): 3474.
- Strydom B., Malan S., Castagnoli N., Bergh J., Petzer J. 2010. Inhibition of monoamine oxidase by 8-benzyloxycaffeine analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **18** (3): 1018.
- Swinkels J., De Jonghe F. 1995. Safety of antidepressants. *International clinical psychopharmacology*, **9**: 19.
- Van der Walt E., Milczek E., Malan S., Edmondson D., Castagnoli N., Bergh J., Petzer J. 2009. Inhibition of monoamine oxidase by (E)-styrylisatin analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **19** (9): 2509.
- Volz H., Gleiter C., Möller H. 1996. Monoamine oxidase inhibitors in psychiatry. Status of current knowledge. *Nervenarzt*, **67** (5): 339.
- Vujčić Z. 2002. *Ekperimentalna biohemija – praktikum*. Beograd: Rantec
- Youdim M., Sourkes T. 1966. Properties of purified, soluble monoamine oxidase. *Canad. journal of biochemistry*, **44**: 1397.
- Yung-Chi C., Prusoff W. 1973. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochemical pharmacology*, **22** (23): 3099.

---

*Pavle Kravljanac*

## Isolation and inhibition of Monoamine Oxidase (MAO) by Derivatives of 8-(3-Arylpropoxy)Caffeine

Inhibitors of monoamine oxidase (MAO) prolong the activity of dopamine in the brain, making them an option either as monotherapy in early Parkinson's disease or as adjunctive therapy in patients already treated with levodopa. Previous studies have shown that 8-alkyloxy derivatives of caffeine act as good inhibitors of human monoamine oxidase. In an attempt to discover new inhibitors, two new compounds were synthesized: 8-(3-(4-methoxyphenyl)propoxy)caffeine and 8-(3-(4-methylphenyl)propoxy)caffeine. Bovine monoamine oxidase was partially purified from bovine liver and its specific activity and Michaelis constant for benzylamine as a substrate were determined. Mechanism of inhibition of this enzyme were studied and enzyme-inhibitor dissociation constants ( $K_i$ ) were measured for caffeine, and were found to be 0.197 M, 0.027 M and 0.092 M respectively. It was shown that the best inhibitor was the first compound, with about 7 fold better inhibition in comparison with caffeine and a competitive inhibition mechanism.

