

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидата Младена Рајаковића, мастер биохемичара, пријављене под насловом

„Испитивање специјализованих метаболита гљиве *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. и *in vitro* процена њихове антинеуродегенеративне активности“.

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Органска хемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања у оквиру ове докторске дисертације је одређивање потенцијала специјализованих метаболита медицинске гљиве *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. у третману деменције узроковане Алцхајмеровом болести. У ту сврху, различите класе метаболита ће бити изоловане и детаљно окарактерисане, са циљем даље оптимизације новоразвијених NMR експеримента за праћење интеракција са циљаним протеинима, као што су ацетилхолинестераза (AChE), бутирилхолинестераза (BChE) и албумин. У ту сврху развијаће се два NMR експеримента. Први, који ће омогућити добијање мапе епитопа везивања испитиваног метаболита са протеинима и добијање података о функционалним групама у молекулу које су најзаслужније за остваривање интеракције. Други експеримент ће се користити као унапређена метода за праћење инхибиторног потенцијала тестираних метаболита са холинестеразама (AChE и BChE), с циљем развијања робусније методе у односу на спектрофотометријску Ellman-ову методу која се данас највише примењује. Одабиру кандидата ће претходити *in vitro* одређивање активности како би се одредио њихов потенцијал као реверзибилних инхибитора, једињења која се користе за ублажавање симптома Алцхајмерове болести. Истраживање ће бити усмерено на процену способности добијених једињења да инхибирају кључне енземе повезане са патогenezом Алцхајмерове болести – AChE и BChE. Поред тога, биће испитана и неуропротективна активност изолованих метаболита на културама астроцита изложених оштећујућим стимулусима.

3. Основне хипотезе

Алцхајмерова болест (АБ) је водећи узрок деменције која доводи до смањеног квалитета живота оболелих, а истовремено дубоко утиче на животе чланова који пружају подршку овим пацијентима. Више од 35 милиона људи широм света је погођено, а пројекције сугеришу да би се њена преваленција могла учетворостручити до 2050. године. [1] Показано је да АБ почиње много година пре него што се појаве први симптоми, који често остају непримећени пошто се

неуропатолошки процеси одвијају споро и неприметно током времена, те се савремена неуронаука и медицинска дијагноза суочавају се са значајним изазовима. [2] Повећање нивоа фактора раста нерава (енгл. Nerve Growth Factor, NGF), који је кључан за преживљавање и функцију неурона, утиче на њихову заштиту од оштећења која настају услед АБ. Штавише, инхибиција (AChE) има кључну улогу, пошто доводи до повећања доступности ацетилхолина и повећања ослобађања и апсорпције NGF. На овај начин, инхибитори AChE стимулишу AChE - зависне сигналне путеве који побољшавају производњу и транспорт NGF до холинергичких неурона. [3] Овај пут је виталан за одржавање правилне функције неурона, посебно у контексту неуродегенерације повезане са АБ. Галантамин, инхибитор AChE, који је одобрила Америчка агенција за храну и лекове 2001. године, и даље представља најновији лек за ублажавање симптома код пацијената са благим до умереним обликом АБ, те је јасна потреба за откривањем нових терапеутика за третман АБ. [4]

Специјализовани метаболити медицинских гљива и биљака су основа за откривање лекова за третман различитих обољења. *Hericium erinaceus* (HE), у народу позната као Лавља грива је медицинска гљива која се користи у људској исхрани. [5,6] Резултати досадашњих испитивања указали су на њен потенцијал као додатне терапије за ублажавање симптома деменције код АБ, а њени специјализовани метаболити привлаче много пажње услед специфичности и разноликости хемијских структура описаних у литератури. [7] Претходне студије су показале да одређени специјализовани метаболити HE, као што су хериценони и еринацини, инхибирају AChE док повећавају производњу фактора раста нерава, што је у складу са тренутним терапијским стратегијама у третману АБ. [7, 8] Тренутно су у литератури доступне студије молекулског моделовања засноване на испитивању различитих метаболита HE, које обухватају и предлог потенцијалног механизма деловања испитиваних метаболита у третману Алцхајмеровој болести путем инхибиције AChE. [9] Једна од метода за добијање додатних експерименталних података је NMR спектроскопија, која омогућава директно мерење интензитета интеракција између појединачних делова молекула и циљног протеина, чиме се олакшава разумевање механизма деловања и инхибиције/интеракције. [10]

Примарни подстицај за дизајнирање новог NMR приступа је значајна предност NMR спектроскопије, која пружа увид у интеракције између лиганда и рецептора, а кључне су за разумевање биолошких процеса. NMR је једна од најмоћнијих техника за проучавање лиганд-протеин интеракција, јер пружа могућност одређивања и квантификације међумолекуларних интеракција. Поред тога, NMR је такође погодан за детекцију и идентификацију различитих супстанци на атомском нивоу, што га чини веома повољном техником за испитивање кинетике ензимских реакција. На основу овога, биће развијен и оптимизован ^1H *in situ* кинетички NMR експеримент за праћење инхибиције AChE и BChE. Највећа предност примене ове NMR

методологије лежи у могућности праћења интеракције на молекулском нивоу и добијање увида у све кораке који се одвијају. Спектрофотометријска Ellman метода је најчешће коришћена метода за одређивање инхибиције холинестераза, али репродуктивност добијених резултата није увек лако постићи. Из тог разлога, кит за скрининг инхибитора ацетилхолинестеразе (AIS кит), заснован на побољшаној Ellman методи, биће коришћен за *in vitro* скрининг и поређење/контролу са новоразвијеним NMR експериментом. Важно је напоменути да НЕ метаболити до сада нису била предмет ниједне NMR студије за праћење интеракција са поменутим протеинима и да не постоје подаци о мапама епитопа у литератури. Резултати добијени применом NMR спектроскопије пружиће сазнања о томе који делови молекула (функционалне групе) се везују за макромолекул (ензим), природу интеракција везивања лиганда на површини рецептора (мапирање епитопа) и који је афинитет лиганда према рецептору (тј. константа дисоцијације). С обзиром на то да постоје *in vitro* експериментални докази да неколико различитих НЕ метаболита интерагује са AChE, добијање мапа епитопа биће коришћено за откривање функционалних група у молекулу одговорних за препознавање за испитиваним ензимом. Овакав приступи ће обезбедити кључне информације за унапређење квалитета нутрацеутика и суплемената заснованих на медицинским гљивама.

Поред тога, у оквиру истраживања биће испитана и неуропротективна активност изолованих метаболита на примарним културама астроцита изложеним оксидативном стресу у *in vitro* моделу неуродегенерације. На тај начин, биће омогућено интегрално сагледавање потенцијалних ефеката НЕ метаболита – кроз ензимску инхибицију (AChE и BChE) и ћелијску заштиту – што у целини доприноси потрази за новим природним супстанцама са терапијским потенцијалом у третману Алцхајмерове болести. Основне хипотезе ове докторске дисертације су:

1. *H. erinaceus* садржи специјализоване метаболите (као што су хериценони и еринацини) са потенцијалном способношћу инхибиције ензима AChE и BChE, што је у складу са постојећим стратегијама у терапији Алцхајмерове болести.
2. Метаболити *H. erinaceus* могу показати специфичне интеракције са ензимима AChE и BChE, које је могуће идентификовати и квантификовати применом ^1H *in situ* NMR спектроскопије, као алтернативе класичној Ellman методи.
3. Новоразвијени NMR експеримент за праћење интеракција ће омогућити мапирање епитопа и идентификацију функционалних група одговорних за интеракцију са AChE и BChE, чиме ће се разјаснити механизми интеракције на молекулском нивоу.
4. Испитивање неуропротективног дејства биоактивних метаболита *H. erinaceus* у културама астроцита изложених оксидативном стресу, указаће на њихов потенцијал за превенцију или ублажавање неуродегенеративних процеса повезаних са Алцхајмеровом болешћу.

5. Интеграција података из ензимских инхибицијских тестова и ћелијских модела пружиће комплементарну процену терапијског потенцијала испитиваних једињења, што може допринети развоју нутрацеутика и суплемената на бази медицинских гљива са циљаним неуропротективним ефектом.

4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Циљ овог истраживања је да се изолују и хемијски окарактеришу специјализовани метаболити из лековите гљиве *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., и да се испита њихов потенцијал у контексту антинеуродегенеративне активности.

Специфични циљеви ове докторске дисертације су:

- Изоловати и карактерисати специјализоване метаболите гљиве *H. erinaceus*.
- Развијање и оптимизовање ^1H *in situ* NMR кинетичког експеримента за праћење ензимске активности и инхибиције AChE и BChE у реалном времену, као алтернативе класичним биохемијским тестовима.
- Мапирање епитопа и идентификовање функционалних група у молекулима активних метаболита који учествују у везивању за AChE и BChE, као и одређивање афинитета лиганд-рецептор интеракција (K_d).
- Испитивање неуропротективне активности изолованих метаболита у култури астроцита, изложених оксидативном стресу.
- Утврђивање да ли метаболити *H. erinaceus* поседују двоструки биолошки ефекат, тј. способност инхибиције холинестераза и истовремено заштиту ћелија од оксидативног оштећења.
- Оцењивање потенцијала испитиваних једињења за даљи развој нутрацеутика и природних суплемената намењених превенцији и подршци лечењу неуродегенеративних болести.

Очекивани резултати су:

1. Хемијска анализа и изоловање метаболита:

- Идентификација и структурна карактеризација специјализованих метаболита *H. erinaceus*.
- Потврда хемијске разноврсности и специфичности метаболита коришћењем NMR и LC-MS/MS анализа.

2. Инхибиција холинестераза (AChE и BChE):

- Добијање концентрационо зависне инхибиције активности AChE и BChE у спектрофотометријском тесту (Ellman метода).
- Идентификација најактивнијих једињења са IC_{50} вредностима упоредивим са референтним инхибиторима као што су галантамин и донезепил.

3. Оптимизације и унапређење NMR експеримената за праћење интеракција лиганата са протеинима:

- Развој и валидација 1H *in situ* NMR методологије за праћење ензимских реакција у реалном времену.
- Мапирање епитопа и идентификација функционалних група одговорних за везивање са AChE/BChE, као и албумином.
- Одређивање константи везивања (K_a/K_d) и предложени механизам инхибиције.

4. Неуропротективна активност на астроцитима:

- Повећана вијабилност астроцита третираних HE метаболитима у поређењу са контролама.
- Потврда да испитивани метаболити смањују оксидативно оштећење у ћелијама.

5. Интегрална процена биолошке активности:

- Идентификација метаболита са двоструким деловањем – као инхибитори холинестераза и као ћелијски заштитни агенси.
- Потврда терапијског потенцијала *H. erinaceus* у контексту алтернативне или допунске терапије код неуродегенеративних болести, пре свега Алцхајмерове болести.

5. Методе истраживања

У току израде ове докторске дисертације користиће се следеће методе:

- Хроматографске методе: колонска хроматографија, танкослојна хроматографија (TLC) и високоефикасна течна хроматографија - користиће се за изоловање специјализованих метаболита.
- Нуклеарна магнетно резонантна спектроскопија биће коришћена за структурну карактеризацију изолованих метаболита, као и за праћење њихових интеракција са протеинима.

- Високоэффективная жидкая хроматография сопряжена с массенной спектрометрией высокой разрешающей способности (LC-MS) будет использоваться для расчета и подтверждения молекулярных формул изолированных метаболитов, а также отслеживание путей их фрагментации с целью получения базы массенных спектров, которая будет применяться в развитии методологии контроля качества.
- Ингибиторная активность испытываемых образцов на AChE и BChE определялась с модифицированным Ellman методом в микропланшетах.
- Нейропротективная активность изолированных метаболитов гриба *H. erinaceus* будет испытана на культурах астроцитов с использованием индуктора окислительного стресса как *in vitro* модели, которая имитирует условия нейродегенерации. После достижения конfluence, клетки будут обработаны испытываемыми образцами метаболитов в различных концентрациях, в временном интервале от 24 часов. После 24-часового воздействия, оценка клеточной жизнеспособности будет проведена с применением МТТ теста. Результаты будут выражены как процент выживания в отношении неопределенного контроля.

6. Литература

1. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. (2019) *Int J Nanomedicine*, 14, 5541-5554. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>
2. Abdul Manap AS, Almadodi R, Sultana S, Sebastian MG, Kavani KS, Lyenouq VE and Shankar A. Alzheimer's disease: a review on the current trends of the effective diagnosis and therapeutics. (2024) *Front Aging Neurosci*, 16, 1429211. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1429211>
3. Subramanian N, Watson B, Li CZ, Moss M, Liu C. Patterning amyloid- β aggregation under the effect of acetylcholinesterase using a biological nanopore - an *in vitro* study. (2023) *Sens Actuators Rep*, 6, 100170. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2023.100170>
4. Thompson C. FDA approves galantamine for Alzheimer's disease. (2001) *Am J Health Syst Pharm*, 58, 649. <https://doi.org/10.1093/ajhp/58.8.649a>
5. Contato AG, Conte-Junior CA. Lion's Mane Mushroom (*Hericium erinaceus*): A Neuroprotective Fungus with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antimicrobial Potential - A Narrative Review. (2025) *Nutrients*, 17(8), 1307. <https://doi.org/10.3390/nu17081307>
6. Qiu Y, Lin G, Liu W, Zhang F, Linhardt R, Wang X, Zhang A. Bioactive compounds in *Hericium erinaceus* and their biological properties: a review. (2024) *Food Sci Hum Wellness*, 13(4), 1825-1844. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250152>

7. Yanshree Yu WS, Fung ML, Lee CW, Lim LW, Wong KH. The Monkey Head Mushroom and Memory Enhancement in Alzheimer's Disease. (2022) *Cells*, 11(15), 2284. <https://doi.org/10.3390/cells11152284>
8. Cornford N, Charnley M. *Hericium erinaceus*: A possible future therapeutic treatment for the prevention and delayed progression of Alzheimer's disease? – A narrative review. (2025) *Nutr Res Rev*, 1-15. <https://doi.org/10.1017/S0954422425000058>
9. Sutthibutpong T, Posansee K, Liangruksa M, Termsaithong M, Piyayotai S, Phitsuwan P, Saparpakorn P, Hannongbua S, Laomettachit T. Combining Deep Learning and Structural Modeling to Identify Potential Acetylcholinesterase Inhibitors from *Hericium erinaceus*. (2024) *ACS Omega*, 9(14), 16311-16321. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c10459>
10. Cala O, Guillièrè F, Krimm I. NMR-based analysis of protein–ligand interactions. (2014) *Anal Bioanal Chem* 406, 943-956. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6931-0>