



MODULATION OF ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE
WITH POLYOXOVOLFRAMS

MODULACIJA AKTIVNOSTI ACETILHOLINESTERAZE
POLIOKSOVOLFRAMATIMA

Milan Lackovic¹, Milica Stojicic¹, Jovana Lalatovic¹, Mirjana Colovic², Danijela Krstic^{1,3}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Srbija

² Institut za Nuklearne nauke Vinča

³ Institut za hemiju u medicini

Correspondence: lackovic011@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Alzheimer's disease has its pathoanatomical origin. The loss of synapses and neurons is dominant in this disease and it leads to changes, primarily at the acetylcholine neurotransmitter system. Polyoxometalates (POM) are highly potent and selective inhibitors of acetylcholinesterase, the enzyme responsible for the disintegration of acetylcholine, and therefore they find their usage in the treatment of Alzheimer's disease, since it would increase and extend the effect of the missing acetylcholine.

The aim: Presenting the results of in vitro influence of POM on the activity of AChE.

Material and methods: In our study we have tested the effects of five Heteropolyoxovolframs: $K_6 [PV_3W_9O_{40}] \times 3H_2O$, $K_6H_2 [TiW_{11}CoO_{40}] \times 13H_2O$, $(NH_4)_{14} [NaP_5W_{30}O_{110}] \times 31H_2O$, $K_7 [SiV_3W_9O_{40}] \times 10H_2O$ and $K_7 [Ti_2PW_{10}O_{40}] \times 10H_2O$ on the activity of acetylcholinesterase. AChE activity was measured by modified Ellman method.

Results: The tested compounds make the inhibition of AChE activity in a dose-dependent manner. Inhibition parameters obtained in this study demonstrate that the compounds 2, 3 and 5 are very potent inhibitors of the enzyme activity. On the other hand, compounds 1 and 4 demonstrate about a hundred, or a thousand times, less potent inhibitory effect on the activity of AChE, comparing to the most potent inhibitor (compound 3), whose IC₅₀ value is $4,79 \times 10^{-7}$ mol/L. The results obtained in this study are consistent with previously demonstrated inhibitory effect of polyoxovolframs on cholinesterase activity.

Conclusion: According to the obtained results we can conclude that the tested Polyoxometalates at physiological pH values inhibit the activity of AChE, and that the inhibition is dose-dependent. Inhibitory range of tested POM in this study verify significantly, possibly as a result of differences in charge, size and shape of these POM.

Keywords:

Alzheimer's disease,
Polyoxometalates,
acetylcholine esterase,
inhibition

SAŽETAK

Uvod: Alchajmerova bolest ima svoju patoanatomsku osnovu. U oboljenju preovlađuje gubitak sinapsi i neurona, što dovodi do poremećaja na neurotransmiterskim sistemima mozga, pre svega na nivou acetilholinskog transmitterskog sistema. Polioksometalati (POM), kao visokopotentni i selektivni inhibitori acetilholinesteraze (AChE), enzima odgovornog za razgradnju acetilholina, pronalaze potencijalnu primenu u lečenju Alchajmerove bolesti jer bi se time povećalo i produžilo delovanje nedostajućeg acetilholina.

Cilj: Ispitivanje in vitro uticaja POM-a na aktivnost AChE.

Materijal i metode: U našem istraživanju je ispitivan uticaj pet novosintetisanih heteropoliooksovolframata: 1) $K_6[PV_3W_9O_{40}] \cdot x \cdot 3H_2O$, 2) $K_6H_2[TiW_{11}CoO_{40}] \cdot x \cdot 13H_2O$, 3) $(NH_4)_{14}[NaP_5W_{30}O_{110}] \cdot x \cdot 31H_2O$, 4) $K_7[SiV_3W_9O_{40}] \cdot x \cdot 10H_2O$ i 5) $K_7[Ti_2PW_{10}O_{40}] \cdot x \cdot 10H_2O$ na aktivnost acetilholinesteraze. Aktivnost AChE merena je modifikovanom Elmanovom (Ellman) metodom.

Rezultati: Ispitivana jedinjenja inhibiraju aktivnost AChE na dozno zavisani način u ispitivanom opsegu koncentracija. Dobijeni inhibitorni parametri pokazuju da su jedinjenja 2, 3 i 5 veoma potentni inhibitori enzimske aktivnosti i da su izračunate IC50 vrednosti ovih poliooksovolframata u oblasti submikromolarnih i mikromolarnih koncentracija. S druge strane, jedinjenja 1 i 4 pokazala su oko sto, odnosno hiljadu puta slabije inhibitorno dejstvo na aktivnost AChE u poređenju sa najpotentnijim inhibitorom (jedinjenje 3), čija IC50 vrednost iznosi $4,79 \times 10^{-7}$ mol/l. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranije pokazanim inhibitornim efektom poliooksovolframata na aktivnost holinesteraza.

Zaključak: Prema dobijenim rezultatima, možemo da zaključimo da ispitivani polioksometalati na fiziološkoj pH vrednosti inhibiraju aktivnost AChE, kao i da je dobijena inhibicija dozno zavisna. Inhibitorne moći POM, testiranih u ovom radu, međusobno se značajno razlikuju, što je verovatno posledica razlika u naelektrisanju, veličini i obliku ovih polioksometalata.

Gljučne reči:

Alchajmerova (Alzheimer) bolest, polioksometalati, acetilholinesteraza, inhibicija

Uvod

Alchajmerova (*Alzheimer*) bolest je najzastupljeniji klinički entitet degenerativnih demencija (1). Ovo neurodegenerativno oboljenje ima svoju patoanatomsku osnovu, kojom dominira gubitak sinapsi i neurona, naročito u frontalnom, parijentalnom i temporalnom režnju. Osnovu patohistološke slike predstavljaju neurotični plakovi i neurofibrilarna klupka (2). Ove promene dovode do poremećaja na neurotransmiterskim sistemima mozga, pre svega na nivou acetilholinskog transmitterskog sistema. Na funkcionalnom nivou dolazi do smanjenja aktivnosti holin-acetiltransferaze, enzima odgovornog za sintezu acetilholina. Ovaj enzim se nalazi u holinergičkim neuronima, a smanjenje njegove aktivnosti nastaje kao posledica izumiranja holinergičkih neurona, naročito u nukleusu bazalisanu – Mejnert (*Meynert*) (3). Ustanovljeno je da težina kognitivnog deficita korelira sa gubitkom neurona u Mejnertovom jedru i, posledično, sa padom aktivnosti holin acetiltransferaze. Ova saznanja čine osnovu hipoteze za upotrebu inhibitora acetilholinesteraze (AChE), enzima odgovornog za razgradnju acetilholina, u lečenju Alchajmerove bolesti jer bi se time povećalo i produžilo delovanje nedostajućeg acetilholina u sinaptičkim prostorima obolelih od Alchajmerove bolesti i smanjilo formiranje neurotičnih plakova i neurofibrilarnih klupka. Ograničenja upotrebe inhibitora acetilholinesteraze u kliničkoj praksi povezana su sa njihovim neželjenim efektima i gubitkom efikasnosti kod njihove dugotrajne upotrebe (4).

Polioksometalati (POM), prema rezultatima novijih naučnih istraživanja, nailaze na široku primenu u domenu medicinske nauke i prakse. Oni poseduju antibakterijska (5, 6), antiviralna (7-11), antitumorska (12) i antikoagulantna (13,14) svojstva. Među njihovim svojstvima izdvajaju se potentnost i visoka selektivnost kao inhibitora acetilholinesteraze (15). Po strukturi su anjonski kompleksi prelaznih metala, povezani kiseoničkim mostovima i poseduju izuzetnu raznolikost u pogledu kompozicije, strukture i površinskog naelektrisanja (16). Neka od ovih jedinjenja pokazuju visoku termodinamičku i kinetičku stabilnost u vodenim rastvorima pri fiziološkom pH. Uočena svojstva ovih inhibitora acetilholinesteraze, poput polariteta, rasporeda površinskog naelektrisanja i oblika, mogu se modifikovati na molekularnom nivou, čime se mogu povećati njihova selektivnost i specifičnost prema ciljnom enzimu. Polioksometalati su i potentni inhibitori agregacije beta amiloidnog peptida, osnovne strukturne komponente neurotičnih plakova i neurofibrilarnih klupka (17).

Imajući u vidu da inhibicija aktivnosti AChE predstavlja jednu od strategija u lečenju Alchajmerove bolesti i podatke iz literature o visokom inhibitornom potencijalu polioksometalata, cilj ovog rada je da se ispita in vitro uticaj pet novosintetisanih heteropoliovolframata: $K_6[PV_3W_9O_{40}] \cdot x \cdot 3H_2O$, $K_6H_2[TiW_{11}CoO_{40}] \cdot x \cdot 13H_2O$, $(NH_4)_{14}[NaP_5W_{30}O_{110}] \cdot x \cdot 31H_2O$, $K_7[SiV_3W_9O_{40}] \cdot x \cdot 10H_2O$ i $K_7[Ti_2PW_{10}O_{40}] \cdot x \cdot 10H_2O$ na aktivnost acetilholinesteraze.

Materijal i metode

Sinteza polioksovolframata

Polioksovolframati ispitivani u ovom radu sintetisani su i indentifikovani (FT-IR, NMR i AA spektroskopijom) u laboratoriji profesora U. Kortza sa Jacobs univerziteta u Bremenu, SR Nemačka.

Polazni rastvori ispitivanih polioksovolframata (0,01 mol/l) pripremljeni su rastvaranjem čvrstih jedinjenja u vodi neposredno pre upotrebe. Radni rastvori su pripremani razblaživanjem vodom do željenih koncentracija.

Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze

Aktivnost AChE je merena modifikovanom Elmanovom (*Ellman*) metodom (18). U 50 mM fosfatni pufer pH 8 dodaje se 10 µl komercijalnog enzimskog preparata (3 IU/ml). Enzim se potom izlaže odgovarajućoj koncentraciji ispitivanog polioksometalata pri temperaturi od 37 °C tokom 15 minuta. Enzimaska reakcija započinje dodatkom supstrata, 10 µl 0,075 M ASChI u kombinaciji sa reagensom za bojenje, 20 µl 0,1 mM DTNB. Proizvod enzimske reakcije, tiholin-jodid i DTNB daju jedinjenje žute boje, 5-tio-2-nitrobenzoat, čije nastajanje se prati spektrofotometrijski na 412 nm. Enzimaska reakcija se zaustavlja sa 50 µl 0,01 M SDS. Vreme inkubacije na 37 °C je 3-5 minuta. Ukupna zapremina reakcione smese je 700 µl. Slepa proba ne sadrži enzim. Aktivnost AChE se izražava kao ΔA/min/mg proteina.

Rezultati

Uticaj pet sintetisanih polioksovolframata na aktivnost AChE ispitivan je in vitro izlaganjem enzima u rasponu koncentracija 1×10^{-9} - 1×10^{-3} mol/l. Eksperimentalno dobijene zavisnosti aktivnosti enzima od koncentracije inhibitora (**prilog 1**) izražene su kao procenat od kontrolne vrednosti (aktivnost enzima dobijena u odsustvu inhibitora) i prate sigmoidnu funkciju:

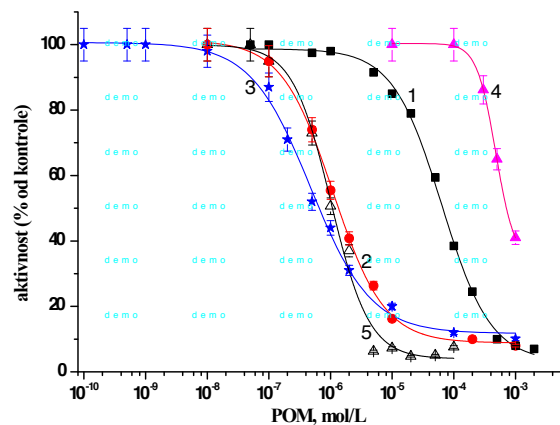
$$(1) \quad y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^n} + A_2$$

gde je y preostala aktivnost enzima, a x koncentracija inhibitora, x_0 odgovara IC_{50} vrednosti, dok n odgovara vrednosti Hilovog (*Hill*) koeficijenta.

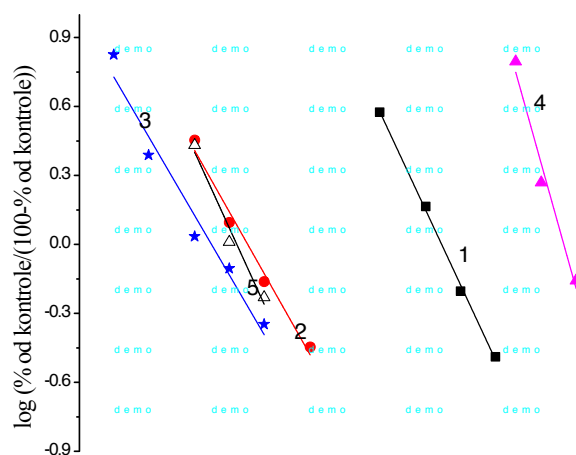
Dobijeni rezultati pokazuju da rastuće koncentracije ispitivanih jedinjenja indukuju inhibiciju enzimske aktivnosti na koncentraciono zavisnan način (**prilog 1**). Veoma indikativan parametar pri praćenju modulacije enzimske aktivnosti jeste vrednost IC_{50} , koja predstavlja onu koncentraciju inhibitora čije prisustvo u smesi smanjuje aktivnost enzima za 50% u odnosu na kontrolnu vrednost. Vrednosti IC_{50} određene su iz inhibitorne krive, dobijene prilagođavanjem eksperimentalnih rezultata sigmoidnom funkcijom (sigmoidal fit, Origin 6.0) (**prilog 1**) i primenom Hilove jednačine (2), koja predstavlja linearnu transformaciju sigmoidne funkcije:

$$\log\left(\frac{\% \text{ aktivnost}}{100 - \% \text{ aktivnost}}\right) = -n \log[I] + \log IC_{50} \quad (2)$$

gde je % aktivnost preostala aktivnost enzima nakon inhibicije, odnosno % od kontrolne vrednosti, n je Hilov koeficijent i [I] koncentracija inhibitora. Vrednost inhibitornih parametara, IC_{50} i n, određuju se iz vrednosti nagiba i odsečka linearne zavisnosti $\log(\% \text{ aktivnost}/(100 - \% \text{ aktivnost})) - \log[I]$. Hilovi dijagrami prikazani su u **prilogu 2**, a dobijeni inhibitorni parametri (vrednosti IC_{50} i n) za sva ispitivana jedinjenja sumirani su u **prilogu 3**.



Grafik 1. Uticaj različitih koncentracija polioksovolframata (1-5) na aktivnost acetilholinesteraze. Preostala aktivnost enzima, dobijena u prisustvu odgovarajućih koncentracija inhibitora, izražena je kao procenat od kontrolne vrednosti (aktivnost enzima dobijena u odsustvu inhibitora). Vrednosti su izražene kao srednje vrednosti dobijene iz tri eksperimentalna merenja \pm S.E.M. (engl. *standard error measurement*, standardna greška merenja). Eksperimentalno dobijene vrednosti su prilagođene sigmoidnom funkcijom (*sigmoidal fit*, Origin 6.0).



Grafik 2. Hilova analiza inhibicije acetilholinesteraze polioksovolframatom (1-5)

Oznaka	POM	Hilova analiza		Sigmoidna funkcija
		IC_{50} , mol/l	N	IC_{50} , mol/l
1	$K_6[PV_3W_9O_{40}] \times 3H_2O$	$6,56 \times 10^{-5}$	$1,08 \pm 0,03$	$6,36 \times 10^{-5}$
2	$K_6H_2[TiW_{11}CoO_{40}] \times 13H_2O$	$1,23 \times 10^{-6}$	$0,89 \pm 0,08$	$1,14 \times 10^{-6}$
3	$(NH_4)_{14}[NaP_5W_{30}O_{110}] \times 31H_2O$	$6,00 \times 10^{-7}$	$0,86 \pm 0,09$	$4,79 \times 10^{-7}$
4	$K_7[SiV_3W_9O_{40}] \times 10H_2O$	$5,82 \times 10^{-4}$	$1,80 \pm 0,27$	$4,80 \times 10^{-4}$
5	$K_7[Ti_2PW_{10}O_{40}] \times 10H_2O$	$1,15 \times 10^{-6}$	$1,10 \pm 0,17$	$1,04 \times 10^{-6}$

Tabela 1. Vrednosti inhibitornih parametara (IC_{50} i Hilovog koeficijenta n), dobijene prilagođavanjem eksperimentalnih rezultata sigmoidnom funkcijom i Hilovom analizom inhibicije acetilholinesteraze polioksovolframatom

Dobijeni rezultati pokazuju da svi ispitivani poliooksovolframati inhibiraju aktivnost AChE, ali da se njihove inhibitorne moći međusobno značajno razlikuju. Pokazano je da su jedinjenja: $(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \times 31\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_6\text{H}_2[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}] \times 13\text{H}_2\text{O}$ i $\text{K}_7[\text{Ti}_2\text{PW}_{10}\text{O}_{40}] \times 10\text{H}_2\text{O}$ snažni inhibitori enzimske aktivnosti i da pri koncentraciji od $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ skoro u potpunosti inhibiraju enzim, dok su jedinjenja $\text{K}_6[\text{PV}_3\text{W}_9\text{O}_{40}] \times 3\text{H}_2\text{O}$ i $\text{K}_7[\text{SiV}_3\text{W}_9\text{O}_{40}] \times 10\text{H}_2\text{O}$ znatno slabiji inhibitori i pri istoj koncentraciji ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$) ne dovode do modulacije enzimske aktivnosti.

Diskusija

U ovom radu ispitivan je in vitro uticaj pet novosintetisanih heteropolioksovolframata: $\text{K}_6[\text{PV}_3\text{W}_9\text{O}_{40}] \times 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_6\text{H}_2[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}] \times 13\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \times 31\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_7[\text{SiV}_3\text{W}_9\text{O}_{40}] \times 10\text{H}_2\text{O}$ i $\text{K}_7[\text{Ti}_2\text{PW}_{10}\text{O}_{40}] \times 10\text{H}_2\text{O}$ na aktivnost acetilholinesteraze. Dobijeni rezultati pokazuju da svih pet jedinjenja u ispitivanom opsegu koncentracija inhibiraju aktivnost enzima, kao i da je procenat inhibicije proporcionalan koncentraciji inhibitora u inkubacionoj smesi.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature da su neki heteropolioksovolframati nekompetitivni inhibitori holinesteraza (acetil i butiril) i da na dozno zavisani način inhibiraju aktivnost ovih enzima (16). Rezultati Iqbala i saradnika (16) predstavljaju, prema našim saznanjima, jedine dostupne podatke o uticaju poliooksovolframata na holinesteraze. Pored toga, prikazani rezultati (**prilozi 1 i 3**) pokazuju da se inhibitorni potencijali ispitivanih poliooksovolframata međusobno značajno razlikuju, tj. da je $(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \times 31\text{H}_2\text{O}$ najpotentniji inhibitor ($\text{IC}_{50} = 4,79 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$) i da je oko sto, odnosno hiljadu puta puta jači inhibitor aktivnosti AChE od $\text{K}_6[\text{PV}_3\text{W}_9\text{O}_{40}] \times 3\text{H}_2\text{O}$ ($\text{IC}_{50} = 6,36 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), odnosno $\text{K}_7[\text{SiV}_3\text{W}_9\text{O}_{40}] \times 10\text{H}_2\text{O}$ ($\text{IC}_{50} = 4,80 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$). Pokazano je i da su inhibitorne moći jedinjenja $\text{K}_6\text{H}_2[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}] \times 13\text{H}_2\text{O}$ i $\text{K}_7[\text{Ti}_2\text{PW}_{10}\text{O}_{40}] \times 10\text{H}_2\text{O}$ međusobno vrlo slične i nešto slabije (oko 2 puta) od inhibitornog potencijala jedinjenja $(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \times 31\text{H}_2\text{O}$. Dobijeni inhibitorni parametri (**prilog 3**) za ova tri jedinjenja u saglasnosti su sa podacima iz literature koji se odnose na uticaj poliooksovolframata na aktivnost holinesteraza (16). Iqbal i saradnici su, naime, pokazali da se IC_{50} vrednosti za sedam različitih poliooksovolframata nalaze u opsegu submikromolarnih i mikromolarnih koncentracija (16).

S druge strane, znatno slabije inhibitorno dejstvo jedinjenja $\text{K}_6[\text{PV}_3\text{W}_9\text{O}_{40}] \times 3\text{H}_2\text{O}$ i $\text{K}_7[\text{SiV}_3\text{W}_9\text{O}_{40}] \times 10\text{H}_2\text{O}$ verovatno su posledica razlika u naelektrisanju, veličini i obliku ovih polioksometalata. Razlog različite reaktivnosti ispitivanih polioksometalata pokušaćemo da razjasnimo u toku naših daljih istraživanja, upoređivanjem dobijenih inhibitornih parametara AChE sa rezultatima dobijenim kristalografskom analizom ispitivanih poliooksovolframata i ab initio izračunavanjima. Imajući u vidu podatke iz literature o inhibitornom delovanju polioksometalata na agregaciju beta amiloidnog peptida (17) i dobijenu inhi-

biciju aktivnosti AChE, poliooksovolframati predstavljaju potencijalnu platformu za razvoj novih lekova za Alchajmerovu bolest.

Zaključak

Ovakav pristup, koji kombinuje rezultate eksperimentalnih inhibitornih studija i teorijska hemijska izračunavanja koja omogućavaju modifikaciju osobina (veličine, naelektrisanja, polarnosti) POM-a, doprinosi pronalazačnju potentnog, ali u isto vreme selektivnog i specifičnog inhibitora AChE, enzima čija inhibicija predstavlja jednu od strategija u lečenju Alchajmerove bolesti. S obzirom na poznatu toksičnost polioksometalata (15), što ograničava njihovu kliničku primenu, naša dalja istraživanja će biti usmerena na testiranje nefro- i hepatotoksičnog delovanja ispitivanih poliooksovolframata.

Zahvalnica

Rezultati saopšteni u ovom radu deo su istraživanja u okviru bilateralnog projekta između Srbije i Nemačke: „Polyoxopalladates: ATPases inhibition studies and toxicity evaluation“.

Literatura

1. Bumbasirević Lj, Sokić D, Stefanova E i sar. drugo izdanje. Kostić V urednik. Neurologija za studente medicine; 2009
2. Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. J Clin Psychiatry. 2006; 67 Suppl 3:3-7; quiz 23
3. Herholz K. Acetylcholine esterase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008;35 Suppl 1:25-9
4. Noetzli M, Eap CB. Pharmacodynamic, pharmacokinetic and pharmacogenetic aspects of drugs used in the treatment of Alzheimer's disease. Clin Pharmacokinet. 2013; 52(4): 225-41
5. Fukuda N, Yamase T, Tajima Y. Inhibitory effect of polyoxotungstates on the production of penicillin-binding proteins and β -lactamase against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Biological and Pharmaceutical Bulletin 1999; 22: 463-70.
6. Fukuda N, Yamase T. In vitro antibacterial activity of vanadate and vanadyl compounds against Streptococcus pneumoniae. Biological and Pharmaceutical Bulletin 1997; 20: 927-30
7. Shigeta S, Mori S, Watanabe J et al. In-vitro anti myxovirus activity and mechanism of anti-influenzavirus activity of polyoxometalates PM-504 and PM-523. Antiviral Chemistry and Chemotherapy 1996; 7: 346-52
8. Inouye Y, Fujimoto Y, Sugiyama M, Yoshida T, Yamase T. Structure-activity relationship and strain specificity of polyoxometalates in anti-human immunodeficiency virus activity. Biological and Pharmaceutical Bulletin 1995; 18: 996-1000
9. Ikeda S, Nishiya S, Yamamoto A, Yamase T, Nishimura C, De Clercq E. Activity of keggin polyoxotungstate pm-19 against herpes simplex virus type 2 infection in immunosuppressed mice: Role of peritoneal macrophage activation.

- Journal of Medical Virology 1993; 41: 191–95
10. Yamamoto N, Schols D, De Clercq E et al. Mechanism of anti-human immunodeficiency virus action of polyoxometalates, a class of broad-spectrum antiviral agents. *Molecular Pharmacology* 1992; 42: 1109–17.
 11. Shigeta S, Mori S, Watanabe J, Soeda S, Takahashi K, Yamase T. Synergistic anti-influenza virus A (H1N1) activities of PM-523 (polyoxometalate) and ribavirin in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41: 1423–27
 12. Wang X, Li F, Liu S, Pope MT. New liposome-encapsulated-polyoxometalates: synthesis and antitumoral activity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2005; 99: 452–57
 13. Tajima Y, Shizuka R, Oshitani S, Amagai H. Phosphotungstate as a useful eluent for antithrombin III purification by heparin-agarose affinity chromatography. *Thrombosis Research* 1990; 57: 697-704
 14. Tajima Y, Amagai H, Okamura N. Phosphotungstate shows a heparin-like anticoagulant effect but inhibits heparin. *Thrombosis Research* 1989; 55: 329-39
 15. Rhule JT, Hill CL, Judd DA, Schinazi RF. Polyoxometalates in Medicine. *Chemical Reviews*, 1998; 98: 327-57
 16. Iqbal J, Barsukova-Stuckart M, Ibrahim M, Usman Ali S, Khan A, Kortz U. Polyoxometalates as potent inhibitors for acetyl and butyrylcholinesterases and as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Chem Res.* 2013; 22: 1224-28
 17. Geng J, Li M, Ren J, Wang E, Qu X. Polyoxometalates as inhibitors of the aggregation of amyloid β peptides associated with Alzheimer's disease. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011 26; 50(18): 4184-8
 18. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7: 88–95