

# $\beta$ -amiloid aggregációt gátló kelátor molekulák oldategyensúlya

SIJA Éva\*

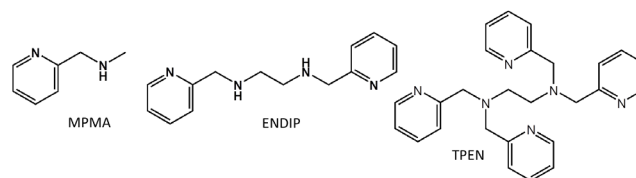
<sup>a</sup>MTA-SZTE Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport, Dóm tér 7, 6720 Szeged, Magyarország<sup>1</sup>

## 1. Bevezetés

A XXI. században a várható élettartam meghosszabbodásával egyre nagyobb az esélye krónikus és „időskori” betegségek kialakulásának. Becslések szerint kb. 25 millió, főként hatvan év feletti ember szenved neurodegeneratív betegségekben. Kelet-Európában számukat 1,8 millió főre, hazánkban 150–160 ezer főre becsülik.<sup>1,2</sup> Annak ellenére, hogy Alois Alzheimer 1907-ben, több mint 100 éve írta le először a kórt, kialakulásának okát és patofiziológiáját még ma sem ismerjük pontosan. Azonban abban egyetértés van, hogy az  $\beta$ -amiloid fehérjék aggregációja a hippocampusban és az agykéregben – akár kiváltó okként, akár végső következményként – kulcsszerepet játszik a betegség kórleletében. Az 1990-es évektől sorra jelentek meg az irodalomban olyan publikációk, melyek a fémionok szerepét hozták összefüggésbe az Alzheimer-kór kialakulásával.<sup>3-5</sup> A  $\beta$ -amiloid fehérjék valóban képesek lehetnek fémionok (Al(III), Fe(III), Cu(II), Zn(II)) megkötésére. A Cu(II) és Zn(II)-ionok a fehérje hisztidin és tirozin oldalláncaival képesek kialakítani koordinatív kötést, míg a hard jellegű Al(III) és Fe(III)-hoz az oxigén donoratomot tartalmazó aminosav oldallánccok koordinálódhatnak (aszparaginsav, glutaminsav, szerin, tirozin).<sup>6,7</sup> A megkötődött fémionok képesek indukálni vagy gyorsítani a  $\beta$ -redő szerkezet kialakulását, így a  $\beta$ -amiloid kezdeti oligomerizációját, majd aggregációját. A képződött szupramolekuláris szerkezetek is képesek lehetnek fémionok megkötésére, sőt a megkötődött fémionoknak szerepe lehet különféle reaktív gyökök képződésében, toxikus folyamatok lejátszódásában. A betegség ma még nem gyógyítható, kezelése a tünetek enyhítésére, és a betegség kifejlődésének lassítására szorítkozik. Mivel a fémkelátorok lassítják az  $\beta$ -amiloid aggregációját, így merült fel a kelátterápia, mint lehetőség az Alzheimer-kór gyógyításában.<sup>8,9</sup>

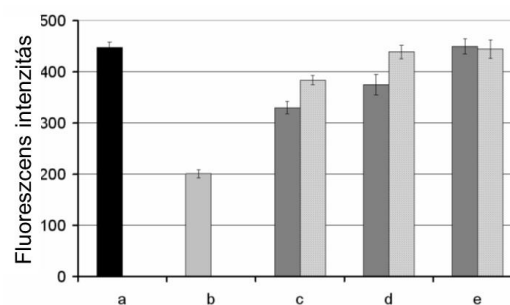
A Tanszékünkön már korábban is történtek kísérletek moderált cinkkötő képességgel rendelkező kelátor molekulák kifejlesztésére. Kezdetben Cu(II) és Zn(II) kelátor molekulák szintézisét és vizsgálatát tűztük ki célul.<sup>10</sup> Az egyik molekula tulajdonképpen egy piridin-származék, a TPEN (*N,N,N',N'*-tetrakis-(2-piridil-metil)-etilén-diamin) molekula „megfelelésének” tekinthető (1. ábra).<sup>10</sup> A TPEN-t a sejtben lévő összes cink fluoreszcens módszerrel való meghatározásában használják. Hatása mérgező. Azonban, ha a molekula méretét felére csökkentjük, csökken a fémkötő képessége is, a negyedakkora méretű MPMA pedig már jóval enyhébb fémkötő képességű ligandum.

A MPMA (*N*-metil-1-(piridin-2-il)-metánamin) Zn(II)- és Cu(II) kötőképessége gyenge, nem elég hatékonyan képes versengeni a  $\beta$ -amiloid fehérjékben kötött fémionokért. Az ENDIP (*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>2</sup>-bisz(piridin-2-il-metil)etán-1,2-diamin) ligandum azonban fiziológiás pH-n mindkét fémionnal elég nagy stabilitású 1:1 összetételű komplexet képez ahhoz,



1. Ábra. Cu(II) és Zn(II)-kötő MPMA és ENDIP és TPEN kelátorok.

hogy kivonja a fémionokat az amiloid komplexéből és így képes gátlani a fémion indukálta  $\beta$ -amiloid oligomerizációt. Hasonlóan ígéretes eredmények születtek hisztidin gazdag oligopeptidekkel is.<sup>11</sup> Ezekben a ligandumokban HisHis vagy GlyHis motívumok kapcsolódnak össze egymással egy lizin linker segítségével. A (HisHis)<sub>2</sub>Lys és (GlyHis)<sub>2</sub>Lys ligandumok is megfelelő erősséggel képesek kötni a fémionokat ahhoz, hogy eltávolítsák őket a  $\beta$ -amiloid komplexekből, azonban nem vonják el a fémionokat az esszenciális metalloproteinektől, így alkalmasak lehetnek arra, hogy megakadályozzák az amiloid aggregációs folyamatait. Ezt spektrofotometriásan ellenőriztük.

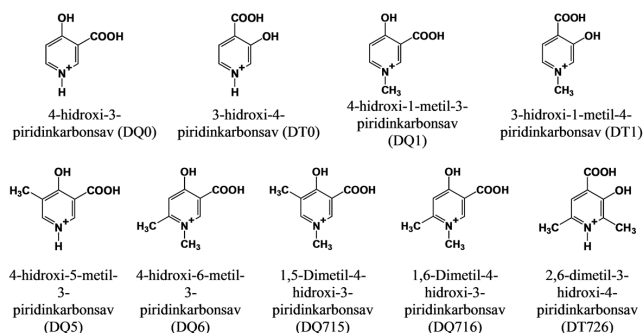


2. Ábra. A (1-40)  $\beta$ -amiloidban lévő Tyr(10) aminosav fluoreszcens emissziójának változása Cu(II) és kelátorok jelenlétében. (a)  $\beta$ -amiloid, (b)  $\beta$ -amiloid és ekvivaláris mennyiségű Cu(II), (c)  $\beta$ -amiloid, Cu(II) és fél ekvivalens kelátor, (d)  $\beta$ -amiloid, Cu(II) és egy ekvivalens kelátor, (e)  $\beta$ -amiloid és két ekvivalens kelátor (kelátor: (GlyHis)<sub>2</sub>Lys – közép szürke és (HisHis)<sub>2</sub>Lys – világosabb szürke oszlopok)  $c_{\beta\text{-amiloid}} = 22 \mu\text{M}$ .<sup>10</sup>

Azt tapasztaltuk, hogy a fémion hozzáadásának hatására az oligomerizációt mutató  $\beta$ -amiloid fluorimetriás emissziójának intenzitása csökken. Azonban, ha a kelátképző ligandum is jelen van a rendszerben, a  $\beta$ -amiloid fluoreszcenciája részben, vagy teljesen visszanyerhető – a fémion-kelátor komplex stabilitásától függően. A Cu(II)-ionnal nyert kísérleti eredményeinket a 2. ábra mutatja be.<sup>11</sup>

Az újabb, jobb tulajdonsággal rendelkező kelátormolekulák felkutatása ma is aktuális feladat. A felhalmozódott, aggregálódást elősegítő fémionok eltávolítására alkalmas ligandumok lehetnek a különböző hidroxi-piridinkarbonsav származékok (3. ábra).

\* Tel.: +36 62 343-579; e-mail: [sija.eva@chem.u-szeged.hu](mailto:sija.eva@chem.u-szeged.hu)



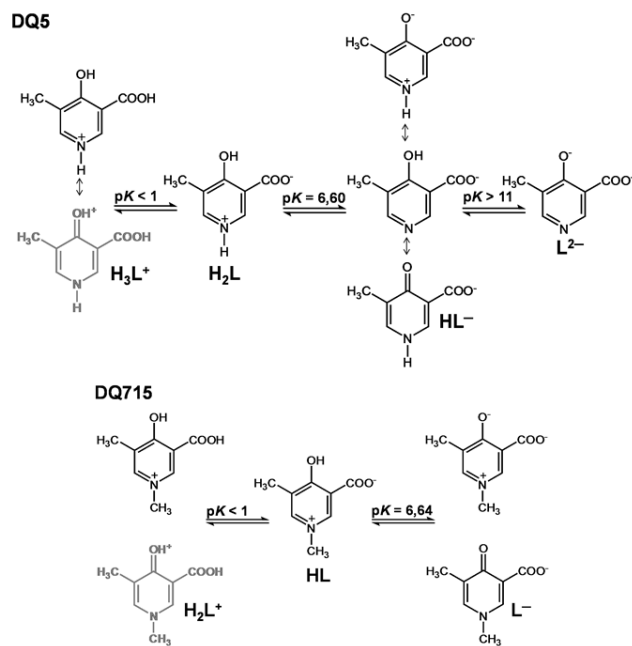
3. Ábra. A tanulmányozott hidroxi-piridinkarbonsav ligandumok szerkezeti képlete.

A piridingyűrűn egymással orto helyzetben lévő fenolos hidroxil- és karboxilcsoport egy hattagú, szalicilát típusú koordináció kialakítására képes. A gyűrűben lévő nitrogén azonban a szalicilsav komplexekhez képest stabilabb komplexek kialakítását teszi lehetővé. A karboxil- és hidroxilcsoportok bázicitása tovább növelhető, metil-szubsztituensek jelenlétével. Különleges jelentősége lehet a metilcsoport jelenlétének 1. pozícióban, azaz a piridin nitrogénen, melynek hatására az aromás gyűrűben lévő nitrogénen pozitív töltést eredményez, amely igen erős elektronszívó hatású a koordinálódni képes funkció csoportokat tekintve.

Habár ezeket a ligandumokat elsősorban 'hard' fémionok (Fe(III), Al(III)) megkötésére tervezték<sup>12</sup>, réz- és cinkion esetében elég, ha kisebb stabilitással kötik a fémiont, itt ugyanis a fő cél a megbomlott fémion-háztartás visszaállítása, és nem a fémfölség minimálisra csökkentése. Mivel feltehetően, a gyógyászati célra megfelelő és alkalmazásra kerülő ligandumok a véráramban szállítódhatnak, kölcsönhatásuk fontos lehet különböző vérben lévő molekulákkal, elsősorban az albuminnal. A ligandum humán szérum albuminnal (HSA) való kölcsönhatását UV-látható spektrofotometriás ultraszűrőssel, és spektrofluorimetriás mérésekkel vizsgáltuk. A biológiai vizsgálatok, illetve a ligandumok  $\beta$ -amiloid fehérjék oligomerizációs folyamataira tett hatásának vizsgálata jelenleg is folyamatban van laboratóriumunkban. Hidroxi-piridinkarbonsavak sav-bázis tulajdonságai

A piridin nitrogénen protonált ligandumok három deprotonálódási lépésen, míg az N-metil származékok két deprotonálódási lépésen mehetnek keresztül (4. ábra)

Az első proton disszociációs állandó ( $pK_1 < 2$ ) mindkét ligandum esetében a karboxilcsoportokhoz rendelhető. Az N-metil szubsztituált származékban a gyűrűn lévő fenolos hidroxilcsoport savassága a fenolhoz és a szalicilsavhoz képest drasztikusan csökken, ami kinoidális mezomer szerkezet kialakulására vezethető vissza. A kinoidális és aromás  $L^-$  izomer formák jelenléte  $^1H$  NMR méréssel is igazolható. A piridin nitrogénen lévő metilcsoport hiányában a második és harmadik disszociációs állandó ( $pK_2$  és  $pK_3$ ) egyértelműen sem a hidroxil-, sem a piridin-N protonjához nem rendelhető. A  $HL^-$  formára három hipotetikus mezomer határszerkezet írható fel (4. ábra), melyek egyidejű létezését az oldatban szintén  $^1H$  NMR mérésekkel bizonyítottuk.<sup>13</sup>



4. Ábra. DQ5 és DQ715 ligandumok lehetséges proton disszociációs folyamatai.

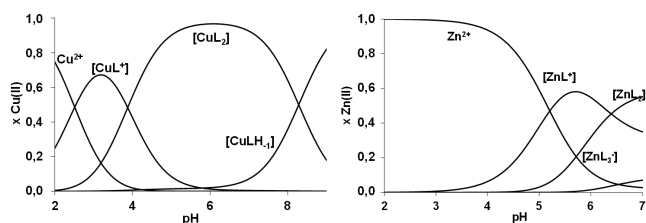
## 2. Hidroxi-piridinkarbonsavak komplexképző sajátosságai

Al(III)- és Fe(III)-ionok komplexképződési folyamatainak tanulmányozása hidroxi-piridinkarbonsav származékokkal a Padovai Egyetemmel közös munka során történtek pH-potenciometriás és UV-látható spektrofotometriás mérések segítségével, melyeket  $^1H$  NMR (Al(III)-komplexek esetében), és ESI-MS mérésekkel egészítettünk ki.<sup>14</sup> Mindkét fémion esetében az oldat pH-jától és a piridin nitrogén szubsztituáltságától függően különböző protonáltságú mono-, bisz- és triszkomplexek képződnek vizes oldatban. N-metil csoport jelenlétében a fémionhoz koordinálódott vízmolekulák deprotonálódhatnak, és vegyes hidroxidokomplexek képződnek. Nem szubsztituált piridin nitrogén jelenlétében a koordinálódott vízmolekula, és a  $NH^+$  csoport is protont veszíthet a pH növekedésével. A ligandumok aszimmetriája folytán bisz- és triszkomplexek képződése esetén diasztereomerek képződésére van lehetőség, melyet Al(III)-komplexek esetében  $^1H$  NMR spektroszkópiával sikerült bizonyítani. A kialakult Fe(III)-komplexek stabilitása, a Fe(III) erősebb Lewis sav jellegének köszönhetően nagyobb, mint az Al(III)-komplexeké. Azonban a vizsgált DQ ligandumok közül csupán kettő volt az, amely a Fe(III)-ionokat képes volt fiziológiai pH-n is oldatban tartani, míg Al(III)-komplexek esetében a hidrolízis minden esetben csak pH 7,4 után kezdődött el.<sup>12</sup>

A komplexek stabilitása nagymértékben függ a gyűrűn lévő metilcsoport(ok) pozíciójától. 1. pozícióban lévő metilcsoportnak stabilitás növelő hatása van, amit további metil-szubsztituensek jelenléte tovább fokoz (DQ715 és DQ716 > DQ1). A 6. és különösképpen az 5. pozícióban lévő metilcsoport a  $-NH^+$  származékok esetében növeli a ligandum affinitását a vas(III)-ionhoz (az előbbiekkal analóg módon DQ5 és DQ6 > DQ0). Ellentétes hatás figyelhető meg 2-metil származékok esetében. A DQ2 ligandum

Fe(III)-komplexe a legkisebb stabilitású, amelynek magyarázata lehet, hogy a 2. pozícióban lévő metilcsoport szterikusan gátolja, hogy a 3. helyen lévő nagyobb méretű karboxilcsoport a piridin gyűrűhöz képest ko-planárisan helyezkedjen el, ami akadályozza a kelátgyűrű kialakulását, így csökkenti a komplex stabilitását.<sup>12</sup>

A ligandumok 'hard' jellege folytán a 'borderline' fémionokkal kisebb stabilitású komplexet képeznek. Cu(II) és Zn(II)-ionokkal a komplexképződést elsősorban pH-potenciometriás mérésekkel vizsgáltuk, de néhány esetben vizsgálatainkat UV-látható és <sup>1</sup>H NMR vagy ESR mérésekkel egészítettük ki. A hidroxipiridinkarbonsavak Cu(II) és Zn(II)-ionnal való komplexképződése minden ligandum esetében hasonló speciációt mutat: kis stabilitású mono és biszkomplexek képződnek (5. ábra). Zn(II) tartalmú rendszerekben triszkomplex képződésére kis koncentrációban csak magasabb fémion-ligandum arány mellett van lehetőség.<sup>13,15</sup>



5. Ábra. Cu(II)-DQ716 és Zn(II)-DQ716 rendszerek koncentrációeloszlási görbéi ( $c_{DQ716} = 2 \times 10^{-3}$  M,  $c_{M(II)} = 5 \times 10^{-4}$  M,  $I = 0,2$  M KCl,  $t = 25$  °C).

Megállapítottuk, hogy a vizsgált ligandumok közül a DQ716 az, amely a  $\beta$ -amiloid fehérjékkel nagyságrendben hasonló stabilitású komplexet képez Cu(II)-ionokkal, így akadályozhatja a  $\beta$ -amiloid fehérjék rézion-indukálta aggregációját. A cinkkomplexek stabilitása olyan kicsi, hogy a vizsgált ligandumok valószínűleg nem befolyásolják a szervezet cink-homeosztázisát.

### 3. Hidroxipiridinkarbonsavak kölcsönhatása HSA molekulával

Néhány ligandum humán szérum albuminnal (HSA) való kölcsönhatást spektrofotometriás és ultraszűréses-UV-látható spektrofotometriás módszerekkel vizsgáltuk. A DQ (4-hidroxi-3-piridinkarbonsav származék) ligandumokkal nem tudtunk kimutatni kölcsönhatást, csupán a DT726 molekula (3. ábra), amely 3-hidroxi-4-piridinkarbonsav származék volt képes a HSA-val kötést kialakítani. A mérések eredményei azt mutatják, hogy megfelelően nagy ligandum felesleg mellett a HSA molekula akár négy ligandum megkötésére is képes lehet. A különböző HSA-ligandum arányoknál a szűrletben lévő nem kötött ligandum koncentrációja alapján következtettünk a kötött ligandum mennyiségére, és ez alapján látszólagos stabilitási állandókat határoztunk meg (1. táblázat).<sup>15</sup>

### 4. Összefoglalás

A vizsgált hidroxipiridinkarbonsav molekulák oldategyensúlyi vizsgálatainak eredményei azt mutatják, hogy egyes ligandumok kelátterápiában való alkalmazása

1. Táblázat. HSA-ligandum (L = DT726) komplexek különböző módszerekkel meghatározott látszólagos stabilitási állandója (pH = 7,40; 0,10 M HEPES puffer;  $t = 25$  °C°).

Spektrofluorimetria	
(HSA)-L	5,79(1)
Ultraszűrés-UV-látható spektrofotometria	
(HSA)-L	4,83(9)
(HSA)-L <sub>2</sub>	9,1(3)
(HSA)-L <sub>3</sub>	13,1(1)
(HSA)-L <sub>4</sub>	16,1(6)

<sup>a</sup> A zárójelben az állandókra számolt utolsó jegy bizonytalansága van feltüntetve.

eredményes lehet. A DQ716 erős komplexképző Fe(III), Al(III) és Cu(II)-ionokkal. Cu(II)-komplexeinek  $K_D$  értéke fiziológias pH-n ( $K_D = 5,49$  nM) abba a tartományba esik, hogy hatékonyan versenghet a  $\beta$ -amiloid fehérjékben kötött rézionokért. A legtöbb vizsgált ligandum szintén erős komplexképző három vegyértékű fémionokkal, Zn(II)- és Cu(II)-ionokkal való vizsgálata azt mutatja a meghatározott  $K_D$ -érték alapján, hogy a ligandum feltehetően nem befolyásolja a szervezet sem réz- sem cinkháztartását. Így a vizsgálataink alapján ezek a ligandumok alkalmasak lehetnek arra, hogy szelektív alumínium kelátorként alkalmazzzák őket. Azonban, bár egyes tanulmányozott ligandumok stabilis komplexet képeznek Fe(III)- és Al(III)-ionnal, azok stabilitása nem éri el a klinikumban használt kelátorok M(III)-komplexeinek stabilitását (pl. deferipron, deferrioxamin).<sup>16</sup> A deferipron esetében pFe = 21, amitől a legerősebb komplexképző hidroxipiridinkarbonsav értéke is 1,7 lg egységgel elmarad (DT712: pFe = 19,3).<sup>16</sup> Azaz a deferipronhoz hasonló hatás feltehetően csak nagyobb dózisú hidroxipiridinkarbonsav adagolása esetén érhető el. Előnyük azonban ezeknek a ligandumoknak, hogy toxicitásuk *in vitro* igazoltan nagyon alacsony. Hatékonyabb komplexképzők lehetnek a dihidroxipiridinkarbonsav származékok, melyekben a két hidroxilcsoport alkalmas helyzetben van pirokatechin-típusú koordinációra az adott fémionnal.

### Köszönetnyilvánítás

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

### Hivatkozások

1. Ferri C.P.; Prince M.; Brayne C.; Brodaty H.; Fratiglioni L.; Ganguli M.; Hall K.; Hasegawa K.; Hendrie H.; Huang Y.; Jorm A.; Mathers C.; Menezes P.R.; Rimmer E.; Sczufca M.; *Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*, Lancet, (2005) 366. 2112.
2. Tariska P.; *Alzheimer-kór*, Golden Book Kiadó, Budapest, 2000.
3. Grasso G.; Giuffrida M.L.; Rizzarelli E.; *Metallomics*, 2012, 4, 937.



4. Viles, J.H.; *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, *256*, 2271.
5. Tiiman A.; Palumaa P.; Tõugu V.; *Neurochem. Int.*, **2013**, *62*, 367.
6. Exley C.; *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, *256*, 2142.
7. Curtain C.C.; Ali F.; Volitakis I.; Cherny R.A.; Norton R.S.; Beyreuther K.; Barrow C.J.; Masters C.L.; Bush A.I.; Barnham K.J.; *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 20466.
8. Huang X.D.; Atwood C.S.; Moir R.D.; Hartshorn M.A.; Vonsattel J.P.; Tanzi R.E.; Bush A.I.; *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 26464.
9. Cherny R.A.; Legg J.T.; McLean C.A.; Fairlie D.P.; Huang X.; Atwood C.S.; Beyreuther K.; Tanzi R.E.; Masters C.L.; Bush A.I.; *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 23223.
10. Lakatos, A.; Zsigó, É.; Hollender, D.; Nagy, N.V.; Fülöp, L.; Simon, D.; Bozsó, Zs.; Kiss T.; *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 1302.
11. Lakatos, A.; Gyurcsik, B.; Nagy, N.V.; Csendes, Z.; Wéber, E.; Fülöp, L.; Kiss T.; *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 1713.
12. Crisponi, G.; Dean, A.; Di Marco, V.; Lachowicz, J.I.; Remelli, M.; Tapparo A.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, *405*, 585.
13. Sija É.; Nagy N.V.; Gandin V.; Marzano C.; Jakusch T.; Dean A.; Di Marco V. B.; Kiss T.; *Polyhedron*, **2014**, *67*, 481.
14. Dean, A.; Sija, É.; Zsigó, É.; Ferlin, M.G.; Marton, D.; Gandin, V.; Marzano, C.; Badocco, D.; Pastore, P.; Venzo, A.; Bertani, R.; Kiss, T.; Di Marco, V.; *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2013**, *1310*.
15. Sija É.; Dean A.; Jakusch T.; Di Marco V. B.; Venzo A.; Kiss T.; *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, **2011**, *142*, 399.
16. Clarke E.T.; Martell A.E.; *Inorg. Chim. Acta.*, **1992**, *191*, 57.
17. Dean A.; Ferlin M.G.; Cvijovic M.; Djurdjevic P.; Dotto F.; Badocco D.; Pastore P.; Venzo A.; Di Marco V. B.; *Polyhedron*, **2014**, *67*, 520.

### Solution equilibrium of metal chelators as inhibitors of $\beta$ -amyloid aggregation

For neurodegenerative disorders the metal ion dyshomeostasis is assumed to be involved in the development of the disease. Balanced homeostasis of metal ions is critical for the normal function of the brain and is maintained within strict limits. Disharmony in metal ion homeostasis, especially that of iron and It has been demonstrated that the increased brain Al(III), Fe(III), Cu(II) and also Zn(II) concentration in dyshomeostasis of these metal ions influences the oligomerisation of  $\beta$ -amyloids in the Alzheimer's brain. The interactions of these metal ions with amyloid precursor (APP) or amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) can produce neurotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The metal ion dyshomeostasis can be corrected by using suitable chelators.

In previous work we synthesised chelator molecules for Cu(II) and Zn(II) (Fig 1.). One of the molecule is a pyridine-derivative, half of the molecule of TPEN used to measure cell Zn level (this molecule sequester Zn(II) practically completely and thus it is toxic), we halved the ligand to decrease its metal binding ability. The other molecules were peptide derivatives, when the strong metal ion chelator GlyHis and HisHis were linked together forming a tetrapeptide with a Lys linker and . Both ligands bind the metal ions in the needed stability range to extract them from the amyloids but not from the essential metalloproteins, so in theory they could prevent promoting of amyloid oligomerisation. This was checked by spectrofluorimetry. Namely, metal ions quenched the fluorescence of the amyloids. However, in the presence of the chelator molecules fluorescence of the amyloid could be partly or fully regained, depending on the stability of the metal-chelator complex. For Cu(II) the results are shown in Fig 2.

These chelators unfortunately are not optimal to remove Fe(III) or Al(III) from the brain as they are mostly N-donors and Fe(III) and Al(III) prefers O donor coordination. For hard metal ions removal we carried out measurements with various substituted hydroxy-pyridine-carboxylates. The ligands studied are depicted in Fig. 3.

The studied ligands which are cytotoxic up to 1 mM and with appropriate substituents may be able to remove the Fe(III), Al(III) and Cu(II) from  $\beta$ -amyloid aggregates without taking the essential metal ions from biomolecules and disturbing their normal functions.

Solution equilibria of the possible chelator compounds with Al(III) and Fe(III) were studied in the University of Padova. The interactions of the ligands with Cu(II), Zn(II) and human serum albumin (HSA) were investigated in Szeged.

The hydroxy-pyridine carboxylic acids form mono, bis and tris complexes with Al(III) and Fe(III). The stability of the complexes was not high enough to prevent the hydrolysis of Fe(III) in most cases, only four studied ligands (DT1, DT712, DQ716 and DQ715) were able to keep the Fe(III) dissolved in the physiological pH range. However, the Al(III) binding ability of these ligands is reasonable – all ligands can prevent the formation of Al(OH)<sub>3</sub> – but unfortunately not so efficiently as deferiprone or deferoxamine. The coordination strength is significantly increased when methyl substituents are present in positions 5 or 6 at the pyridine ring.

Due to the hard character of the donor atoms of these studied ligands the complex stability is lower with the borderline Zn(II) and Cu(II) ions than that of Fe(III) and Al(III). The stability constants of the formed Zn(II) and Cu(II) complexes were determined primarily by pH-potentiometry and some cases the results were confirmed by the combined approach of UV-Vis spectrophotometric and EPR or <sup>1</sup>H NMR spectroscopic measurements.

On basis of the overall stability constants, the  $K_D$  dissociation constants have been calculated for the complexes at pH 7.4. It has been found that among the studied ligands only the DQ716 can form sufficiently high stability complexes with Cu(II) and can retrieve the Cu(II) from the  $\beta$ -amyloid-aggregates and prevent the oligomerisation and aggregation processes. The order of magnitude of the  $K_D$  value of the Zn(II) complexes falls in the range of mmol/dm<sup>3</sup>, which means that Zn(II) binding ability of both ligands is very low. Therefore these ligands most probably do not affect the zinc homeostasis in vivo.

Interactions of some chosen ligands with human serum albumin (HSA) were studied by ultrafiltration/UV-Vis and fluorescence spectroscopy. DQ ligands do not exhibit a measurable tendency to interact with HSA. Only ligand DT726 – one of 3-hydroxy-4-pyridinecarboxylic derivatives is able to bind to the albumin. From our measurements, we could conclude that up to four DT726 molecules bind to HSA with high affinity at pH 7.40.