ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (Ι) Χημικών Επιστημών

«Σύνθεση νέων υβριδικών μορίων κουμαρινών και αξιολόγηση της δράσης τους ως αναστολείς του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE)»

Διπλωματική εργασία

Πολυξένη Πανουσάκη

Επιβλέπουσα:

Αναστασία Δέτση

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

Αθήνα 2021

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Δρ. Αναστασίας Δέτση, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ε.Μ.Π., κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Αρχικά, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. κα. Αναστασία Δέτση, για την ευκαρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία σε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα που συνδυάζει δύο από τα πεδία ενδιαφέροντός μου, την Οργανική Σύνθεση και τη Φαρμακευτική Χημεία. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση ενός τόσο απαιτητικού θέματος, αλλά και η συνεχής της καθοδήγηση και οι πολύτιμες συμβουλές της καθ'όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα για την επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Ειδικά στις πρωτόγνωρες συνθήκες εργασίας του τελευταίου χρόνου, ένα τέτοιο άρτιο αποτέλεσμα δεν θα ήταν δυνατό χωρίς την καίρια συμβολή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον Δρ. Κωνσταντίνο Μαγουλά, Καθηγητή Ε.Μ.Π. και στον Δρ. Φώτιο Τσόπελα, Επίκουρο Καθηγητή Ε.Μ.Π. για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και το χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να αποδώσω στην υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., Αννίτα Κατωπόδη. Η καθοδήγησή της, οι επιστημονικές της γνώσεις και δεξιότητες και οι καίριες παρατηρήσεις της συνέβαλλαν δραστικά στην αντιμετώπιση κάθε προβλήματος που προέκυπτε και στην επίτευξη αυτού του αποτελέσματος. Την ευχαριστώ από καρδιάς τόσο για την άριστη συνεργασία μας, όσο και για την συνεχή της στήριξη σε αυτήν την προσπάθεια.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου στον Αλέξανδρο Καλοσπύρο, υποψήφιο διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., για τη σημαντική του συμβολή με τη μεταλαμπάδευση τόσο πρακτικών όσο και θεωρητικών γνώσεων, για τη συνεχή βοήθειά του σε κάθε τι που χρειαζόταν και για τη στήριξή του στο εγχείρημα αυτό.

Ακόμα οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την άριστη συνεργασία και το πάντα ευχάριστο κλίμα που διευκόλυνε τη διεκπεραίωση των πειραμάτων. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ελένη Καβέτσου και την υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Πιττερού, για την καθημερινή τους υποστήριξη και ενθάρρυνση.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη στην οικογένειά μου, τους φίλους μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους για την συνεχή τους συμπαράσταση, υπομονή και αγάπη που με στήριζαν καθ'όλη την πενταετή μου φοίτηση στο Ε.Μ.Π.

Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια με πρακτικά:

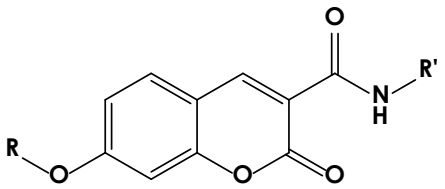
- A. Kalospyros, A. Katopodi, **P. Panousaki**, G. Eressiou, A. Detsi, "*Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Coumarin Analogues as Potent Acetylcholinesterase Inhbitors*", Athens Summer School on Organic Synthesis 2021 (ASSOS 2021), August 25-27, 2021.
- A. Katopodi, A. Kalospyros, G. Eressiou, **P. Panousaki**, E. Kritsi, M. Zervou, A. Detsi, "*Design, Synthesis and Molecular Docking Studies of Acetylcholinesterase Inhibitors Based on the Coumarin Scaffold*", European Symposium on Organic Chemistry 2021 (ESOC 2021), July 5-6, 2021.
- A. Katopodi, A. Kalospyros, **P. Panousaki**, F. Marinou, A. Detsi, "*Design and Synthesis of Novel Coumarin Analogues as Potent Acetylcholinesterase Inhibitors*", XXIX European Colloquium on Heterocyclic Chemistry (ECHC 2021), April 26-28, 2021.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κουμαρίνες αποτελούν ετεροκυκλικές φαινολικές ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών. Εντοπίζονται σε πληθώρα φυτών είτε σε ελεύθερη μορφή είτε υπό τη μορφή γλυκοζιτών, ενώ ταυτόχρονα διαθέτουν πολλαπλές βιολογικές δράσεις, συμπεριλαμβανόμενης της αντιβακτηριακής, αντιικής, αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντικαρκινικής και νευροπροστατευτικής δράσης. Η δραστικότητα των κουμαρινών που εντοπίζονται στη φύση τις καθιστά ιδανικό δομικό υπόβαθρο για τη σύνθεση νέων βιοδραστικών ενώσεων οι οποίες δύναται να αποτελέσουν φαρμακευτικά σκευάσματα. Μία συνήθης τεχνική είναι η σύνθεση υβριδικών μορίων, η συνένωση δηλαδή γνωστών δραστικών μορίων προς νέα μόρια ικανά να αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς θεραπευτικούς στόχους ταυτόχρονα.

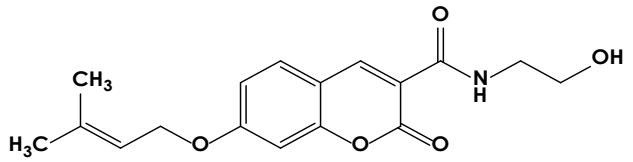
Έναν τέτοιο στόχο αποτελεί η ακετυλοχολινεστεράση, ένα ένζυμο που ανήκει στις α/β υδρολάσες και φυσιολογικό της ρόλο αποτελεί η κατάλυση της υδρόλυσης του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη σε χολίνη και οξικό οξύ. Ωστόσο, η εκτεταμένη μείωση των επιπέδων ακετυλοχολίνης στον οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή και πιο συγκεκριμένα δημιουργεί το νευροπαθολογικό προφίλ της νόσου Αλτσχάιμερ. Η πιο αποτελεσματική προσέγγιση για τη θεραπεία της νόσου του Αλτσχάιμερ έως σήμερα είναι η χρήση φαρμάκων-αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης.

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων υβριδικών κουμαρινικών αναλόγων ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης. Ως εκ τούτου συντέθηκαν δέκα υβριδικά κουμαρινικά καρβοξαμίδια σε τρία στάδια. Δομικό υπόβαθρο αποτέλεσε η *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-2Η-χρωμεν-2-όνη*, η οποία συντέθηκε μέσω συμπύκνωσης Knoevenagel. Από την κουμαρίνη αυτή και μέσω αντίδρασης σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson προέκυψαν δύο αλκοξυ-παράγωγα, η *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-2Η-χρωμεν-2-όνη* και η *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-2Η-χρωμεν-2-όνη.* Από τα αλκοξυ-παράγωγα και με αντίδραση υποκατάστασης στη θέση 3 προέκυψαν τελικά δέκα κουμαρινικά καρβοξαμίδια, τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^{1}H NMR.



Χημική δομή νέων κουμαρινικών καρβοξαμιδίων.

Τα υβριδικά καρβοξαμίδια μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης μέσω της τροποποιημένης μεθόδου του Ellman. Τα πρενυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα εμφάνισαν ισχυρότερη δράση από τα αντίστοιχα βενζυλοξυ-, των οποίων η ικανότητα αναστολής για συγκέντρωση 100 μΜ κυμάνθηκε από 25 έως 28%. Από τα έξι πρενυλοξυ-παράγωγα, τρία δεν εμφάνισαν δράση, ενώ η ικανότητα αναστολής των υπόλοιπων για συγκέντρωση 100 μΜ κυμάνθηκε από 55 έως 70%. Δραστικότερο αναστολέα αποτελεί η ένωση **3c**, με ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης κατά 70% για συγκέντρωση 100 μΜ και IC_{50}=34.9 μΜ.



3c

70% inhibition (100 μM), IC_{50}=34.9 μM

*Ισχυρότερος αναστολέας, ένωση **3c**.*

Τέλος, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των νέων ενώσεων με τη χρήση υπολογιστικών εργαλείων. Τα αποτελέσματα της εφαρμογής του κανόνα των 5 του Lipinski, της πρόβλεψης της λιποφιλίας και της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ήταν ενθαρρυντικά, καθώς καμία από τις ενώσεις δεν κρίθηκε ακατάλληλη για από του στόματος χορήγηση σε μελλοντικά φαρμακευτικά σκευάσματα, ενώ όλες πλην μίας μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να δράσουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

Επιστημονική περιοχή: Φαρμακευτική Χημεία, Οργανική Σύνθεση, Αναστολή ακετυλοχολινεστεράσης

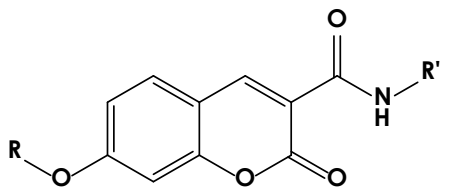
Λέξεις-κλειδιά: Κουμαρίνες, Υβριδικά Μόρια, Καρβοξαμίδια, Αναστολείς Ακετυλοχολινεστεράσης, Νόσος Αλτσχάιμερ, Νευροπροστατευτική Δράση

ABSTRACT

Coumarins are heterocyclic phenolic compounds that belong to the benzopyrone chemical class. They can be found in many plants, either in a free state or as glycosides and they possess a wide range of biological activities, such as antibacterial, antiviral, antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, and neuroprotective. The multiple bioactivities of naturally derived coumarins renders them ideal scaffolds for novel pharmaceutical compounds. A common technique to achieve this goal is hybrid molecules synthesis, i.e. the combination of known potent structural domains in one privileged scaffold that results in novel compounds with the ability to interact with multiple therapeutic targets.

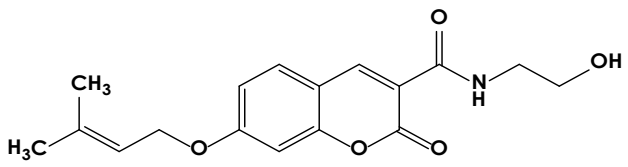
Acetylcholinesterase is an a/b hydrolase that acts as a catalyst to the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine to choline and acetic acid. However, an extensive reduction of acetylcholine levels can lead to a progressive neurodegenerative disorder, creating the neuropathological profile of Alzheimer's Disease. The most potent therapeutical approach to Alzheimer's Disease up to today is the administration of acetylcholinesterase inhibitors.

The aim of this thesis is the design, synthesis, and characterization of novel hybrid coumarin compounds that act as acetylcholinesterase inhibitors. In this context, ten novel hybrid coumarin carboxamides were synthesized via three step reactions. *Methyl 7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate* was synthesized first via a Knoevenagel condensation reaction. Using this coumarin analogue as a substrate for Williamson ether synthesis resulted in two alkoxy-derivatives, *methyl 7-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate* and *methyl 7-(benzyloxy)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate*. From these alkoxy-derivatives and via substitution in the 3-position ten novel coumarin carboxamides were produced, which were identified via ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{1}H NMR).



Chemical structure of fused coumarin carboxamides.

The novel hybrid coumarin carboxamides were evaluated for their ability to inhibit acetylcholinesterase enzyme via a modified Ellman's method. The prenyloxy-coumarin analogues exhibited higher potency than the respective benzyloxy-analogues, with the latter exhibiting inhibitory activity ranging from 25 to 28%, at the concentration of 100 μM. From the six prenyloxy-derivatives, three were found inactive, while the inhibitory activity of the rest ranged from 55 to 70%, at the concentration of 100 μM. Compound **3c** was the most potent inhibitor, exhibiting 70% acetylcholinesterase inhibition for a concentration of 100 μM and IC_{50} value 34.9 μM.



3c

70% inhibition (100 μM), IC_{50}=34.9

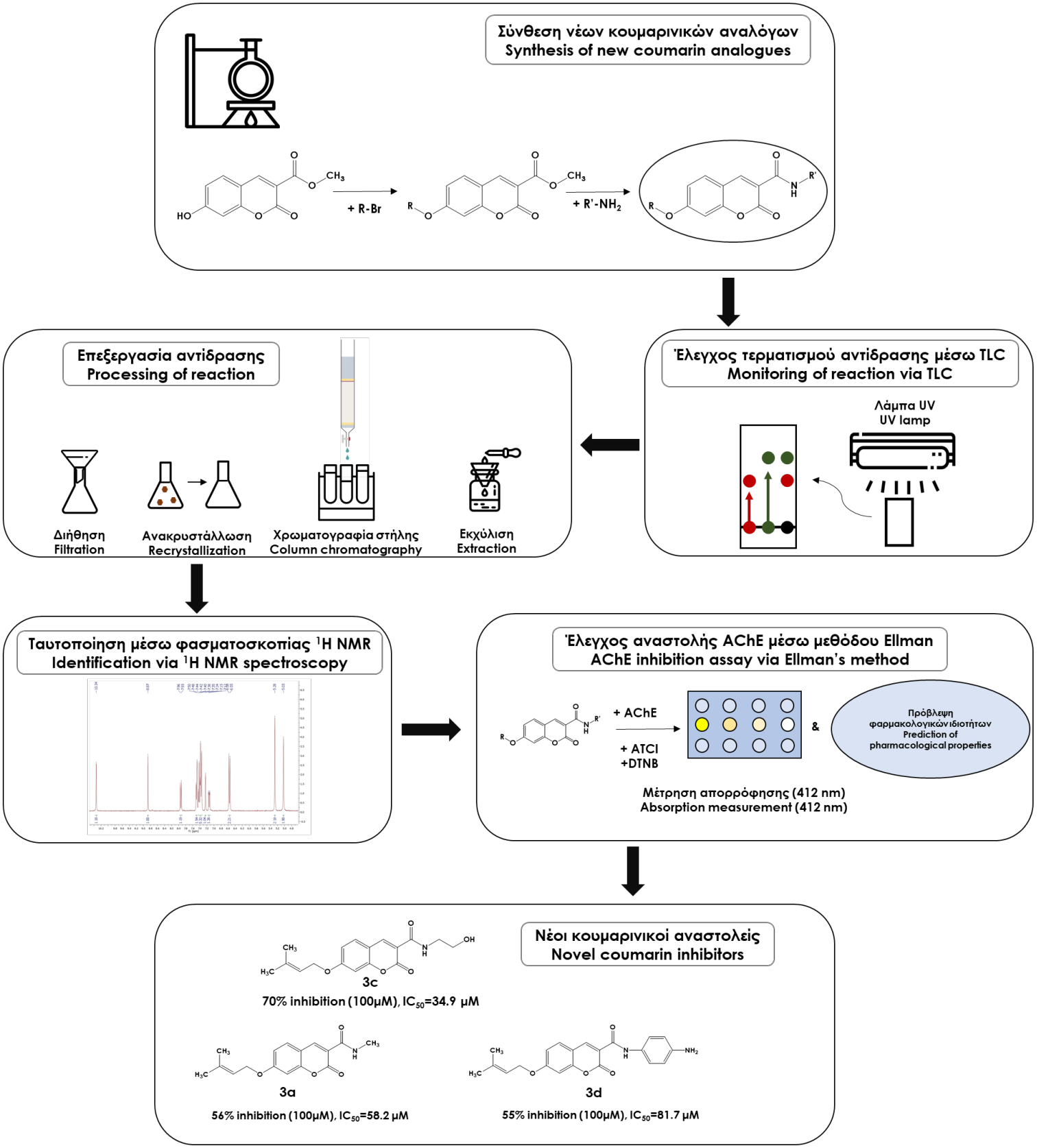
*Most potent inhibitor, compound **3c**.*

Finally, the pharmacokinetic properties of the synthesized compounds were predicted using computational models. The predictive results of Lipinski's Rule of 5, lipophilicity and blood-brain barrier permeability were promising, as no compound was found inappropriate for *per os* administration, while all except for one seemed to be able to permeate the blood-brain barrier and act in the Central Nervous System.

Scientific area: Pharmaceutical Chemistry, Organic Synthesis, Acetylcholinesterase Inhibition

Keywords: Coumarins, Hybrid Molecules, Carboxamides, Acetylcholinesterase Inhibitors, Alzheimer's Disease, Neuroprotective Activity

ΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ - GRAPHICAL ABSTRACT



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ 1

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 3

ABSTRACT 5

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 10

1. ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ 10
   - 1.1. Προέλευση κουμαρινών 10
   - 1.2. Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών 11
   - 1.3. Βιολογική δράση κουμαρινών 14
2. ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ (AChE) 25
   - 2.1. Ακετυλοχολίνη 26
   - 2.2. Δομή AChE 27
   - 2.3. Δράση AChE 30
   - 2.4. Νόσος Αλτσχάιμερ 30
3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ 33
   - 3.1. Υπάρχοντα φάρμακα-αναστολείς 33
   - 3.2. Κουμαρίνες ως αναστολείς της AChE 36
4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ 38
   - 4.1. Ανακάλυψη νέων φαρμάκων 38
   - 4.2. Υβριδικά μόρια 40
   - 4.3. Βασικοί ορισμοί και έννοιες 41
   - 4.4. Μνημονικός κανόνας των 5 του Lipinski 44

ΣΚΟΠΟΣ 46

ΣΥΝΘΕΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ 47

1. Σύνθεση καρβοξαμιδίων 47
2. Μηχανισμός σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson 49
3. Ταυτοποίηση των νέων ενώσεων 50
   - 3.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) 50
   - 3.2. Χαρακτηριστικά Φασμάτων NMR 52
4. Αξιολόγηση ικανότητας αναστολής της AChE 54

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 56

1. Όργανα και συσκευές οργανικής σύνθεσης 56
2. Σύνθεση καρβοξαμιδίων 58

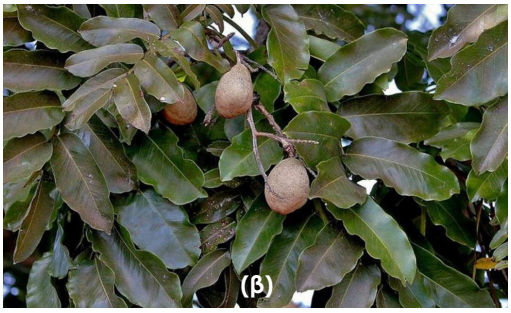
2.1. Σύνθεση 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-2Η-χρωμεν-2-όνης (1) 58
2.2. Γενική μέθοδος σύνθεσης 7-αλκοξυ κουμαρινικών παραγώγων (2a-2b) 58
2.3. Γενική μέθοδος σύνθεσης καρβοξαμιδίων (3a-3j) 60
3. Αναστολή AChE..... 66
3.1. Υλικά και όργανα 66
3.2. Πειραματική διαδικασία 67
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ 68
1. Φασματοσκοπική μελέτη 68
2. Αξιολόγηση δράσης των νέων ενώσεων ως αναστολείς της AChE..... 75
3. Πρόβλεψη φαρμακολογικών ιδιοτήτων 78
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 83
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ..... 85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 86
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ^{1}Η NMR..... 90
ΕΥΡΕΤΗΡΙΑ 99
1. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ..... 99
2. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ..... 101
3. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ 101
4. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ 101

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ

1.1. Προέλευση κουμαρινών

Οι κουμαρίνες αποτελούν μία μεγάλη τάξη φαινολικών ουσιών εντοπιζόμενων κυρίως σε φυτά. Απομονώθηκαν αρχικά από καρπούς τόνκα (tonka beans) του φυτού *Διπτέρυξ η εύοσμος* (*Dipteryx odorata*, του είδους *Coumarouna odorata*) από τον Vogel το 1820. Το όνομά τους οφείλεται στο γαλλικό *"coumarou"*, όρο της καθομιλουμένης για το φυτό προέλευσής τους.[1] Αρχικά ήταν γνωστές μόνο οι φυσικές κουμαρίνες, οι οποίες εντοπίστηκαν σε ένα ευρύ φάσμα εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών, τα οποία φαίνεται να έχουν θεραπευτικές εφαρμογές από το 1000 π.Χ. Πρώτα το 1936 έγινε αναφορά στις κουμαρίνες ως θεραπευτικούς παράγοντες από τον Von Werder, ενώ το 1958 ο Bose εξέδωσε μία σύνοψη της πλειονότητας των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Στα τέλη του 19ου αιώνα το ενδιαφέρον της επιστημονικής μελέτης στράφηκε στη φαρμακολογική τους δράση, αλλά και στην απομόνωση, το δομικό χαρακτηρισμό και τη σύνθεσή τους. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 1300 φυσικές κουμαρίνες.[1], [3]



Εικόνα 1: Tonka beans (α) και Dipteryx odorata (β).[i], [ii]

Τουλάχιστον 150 είδη κουμαρινών εντοπίζονται σε άνω των 30 είδη φυτών, κυρίως στις οικογένειες των *Εσπεριδοειδών* (*Rutaceae*), *Σελινοειδών* (*Umbelliferae*), *Ελαιοειδών* (*Oleaceae*) και *Νυκταγινιδών* (*Nyctaginaceae*). Πιο χαρακτηριστικά, βρίσκονται στο γρασίδι, στα τριφύλλια, στα ραδίκια και σε μεγαλύτερο ποσοστό σε φρούτα, λαχανικά, μούρα, ξηρούς καρπούς, στον καφέ, το πράσινο τσάι, το κρασί, στα αιθέρια έλαια κανέλλας και λεβάντας.[4] Τα διάφορα φυσικά κουμαρινικά παράγωγα αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και βρίσκονται σε αυτά σε ελεύθερη ή συζευγμένη μορφή (ως γλυκοζίτες). Συνήθως εντοπίζονται 5 έως 10 διαφορετικά είδη κουμαρινών σε ένα φυτό, αλλά μόνο ένας τύπος παραγώγου ανά είδος. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται σε όλα τα μέρη του φυτού, από τις ρίζες και το φλοιό έως τα κλαδιά και τους καρπούς, με την ποσότητα να ποικίλλει ανάλογα με τη φάση ανάπτυξής του: κάποια φυτά εμφανίζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κουμαρίνες όταν βλαστάνουν, ενώ σε νεαρότερα φύλλα η ποσότητα είναι μεγαλύτερη από ότι στα πιο γηραιά.[1] Περίπλοκες κουμαρίνες έχουν επίσης ταυτοποιηθεί ως μεταβολικά προϊόντα βακτηρίων και μυκήτων.[5]

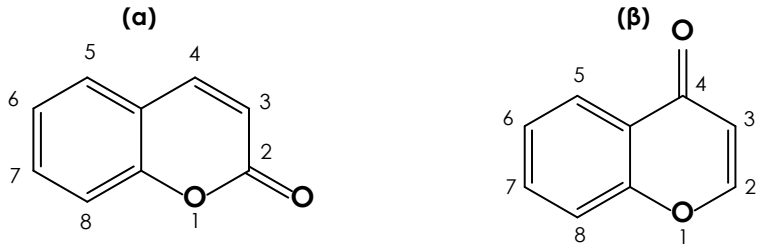
Παρά το γεγονός ότι οι κουμαρίνες είναι τόσο διαδεδομένες στα φυτά, ο ρόλος τους σε αυτά δεν είναι ακόμα τελείως ξεκάθαρος. Φαίνεται να επηρεάζουν τη βιοχημεία και τη φυσιολογία τους δρώντας ως αντιοξειδωτικά ή αναστολείς ενζύμων, αλλά και την ανάπτυξή τους, επιδρώντας στη δράση αυξητικών και ρυθμιστικών ορμονών. Ειδικότερα, έχει βρεθεί

ότι κουμαρίνες σε χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξεως 10^{-12}-10^{-4} mol/l) υποβοηθούν την ανάπτυξη των φυτών, ενώ σε υψηλότερες (της τάξεως 10^{-4}-10^{-2} mol/l) την καταστέλλουν. Για παράδειγμα, η απλή κουμαρίνη σε συγκέντρωση $1.3 \cdot 10^{-3}$ mol/l βρέθηκε ότι καταστέλλει την ανάπτυξη καλλιεργειών άλγης τύπου *Chlorella vulgaris*. Ο μηχανισμός που διέπει τη σχέση υποβοήθησης-καταστολής είναι ακόμα άγνωστος, με μία πιθανή εξήγηση να αποτελεί τη δυνατότητα των κουμαρινών να μεταβάλλουν τη διαπερατότητα και την ακαμψία των κυτταρικών μεμβρανών ή να επιδρούν σε διάφορα φυτικά ένζυμα. Επιπλέον, η σχέση αυτή ενδέχεται να είναι μια σχέση ισορροπίας, με τη δράση να είναι αντιστρεπτή όταν η κουμαρίνη απομακρύνεται. Επίσης, οι κουμαρίνες φαίνεται να συμβάλλουν στον έλεγχο της αναπνοής και της φωτοσύνθεσης, αλλά και να προστατεύουν τα φυτά ενάντια σε μικροοργανισμούς και ασθένειες.[1], [6]

Ως αποτέλεσμα της ευρείας διαθεσιμότητας των κουμαρινών στα φυτά, η περιεκτικότητά τους στην ανθρώπινη δίαιτα είναι υψηλή (ενδεικτικά: 1 g/d βενζοπυρόνες, κυρίως κουμαρίνες και φλαβονοειδή, περιέχονται στη μέση δυτική δίαιτα). Χάριν στην ευχάριστη μυρωδιά τους, οι κουμαρίνες χρησιμοποιούνταν ως αρωματικά σε τρόφιμα ή καλλυντικά σκευάσματα, με τη χρήση αυτή να περιορίζεται μετά από την ανακάλυψη της ηπατοτοξικής τους δράσης και να αντικαθίσταται από τη χρήση τους ως εντομοκτόνα. Έρευνες αναφέρουν ως TDI (*Tolerable Dose Intake*) της κουμαρίνης 0.1 mg/kg ανθρώπινου σώματος, με υψηλότερες ποσότητες να εγκυμονούν κίνδυνο για την υγεία. Για παράδειγμα, η υπερβολική κατανάλωση κινέζικης κανέλλας (*cassia cinnamon*) την περίοδο των Χριστουγέννων στη Γερμανία υπερέβη το όριο του TDI, δημιουργώντας κίνδυνο ηπατοτοξικής και καρκινογενετικής επίδρασης. Παράλληλα, βρέθηκε ότι η κατανάλωση κουμαρινών σε υψηλές δόσεις από πειραματόζωα οδήγησε σε τοξική δράση στο ήπαρ, καρδιαγγειακά προβλήματα, μέχρι και κώμα ή θάνατο, οδηγώντας στην απαγόρευση της χρήσης τους σε τρόφιμα στις ΗΠΑ. Παρόλα αυτά, οι παρατηρήσεις που αφορούν την τοξικότητα των κουμαρινών μέχρι στιγμής είναι αντικρουόμενες, με ανάγκη περαιτέρω τοξικολογικών, βιολογικών και φαρμακολογικών μελετών.[1]

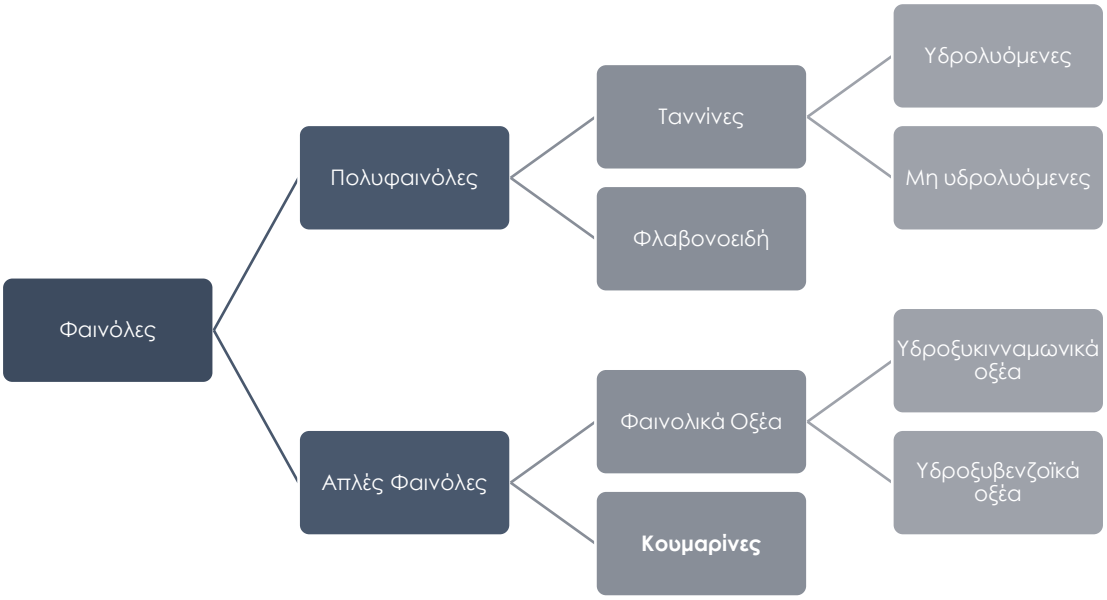
1.2. Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών

Οι κουμαρίνες ανήκουν στις βενζοπυρόνες, ετεροκυκλικές ενώσεις που προκύπτουν από τη σύζευξη ενός δακτυλίου α-πυρόνης με ένα βενζολικό δακτύλιο. Οι βενζοπυρόνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις βενζο-α-πυρόνες (ή κουμαρίνες) και τις βενζο-γ-πυρόνες (ή χρωμόνες), με τις τελευταίες να διαφέρουν από τις πρώτες μόνο στη θέση της καρβονυλικής ομάδας στον ετεροκυκλικό δακτύλιο.



Εικόνα 2: Χημική δομή βενζο-α-πυρονών (α) και βενζο-γ-πυρονών (β).

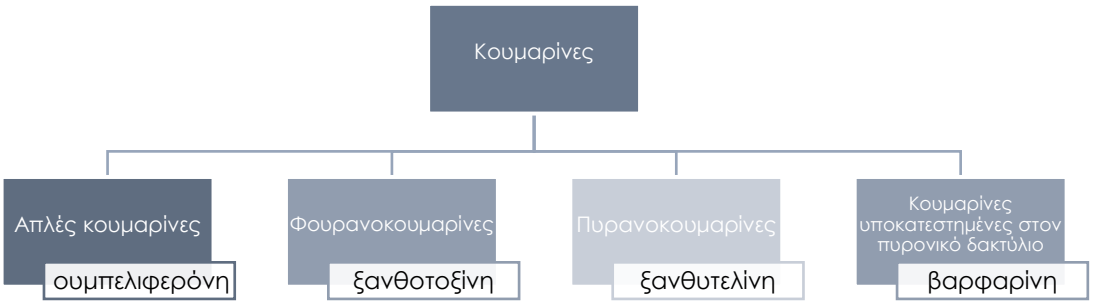
Αρχικά, η κουμαρίνη θεωρούταν παράγωγο του βενζοϊκού οξέος. Η σύνθεσή της όμως από τον Perkin από σαλικυλαλδεΰδη απέδειξε την προέλευσή της από το ο-υδροξυκινναμωμικό οξύ, καθιστώντας τις κουμαρίνες και τα παράγωγά τους μία ομάδα λακτονών προερχόμενη από τα κινναμωμικά οξέα.[7]



Διάγραμμα 1: Ταξινόμηση φαινολικών ενώσεων.

Η απλούστερη κουμαρίνη (**Εικόνα 2α***)* ονομάζεται επίσης κατά IUPAC *2H-χρωμεν-2-όνη* ή *1,2-βενζοπυρόνη*, ή ακόμα *2H-βενζοπυραν-2-όνη*. Έχει χαρακτηριστεί ως προνομιούχος δομικός σκελετός για τη φαρμακευτική χημεία, καθώς είναι δυνατή η υποκατάστασή της σε πολλά σημεία αλλά και η σύζευξη με άλλα μόρια, δίνοντας πληθώρα νέων κουμαρινών. Οι περισσότερες φαρμακολογικές και βιοχημικές μελέτες έχουν γίνει στην ίδια την κουμαρίνη και την *7-υδροξυ-κουμαρίνη*, τον κύριο μεταβολίτη της στον άνθρωπο.[1], [8]

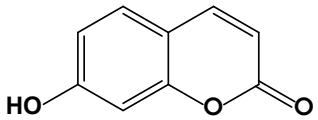
Οι κουμαρίνες ταξινομούνται ως εξής:



Διάγραμμα 2: Ταξινόμηση κουμαρινών και χαρακτηριστικότερες ενώσεις κάθε κατηγορίας.

1.2.1. Απλές κουμαρίνες

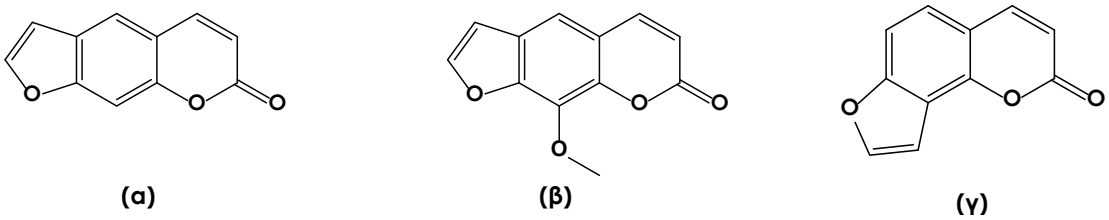
Οι απλές κουμαρίνες αποτελούνται από την ίδια την κουμαρίνη, τα υδροξυ-, αλκοξυ- και αλκυλο- υποκατεστημένα στο βενζολικό δακτύλιο παράγωγά της, καθώς και τους γλυκοζίτες τους. Η πιο κοινή απλή κουμαρίνη είναι η *7-υδροξυ-κουμαρίνη* ή ουμπελιφερόνη (*umbelliferone*), η οποία αποτελεί βιολογικό προκάτοχο πιο σύνθετων κουμαρινών. Η ουμπελιφερόνη βρίσκεται στα καρότα, τον κόλιανδρο και το βότανο αγγελική (*garden angelica*) και έχει χρησιμοποιηθεί σε αντηλιακά, καθώς και ως φθορίζουσα ουσία.[2], [9]



Εικόνα 3: Χημική δομή ουμπελιφερόνης.

1.2.2. Φουρανοκουμαρίνες

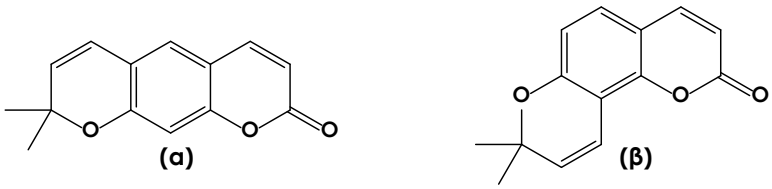
Οι φουρανοκουμαρίνες αποτελούν ομάδα κουμαρινών που περιέχουν έναν πενταμελή φουρανικό δακτύλιο συζευγμένο με τον κουμαρινικό πυρήνα. Ο δακτύλιος αυτός μπορεί να συνδεθεί γραμμικά όπως στα ψωραλένια, με μητρική ένωση το ψωραλένιο (*psoralen*) και χαρακτηριστικό παράδειγμα την ξανθοτοξίνη (*xanthotoxin*) ή υπό γωνία όπως στην αγγελικίνη (*angelicin*). Τα ψωραλένια αποτελούν φωτοευαίσθητες ενώσεις με τη δυνατότητα πρόκλησης δερματικών προβλημάτων σε ζώα που τρέφονται με τα φυτά τα οποία τα περιέχουν. Κάποια όμως ψωραλένια χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών δερματικών νόσων, όπως η ψωρίαση.[8], [9]



Εικόνα 4: Χημική δομή ψωραλενίου (α), ξανθοτοξίνης (β) και αγγελικίνης (γ).

1.2.3. Πυρανοκουμαρίνες

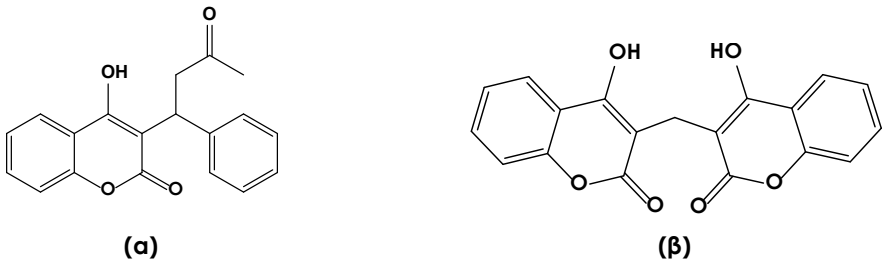
Οι πυρανοκουμαρίνες είναι παρόμοιες με τις φουρανοκουμαρίνες όσον αφορά τη δομή και τον τρόπο σύνδεσης του δακτυλίου, με τη διαφορά ότι πρόκειται για έναν εξαμελή πυρονικό δακτύλιο ο οποίος συνδέεται με τον πυρήνα της κουμαρίνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ξανθυλετίνη (*xanthyletin*-γραμμική σύνδεση) και η σεσελίνη (*seselin*-σύνδεση υπό γωνία).



Εικόνα 5: Χημική δομή ξανθυτελίνης (α) και σεσελίνης (β).

1.2.4. Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο

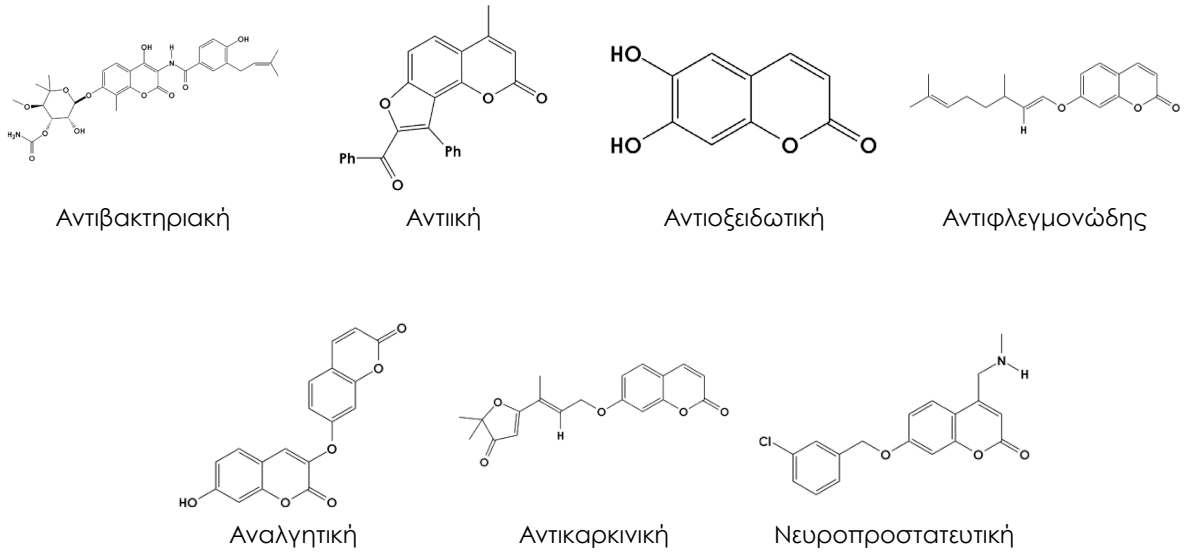
Στην κατηγορία αυτή απαντώνται κουμαρίνες υποκατεστημένες είτε στη θέση 3 είτε στη θέση 4 του πυρονικού δακτυλίου (είτε και στις δύο), καθώς και οι 3,4-συμπυκνωμένες κουμαρίνες και οι 4-υδροξυ-κουμαρίνες. Στην τελευταία κατηγορία ανήκει η βαρφαρίνη (*warfarin*), μία φυσική κουμαρίνη που απομονώθηκε από το γάλιο το αρωματικό (*woodruff*) και τη λεβάντα και χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό για την αποφυγή θρομβώσεων στις φλέβες, τους πνεύμονες και την καρδιά, αλλά και ως ποντικοφάρμακο. Η ανακάλυψη της δράσης της αυτής οφείλεται στη μελέτη των τάσεων αιμορραγίας βοοειδών που έπασχαν από δηλητηρίαση από γλυκό τριφύλλι (*sweet clover disease*). Η τοξικότητα του γλυκού τριφυλλιού οφείλεται σε μία άλλη κουμαρίνη της τάξης αυτής (υποκατεστημένη στη θέση 3), τη δικουμαρόλη (*dicoumarol*), η οποία χρησιμοποιείται επίσης ως αντιπηκτικό.[8], [9]



Εικόνα 6: Χημική δομή βαρφαρίνης (α) και δικουμαρόλης (β).

1.3. Βιολογική δράση κουμαρινών

Οι κυριότερες βιολογικές δράσεις των κουμαρινών, οι οποίες θα αναλυθούν εκτενέστερα στη συνέχεια, φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Διάγραμμα 3: Κυριότερες βιολογικές δράσεις κουμαρινών και δραστικότερες κουμαρίνες ανά κατηγορία.

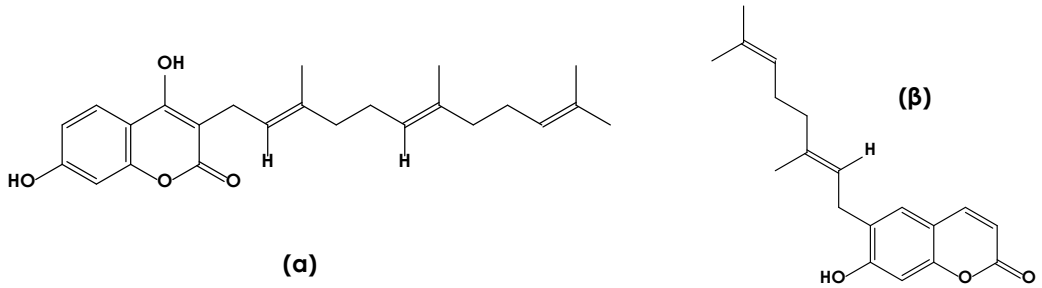
Επίσης, αξίζει να αναφερθεί η δράση τους ως οιστρογόνα, μαλακιοκτόνα, ηρεμιστικά, υπνωτικά και ως αντιπηκτικοί παράγοντες ή φωτοευαίσθητοι παράγοντες που συμβάλλουν σε δερματικές παθήσεις. Επιπλέον, έχουν αγγειοδιασταλτική, ανοσοκατασταλτική και υποθερμική δράση.[2], [8]

1.3.1. Αντιβακτηριακή δράση

Παρόλο που η ίδια η κουμαρίνη και η ουμπελιφερόνη δεν εμφανίζουν ιδιαίτερη δράση ενάντια σε βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς, πολλά φυσικά αλλά και συνθετικά κουμαρινικά παράγωγα εμφανίζουν μεγάλο εύρος αντιβακτηριακής δράσης.

Ειδικότερα, η δικουμαρόλη δρα κατά ορισμένων Gram + βακτηρίων όπως των *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus pyogenes* και *Pasteurella avicida*. Σύμφωνα με τον Cavallito και τους συνεργάτες του, η δράση της δικουμαρόλης έναντι Gram + βακτηρίων σχετίζεται με το λιπόφιλο χαρακτήρα της.[5]

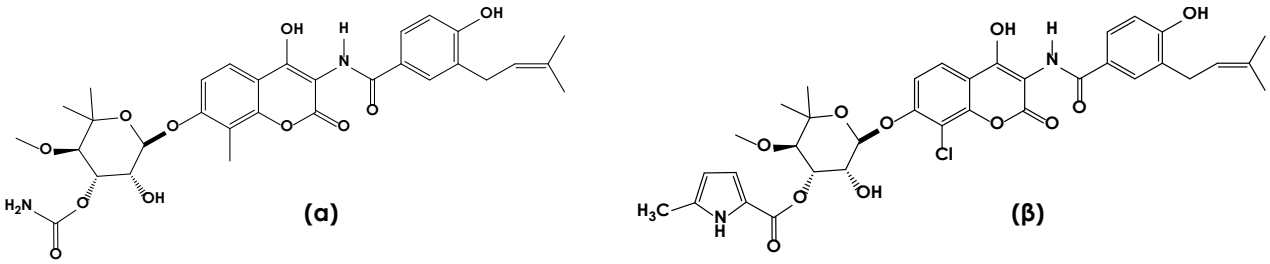
Τα φυσικά παράγωγα της ουμπελιφερόνης *3-φαρνεσυλο-4,7-διυδροξυ-κουμαρίνη* (*ammoresinol*) και *6-γερανυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη* (*ostruthin*) είναι δραστικά έναντι μεγάλου εύρους βακτηρίων, με το τελευταίο κυρίως εναντίον Gram + βακτηρίων. Η βακτηριοστατική τους δράση φαίνεται να οφείλεται στην πλευρική αλυσίδα ισοπρενίου που περιέχουν, με απλές ή άλλες αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες να μην επηρεάζουν την κατασταλτική δράση. Η υποκατάσταση όμως των υδρογόνων των υδροξυλομάδων της ammoresinol από ακετυλο-ομάδες βρέθηκε ότι μειώνει τη δραστικότητά της λόγω αργής υδρόλυσής της, ενώ η μεθυλίωση των υδροξυλίων οδηγεί σε ολική απώλεια της δράσης της. Επιπλέον, σύμφωνα με την ερευνητική ομάδα του Ukita, το συνθετικό παράγωγο *3-ακέτυλο-4-υδροξυ-κουμαρίνη* εμφανίζει σημαντική δράση ενάντια στον *Staphylococcus aureus* και το *Mycobacterium tuberculosis*. Με περαιτέρω έρευνα, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία της πλευρικής αλυσίδας στη θέση 3 είναι απαραίτητη για τη δραστικότητα, η οποία αυξάνεται με αύξηση του μήκους της, καθώς και ότι η δράση της 3-ακετυλο-αλυσίδας οφείλεται στην διακοπή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των βακτηρίων. Η πιο δραστική βακτηριοστατική κουμαρίνη της ομάδας αυτής βρέθηκε ότι είναι η *3-δεκανο-4-υδροξυ-κουμαρίνη*.[5]



Εικόνα 7: Χημική δομή ammoresinol (α) και ostruthin (β).

Τα πιο σημαντικά κουμαρινικά αντιβιοτικά είναι η νοβοβιοκίνη (*novobiocin*) και η χλωροβιοκίνη (*chlorobiocin*), των οποίων η δράση οφείλεται στην καταστολή της βακτηριακής DNA γυράσης. Είναι ιδιαίτερα δραστικά ενάντια σε μεγάλο εύρος κυρίως Gram + βακτηρίων, αναστέλλοντας και το ανθεκτικό προς τη μεθικιλλίνη στέλεχος του σταφυλόκοκκου (*Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus*). Ειδικότερα η νοβοβιοκίνη, αποτελεί την πρώτη αζωτούχα 4-υδροξυ-κουμαρίνη η οποία απομονώθηκε ως μεταβολίτης μύκητα, στην προκειμένη από τον *Streptomyces niveus*. Ακόμα έχουν εντοπιστεί παράγωγά της με καλή αντιβακτηριακή δράση, όπως η *4-αμινο-4,7-διυδροξυ-8-μεθυλο-κουμαρίνη*, τα αμιδικά παράγωγά αυτής και οι εστέρες της. Παρά τη σημαντική τους δράση, τα δύο αυτά κουμαρινικά αντιβιοτικά έχουν και κάποια μειονεκτήματα, τα οποία σχετίζονται με την περιορισμένη διαλυτότητά τους, την τοξικότητα και την ανάπτυξη αντίστασης των μικροοργανισμών προς αυτά. Για αυτό επιδιώκεται η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων

βασιζόμενων σε αυτά, τα οποία να καταστέλλουν την DNA γυράση αλλά να εμφανίζουν και καλή βιοδιαθεσιμότητα χωρίς τοξικότητα. Τα νέα αυτά συνθετικά μόρια περιέχουν τον κουμαρινικό σκελετό αλλά και ισοστερή όπως καρβοξυλικές ή βασικές αμιδικές ομάδες, μιμούμενα τη δομή και τη δράση της νοβοβιοκίνης αλλά εμφανίζοντας καλύτερο φαρμακευτικό προφίλ. Κατά τη μελέτη των συνθετικών αυτών κουμαρινών βρέθηκε ότι η ύπαρξη ελεύθερου υδροξυλίου στη θέση 6 του κουμαρινικού σκελετού συμβάλλει στην εμφάνιση αντιμυκητιακής δράσης, ενώ στη θέση 7 αντιβακτηριακής. Η υποκατάσταση με εστέρα ή καρβοξυλικό οξύ βρέθηκε ότι οδηγεί σε σημαντική δράση κατά Gram + αλλά και Gram - βακτήρια, ενώ η προσθήκη φαινολικών ομάδων υδροξυλίου ή καρβοξυλικού οξέος οδήγησε σε ενισχυμένη δράση ενάντια στο ελικοβακτήριο του πυλωρού.[3], [5]

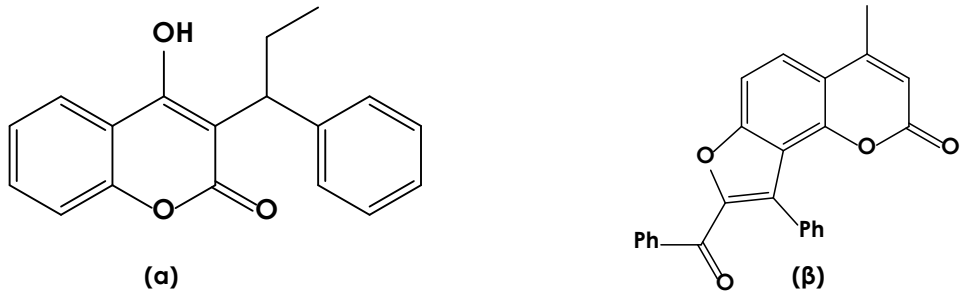


Εικόνα 8: Χημική δομή νοβοβιοκίνης (α) και χλωροβιοκίνης (β).

Άλλα κουμαρινικά ανάλογα με αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση είναι τα παράγωγα της 3-αμινο-κουμαρίνης, με τη βέλτιστη δράση να εμφανίζεται από την *3-αμινο-7,8-διυδροξυ-κουμαρίνη* ενάντια στο στέλεχος *Streptococcus pyogenes*. Από τις φουρανοκουμαρίνες οι πιο δραστικές ενώσεις είναι το ψωραλένιο και η ξανθοτοξίνη, οι οποίες καταστέλλουν το βάκιλο της φυματίωσης. Ένα ακόμα κουμαρινικό αντιβιοτικό είναι ο μεταβολίτης του *Streptomyces chartreusis* X-465A (*chartreusin*), το οποίο δρα ενάντια σε Gram + βακτήρια και μυκοβακτήρια, με μειονέκτημα όμως την εμφάνιση τοξικότητας σε περίπτωση συσσώρευσης. Τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι μεταξύ 17 φυσικών κουμαρινικών παραγώγων, τα ψωραλένια αποτελούν τις πιο δραστικές αντιμυκητιακές ουσίες.[5]

1.3.2. Αντιική δράση

Η αντιική δράση των απλών κουμαρινών αφορά κυρίως τον ιό HIV και επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της HIV-1 πρωτεάσης και ιντεγκράσης, ένζυμα απαραίτητα για την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών και τη σύνδεση του ιού με τον ξενιστή. Οι κουμαρίνες που δρουν κατά της HIV-1 πρωτεάσης αποτελούν ομάδα ικανών αντιικών φαρμάκων, με την *4-υδροξυ-3-(1-φαινυλοπροπυλο)-κουμαρίνη* (*phenprocoumon*) και τη βαρφαρίνη να αναφέρονται ως η πρώτη γενιά κουμαρινών με ανασταλτική δράση έναντι της πρωτεάσης του ιού.



Εικόνα 9: Χημική δομή phenprocoumon (α) και BPRHIV001 (β).

Ακόμα, το κουμαρινικό παράγωγο BPRHIV001 βρέθηκε ότι αναστέλλει την αντιγραφή του ιού. Σε αντίθεση με τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα AZT, EFV, τα οποία εμποδίζουν την αντιγραφή αναστέλλοντας την HIV-1 αντίστροφη μεταγραφάση, το BPR στοχεύει την πρωτεΐνη Tat του ιού, η οποία προσδένεται στο RNA και συμβάλλει στη μεταγραφή του. Το BPR μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης, περιορίζοντας σε σημαντικό βαθμό την αναπαραγωγή και άρα τη δράση του ιού. Έτσι, αποτελεί σημαντική υποψήφια ένωση-οδηγό για την ανάπτυξη νέων φαρμακομορίων κατά του ιού HIV.

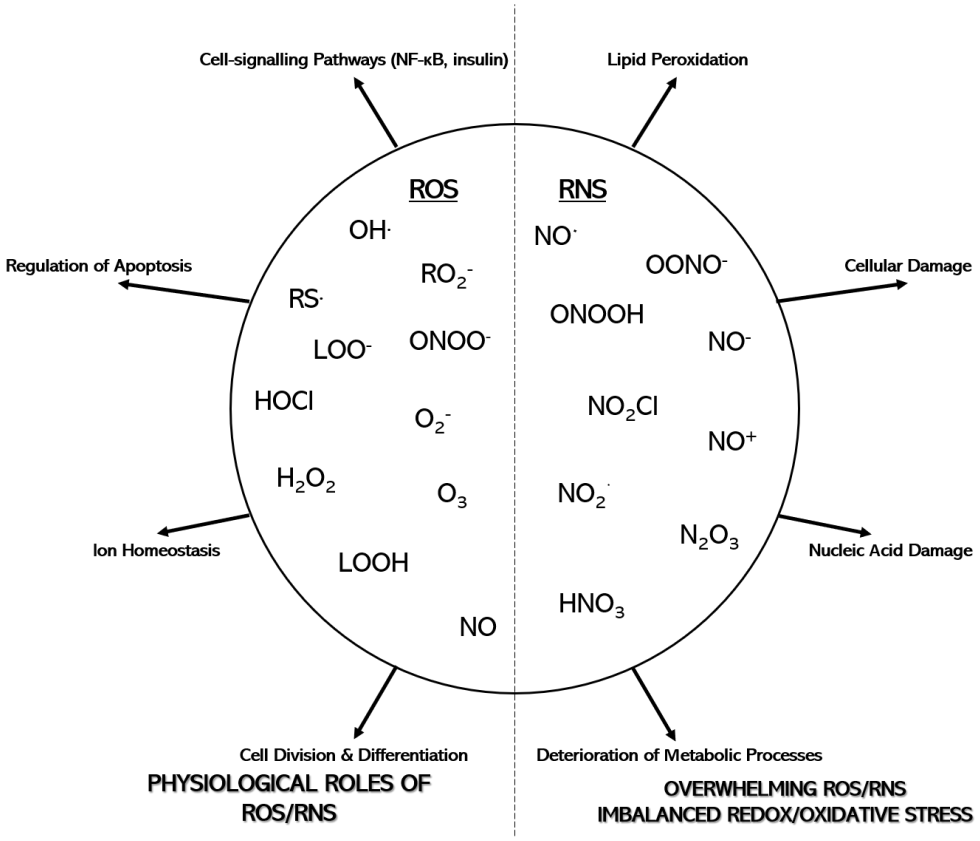
Ακόμα, από τα κουμαρινικά παράγωγα που εξετάστηκαν ως προς τη δράση τους κατά του ιού του έρπη (*Herpes Simplex Virus*), η *5,7,4'-τριυδροξυ-4-στυρυλο-κουμαρίνη* εμφάνισε την ισχυρότερη αντιική δράση.[3], [4]

1.3.3. Αντιοξειδωτική δράση

Η σταθερότητα ενός ζωντανού οργανισμού εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ σχηματισμού και καταστροφής ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα με ελεύθερα ηλεκτρόνια τα οποία προέρχονται από πληθώρα κανονικών και παθολογικών μεταβολικών μεταβολών, από απόκριση (χημική ή βιολογική) ενάντια σε μία ανεπιθύμητη εισβολή μέχρι και αντίδραση λόγω διαταραχής της ακεραιότητας των ιστών, που μπορεί να οφείλεται σε τραυματισμό ή κυτταρική βλάβη. Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών στον οργανισμό ξεκινούν από τις δραστικές μορφές (*reactive species*), οι οποίες περιλαμβάνουν συνήθως ένα άτομο οξυγόνου (*Reactive Oxygen Species*) ή αζώτου (*Reactive Nitrogen Species*), καθώς και ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο. Στην περίπτωση σχηματισμού περισσότερων δραστικών μορφών από τις απαιτούμενες για την αυτοάμυνα και οξειδοαναγωγική σηματοδότηση του οργανισμού, προκύπτει οξειδωτικό στρες το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτική κυτταρική βλάβη, έως και θάνατο. Η κυτταρική βλάβη επιτυγχάνεται από τις ελεύθερες ρίζες μέσω τροποποίησης των βιολογικών δράσεων

πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων και DNA, κάτι που επιτείνει το οξειδωτικό στρες και την καταστροφή των ιστών και μπορεί να οδηγήσει σε λύση του κυττάρου.

Η αρνητική δράση των δραστικών μορφών μπορεί να αποφευχθεί μέσω περιορισμού της σύνθεσης τους, ανασυνδυασμό (με παράγοντες δέσμευσης - *radical scavengers*) ή τροποποίηση της δράσης τους. Κατά τη μελέτη των βιολογικών δράσεων διαφόρων κουμαρινών, βρέθηκε ότι κατέχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ειδικά οι υδροξυ-κουμαρίνες αποτελούν παράγοντες δέσμευσης ελευθέρων ριζών και ισχυρά αντιοξειδωτικά που σταματούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.



Εικόνα 10: Θεμιτές και μη δράσεις των δραστικών μορφών στον οργανισμό.[10]

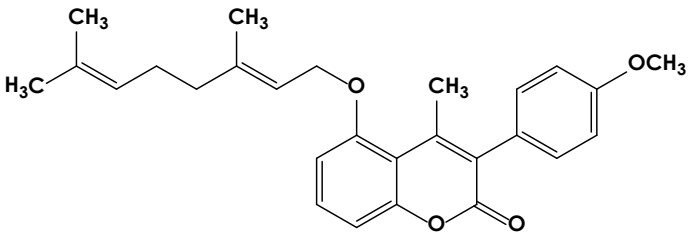
Η ίδια η κουμαρίνη εμφανίζει δράση κατά του νεφρικού οξειδωτικού στρες και τοξικότητας, τα οποία προέκυψαν από την ευνοημένη παραγωγή οξειδάσης της ξανθίνης, υπεροξειδίου του υδρογόνου και λιπιδικής υπεροξείδωσης από βρωμικό κάλιο σε ποντικούς Wistar. Επίσης σημαντική δράση έδειξε και η ουμπελιφερόνη, με καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vitro*, καθώς και αγγειοδιασταλτική δράση. Γενικά, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των μονοϋδροξυ- και διυδροξυ- κουμαρινών σχετίζονται με την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών και την αναστολή κινασών της τυροσίνης.

Κατά τη μελέτη φυσικών κουμαρινών ως προς την αντιοξειδωτική δράση, το κουμαρινικό παράγωγο *mansonone N* εντοπίστηκε ως το πιο ικανό προϊόν μεταξύ 11 ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές απομονώθηκαν από το ξύλο του φυτού *Mansonia gagei* και αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών με DPPH. Ακόμα, μελετήθηκαν κουμαρίνες από κινέζικα βότανα ως προς την ικανότητα αναστολής της υπεροξείδωσης λιπιδίων σε εγκέφαλο και νεφρά ποντικών. Από αυτές, η ξανθοτοξόλη εμφάνισε την ισχυρότερη δράση, με την

ελεύθερη ομάδα αρωματικού υδροξυλίου που περιέχει να φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο. Παρόλο που η αντιοξειδωτική δράση των κουμαρινών αποδίδεται κυρίως στην παρουσία ελεύθερων υδροξυλίων, έχει βρεθεί σημαντική αντιοξειδωτική δράση και σε περιπτώσεις όπου οι ομάδες αυτές είναι ακετυλιωμένες.[2], [6]

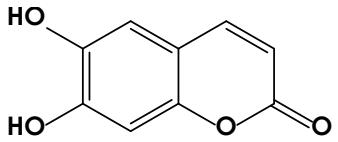
Έχουν επίσης μελετηθεί αρκετές συνθετικές κουμαρίνες ως προς τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Σε μία μελέτη σύγκρισης της αντιοξειδωτικής δράσης φλαβονοειδών με κουμαρίνες, εξήχθησαν συμπεράσματα για τη συσχέτιση δομής και ιδιοτήτων. Ειδικότερα βρέθηκε ότι η παρουσία υδροξυλίων στον κουμαρινικό πυρήνα εντείνει τη δραστικότητα, ενώ η υποκατάσταση με μεθοξυ-ομάδες στην ίδια θέση την εξαφανίζει. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε επρόκειτο για τη μελέτη της αναστολής της υπεροξείδωσης λιπιδίων προκαλούμενης από ιόντα δισθενούς ή τρισθενούς σιδήρου, ή από ελεύθερες ρίζες αζώτου σε λιπιδικό μεμβρανικό σύστημα. Οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν βάσει της ικανότητας των εξεταζόμενων ενώσεων να περιορίζουν την ένταση του φθορισμού ενός εξωτερικού αισθητήρα DPH-PA, με το φθορισμό να οφείλεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων.[6]

Οι λιποξυγενάσες (LOX) είναι ένζυμα που φέρουν σίδηρο και καταλύουν την οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινολεϊκό και το αραχιδονικό οξύ σε υδροϋπεροξείδια, με τους καταστολείς των ενζύμων αυτών να δρουν ως πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες φλεγμονών ή αλλεργιών που οφείλονται στη δράση των λιποξυγενασών. Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης, συντέθηκε μία σειρά υποκατεστημένων ακετυλοξυ-, υδροξυ- και γερανυλοξυ-κουμαρινών. Από αυτές δύο βρωμιωμένες ακετυλοξυ-κουμαρίνες, μια υδροξυ-κουμαρίνη μη υποκατεστημένη στο φαινολικό δακτύλιο και μία αζωτούχα γερανυλοξυ-κουμαρίνη διαπιστώθηκαν ως οι πιο δραστικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, βάσει της ικανότητάς τους να αναστέλλουν την *in vitro* λιπιδική υπεροξείδωση. Ακόμα, η *5-γερανυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη* βρέθηκε ως η πιο ικανή αναστολέας της λιποξυγενάσης σόγιας LOX-1, η οποία πρόκειται για μία πρότυπη ένωση που χρησιμοποιείται στη μελέτη των λειτουργικών και δομικών ιδιοτήτων των 15-LOX, οικογένειας λιποξυγενασών υπεύθυνων για φλεγμονώδη δράση.[11], [15] Εκτός από τα παραπάνω κουμαρινικά παράγωγα, έχουν βρεθεί και αρυλο-κουμαρίνες με ισχυρή ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξείδωσης και της λιποξυγενάσης σόγιας. Από αυτές, ως πιο δραστικές χαρακτηρίστηκαν πρενυλιωμένες 3-αρυλο-κουμαρίνες με μεθύλιο στη θέση 4. Αντίστοιχες θειοκουμαρίνες αποτελούν επίσης ικανούς αναστολείς λιποξυγενάσης, ενώ η προσθήκη υδραζονικών ομάδων στη θέση 3 δεν οδήγησε σε ανάλογη δράση, αλλά σε ικανότητα εύρεσης ελευθέρων ριζών DPPH.[12]



Εικόνα 11: Χημική δομή 5-γερανυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης.

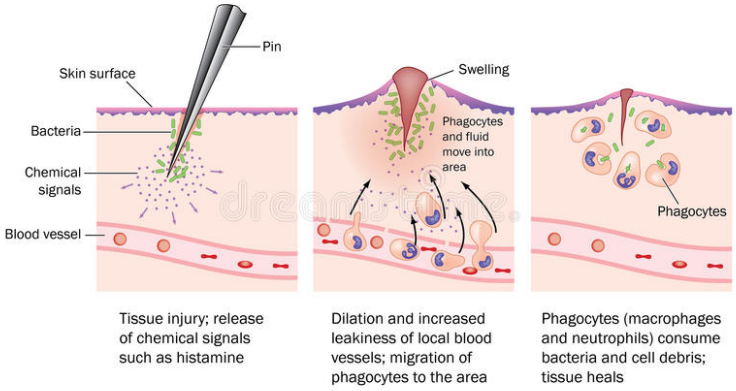
Η πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση εμφανίζεται στην κουμαρίνη *6,7-διυδροξυ-κουμαρίνη* (*esculetin*). Η δράση της διαπιστώθηκε από την ικανότητα περιορισμού ηπατοτοξικότητας *in vivo* και *in vitro*, με την τοξικότητα να προκαλείται από το ανάλογο λιπιδικού υπεροξειδίου t-BHP. Η ένωση αυτή προκαλεί υπεροξείδωση λιπιδίων καθώς μεταβολίζεται σε ελεύθερη ρίζα και οδηγεί σε συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου και άρα τοξικότητα. Ακόμα, κατά τη μελέτη καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας, η εσκουλετίνη και η 4-μεθυλο-εσκουλετίνη (*6,7-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη*) προστάτευσαν τα κύτταρα από κυτταροτοξικότητα προκαλούμενη από το υδροϋπεροξείδιο του λινολεϊκού οξέος.[6]



Εικόνα 12: Χημική δομή εσκουλετίνης.

1.3.4. Αντιφλεγμονώδης δράση

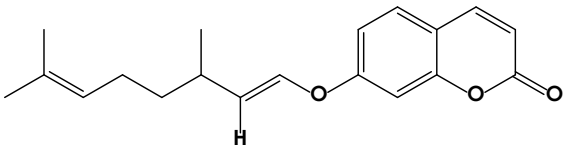
Η φλεγμονή αποτελεί παθοφυσιολογικό φαινόμενο κατά το οποίο χημικές ουσίες απελευθερώνονται στη ροή του αίματος με σκοπό την προστασία του οργανισμού από ξένες ουσίες, οδηγώντας σε ερυθρότητα, αύξηση θερμοκρασίας ή διόγκωση των ιστών και εμπλέκεται σε πολλές ασθένειες. Μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε καρκινογένεση, καθώς φλεγμονώδη κύτταρα ενδέχεται να εξελιχθούν σε κακοήθεις όγκους. Στα πλαίσια της μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων των κουμαρινών, έχουν βρεθεί πολλές φυσικές ή συνθετικές κουμαρίνες με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, με την υποκατάσταση στις θέσεις 4 και 7 να δίνουν την πιο ισχυρή δράση.[3], [13]



Εικόνα 13: Μηχανισμός φλεγμονής σε επιθηλιακά κύτταρα.[14]

Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλεγμονής στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι η ισχαιμία, κατά την οποία φλεγμονώδη κύτταρα συσσωρεύονται εντός των εγκεφαλικών ιστών, δημιουργώντας πληγή. Η ωραπτένη (*auraptene - 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη*) αποτελεί φυσικό κουμαρινικό παράγωγο που εντοπίζεται σε εσπεριδοειδή και εμφανίζει σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση στους περιφερειακούς ιστούς του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ένωση αυτή αναστέλλει τη φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλείται κατά το νευρωνικό θάνατο λόγω ισχαιμίας, κάτι πολύ σημαντικό καθώς πολλοί ασθενείς με ισχαιμία πάσχουν

από νοητικές δυσλειτουργίες ως αποτέλεσμα του θανάτου των νευρικών κυττάρων. Επομένως, η ωραπτένη αποτελεί πιθανή ένωση-οδηγό για μελλοντικά νευροπροστατευτικά φάρμακα.[13]



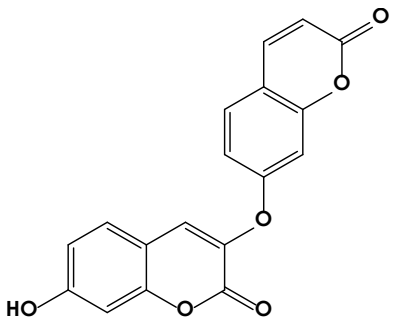
Εικόνα 14: Χημική δομή ωραπτένης.

Η ίδια η κουμαρίνη εμφάνισε ικανή δυνατότητα μείωσης οιδήματος σε ποντικούς, ενώ η ουμπελιφερόνη βρέθηκε αδρανής. Μελέτες *in vivo* με την αναπαραγωγίσιμη μέθοδο τεχνητού οιδήματος από TNBS (*2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid*), το οποίο προκαλεί οξεία εξέλκωση του παχέος εντέρου και φλεγμονή σε ποντίκια, διαπίστωσαν ότι υπάρχει εύρος κουμαρινών με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (όπως η *6,7-διυδροξυ-κουμαρίνη*, οι 3-αρυλο-κουμαρίνες και πολλά πρενυλιωμένα παράγωγα), οι οποίες φαίνεται να σχετίζονται και με την αντιοξειδωτική τους δράση. Τέλος, από συνθετικές κουμαρίνες, η *3-[(3,4-διχλωρο)-βενζυλιδενο-αμινο]-κουμαρίνη* χαρακτηρίστηκε από τον Maddi ως η πιο δραστική, με δράση ανάλογη με αυτή της ασπιρίνης σε μελέτη φλεγμονής ποντικιών από οξικό οξύ, αλλά φάνηκε να είναι αδρανής σε άλλες μεθόδους αξιολόγησης της αντιφλεγμονώδους δράσης.[4], [8]

1.3.5. Αναλγητική δράση

Οι απλές κουμαρίνες έχουν μέχρι στιγμής δώσει διαφορετικά αποτελέσματα ως προς την αναλγητική τους δράση, με τη δικουμαρόλη και την *4-υδροξυ-κουμαρίνη* να μην εμφανίζουν σημαντική αναλγητική δράση σε *in vivo* ελέγχους, αλλά την ίδια την κουμαρίνη να εμφανίζει ισχυρή δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα βατράχων, ποντικών και κουνελιών.[1], [5]

Μελέτη που διεξήχθη από τον Ito και τους συνεργάτες του[2] ως προς την αναλγητική και υπνωτική ικανότητα των κουμαρινών έδωσε ορισμένα συμπεράσματα για τη σχέση δομής-δράσης. Ειδικότερα, αποφάνθηκαν ότι ο διπλός δεσμός μεταξύ θέσεων 3 και 4 είναι απαραίτητος για τη δραστικότητα, καθώς και ότι τα αιθυλο-καρβοξυλικά παράγωγα των κουμαρινών εμφάνισαν τη μεγαλύτερη δράση, με τη μέγιστη να εντοπίζεται στο καρβοξαμίδιο που προέκυψε από το 3-κουμαρινικό καρβοξυλικό οξύ και τη διαιθυλαμίνη. Επίσης ο Kitagawa και οι συνεργάτες του[2] παρατήρησαν ότι άρτιος αριθμός των ανθράκων αλκυλικής πλευρικής αλυσίδας στη θέση 3 του κουμαρινικού σκελετού οδηγεί σε υπνωτική δράση, ενώ περιττός οδηγεί σε τοξικότητα, με μέγιστη δραστικότητα να εμφανίζει η αιθυλομάδα. Ομάδες κουμαρινικών αιθέρων εμφανίζουν επίσης αναλγητική δράση, με την ισχυρότερη δράση να εμφανίζεται από 3 φυσικές κουμαρίνες απομονωμένες από το φυτό *Edgeworthia chrysantha L.*, την *7-υδροξυ-3-(2-οξο-χρωμεν-7-υλ)-οξυχρωμεν-2όνη* (*edgeworin - EdN*) και τα παράγωγά της τύπου A και C (*EdeA*, *EdeC*).[2]



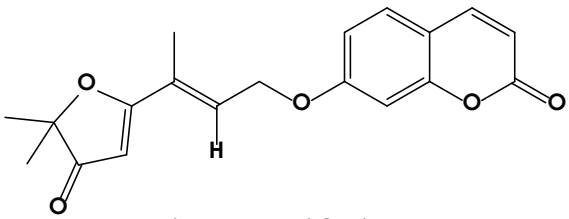
Εικόνα 15: Χημική δομή EdN.

1.3.6. Αντικαρκινική δράση

Η δράση των κουμαρινών ενάντια σε όγκους ανθρώπινων κυττάρων μελετήθηκε πρώτη φορά για την απλή κουμαρίνη και την ουμπελιφερόνη από τον Weber. Στη συνέχεια, η χρήση τους σε χημειοθεραπείες άρχισε συνδυαστικά με το άλας του νατρίου της βαρφαρίνης σε καρκινικά κύτταρα, λεμφοκύτταρα και μακροφάγα από διάφορα πειραματόζωα και οι κλινικές δοκιμές έδειξαν δράση κατά διαφορετικών ειδών καρκίνου όπως καρκίνου του προστάτη, κακοήθες μελάνωμα και μεταστατικό καρκίνωμα νεφρών. Οι χημειοθεραπείες χρησιμοποιούν συχνά κυτταροτοξικές ενώσεις οι οποίες παρεμποδίζουν τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης, αποτρέποντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων.

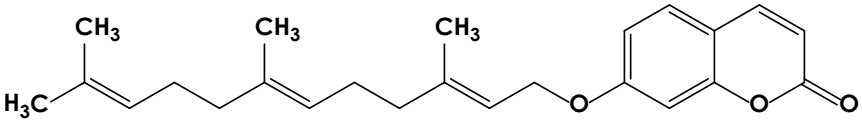
Έχουν γίνει διάφορες υποθέσεις για τον τρόπο δράσης των κουμαρινικών παραγώγων ενάντια σε καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η *4-υδροξυκουμαρίνη* φαίνεται να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης σε διάφορες πρωτεΐνες κυττάρων μελανώματος, ενώ η *7-υδροξυκουμαρίνη* αναστέλλει την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (*Myocine Light Chain Kinase*), προκαλώντας τυχαία κατανομή χρωμοσωμάτων στη μετάφαση και καταστέλλοντας τη μίτωση των κυττάρων. Η μελέτη της *in vitro* δράσης της *4-υδροξυκουμαρίνης* την ανέδειξε ως ένα χρήσιμο ανοσοενισχυτικό για τη θεραπεία του μελανώματος, ενώ υδροξυ-κουμαρίνες με αζωτούχα ομάδα στον αρωματικό δακτύλιο φαίνεται να είναι εκλεκτικοί αντι-πολλαπλασιαστικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την απόπτωση σε νεφρικά κύτταρα καρκινώματος μέσω τροποποίησης πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από τη μίτωση (*Mitogen-activated Protein Kinases*).[2], [3] Ακετυλοξυ-κουμαρίνες αναδείχθηκαν ως ικανοί κυτταροτοξικοί παράγοντες, με τη δραστικότητά τους να οφείλεται στη βελτίωση της λιποφιλίας και της ικανότητας διέλευσης από μεμβράνες χάρη στην παρουσία βρωμίου στο φαινολικό δακτύλιο.[11], [15]

Από τα κουμαρινικά παράγωγα που ελέγχθηκαν για την αντικαρκινική τους δράση, η *geiparvarin* εμφάνισε σημαντική κυτταροτοξική δράση *in vitro*. Αποτελεί φυσική κουμαρίνη που απομονώθηκε από τα φύλλα του φυτού *Geijera Parviflora Lindl*. Ο σκελετός της αποτελείται από 3 τμήματα: μια 3(2H)-φουρανόνη, ένα μη κορεσμένο αλκενυλοξυ-υποκαταστάτη και τον κουμαρινικό σκελετό. Το πρώτο τμήμα είναι απαραίτητο για τη δράση, καθώς φαίνεται να δρα ως παράγοντας αλκυλίωσης πυρηνόφιλων ατόμων σε αντιδράσεις τύπου Michael. Χάρη στην ικανή της δράση, συντέθηκαν και παράγωγά της ούτως ώστε να βρεθούν τα δομικά χαρακτηριστικά τα οποία οδηγούν στην *in vitro* κυτταροτοξική δράση.[3]



Εικόνα 16: Χημική δομή geiparvin.

Έχουν επίσης εντοπιστεί κουμαρινικά παράγωγα με καλές λειτουργίες στη φαρμακοθεραπεία του καρκίνου του μαστού. Μία σειρά αλκοξυ-κουμαρινών συντέθηκε και μελετήθηκε ως προς την κυτταροτοξικότητά τους ενάντι κυττάρων ενδοπορικού καρκινώματος, το οποίο αποτελεί την πιο κοινή περίπτωση κακοήθειας στο μαστό. Η πιο ισχυρή κυτταροτοξική δράση εντοπίστηκε στην ωραπτένη, ενώ οι μελετούμενες ενώσεις δεν εμφάνισαν τοξικότητα σε υγειείς ινοβλάστες. Ακόμα, οι νέες αυτές ενώσεις μελετήθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, υπό τις οποίες τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχύτερα, με την ουμπελιπρενίνη (*umbelliprenin - 7-φαρνεσυλοξυ-κουμαρίνη*) να αποτελεί την πιο δραστική κουμαρίνη υπό τις συνθήκες αυτές. Τα δεδομένα της μελέτης αυτής υποδεικνύουν ότι οι αλκοξυ-κουμαρίνες αποτελούν μια σειρά ισχυρών ενώσεων-οδηγών για μελλοντικές θεραπείες μεταστατικών όγκων.[15]



Εικόνα 17: Χημική δομή ουμπελιπρενίνης.

Σε μελέτη της δράσης της ουμπελιφερόνης και των φυσικών και συνθετικών πρενυλοξυ- και γερανυλοξυ- παραγώγων της ενάντια σε σειρά κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2, η ωραπτένη αναδείχθηκε ως η πιο δραστική κουμαρίνη και στις δύο περιπτώσεις. Άλλες υποψήφιες ενώσεις οδηγοί για τη θεραπεία του νευροβλαστώματος είναι η *4-μεθυλο-ωραπτένη*, η ουμπελιπρενίνη και η *4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνη*, καθώς εμφάνισαν ισχυρή κυτταροτοξική δράση ενάντια στα κύτταρα SK-N-SH. Η *4-μεθυλο-ωραπτένη* εμφανίζει επίσης κυτταροτοξική δράση ενάντια στα κύτταρα HepG2, σε αντίθεση με τα λοιπά κουμαρινικά παράγωγα που εξετάσθηκαν. Τα παραπάνω ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αλκυλίωση της υδροξυλομάδας της θέσης 7 οδηγεί σε σημαντική βελτίωση της κυτταροτοξικής δράσης των κουμαρινών.[16]

Άλλες κουμαρίνες με αντικαρκινική δράση είναι η εσκουλετίνη και η *6-νιτροκουμαρίνη*.[2] Η κουμαρίνη phenprocoumon βρέθηκε ότι αναστέλλει τη δημιουργία αυθόρμητων μεταστάσεων στους πνεύμονες πειραματοζώων, ενώ η παρουσία πολικών υποκαταστατών στις θέσεις 3, 4 και 7 του κουμαρινικού σκελετού αναστέλλει τη μεταλλαξιογένεση. Γενικά, τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες για την τροποποίηση των ήδη υπαρχόντων δομών προς καλύτερη δράση, καθώς και την ταυτοποίηση νέων υποψηφίων φαρμάκων από μόρια που βασίζονται δομικά στην κουμαρίνη.[1], [3]

1.3.7. Νευροπροστατευτική δράση

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως οι νόσοι Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον, είναι πλέον κοινές στις μεγαλύτερες ηλικίες λόγω αύξησης του προσδόκιμου ηλικίας, καθιστώντας απαραίτητη την εύρεση νέων φαρμάκων για την αντιμετώπισή τους. Οι φυσικές και συνθετικές κουμαρίνες αποτελούν τάξη ενώσεων με νευροπροστατευτική δράση, με αγνώστους όμως μηχανισμούς δράσης μέχρι στιγμής.

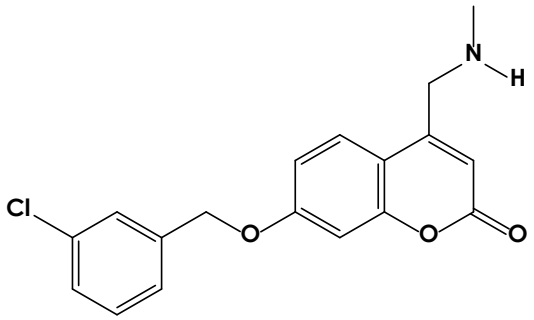
Η δράση αυτή των κουμαρινών εντοπίζεται αρχικά στα φυτά. Ειδικότερα, εκχύλισμα 1-βουτανόλης από ρίζα του φυτού αγγελική το οποίο περιέχει κουμαρίνες, βρέθηκε ότι προστατεύει τα κύτταρα του φλοιού από τοξικότητα οφειλόμενη στο ανιόν του γλουταμινικού οξέος, η οποία χρησιμοποιείται ως μοντέλο στη μελέτη πολλών νευροεκφυλιστικών νόσων. Πυρανοκουμαρίνες (όπως η *decursinol*), διυδρο-φουρανοκουμαρίνες (όπως η *marmesin*) και απλές κουμαρίνες (όπως η ουμπελιφερόνη και η εσκουλετίνη) έχουν ταυτοποιηθεί ως νευροπροστατευτικές ενώσεις, με τη δραστικότητα να φθίνει με αυτή τη σειρά. Επίσης οι πρενυλοξυ-κουμαρίνες εμφανίζουν ικανή νευροπροστατευτική δράση και φαίνεται να είναι σημαντικές υποψήφιες ενώσεις-οδηγοί για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά νευροεκφυλιστικών ασθενειών.[4]

Η ακετυλοχολινεστεράση (*acetylcholinesterase* - AChE) αποτελεί ένζυμο υπεύθυνο για την καταλυτική υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, τερματίζοντας τη συναπτική διαβίβαση και οδηγώντας σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα (όπως Αλτσχάιμερ). Η αναστολή της δράσης της AChE επαναφέρει τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης στους νευρώνες. Κουμαρινικά παράγωγα αποτελούν ομάδα μορίων που δρουν ως αναστολείς της AChE, ειδικότερα όταν αυτά συνδυάζονται με ήδη γνωστούς αναστολείς του ενζύμου σε υβριδικά μόρια.

Η μονοαμινοξειδάση (*monoamine oxidase* - MAO) αποτελεί ένζυμο υπεύθυνο για την οξειδωτική απαμίνωση μονοαμινο-νευροδιαβιβαστών. Η δυσλειτουργία της, ή η ύπαρξη σε υψηλότερα ή χαμηλότερα επίπεδα από το κανονικό σχετίζονται με παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως σχιζοφρένεια, κατάθλιψη και άλλες διαταραχές. Διακρίνονται δύο κατηγορίες του ενζύμου, τύπου α και β, ως προς την εκλεκτικότητα προς τα υποστρώματα και την ευαισθησία τους σε αναστολείς. Εκλεκτικοί αναστολείς της MAO-α χρησιμοποιούνται ως αντικαταθλιπτικά, ενώ MAO-β μαζί με λεβοντόπα στη θεραπεία της νόσου Πάρκινσον.

Η χρήση συνθετικών κουμαρινών ως αναστολείς της MAO έγινε πρώτη φορά το 1994, με τις 7-αρυλαλκοξυ-κουμαρίνες και τις 7-αρυλοσουλφονυλοξυ-κουμαρίνες να δρουν ως αναστολείς υψηλής εκλεκτικότητας της MAO- α και β. Για την αναστολή της MAO-α παρατηρήθηκε ότι συσχετίζεται με υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις, ενώ της MAO-β με λιπόφιλες. Η υποκατάσταση στις θέσεις 3 ή 4 του κουμαρινικού σκελετού με μεθύλιο ή άλλες μικρές ομάδες οδήγησε σε αύξηση της δραστικότητας των κουμαρινών ενάντια στη MAO-β. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από μοντέλα docking και QSAR ανέδειξε την εξαιρετική αλληλεπίδραση της *7-[(3-χλωροβενζυλ)οξυ]-4-[(μεθυλαμινο)μεθυλο-κουμαρίνης* με τη MAO-β. Όσον αφορά φυσικές κουμαρίνες, η *geiparvarin* και τα παράγωγά της επίδειξαν εξίσου καλή δράση κατά της MAO-β. Γενικά, η χρήση υπολογιστικών μεθόδων και δεδομένων από δομές ακτινών X ήδη υπάρχοντων αναστολέων, καταδεικνύει τη

δυνατότητα μελλοντικής σύνθεσης αναστολέων ΜΑΟ-α και -β υψηλής εκλεκτικότητας με βάση την κουμαρίνη.[1]

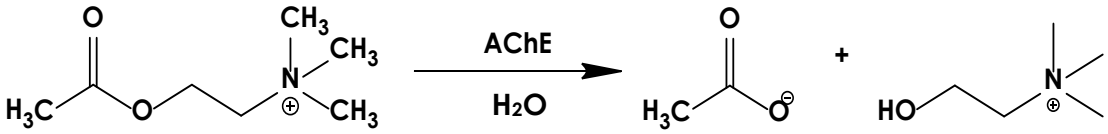


Εικόνα 18: Χημική δομή 7-[(3-χλωροβενζυλ)οξυ]-4-[(μεθυλαμινο)μεθυλο-κουμαρίνης.

2. ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ (AChE)

Η ακετυλοχολινεστεράση ανήκει στις α/β υδρολάσες, μια οικογένεια πρωτεϊνών που χαρακτηρίζεται από κοινή δομή και περιλαμβάνει τις χολινεστεράσες, τις καρβοξυλεστεράσες και τις λιπάσες. Οι χολινεστεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη σε χολίνη και οξικό οξύ, μια αντίδραση απαραίτητη ώστε οι χολινεργικοί νευρώνες να επιστρέψουν σε κατάσταση ηρεμίας κατόπιν της ενεργοποίησής τους. Η ακετυλοχολινεστεράση εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με τη βουτυρυλοχολινεστεράση, ενώ επίσης εμφανίζει σημαντική ομολογία με αρκετές μη ενζυμικές πρωτεΐνες όπως η νευρολιγνίνη και η θυρογλοβουλίνη.

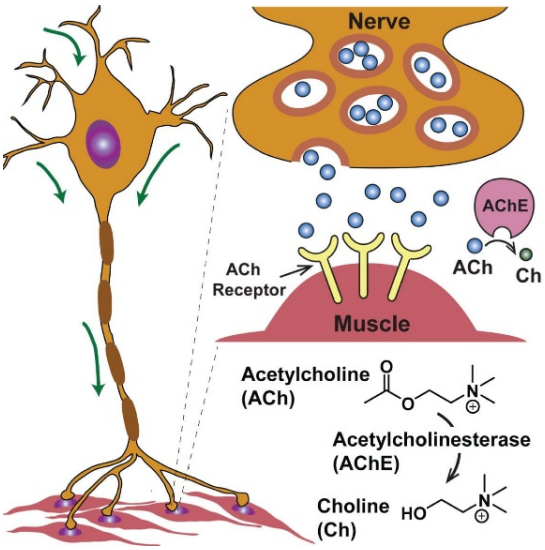
Η ίδια η ακετυλοχολινεστεράση εντοπίζεται σε όλα τα θηλαστικά και κάποιες οικογένειες ασπόνδυλων, ενώ υπάρχουν επίσης αναφορές σε πρωτεΐνες ανάλογές της σε φύκη, το πρωτόζωο παραμήκιο και τη μούχλα *Dictyostelium.* Ειδικότερα, η ανθρώπινη ακετυλοχολινεστεράση εντοπίζεται σε πολλούς τύπους ιστών όπως νευρικοί, μυϊκοί, κεντρικοί και περιφερειακοί εγκεφαλικοί ιστοί, χολινεργικά και μη ινίδια, ή άλλα ινίδια που ελέγχουν την κίνηση και τις αισθήσεις. Η δράση της ακετυλοχολινεστεράσης είναι εντονότερη σε κινητικούς παρά σε αισθητικούς νευρώνες, ενώ βρίσκεται επίσης σε μεμβράνες ερυθροκυττάρων. Το ένζυμο εντοπίζεται σε πολλαπλές μοριακές μορφές, οι οποίες διαθέτουν παρόμοιες καταλυτικές ιδιότητες αλλά διαφέρουν στην ολιγομερή σύσταση και τον τρόπο κατά τον οποίο προσδένονται σε κυτταρικές επιφάνειες. Αντίθετα, η βουτυρυλοχολινεστεράση (ή αλλιώς *ψευδοχολινεστεράση* ή *χολινεστεράση του πλάσματος*) εντοπίζεται κυρίως στο πλάσμα και το συκώτι και η διαφορά της από την ακετυλοχολινεστεράση έγκειται στο γεγονός ότι καταλύει τη βουτυρυλοχολίνη ταχύτερα από ότι την ακετυλοχολίνη. Η βουτυλοχολινεστεράση γενικά ευθύνεται για την υδρόλυση διαφόρων εστέρων, μια ιδιότητα η οποία έχει μελετηθεί προς την κατανόηση μιας σειράς μεταβολικών φαινομένων με σκοπό την εύρεση νέων θεραπειών, όπως για παράδειγμα τη θεραπεία του εθισμού στην κοκαΐνη. Επίσης έχει μελετηθεί εκτενώς λόγω της στοιχειομετρικής της αντίδρασης με οργανοφωσφορικές ενώσεις, κάτι που την καθιστά βιολογικό δείκτη έκθεσης σε τοξικά χημικά, αλλά και πιθανή θεραπεία της μέθης, με δράση ως βιολογικό ανιχνευτή νευρικών παραγόντων.[17], [18], [19]



Σχήμα 1: Υδρόλυση ακετυλοχολίνης από την ακετυλοχολινεστεράση.

2.1. Ακετυλοχολίνη

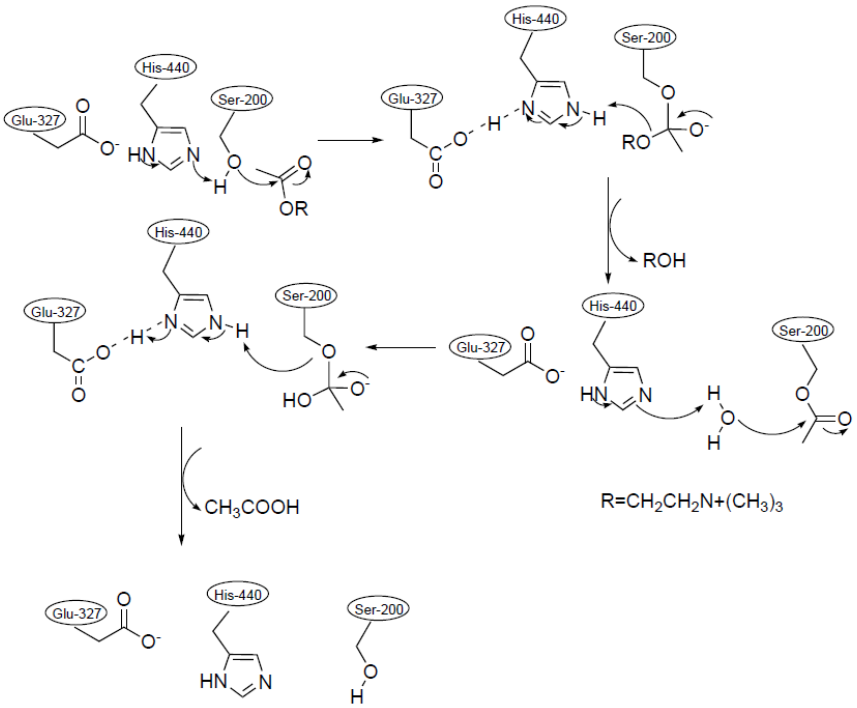
Η ακετυλοχολίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής εντοπιζόμενος στους νευρομυικούς κόμβους του Περιφερειακού Νευρικού Συστήματος, μεταξύ των κινητικών νεύρων και των σκελετικών μυών. Ως χολινεργικοί χαρακτηρίζονται οι νευρώνες που χρησιμοποιούν την ακετυλοχολίνη ως νευροδιαβιβαστή. Στο Κεντρικό Νευρικό σύστημα, η ακετυλοχολίνη εντοπίζεται κυρίως στους διαμεσολαβητικούς νευρώνες, ενώ έχουν εντοπιστεί και άλλα χολινεργικά μονοπάτια. Άξια αναφοράς είναι η χολινεργική προβολή από το βασικό νευρώνα του Maynert (στο βασικό πρόσθιο εγκέφαλο) στο ανώτερο επίπεδο του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, με τον εκφυλισμό της οδού αυτής να οδηγεί σε παθογένειες του Νευρικού Συστήματος. Οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης διακρίνονται σε νικοτινικούς και μουσκαρινικούς, με τους πρώτους να ανταποκρίνονται στη νικοτίνη και τους δεύτερους στη μουσκαρίνη. Οι νικοτινικοί συνδέονται με ιονοτροπικά προσδέματα και δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και τους νευρομυικούς κόμβους, ενώ οι μουσκαρινικοί συνδέονται με G-πρωτεΐνες και δρουν στο Περιφερειακό και Κεντρικό Νευρικό σύστημα.



Εικόνα 19: Κύκλος ζωής της ακετυλοχολίνης στον νευρομυικό κόμβο.[iii]

Η σύνθεση της ακετυλοχολίνης γίνεται μέσω μιας αντίδρασης ενός σταδίου, καταλυόμενης από το βιοσυνθετικό ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης. Η παρουσία του ενζύμου αυτού αποτελεί ένδειξη ότι ένας νευρώνας είναι χολινεργικός. Η πλειονότητα της ακετυλοχολίνης στις νευρικές απολήξεις περιέχεται σε διάφανες κύστες μήκους 100 nm, ενώ μία μικρή ποσότητα είναι ελεύθερη στο κυτταρικό υγρό. Η πρόσληψη της ακετυλοχολίνης στις κύστες αυτές προς αποθήκευσή της επιτυγχάνεται μέσω μιας αντλίας.

Κατά τη νευροδιαβίβαση, η ακετυλοχολίνη απελευθερώνεται από το νεύρο προς τη συναπτική σχισμή και προσδένεται στους διάφορους υποδοχείς της στην μετα-συναπτική μεμβράνη, μεταφέροντας το σήμα. Η ακετυλοχολινεστεράση, η οποία επίσης εντοπίζεται στη μετα-συναπτική μεμβράνη, τερματίζει τη διαβίβαση του σήματος υδρολύοντας την ακετυλοχολίνη. Ο μηχανισμός υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης έχει ως πρώτο στάδιο την υδρόλυση του καρβοξυλικού εστέρα, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενός ακετυλο-ενζύμου και ελεύθερης χολίνης. Στη συνέχεια, το ακετυλο-ένζυμο υφίσταται πυρηνόφιλη προσβολή από ένα μόριο νερού, απελευθερώνοντας οξικό οξύ. Η χολίνη που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση επαναπροσλαμβάνεται από το προ-συναπτικό νεύρο και ο νευροδιαβιβαστής συντίθεται από την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης, χρησιμοποιώντας το ακετυλοσυνένζυμο Α. Γενικότερα, ο ρόλος της ακετυλοχολίνης στην ενεργοποίηση των μυικών κυττάρων, αλλά και στα χολινεργικά μονοπάτια του Νευρικού Συστήματος, την καθιστά καίρια για τον ανθρώπινο οργανισμό.[18]



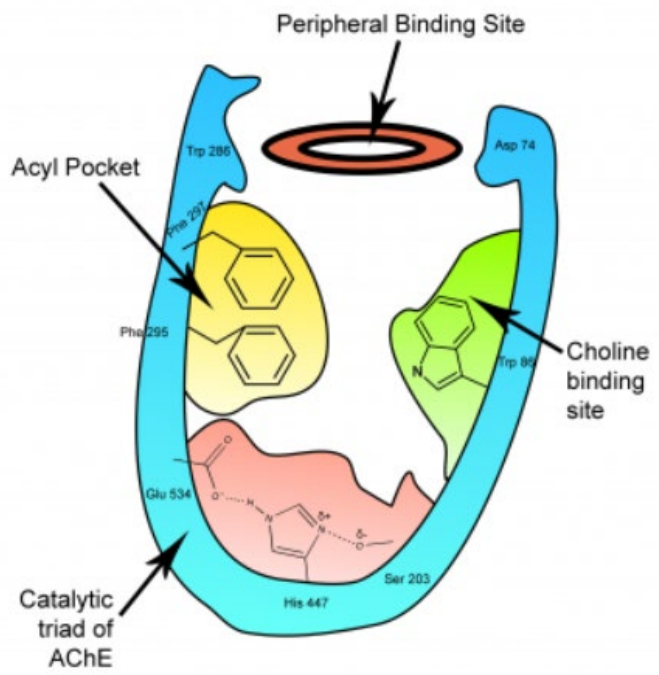
Εικόνα 20: Μηχανισμός υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης.[18]

2.2. Δομή AChE

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι μια υδρολάση της σερίνης, η οποία εντοπίζεται κυρίως σε νευρομυικούς κόμβους και χολινεργικές εγκεφαλικές συνάψεις. Εντοπίζεται σε πληθώρα μοριακών μορφών, οι οποίες διαφέρουν τόσο ως προς την τεταρτοταγή τους δομή, όσο και ως προς τον τρόπο σύνδεσης με τη εκάστοτε σύναψη. Οι διαφορές αυτές ποικίλλουν από ιστό σε ιστό ακόμα και στον ίδιο οργανισμό, ούτως ώστε να ικανοποιούν τις διαφορετικές προϋποθέσεις σε διαφορετικούς τύπους συνάψεων.[20]

Εν γένει, το μόριο της ακετυλοχολινεστεράσης έχει ελλειψοειδές σχήμα διαστάσεων 45×60×65 Å. Το μονομερές του ενζύμου είναι μία α/β πρωτεΐνη, η οποία περιέχει 12 κεντρικά β' πτυχωτά φύλλα περιβαλλόμενα από 14 α' έλικες. Το πιο αξιοσημείωτο τμήμα της δομής

είναι ένα βαθύ στενό «φαράγγι» (ή «λαιμός») μήκους περίπου 20 Å στη μέση του ενζύμου, το οποίο γίνεται πιο πλατύ κοντά στον πυθμένα του. Το ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης εντοπίζεται σε απόσταση 4 Å από τη βάση του μορίου και αποτελείται από τέσσερεις επιμέρους υπομονάδες. Σημειώνεται ότι η αρίθμηση των αμινοξικών ακολουθιών που παρατίθενται αναφέρεται στην ακετυλοχολινεστεράση του πρότυπου οργανισμού *Torpedo Californica*, ενώ της αντίστοιχης ανθρώπινης παρατίθεται σε παρενθέσεις.



Εικόνα 21: Δομή ακετυλοχολινεστεράσης Torpedo Californica.[iv]

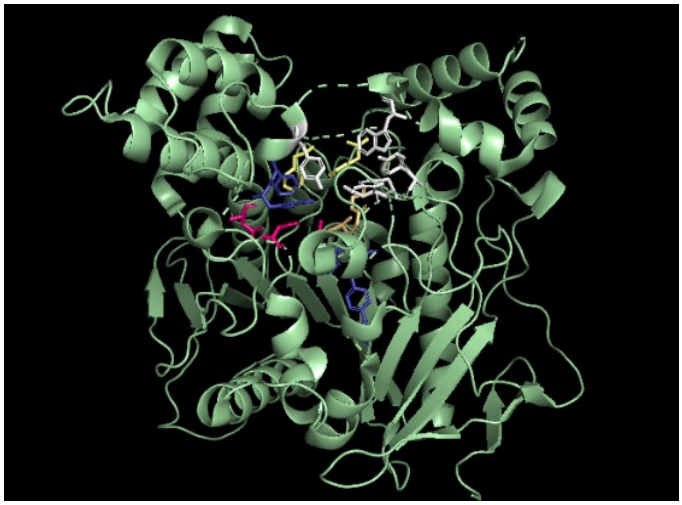
Η εστερατική υπομονάδα (*esteratic subsite*) περιέχει την καταλυτική τριάδα των αμινοξέων τα οποία απαρτίζουν το ενεργό κέντρο, κατ'αντιστοιχία με τις καταλυτικές υπομονάδες άλλων υδρολασών της σερίνης. Τα αμινοξέα αυτά είναι σερίνη 200 (203), ιστιδίνη 440 (447) και γλουταμινικό οξύ 327 (334) και φαίνονται με ροζ χρώμα στην **Εικόνα 22**. Εκεί η ακετυλοχολίνη υδρολύεται στα επιμέρους συστατικά της.

Η ανιονική υπομονάδα (*anionic subsite*) αποτελείται από τα αμινοξέα τρυπτοφάνη 84 (86), τυροσίνη 130 (133), τυροσίνη 330 (337) και φαινυλαλανίνη 331 (338), τα οποία φαίνονται με μπλε χρώμα στην **Εικόνα 22**. Είναι ουδέτερα φορτισμένη και λιπόφιλη και χρησιμεύει στην πρόσδεση της θετικής τεταρτοταγούς αμίνης της ακετυλοχολίνης, καθώς και άλλα τεταρτοταγή προσδέματα που δρουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς. Τα κατιονικά υποστρώματα δεν προσδένονται στα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα του ανιονικού κέντρου, αλλά αλληλεπιδρούν με 14 αρωματικά υπολείμματα που επενδύουν το «φαράγγι» που οδηγεί προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτά τα 14 αμινοξέα του αρωματικού «λαιμού» διατηρούνται σταθερά σε όλα σε διαφορετικά είδη ακετυλοχολινεστεράσης. Από αυτά, η τρυπτοφάνη 84 είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η αντικατάστασή της, για παράδειγμα από αλανίνη, προκαλεί μείωση της δραστικότητας του ενζύμου κατά 3000 φορές.

Το *acyl pocket* αποτελείται από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη 288 (295) και φαινυλαλανίνη 290 (297) τα οποία φαίνονται με κίτρινο χρώμα στην **Εικόνα 22**. Είναι υπεύθυνο για την εκλεκτικότητα του ενζύμου ως προς τα διάφορα υποστρώματα, καθώς αποτρέπει την είσοδο σε μεγαλύτερους εστέρες της χολίνης.

Η *oxyanion hole* αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη 118 (121), γλυκίνη 119 (122(και αλανίνη 201 (204), τα οποία φαίνονται με πορτοκαλί χρώμα στην **Εικόνα 22**. Ο ρόλος του έγκειται στην παροχή δοτών δεσμού υδρογόνου που σταθεροποιούν την τετραεδρική μεταβατική δομή του υποστρώματος.

Πέρα από τις τέσσερεις υπομονάδες του ενεργού κέντρου, η ακετυλοχολινεστεράση περιέχει ένα ή περισσότερα περιφερειακά ανιονικά κέντρα διαφορετικά από το σημείο πρόσδεσης της χολίνης του ενεργού κέντρου. . Ένα τέτοιο περιφερειακό ανιονικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια του ενζύμου σε απόσταση 20 Å από το ενεργό κέντρο και απεικονίζεται με λευκό χρώμα στην **Εικόνα 22**. Αρχικά προσδένει την ακετυλοχολίνη ως το πρώτο βήμα του καταλυτικού μονοπατιού και ρυθμίζει αλλοστερικά την κατάλυση, καθώς εκεί μπορούν να προσδεθούν και άλλα τεταρτοταγή προσδέματα που δρουν ως μη συναγωνιστικοί αναστολείς. Το περιφερειακό ανιονικό κέντρο συμβάλλει επίσης σε μη χολινεργικές λειτουργίες, όπως στην κυτταρική συνένωση, την ανάπτυξη νευριτών αναπτυσσόμενων ή μετασχηματιζόμενων νευρικών κυττάρων, καθως και στην αμυλοείδωση μέσω αλληλεπίδρασης με το β-αμυλοειδές πεπτίδιο (Αβ) στη νόσο Αλτσχάιμερ. Η δομή του περιφερειακού ανιονικού κέντρου και ο αριθμός λειτουργιών που του αντιστοιχούν οδηγούν στο συμπέρασμα ότι είναι μια περιοχή μεγάλης πολυπλοκότητας και χρηστικότητας.



Εικόνα 22: Τρισδιάστατη απεικόνιση ανθρώπινης AChE μέσω του λογισμικού PyMOL.

Η γνώση της δομής της ακετυλοχολινεστεράσης είναι απαραίτητη για την κατανόηση της υψηλής καταλυτικής της ικανότητας και της μοριακής δομής στην οποία ευθύνεται η αναγνώριση της ακετυλοχολίνης, καθώς και για την αποσαφήνιση του μηχανισμού της δράσης που διέπει τη φαρμακολογική και τοξικολογική δράση των φορέων αυτών προς ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων.[17], [18]

2.3. Δράση AChE

Όπως προαναφέρθηκε, η κύρια λειτουργία της ακετυλοχολινεστεράσης είναι η ταχεία υδρόλυση της ακετυλοχολίνης σε συναπτικούς και νευρομυικούς κόμβους, οδηγώντας σε τερματισμό της νευρωνικής μετάδοσης και σηματοδότησης μεταξύ συνάψεων. Η εξελικτική πίεση να τελειοποιηθεί αυτός ο σημαντικός ρόλος έχει οδηγήσει την ακετυλοχολινεστεράση στο να γίνει ένα από τα πιο ισχυρά και αποτελεσματικά γνωστά ένζυμα, με ένα ρυθμό ανανέωσης (*turnover rate*) 10^4 s^{-1}. Το ένζυμο εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή εξειδικευμένη καταλυτική δράση, ειδικά για μία υδρολάση της σερίνης. Ειδικότερα, στο νευρομυικό κόμβο η πορεία της μετάδοσης σήματος, δηλαδή η απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης, η διάχυσή της κατά μήκος της συναπτικής σχισμής, η αντιστρεπτή της αλληλεπίδραση με το νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης και τελικά η υδρόλυση της από την ακετυλοχολινεστεράση, διεκπεραιώνεται στη διάρκεια λίγων millisecond, με κάθε μόριο ενζύμου να αποδομεί περίπου 25000 μόρια ακετυλοχολίνης/s, πλησιάζοντας το ρυθμό μιας αντίδρασης ελεγχόμενης από το στάδιο της διάχυσης.[17], [18], [20]

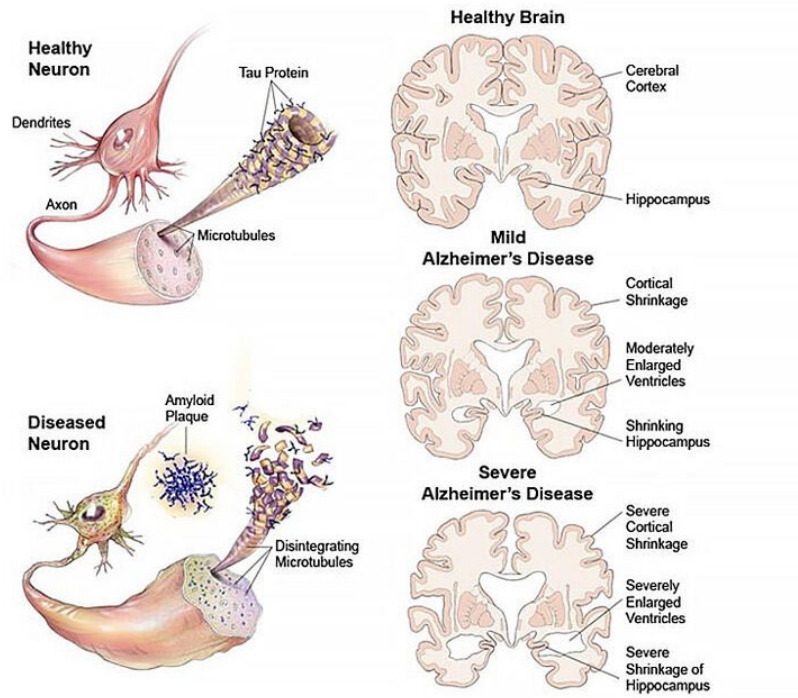
Ο φυσιολογικός ρόλος της ακετυλοχολινεστεράσης έγκειται επομένως στη διαβίβαση νευρικών ερεθισμάτων και τη σωστή μυική λειτουργία στους συναπτικούς κόμβους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος των έμβιων οργανισμών. Όμως, σε περιπτώσεις χολινεργικής απώλειας, δηλαδή μείωσης των επιπέδων ακετυλοχολίνης στη συναπτική σχισμή, εμφανίζεται παθογένεια συσχετιζόμενη με απώλεια της διεγερτικής ικανότητας των νευρώνων και άλλες διαταραχές συμπεριφοράς. Ταυτόχρονα, η ανακάλυψη της εμπλοκής της ακετυλοχολινεστεράσης στην παραγωγή αμυλοειδών ινιδίων αποτελεί άλλον έναν παράγοντα παθογένειας. Τα παραπάνω συνοψίζονται στη χολινεργική και στην αμυλοειδή υπόθεση για τη νόσο Αλτσχάιμερ, τη νευρολογική πάθηση που σχετίζεται άμεσα με τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης στον ανθρώπινο οργανισμό.[21]

2.4. Νόσος Αλτσχάιμερ

Ο όρος «άνοια» χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός μοτίβου εξασθένησης της μνήμης και της σκέψης, το οποίο επιδρά σε τουλάχιστον δύο εκ των γνωστικών τομέων του εγκεφάλου (αίσθηση, αντίληψη, κινητικές λειτουργίες, προσοχή και συγκέντρωση, μνήμη, εκτελεστικές λειτουργίες, ταχύτητα επεξεργασίας, γλώσσα και λεκτικές δεξιότητες). Η νόσος του Αλτσχάιμερ (*Alzheimer's Disease* - AD) είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική εγκεφαλική διαταραχή, η οποία αποτελεί την πιο κοινή αιτία άνοιας, με τις περισσότερες περιπτώσεις να εκδηλώνονται σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών (*late-onset AD*) και ένα μικρό ποσοστό 6% των συνολικών περιπτώσεων να εκδηλώνεται σπανίως σε ηλικίες μικρότερες των 65 (*early-onset* AD). Εκτιμάται ότι περίπου το 4.5% του πληθυσμού ηλικίας άνω των 70 πάσχει από τη νόσο Αλτσχάιμερ, ποσοστό που αναμένεται να αυξηθεί λόγω της άυξησης του προσδόκιμου ζωής. Περίπου 1-2% των περιπτώσεων της νόσου οφείλεται σε κληρονομικά αίτια και μπορεί να εκφραστεί με μικρή ηλικία απαρχής και πολύ ταχύτερο ρυθμό εξέλιξης.

Βιολογικά, η νόσος Αλτσχάιμερ χαρακτηρίζεται από ένα εξειδικευμένο νευροπαθολογικό προφίλ, το οποίο συνίσταται σε εκφυλισμό ή ατροφία των χολινεργικών νευρώνων του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου, σε εξωκυτταρικές εναποθέσεις β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Αβ) στη μορφή νευριτικών πλακών και την παρουσία εσωκυτταρικών νευροϊνιδιακών

σωρών υπερφωσφορυλιωμένης «τ» πρωτεΐνης. Η άνοια που οφείλεται στη νόσο αυτή εξελίσσεται βαθμιαία και διακρίνεται σε τρία στάδια. Στο ασυμπτωματικό (ή προκλινικό) στάδιο, το οποίο ενδέχεται να είναι πολυετές, βλάπτονται ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου με τις νευρικές βλάβες να συσσωρεύονται, σε τέτοια ένταση όμως ώστε να μην προκαλούν συμπτώματα. Στο στάδιο της ήπιας γνωστικής διαταραχής, οι βλάβες στον εγκέφαλο επεκτείνονται και οδηγούν στην εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων που συνήθως σχετίζονται με τη μνήμη, με τη διάρκεια του σταδίου αυτού να ποικίλλει. Τα συμπτώματα εδώ αφορούν κυρίως την «επεισοδιακή μνήμη», η οποία αφορά πρόσφατα γεγονότα έκτασης λεπτών έως ετών, με σύνηθες σύμπτωμα την συχνή επανάληψη των ίδιων ερωτήσεων. Τέλος, στο κλινικό στάδιο τα συμπτώματα εντείνονται με τις νοητικές λειτουργίες να επιβαρύνονται και την ανάγκη για φροντίδα και επιτήρηση των ασθενών να είναι απαραίτητη. Κύρια συμπτώματα αποτελούν η διαταραχή του λόγου και της αντίληψης του χώρου, η δυσκολία προγραμματισμού και εκτέλεσης δραστηριοτήτων, η απραξία και η εμφάνιση διαταραχών στην συμπεριφορά και την ψυχική υγεία, όπως κατάθλιψη, άγχος, ανάρμοστη συμπεριφορά, ψευδαισθήσεις και διαταραχές του ύπνου. Στα τελευταία στάδια της νόσου οι ασθενείς εξαρτώνται πλήρως από το περιβάλλον τους, ακόμα και για τις πιο βασικές λειτουργίες. Γενικά, οι σποραδικές μορφές της νόσου Αλτσχάιμερ έχουν πολλές μεταβλητές, η κάθε μία με ξεχωριστά κλινικά και γενετικά χαρακτηριστικά. Επομένως, η παθοφυσιολογία της νόσου είναι ετερογενής όσον αφορά την πρόοδο, την εμφάνιση και το ρυθμό επιδείνωσης, ενώ αντικατοπτρίζει μη γραμμικές δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πληθώρας παραγόντων.[22], [23]



Εικόνα 23: Απεικόνιση ανθρώπινου εγκεφάλου στα διαφορετικά στάδια της νόσου Αλτσχάιμερ.[v]

Η νόσος Αλτσχάιμερ σχετίζεται με την απώλεια του χολινεργικού συστήματος στο βασικό πρόσθιο εγκέφαλο, σε περιοχές που επηρεάζουν τη μάθηση, τη μνήμη, τη συμπεριφορά και τις συναισθηματικές αντιδράσεις. Η απώλεια των χολινεργικών αυτών κυττάρων οδηγεί σε

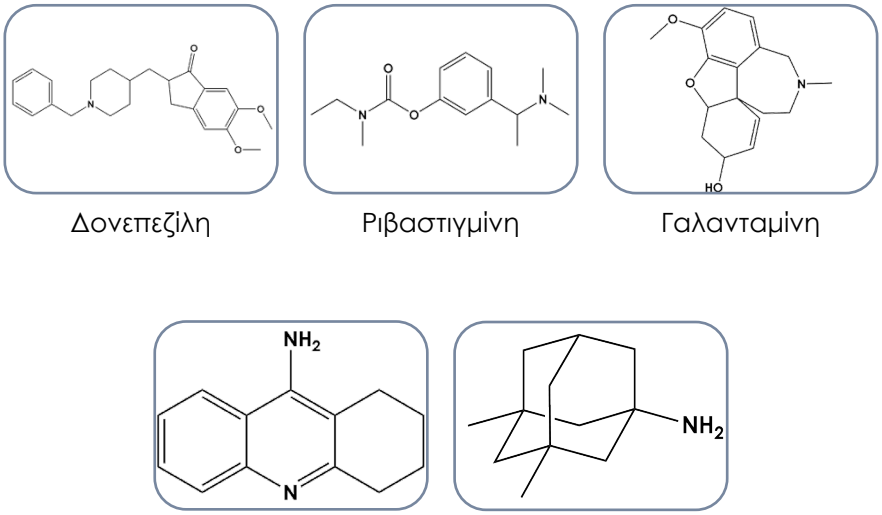
μειωμένη συναπτική διαθεσιμότητα της ακετυλοχολίνης και άρα νοητική βλάβη. Τα παραπάνω διατυπώνονται στη χολινεργική υπόθεση για τη νόσο του Αλτσχάιμερ, σύμφωνα με την οποία η απώλεια της χολινεργικής νεύρωσης του εγκεφαλικού φλοιού σε ασθενείς με νόσο Αλτσχάιμερ είναι μία πρόωρη παθογένεια που σχετίζεται με τη γνωστική δυσλειτουργία και ειδικότερα με την απώλεια μνήμης λόγω ατροφίας του συστήματος που είναι υπεύθυνο για αυτή. Οι βάσεις για τη χολινεργική υπόθεση διατυπώθηκαν το 1976 από τους Bowen, Davis και Maloney, οι οποίοι διαπίστωσαν σημαντική μείωση της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης σε δείγματα εγκεφαλικού φλοιού από ασθενείς με τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Την ίδια χρονική περίοδο, έρευνες άρχισαν να ξεκαθαρίζουν τη σχέση ακετυλοχολίνης-μνήμης, με το βασικό πυρήνα του Maynert να ταυτοποιείται ως πηγή της χολινεργικής νεύρωσης στο φλοιό του κυρίως εγκεφάλου. Παράλληλα, βρεθηκε ότι η χορήγηση υψηλών δόσεων φυσοστιγμίνης, η οποία αποτρέπει την αποικοδόμηση της ακετυλοχολίνης, βελτίωσε τη μνήμη γηραιών θηλαστικών, οδηγώντας στην πρόταση σχετικής θεραπείας. Όλα τα παραπάνω συνέβαλλαν στη συσχέτιση της σοβαρότητας της άνοιας οφειλόμενης στη νόσο του Αλτσχάιμερ με την έκταση της χολινεργικής απώλειας.[24] Ως εκ τούτου, διαπιστώθηκε ότι η περισσότερα υποσχόμενη προσέγγιση για τη θεραπεία της νόσου Αλτσχάιμερ είναι η αύξηση των συναπτικών επιπέδων της ακετυλοχολίνης μέσω αναστολής του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης.[23] Αντίστοιχα, κατά την εξέλιξη της νόσου η δράση της βουτυρυλοχολινεστεράσης αυξάνεται κατά 40-90% και η αναστολή της βουτυρυλοχολινεστεράσης θεωρείται μια αρκετά υποσχόμενη προσέγγιση για τη θεραπεία του Αλτσχάιμερ.[25]

Εκτός από την απώλεια του χολινεργικού συστήματος, η συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Αβ) σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου είναι καίρια για την επαγωγή της νόσου. Η συσσώρευση αυτή οδηγεί σε μία αλληλουχία βιοχημικών διεργασιών, συμπεριλαμβανόμενης της παραγωγής ελευθέρων ριζών, φλεγμονής, απορρύθμισης των επιπέδων ασβεστίου και βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης των νευρώνων, οδηγώντας σε νευρωνική δυσλειτουργία. Ακόμα, όπως προαναφέρθηκε, η ακετυλοχολινεστεράση ευθύνεται για αρκετές μη καταλυτικές δράσεις, με μία από αυτές να είναι η συμβολή στη συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Ειδικότερα, η ακετυλοχολινεστεράση αλληλεπιδρά με το Αβ, ευνοώντας το σχηματισμό ινιδίων αμυλοειδούς από ένα σύνολο αμινοξέων εντοπιζόμενων κοντά στο περιφερειακό ανιονικό κέντρο του ενζύμο. Τα μόρια που αλληλεπιδρούν είτε αποκλειστικά με το περιφερειακό ανιονικό κέντρο, είτε με τα καταλυτικά ή περιφερειακά σημεία πρόσδεσης της ακετυλοχολινεστεράσης αποτρέπουν τη συνεργιστική δράση της ακετυλοχολινεστεράσης στη συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Σχετικές έρευνες έχουν δείξει ότι πολλοί αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης όχι μόνο συντελούν στη χολινεργική διαβίβαση, αλλά αποτρέπουν τη σύνθεση, εναπόθεση και συσσώρευση του τοξικού Αβ. Επομένως, η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης αποτελεί κρίσιμο στόχο στην επιτυχή αντιμετώπιση της νόσου του Αλτσχάιμερ, χάρη στην αύξηση της συναπτικής διαθεσιμότητας της ακετυλοχολίνης στον εγκέφαλο και τη μείωση της απόθεσης του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Ως εκ τούτου, ενώσεις με ταυτόχρονη πρόσδεση στα καταλυτικά και περιφερειακά κέντρα της ακετυλοχολινεστεράσης αποτελούν νέα θεραπευτικά μέσα για την επιτυχή αντιμετώπιση της νόσου Αλτσχάιμερ.[23]

3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων που αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση. Πολλές από αυτές τις ενώσεις, όπως οι οργανοφωσφορικές και καρβαμιδικές ενώσεις προσδένονται άμεσα και ανταγωνιστικά στη σερίνη του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Κάποιες, όπως το εδροφώνιο (*edrophonium*), προσδένονται στο ανιονικό τμήμα, ενώ άλλες προσδένονται μη ανταγωνιστικά στο περιφερειακό ανιονικό κέντρο.[17] Οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και μη, με τους πρώτους να έχουν θεραπευτική δράση και τους τελευταίους να σχετίζονται κυρίως με τοξικές αποκρίσεις. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης περιλαμβάνουν ενώσεις με διαφορετικές δραστικές ομάδες και έχουν εφαρμοστεί στη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών όπως της σοβαρής μυασθένειας, της νόσου Αλτσχάιμερ, του ειλεού και του γλαυκώματος. Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης είναι οργανοφωσφορικές ενώσεις, δηλαδή εστέρες ή θειόλες που αποτελούν παράγωγα του φωσφορικού, φωσφονικού, φωσφινικού ή φωσφοραμιδικού οξέος. Χρησιμοποιούνται κυρίως ως εντομοκτόνα γενικής χρήσεως και ενώ διαθέτουν κάποιες θεραπευτικές εφαρμογές, εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα και για αυτό το λόγο δε θα αναλυθούν περαιτέρω. Ο συνδυασμός της γνώσης της τρισδιάστατης δομής της ακετυλοχολινεστεράσης και των δομών των ενώσεων που προσδένονται σε αυτή, καθώς και των δεδομένων των μοριακών μοντέλων δίνει τη βάση για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων-αναστολέων του ενζύμου.[18]

3.1. Υπάρχοντα φάρμακα-αναστολείς



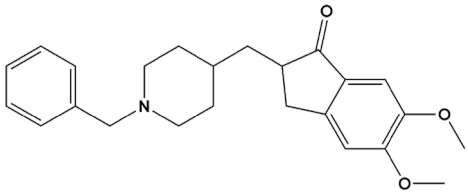
Διάγραμμα 4: Υπάρχοντα φάρμακα για τη νόσο του Αλτσχάιμερ και χημικές δομές τους.

Μέχρι σήμερα, οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης αποτελούν τις κυρίες εγκεκριμένες φαρμακολογικές θεραπείες για γνωστικές δυσλειτουργίες οφειλόμενες στη νόσο του Αλτσχάιμερ. Παρόλο που οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης θεωρείται ότι παρέχουν μόνο ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου, υπάρχουν δεδομένα που συνιστούν ότι μπορούν να επηρεάσουν και την πρόοδό της. Για παράδειγμα, μελέτη μίας ασθενούς έκφανσης της νόσου σε ασθενή έδειξε σταθεροποίηση της νοητικής λειτουργίας κατόπιν ενός χρόνου θεραπείας με αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, ενώ έρευνες

μακράς διαρκείας έδειξαν συνεχή πλεονεκτήματα για ασθενείς που λαμβάνουν αντίστοιχη θεραπεία για εκτεταμένο χρονικό διάστημα.[24]

Οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης που χρησιμοποιούνται παροντικά ως φάρμακα αποτελούν αντιστρεπτούς αναστολείς, οι οποίοι διατηρούν τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης μειώνοντας το ρυθμό υδρόλυσής της. Έτσι ενισχύουν τη χολινεργική νευροδιαβίβαση στον πρόσθιο εγκέφαλο, εξισορροπώντας την απώλεια λειτουργικών εγκεφαλικών κυττάρων. Τα φάρμακα που έχουν εγκριθεί από τους κατάλληλους ρυθμιστικούς οργανισμούς, όπως τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (*Food and Drug Administration* - FDA) και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (*European Medicines Agency* - EMA) είναι η δονεπεζίλη (*donepezil*), η ριβαστιγμίνη (*rivastigmine*) και η γαλανταμίνη (*galantamine*) ως αντιστρεπτοί αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, καθώς και η μεμαντίνη (*memantine*) ως ανταγωνιστής του υποδοχέα NMDA, ενός ιονοτροπικού υποδοχέα του νευροδιαβιβαστή γλουταμικό οξύ, ο οποίος συμβάλλει σε διεργασίες συναπτικής πλαστικότητας, μάθησης και μνήμης. Η τακρίνη (*tacrine*) αποτέλεσε τον πρώτο αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης που δέχθηκε έγκριση το 1993 και κυκλοφόρησε υπό την εμπορική ονομασία Cognex®. Έκτοτε η χρήση της έχει σταματήσει λόγω συχνής εμφάνισης παρενεργειών, με πιο κοινές τη ναυτία, εμετό, διάρροια, πονοκεφάλους, ζαλάδα, δυσπεψία και κοιλιακοί πόνοι, μυαλγία, αϋπνία, κόπωση, παραισθήσεις και σπανιότερα ηπατοτοξικότητα, ωτοτοξικότητα και επιληπτικές κρίσεις.

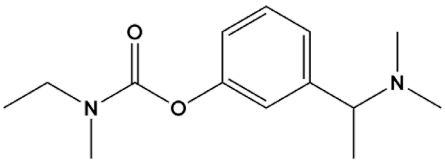
Η δονεπεζίλη αποτελεί έναν εκλεκτικό αντιστρεπτό αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης ο οποίος προσδένεται στο περιφερειακό ανιονικό κέντρο και επιφέρει ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου Αλτσχάιμερ, ενώ επίσης μειώνει το ρυθμό απόθεσης πλακών β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Το φάρμακο αυτό παράγεται από τις φαρμακευτικές εταιρείες Eisai και Pfizer υπό το όνομα Aricept® και σε μορφή δισκίου ή διαλύματος χορηγούμενου από του στόματος με βιοδιαθεσιμότητα 100% και καλή διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η δονεπεζίλη χρησιμοποιείται κυρίως ως ανακουφιστική αγωγή σε περιπτώσεις ήπιας έως μέσης έκφανσης της νόσου, όμως ορισμένες κλινικές έρευνες έχουν δείξει ικανότητα βελτίωσης της γνωστικής ικανότητας και σε ασθενείς με βαριά συμπτώματα. Κοινές παρενέργειες συμπεριλαμβάνουν γαστρεντερικές ανωμαλίες όπως ναυτία, διάρροια, ανορεξία και κοιλιακούς πόνους, καθώς και βραδυκαρδία.



Εικόνα 24: Χημική δομή δονεπεζίλης.

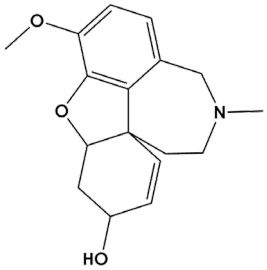
Η ριβαστιγμίνη αποτελεί έναν ισχυρό αντιστρεπτό καρβαμικό αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης ο οποίος προσδένεται στην εστερατική υπομονάδα του ενεργού κέντρου και κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Exelon® από την εταιρεία Novartis. Σε αντίθεση με τη δονεπεζίλη, η οποία αναστέλλει την ακετυλοχολινεστεράση εκλεκτικά, η ριβαστιγμίνη αναστέλλει τόσο την ακετυλο- όσο και τη βουτυρυλο- χολινεστεράση.

Χρησιμοποιείται στη θεραπεία ήπιων έως μέτριων περιπτώσεων της νόσου του Αλτσχάιμερ και απαντάται σε μορφή κάψουλας ή υγρή μορφή, με καλή απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα περίπου ίση με 40%. Η έγκαιρη και συνεχόμενη θεραπεία του Αλτσχάιμερ με ριβαστιγμίνη μεγιστοποιεί την ωφέλιμή της δράση στη διαχείριση του ρυθμού επιδείνωσης της γνωστικής λειτουργίας των ασθενών. Κοινές παρενέργειες συμπεριλαμβάνουν ναυτία, εμετούς, διάρροια, πονοκεφάλους, κοιλιακούς πόνους και ζαλάδες, κάτι που μπορεί να αποφευχθεί με τη χορήγηση του φαρμάκου σε μορφή διαδερμικού εμπλάστρου, μειώνοντας σημαντικά τις παρενέργειες. Πέραν από τη νόσο Αλτσχάιμερ, η ριβαστιγμίνη χορηγείται και για τη θεραπεία άνοιας προκαλούμενης από τη νόσο Πάρκινσον ή τα σωμάτια Lewey.



Εικόνα 25: Χημική δομή ριβαστιγμίνης.

Η γαλανταμίνη πρόκειται για ένα αλκαλοειδές που απομονώνεται από το φυτό *Γάλανθος του Woronow* (*Galanthus Woronowii*) της οικογένειας των *Αμαρυλλιδοειδών* (*Amaryllidaceae*). Αποτελεί έναν εκλεκτικό ανταγωνιστικό αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης, ο οποίος αλληλεπιδρά με την ανιονική υπομονάδα, καθώς και τα αρωματικά υπολείμματα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Εκτός αυτού, η γαλανταμίνη αποτελεί ένα αλλοστερικό πρόσδεμα των νικοτινικών χολινεργικών υποδοχέων, το οποίο αλληλεπιδρά μαζί τους σε κατάλληλα σημεία πρόσδεσης και ενισχύει τη δράση των νικοτινικών υποδοχέων παρουσία ακετυλοχολίνης. Αυτό αποτελεί κομβικό σημείο της θεραπείας, καθώς η έκταση της γνωστικής βλάβης στη νόσο του Αλτσχάιμερ σχετίζεται με την απώλεια της δράσης των νικοτινικών υποδοχέων. Η γαλανταμίνη εφαρμόζεται ως θεραπεία ήπιων έως μέτριων περιπτώσεων της νόσου Αλτσχάιμερ και κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Radazyne® ή Nivalin® σε μορφή δισκίων, καψουλών ή διαλύματος χορηγούμενου από του στόματος, το οποίο εμφανίζει βιοδιαθεσιμότητα κυμαινόμενη από 80-100%. Οι εμφανιζόμενες παρενέργειες σχετίζονται κυρίως με γαστρεντερικά συμπτώματα όπως αυτά των άλλων δύο αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης, με τη γαλανταμίνη όμως να είναι λιγότερο ανεκτή από τον οργανισμό σε σχέση με αυτούς. Αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με προσεκτική και σταδιακή χορήγηση διάρκειας τριών μηνών και άνω. Χάρη στην επιπρόσθετη αλλοστερική της δράση στους νικοτινικούς υποδοχείς, η γαλανταμίνη μπορεί να εφαρμοστεί για τη βελτίωση της γνωστικής δυσλειτουργίας σε παθήσεις όπως σχιζοφρένεια, κατάθλιψη και διπολική διαταραχή.[18]

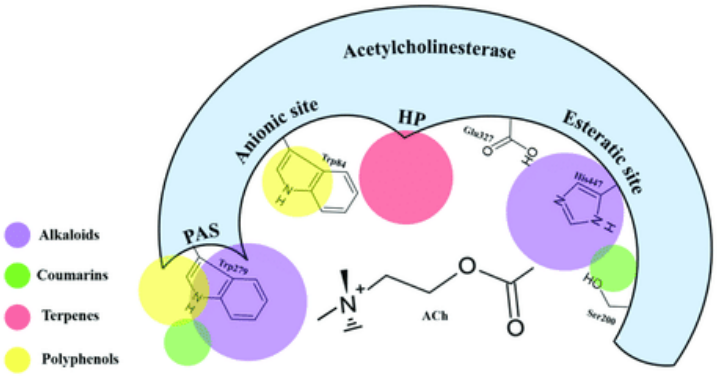


Εικόνα 26: Χημική δομή γαλανταμίνης.

Γενικά, τα ποσοστά επιτυχίας φαρμάκων κατά της νόσου Αλτσχάιμερ σε κλινικές φάσεις είναι ιδιαίτερα χαμηλά, ακόμα χαμηλότερα από αυτά των φαρμάκων κατά του καρκίνου ή άλλων περίπλοκων ασθενειών. Το δεδομένο αυτό, σε συνδυασμό με τα υψηλά ποσοστά εμφάνισης της νόσου στις μεγαλύτερες ηλικίες καθιστά απαραίτητη τη σύνθεση νέων ενώσεων οι οποίες να αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση και τη συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου με υψηλή δραστικότητα.[24]

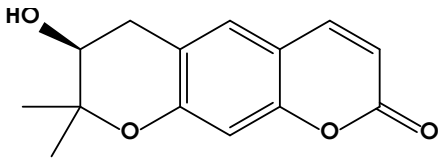
3.2. Κουμαρίνες ως αναστολείς της AChE

Πληθώρα ενώσεων ικανών να αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση εντοπίζονται στη φύση, με τη διεκπεραίωση ανάλογων μελετών να έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση και απομόνωση φυσικών προϊόντων ικανών να αποτελέσουν τη βάση για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Αυτά ανήκουν στις κατηγορίες των αλκαλοειδών, των τερπενίων, των πολυφαινολών και των κουμαρινών και στο Βασίλειο των Φυτών εντοπίζονται κυρίως στις οικογένειες των *Αμαρυλλιδοειδών* (*Amaryllidaceae*), *Λυκοποδιοειδών* (*Lycopodiaceae*) και *Πολυγονατοειδών* (*Polygonaceae*). Η πλειονότητα των δραστικών φυτικών παραγώγων ανήκει στα αλκαλοειδή, με τη δραστικότητά τους να οφείλεται στις πολύπλοκες δομές αζώτου που περιέχουν, οι οποίες φορτίζονται θετικά και προσδένονται στο ανιονικό τμήμα του ενεργού κέντρου. Τα φυτικά προϊόντα των λοιπών κατηγοριών δρουν ως μη ανταγωνιστικοί αναστολείς που προσδένονται σε διαφορετικά τμήματα του ενεργού κέντρου του ενζύμου.



Εικόνα 27: Φυσικές ενώσεις-αναστολείς της AChE και σημεία πρόσδεσής τους στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης.[26]

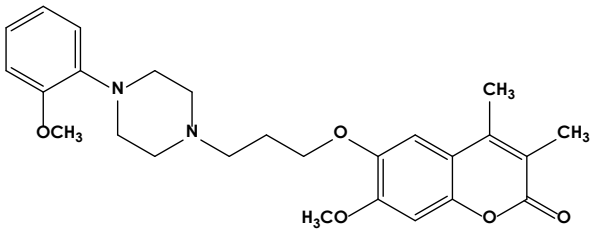
Όπως φαίνεται και παραπάνω, οι κουμαρίνες προσδένονται τόσο στο εστερατικό όσο και στο περιφερειακό ανιονικό κέντρο του ενζύμου. Σε μελέτη της ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης από φυσικές ενώσεις, βρέθηκαν δύο κουμαρίνες με δράση μεγαλύτερη από αυτή της γαλανταμίνης. Ειδικότερα, η διυδροπυρανοκουμαρίνη *decursinol*, η οποία απομονώνεται από το φυτό *Angelica gigas Nakai* εμφανίσε την πιο ισχυρή δράση (με IC_{50}=0.28 μM, ενώ για τη γαλανταμίνη IC_{50}=4.82 μM και IC_{50} η μοριακή συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί το 50% της ενζυμικής αναστολής). Η υψηλή αυτή δραστικότητα αποδίδεται στην κυκλοποίηση της ομάδας ισοπρενυλίου του άνθρακα της θέσης 6 και στις χαρακτηριστικές ομάδες που ενώνονται με τον κουμαρινικό πυρήνα, που διαφέρουν από αυτές άλλων κουμαρινών.[26]



Εικόνα 28: Χημική δομή decursinol.

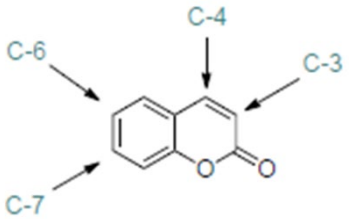
Επίσης ικανοποιητική τιμή IC_{50} εμφανίζει το φυτικό κουμαρινικό παράγωγο *mesuagenin*, του οποίου το εκχύλισμα που προέρχεται από το φυτό *Mesua elegans* έδωσε IC_{50}=0.7 μM. Άλλες κουμαρίνες φυσικής προέλευσης με ικανή ανασταλτική δράση αποτελούν η σκοπολετίνη, η σκοπολίνη, η ξανθοτοξίνη, το ψωραλένιο και ισοψωραλένιο.[23] Οι κουμαρίνη εσκουλετίνη (**Εικόνα 12**), η οποία απομονώθηκε από το φυτό *Angelica decursiva*, βρέθηκε ότι αναστέλλει ικανοποιητικά τόσο την ακετυλο- όσο και τη βουτυρυλο- χολινεστεράση, με τιμές IC_{50}= 6.13 μM και 9.29 μM αντίστοιχα.[25] Πέρα από τη *decursinol*, το φυτό *Angelica gigas Nakai* παράγει τρεις κουμαρίνες-αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, τις *marmesin, nodakenin* και *isoimperatorin*. Τέλος, το φυτό *Murraya paniculata Jack* παράγει δύο κουμαρίνες-αναστολείς, τις *murranganone* και *paniculatin*.[27]

Βάσει της γνώσης των κουμαρινών φυσικής προέλευσης που αλληλεπιδρούν με το ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης και σε συνδυασμό με κατάλληλες δομικές τροποποιήσεις και προσθήκες, έχουν προκύψει συνθετικά κουμαρινικά παράγωγα που αποτελούν ικανούς αναστολείς του ενζύμου. Ειδικότερα, το συνθετικό παράγωγο *ensaculin* το οποίο προέκυψε με σύνδεση μίας δομής πιπεραζίνης στη θέση 6 μέσω μίας ανθρακικής αλυσίδας μήκους 3C (τρία μόρια άνθρακα), έδωσε IC_{50}=0.36 μM και αποτελεί αντικείμενο κλινικών μελετών ως υποψήφια θεραπεία κατά της νόσου του Αλτσχάιμερ, καθώς όχι μόνο αναστέλλει την ακετυλοχολινεστεράση, αλλά δρα και ως ανταγωνιστής του υποδοχέα NMDA.[23] Ακόμα, συνθετικές κουμαρίνες που φέρουν διάφορες δραστικές ομάδες οι οποίες συνδέονται με τον κουμαρινικό σκελετό στη θέση 3 ως N-αιθυλο-καρβοξαμίδια ή απλά καρβοξαμίδια, βρέθηκε να έχουν ικανή ανασταλτική δράση, ιδιαίτερα όταν έφεραν βρωμο-, νιτρο- ή μεθοξυ-υποκαταστάτες.[28] Σε άλλη μελέτη, συντέθηκαν υβριδικά μόρια κουμαρινών με δομή παρεμφερή με αυτή της δονεπεζίλης, τα οποία αξιολογήθηκαν για την ικανότητα τους να αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση και ορισμένα υβρίδια που έφεραν ομάδες 4-χλωροφαινυλίου ή 4-νιτροφαινυλίου στη θέση 6 εμφάνισαν ικανότητα αναστολής μεγαλύτερη από αυτή της δονεπεζίλης.[29] Τέλος, η υποκατάσταση με αλκοξυ-βρωμίδια στη θέση 7 του κουμαρινικού σκελετού φαίνεται να δίνει αρκετά δραστικά κουμαρινικά παράγωγα.[30]



Εικόνα 29: Χημική δομή ensaculin.

Γενικότερα, έχουν γίνει ποικίλες μελέτες της σχέσης δομής-δράσης όσον αφορά τα κουμαρινικά παράγωγα που αποτελούν ικανούς αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, από τις οποίες εξάγονται ορισμένα συμπεράσματα για τη δομή των κουμαρινικών αναστολέων. Ειδικότερα, ο κουμαρινικός πυρήνας φαίνεται να είναι απαραίτητο να παραμένει άθικτος για τη διατήρηση της δραστικότητας. Η ίδια η κουμαρίνη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αλληλεπιδρά με το περιφερειακό ανιονικό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης. Ως εκ τούτου, η προσθήκη διαφορετικών δομών που αλληλεπιδρούν με την καταλυτική τριάδα του ενζύμου, όπως βενζυλαμινο-ομάδες, φαινυλοπιπεραζίνες και ανιλίνες οδηγεί σε υβριδικά κουμαρινικά παράγωγα ικανά να αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα με περισσότερα από ένα σημεία του ενεργού κέντρου. Οι ενώσεις αυτές όχι μόνο αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση, αλλά αποτρέπουν και τη συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Στην περίπτωση τέτοιων παραγώγων, το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας που ενώνει τις δύο δομές αποτελεί επίσης σημαντική παράμετρο, με βέλτιστη δραστικότητα να εμφανίζεται με τη χρήση τετραμεθυλενίου ή φαινυλίου ως συνδέτη. Οι βέλτιστες θέσεις προσθήκης δομών που αλληλεπιδρούν με την καταλυτική τριάδα είναι οι θέσεις 3 ή 4 του κουμαρινικού δακτυλίου. Αντίθετα, ενώ η προσθήκη τέτοιων ενώσεων στις θέσεις 6 ή 7 δεν οδηγεί σε αναστολή του ενζύμου, η υποκατάσταση με διαφορετικές ομάδες στις θέσεις αυτές μπορεί να οδηγήσει σε δραστικές ενώσεις. Ειδικότερα, η προσθήκη ομάδων-δοτών ηλεκτρονίων όπως $-OCH_3$, -OH και $-NH_2$ οδηγεί σε αυξημένη δραστικότητα λόγω υψηλής λιποφιλίας.[23]



Εικόνα 30: Κατάλληλες θέσεις υποκατάστασης στον κουμαρινικό δακτύλιο για αναστολή της AChE.[28]

4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

4.1. Ανακάλυψη νέων φαρμάκων

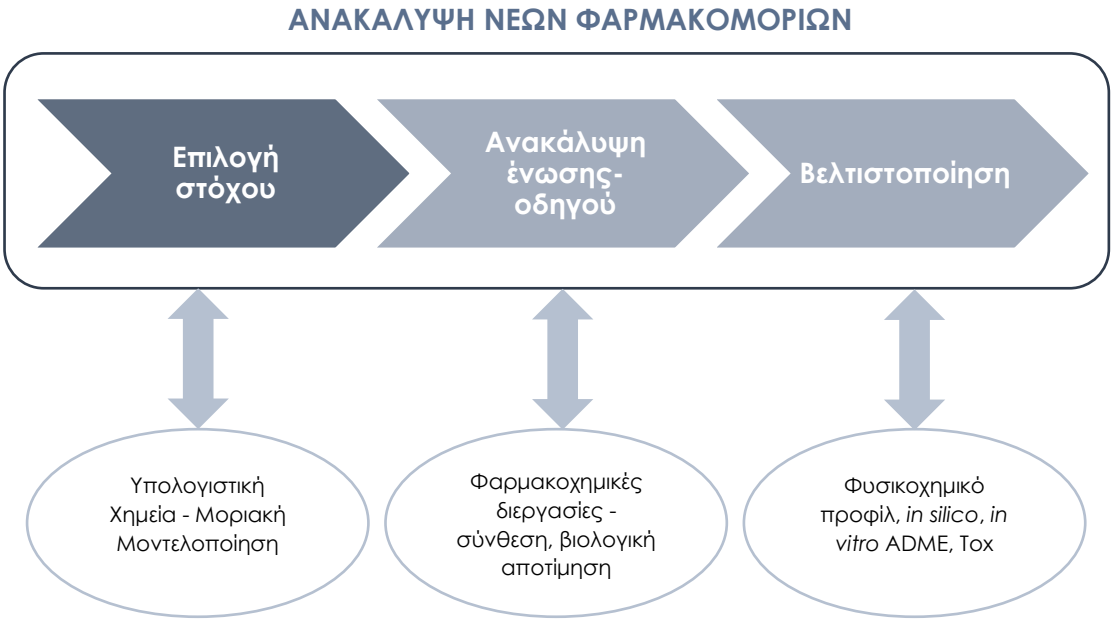
Τα φάρμακα αποτελούν πολύτιμα αγαθά για την πρόληψη και αντιμετώπιση των ασθενειών από τις οποίες ο άνθρωπος απειλείται διαρκώς κατά τη διάρκεια της ζωής του. Τα φυτά αποτέλεσαν τα πρώτα θεραπευτικά μέσα από την αρχαιότητα, ενώ μέχρι και σήμερα αποτελούν πηγή φυσικών δραστικών ενώσεων. Σήμερα, η εξέλιξη της επιστήμης και της τεχνολογίας έχει δώσει νέα εργαλεία για τη σύνθεση, τον έλεγχο και την αξιολόγηση νέων φαρμάκων, με τα σύγχρονα φάρμακα να υπακούν σε υψηλές προδιαγραφές. Ένα φάρμακο πρέπει να είναι πρωτίστως αποτελεσματικό και ασφαλές, αλλά και εύληπτο και φθηνό, ώστε να είναι κοινωνικά αποδεκτό.

Οι φάσεις ελέγχου νέων υποψήφιων φαρμάκων διακρίνονται σε προκλινικές και κλινικές. Ο προκλινικός έλεγχος συμπεριλαμβάνει τον εργαστηριακό έλεγχο και τον έλεγχο σε πειραματόζωα. Στην κλινική Φάση Ι, μελετάται η ασφάλεια, η δοσολογία και οι αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου με την τροφή σε μικρό αριθμό υγιών εθελοντών. Στη Φάση

ΙΙ μελετάται η δραστικότητα, οι παρενέργειες, οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές παράμετροι του φαρμάκου σε ασθενείς εθελοντές. Τέλος, στη Φάση ΙΙΙ μελετώνται η ασφάλεια, η δραστικότητα και οι παρενέργειες του φαρμάκου κατά τη χρόνια χρήση σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών εθελοντών, ενώ ταυτόχρονα μελετώνται ειδικές ομάδες ασθενών και το φάρμακο συγκρίνεται με ήδη υφιστάμενες θεραπείες.

Εικόνα 31: Διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων.[v]

Τις τελευταίες δεκαετίες, εμφανίζεται σχετική μείωση των συνολικών νέων εγκρινόμενων φαρμάκων. Εξαίρεση αποτελούν τα αντιμικροβιακά και τα αντικαρκινικά φάρμακα, των οποίων ο αριθμός εγκρίσεων παραμένει σταθερός. Οι λόγοι αποκλεισμού των υποψηφίων φαρμάκων από την κλινική ανάπτυξη αποδίδονται κυρίως σε μη ικανοποιητικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες ή χαμηλή αποτελεσματικότητα. Άλλοι λόγοι αφορούν την εμφάνιση τοξικότητας και ανεπιθύμητων ενεργειών ή εμπορικούς λόγους. Γενικά προτιμάται η απόρριψη ενός υποψηφίου φαρμάκου να γίνεται στα πρώτα στάδια ελέγχων, ώστε να αποφευχθούν δαπανηρές κλινικές δοκιμές.



Διάγραμμα 5: Βασική πορεία ανακάλυψης νέων φαρμακομορίων και υποστηρικτικές διεργασίες.

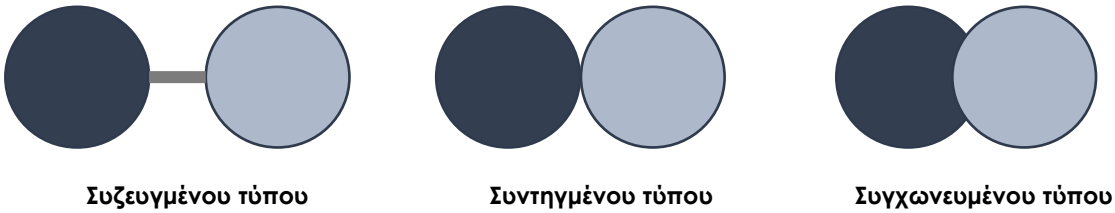
Τα βασικά βήματα που ακολουθούνται για το σχεδιασμό νέων φαρμακολογικά δραστικών ενώσεων αφορούν αρχικά στην επιλογή ενός μοριακού στόχου και έπειτα στην ανακάλυψη μιας ένωσης-οδηγού, ενός σκελετού δηλαδή που αποτελεί τη βάση για σύνθεση συγγενών, βελτιστοποιημένων μορίων. Συχνά, προηγείται η ανακάλυψη μιας αρχικής βιοδραστικής δομής-οδηγού (hit), η οποία προκύπτει από ταχύ βιολογικό έλεγχο υψηλής απόδοσης (*High Throughput Screening*). Κατά το στάδιο της βελτιστοποίησης της ένωσης οδηγού γίνονται τροποποιήσεις στο μόριο, που κατά κανόνα δεν αφορούν το δομικό υπόβαθρο (*scaffold*) και οι οποίες είναι δυνατόν να μεγιστοποιούν τη συγγένεια ή/και την εκλεκτικότητα προς τους υποδοχείς ή να βελτιώνουν τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Παράλληλα γίνεται εκτίμηση των φυσικοχημικών και φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των εξεταζόμενων ενώσεων, είτε υπολογιστικά (*in silico*) είτε με ταχείες μετρήσεις που παρέχουν μία πρώτη εκτίμηση. Επισημαίνεται ότι για τις ενώσεις που επιλέγονται τελικά απαιτούνται ακριβείς πειραματικοί προσδιορισμοί των παραπάνω ιδιοτήτων. Τα στάδια της ανακάλυψης και βελτιστοποίησης της ένωσης-οδηγού, αν και παραμένουν βασικά και στη σύγχρονη αντίληψη για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, συμπληρώνονται με επί πλέον διεργασίες, που καταδεικνύουν την πολυπλοκότητα της φαρμακευτικής έρευνας και την ανάγκη για μια πολυεπιστημονική και ολιστική προσέγγιση με αφετηρία το μοριακό επίπεδο.[31]

4.2. Υβριδικά μόρια

Ο όρος πολυφαρμακολογία αποτυπώνει την ικανότητα ενός μορίου να δρα σε πολλαπλούς βιολογικούς στόχους. Στο παρελθόν, ο όρος ταυτιζόταν με τη χορήγηση μείγματος φαρμάκων για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος, τακτική που συχνά επέφερε μη συμμόρφωση των ασθενών. Ως εκ τούτου προέκυψε η τάση χρήσης πολυσύστατων φαρμάκων, όπως δισκίων που περιέχουν δύο ή περισσότερα φαρμακομόρια, με πιθανότητα παρενεργειών. Σήμερα, η πολυφαρμακολογία επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη νέων ενώσεων που διαθέτουν την ικανότητα ταυτόχρονης αλληλεπίδρασης με πολλαπλούς θεραπευτικούς στόχους.

Υπάρχουν ποικίλες στρατηγικές σχεδιασμού προσδεμάτων πολλαπλών στόχων. Σε μία από αυτές, τα δομικά υπόβαθρα δυο βιβλιογραφικά γνωστών δραστικών και εκλεκτικών προσδεμάτων για δύο διαφορετικούς στόχους συνενώνονται χημικά για να οδηγήσουν σε ένα νέο μόριο με συνδυασμένη δράση, το οποίο ονομάζεται υβριδικό. Αυτός ο τρόπος ανάπτυξης μίας ένωσης οδηγού αναφέρεται ως «προσθετικός σχεδιασμός» (*designing in*). Τα προσδέματα πολλαπλών στόχων που αναπτύσσονται μέσω προσθετικού σχεδιασμού διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, τα υβριδικά συζευγμένου τύπου (*conjugates*), τα συντηγμένου τύπου (*fused*) και τα συγχωνευμένου τύπου (*merged*). Στα υβριδικά μόρια συζευγμένου τύπου οι δυο δομές που εμπεριέχουν τα φαρμακοφόρα στοιχεία για τους δυο στόχους διαχωρίζονται μεταξύ τους μέσω μιας χημικής ομάδας σύνδεσης, η οποία δεν παρουσιάζει δομική ομοιότητα με τα δυο πρότυπα εκλεκτικά προσδέματα και είναι σταθερή σε βιολογικές μετατροπές. Αντιθέτως, στα σχάσιμα υβρίδια συζευγμένου τύπου (*cleavable conjugates*) χρησιμοποιείται συνδετικός βραχίονας κατάλληλα σχεδιασμένος ώστε να μεταβολίζεται και να απελευθερώνει τα δυο προσδέματα που δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο στους διαφορετικούς στόχους. Όσο το μέγεθος του συνδετικού βραχίονα μειώνεται, επέρχεται ένα σημείο όπου τα δυο δομικά υπόβαθρα εφάπτονται. Αυτά τα προσδέματα

πολλαπλών στόχων θεωρούνται μόρια συντηγμένου τύπου. Τέλος, τα συγχωνευμένου τύπου (ή χιμαιρικά - *chimeric*) μόρια συμπεριλαμβάνουν τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά των πρότυπων εκλεκτικών προσδεμάτων για τους δυο υπό μελέτη στόχους, οδηγώντας σε υψηλή αλληλοεπικάλυψη των δομικών υποβάθρων των δύο φαρμακοφόρων και τελικά σε συγκριτικά απλούστερα μόρια, μικρότερου μοριακού βάρους και λιποφιλίας.



Εικόνα 32: Κατηγορίες υβριδικών μορίων.

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση υβριδικών μορίων στη Φαρμακευτική έχει πολλά πλεονεκτήματα, καθώς επιτυγχάνει βελτιωμένες, συνδυασμένες φαρμακολογικές ιδιότητες και άρα δραστικότερα μόρια. Ειδικά για την περίπτωση της ακετυλοχολινεστεράσης, προτείνεται οι αναστολείς της να περιέχουν ένα σύστημα κεντρικού δακτυλίου (*core ring system*), το οποίο αλληλεπιδρά με το περιφερειακό ανιονικό κέντρο, ένα τμήμα κατιοντικού χαρακτήρα που να αλληλεπιδρά με την εστερατική περιοχή και έναν κατάλληλο μεταξύ τους σύνδεσμο, ώστε να εκπληρώνονται οι δομικές απαιτήσεις.[31]

Η έρευνα για τη σύνθεση νέων, ισχυρών αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης έχει ήδη στραφεί στη σύνθεση υβριδικών μορίων, για τους παραπάνω λόγους. Έχουν γίνει δοκιμές σύνθεσης φαρμακομορίων με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, με τη χρήση των ήδη υπαρχόντων φαρμάκων που χορηγούνται κατά της νόσου Αλτσχάιμερ, όπως υβριδικά μόρια τακρίνης-βενζοφουρανίου, τακρίνης-κινόνης, δονεπεζίλης-κλιοκινόνης ενώ σε άλλες δοκιμές έχει γίνει χρήση φυσικών ενώσεων όπως η κουρκουμίνη, η μελατονίνη και η βιταμίνη B_3. Οι κουμαρίνες, ως ιδιαίτερα δραστικές φυσικές ενώσεις με ευρύ φάσμα εφαρμογών αποτελούν ιδανικό δομικό υπόβαθρο για σύνθεση ισχυρών υβριδικών φαρμακομορίων με στοχευμένη δράση.[31], [32]

4.3. Βασικοί ορισμοί και έννοιες

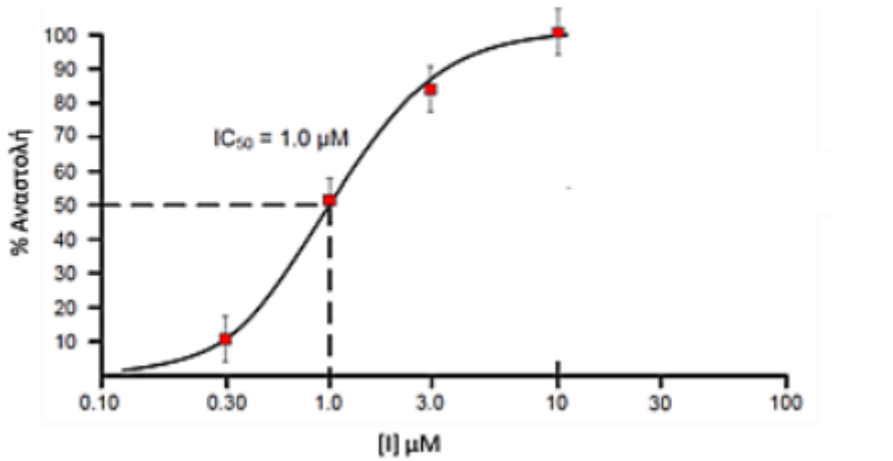
Η Φαρμακολογία ορίζεται ως η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών και των έμβιων συστημάτων και κατηγοριοποιείται στη Φαρμακοδυναμική και τη Φαρμακοκινητική. Η Φαρμακοκινητική μελετά τα αποτελέσματα που επιφέρει το σώμα στο φάρμακο και σχετίζεται με τη δόση και τη συγκέντρωση του χορηγούμενου φαρμάκου. Βασικές εξεταζόμενες παράμετροι είναι η απορρόφηση (*adsorption*), η κατανομή (*distribution*), ο μεταβολισμός (*metabolism*) και η απέκκριση (*excretion*), οι οποίες συναντώνται με το ακρωνύμιο ADME. Η Φαρμακοδυναμική εξετάζει τα αποτελέσματα του φαρμάκου στον ανθρώπινο οργανισμό και σχετίζεται με τη συγκέντρωση του φαρμάκου και το αποτέλεσμα το οποίο αυτή επιφέρει. Το αποτέλεσμα αυτό πρόκειται για την κλινική απόκριση, η οποία μπορεί να οδηγήσει είτε σε αποτελεσματική, είτε σε τοξική δράση.

4.3.1. Ένωση-οδηγός

Ως ένωση-οδηγός (*lead compound*) ορίζεται ένα μόριο που φέρει τη φαρμακοφόρο δομή, το σύνολο δηλαδή των ηλεκτρονιακών και στερεοχημικών χαρακτηριστικών που είναι απαραίτητα για τη μοριακή αναγνώριση του προσδέματος από το βιολογικό στόχο και την επίτευξη των βέλτιστων υπερμοριακών αλληλεπιδράσεων. Η φαρμακοφόρος δομή είναι απαραίτητη για τη βιολογική δράση, η εκδήλωση της οποίας ωστόσο συχνά εξαρτάται και από άλλα μοριακά χαρακτηριστικά. Η ένωση-οδηγός διαθέτει τις φυσικές ιδιότητες που σχετίζονται με την ικανότητα να φτάσει στο στόχο της μετά τη χορήγησή της, ή μπορεί να τροποποιηθεί για να τις αποκτήσει.

4.3.2. IC_{50}

Το IC_{50} ορίζεται ως η μοριακή συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί το 50% της ενζυμικής αναστολής. Η τιμή του IC_{50} προσδιορίζεται από την καμπύλη που προκύπτει από την απεικόνιση της δράσης ως προς τη συγκέντρωση του αναστολέα, παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης φυσιολογικού υποστρώματος (καμπύλη δόσης-απόκρισης, *dose-response curve*). Κατά συνέπεια το μέγεθος IC_{50} εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες και αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά η σύγκριση τιμών που προέρχονται από διαφορετικές πηγές. Είναι προφανές ότι όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50}, τόσο δραστικότερος είναι ο αναστολέας. Για να θεωρηθεί μια ένωση ότι μπορεί να αποτελέσει ένωση-οδηγό επιδιώκεται η IC_{50} να είναι σε μονοψήφιες μικρομοριακές συγκεντρώσεις ($IC_{50}<10^{-5}$ M), ενώ η βελτιστοποίηση στοχεύει σε μείωση της IC_{50} σε νανομοριακές συγκεντρώσεις ($IC_{50}< 10^{-8}$ M).



Εικόνα 33: Προσδιορισμός τιμής IC_{50}.[31]

4.3.3. Λιποφιλία

Ως λιποφιλία ορίζεται σύμφωνα με την IUPAC η συγγένεια που έχει ένα μόριο ή κάποιο τμήμα του ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Πρόκειται για ένα φυσικοχημικό μέγεθος, το

οποίο συμμετέχει σε διαδικασίες σύνδεσης και παθητικές, επηρεάζοντας έτσι τόσο τη φαρμακοδυναμική όσο και τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά ενός φαρμάκου. Υψηλές τιμές λιποφιλίας σχετίζονται με μεγάλο χρόνο παραμονής της φαρμακευτικής ουσίας στον οργανισμό, με την ουσία να αποθηκεύεται σε ουδέτερα λιπίδια και να εμφανίζονται αθροιστικά φαινόμενα. Η τάση αυτή συσσώρευσης οδηγεί σε εμφάνιση τοξικότητας και ο οργανισμός επάγει τα κατάλληλα ένζυμα ως μηχανισμό άμυνας. Τα ένζυμα αυτά πρόκεινται για μικροσκοπικά ένζυμα, τα οποία μετατρέπουν τη λιπόφιλη ένωση σε υδρόφιλη, ώστε να αποβληθεί με ευκολία από τον οργανισμό. Ακόμα, πολύ λιπόφιλα φάρμακα συχνά εμφανίζουν προβλήματα μορφοποίησης. Με βάση τις παραπάνω διαπιστώσεις, ο Hansch το 1987 διατύπωσε την αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας, σύμφωνα με την οποία ο σχεδιασμός των φαρμάκων πρέπει να προσανατολίζεται σε ενώσεις που ναι μεν προκαλούν την επιθυμητή δράση, έχουν όμως την ελάχιστη δυνατή λιποφιλία.

Το μέτρο της λιποφιλίας μίας ένωσης είναι είτε ο συντελεστής μερισμού P (*partition coefficient*), όταν η ένωση βρίσκεται στην ουδέτερη μορφή της, είτε ο συντελεστής κατανομής D (*distribution coefficient*), όταν βρίσκεται στην ιονισμένη μορφή. Οι συντελεστές αυτοί απαντώνται συνήθως στη λογαριθμική μορφή τους και ορίζονται για μία ένωση διαλυμένη σε ένα διφασικό σύστημα υγρής φάσης που αποτελείται από έναν οργανικό διαλύτη και νερό.

Για μία ένωση σε ουδέτερη μορφή:

$$P = \frac{C_{org}}{C_{aq}} \rightarrow logP = \log\left(\frac{C_{org}}{C_{aq}}\right)$$

Όπου:

- C_{org}: η συγκέντρωση της ένωσης διαλυμένη στην οργανική φάση
- C_{aq}: η συγκέντρωση της ένωσης διαλυμένη στην υδατική

Για μία ένωση σε ιονισμένη μορφή:

$$D = \frac{\Sigma C_{org}}{\Sigma C_{aq}} \rightarrow logD = \log\left(\frac{\Sigma C_{org}}{\Sigma C_{aq}}\right)$$

Όπου:

- ΣC_{org}: το άθροισμα των συγκεντρώσεων των ιονισμένων και μη μορφών της ένωσης η οποίες είναι διαλυμένες στην οργανική φάση
- ΣC_{aq}: το άθροισμα των συγκεντρώσεων των ιονισμένων και μη μορφών της ένωσης η οποίες είναι διαλυμένες στην υδατική φάση.

4.3.4. Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (*blood-brain barrier* - ΑΕΦ ή BBB) πρόκειται για ένα φυσικό φραγμό μεταξύ αίματος και εγκεφάλου, ο οποίος είναι ιδιαίτερα σύνθετος και επιτρέπει μόνο την εκλεκτική μεταφορά απαραιτήτων μορίων, προστατεύοντας τον εγκέφαλο από πιθανόν βλαβερές ουσίες. Τα φάρμακα που έχουν σχεδιαστεί για να δράσουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα πρέπει επομένως να μπορούν να τον ξεπεράσουν, ώστε να

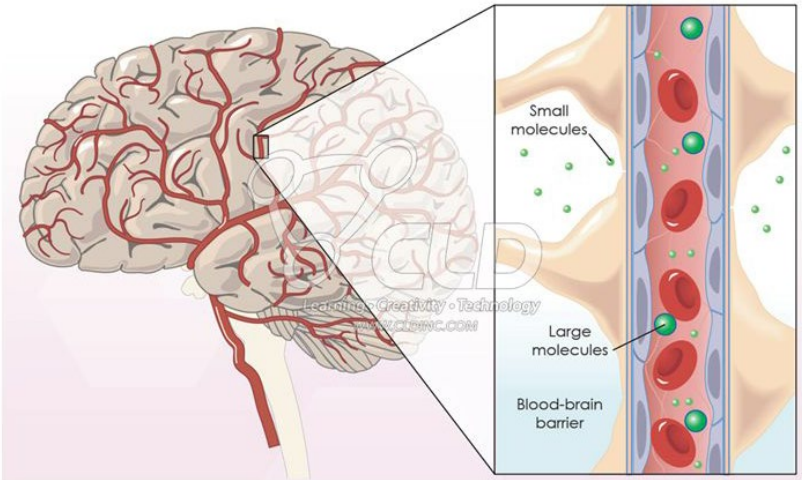
θεωρηθούν αποτελεσματικά. Ο μόνος τρόπος για να γίνει αυτό είναι μέσω παθητικής διάχυσης, η οποία διέπεται από τη σχέση:

$$logBB = \log\left(\frac{C_{brain}}{C_{blood}}\right)$$

Όπου:

- C_{brain}: η συγκέντρωση του αναλύτη στον ιστό του εγκεφάλου
- C_{blood}: η συγκέντρωση του αναλύτη στο αίμα

Η *in vivo* μέτρηση της διαπερατότητας του εγκεφαλικού φραγμού μέσω του logBB παρόλο που φαίνεται αρκετά υποσχόμενη και αποτελεσματική, είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και γεννά ταυτόχρονα ηθικά ζητήματα καθώς απαιτεί πειραματόζωα για την διεκπεραίωσή της. Εναλλακτική μέθοδο αποτελεί η εκτίμηση του μεγέθους *permeability surface-area product*, το οποίο εκφράζεται επίσης λογαριθμικά (logPS).[33]



Εικόνα 34: Αιματοεγκεφαλικός φραγμός.[vii]

Τα φάρμακα που διαπερνούν τον ΑΕΦ είναι τα μη ιονισμένα/πολικά φάρμακα χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία είναι λιπόφιλα. Όσον αφορά τη λιποφιλία, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η άριστη τιμή λιποφιλίας (logP ή logD) για τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι περίπου ίση με 2. Ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι ενώσεις με συντελεστή μερισμού logP (ή κατανομής logD σε pH=7.4)≈2 προκαλούν, ανεξάρτητα από οποιαδήποτε άλλη δράση έχουν, καταστολή στο ΚΝΣ λόγω υψηλής συγγένειας με τις εγκεφαλικές μεμβράνες. Συνεπώς, για φάρμακα που στοχεύουν το ΚΝΣ ο σχεδιασμός δεν πρέπει εστιάζει σε ενώσεις με logP ή logD≈2, αλλά σε ενώσεις με χαμηλότερη λιποφιλία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μορφίνη, η οποία εμφανίζει χαμηλό συντελεστή κατανομής (logD=0,07 σε pH=7.4), έχει όμως εξαιρετικά μεγάλη ενδογενή δραστικότητα, δηλαδή παρόλο που περνάει σε μικρά ποσοστά στο ΚΝΣ, εμφανίζει ισχυρή αναλγητική δράση.

4.4. Μνημονικός κανόνας των 5 του Lipinski

Η χορήγηση από του στόματος (*per os*) αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο χορήγησης φαρμάκων, καθώς είναι η πλέον αποδεκτή από τους ασθενείς, ενώ παράλληλα είναι μία

απλή, ασφαλής και οικονομική μέθοδος. Ωστόσο δεν είναι όλα τα φάρμακα κατάλληλα για από του στόματος χορήγηση, καθώς κάποια δεν απορροφώνται επαρκώς, ενώ άλλα αποσυντίθενται στο γαστρεντερικό σωλήνα, κάτι που οφείλεται στο φαινόμενο πρώτης διόδου, δηλαδή το μεταβολισμό ενός φαρμάκου κατά τη διέλευσή του από το εντερικό τοίχωμα και το ήπαρ πριν την απορρόφησή του.

Ο Lipinski το 1997 συνόψισε τα έως τότε δεδομένα για την επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στη διαπερατότητα σε ένα απλό μνημονικό κανόνα πολλαπλασίων του 5 (κανόνας των 5 - *rule of five*). Ο κανόνας αυτός αφορά σε μη ευνοϊκά μοριακά χαρακτηριστικά για την απορρόφηση των φαρμάκων που χορηγούνται *per os*.

Τα μοριακά χαρακτηριστικά που πιθανώς να προσδώσουν στο φαρμακομόριο προβληματική απορρόφηση ή διαπερατότητα είναι:

- Μοριακό βάρος > 500
- Συντελεστής μερισμού logP > 5
- Περισσότερες από 5 θέσεις δοτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου, υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ομάδων OH και NH στο μόριο
- Περισσότερες από 10 θέσεις δεκτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου, υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ομάδων O και N στο μόριο

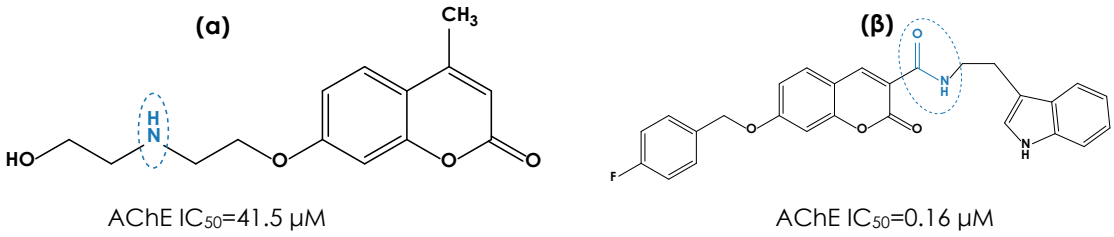
Γενικά, ο κανόνας των πέντε του Lipinski εκτιμά ότι όταν μία ένωση έχει δυο τουλάχιστον από τα παραπάνω χαρακτηριστικά αναμένεται να εμφανίζει προβλήματα στην απορρόφησή της *per os*, στη διαλυτότητά της και γενικά στη βιοδιαθεσιμότητά της (με τη βιοδιαθεσιμότητα να ορίζεται ως το ποσοστό της χορηγούμενης δόσης του φαρμάκου που εμφανίζεται στην κυκλοφορία του αίματος). Ο κανόνας των πέντε έχει διευρυνθεί από άλλους ερευνητές με την προσθήκη επιπλέον μετρικών κριτηρίων που αφορούν την παθητική *per os* απορρόφηση φαρμακομορίων. Ειδικότερα, ο Veber προσέθεσε τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Περισσότεροι από 10 περιστρεφόμενοι δεσμοί
- Εμβαδό πολικής επιφάνειας (*polar surface area* - PSA) > 140 Å

Το εμβαδόν της πολικής επιφάνειας (PSA) του μορίου είναι ένας συνδυαστικός τρόπος έκφρασης της πολικότητας και της δυνατότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Ο πλέον εύχρηστος τρόπος υπολογισμού του εμβαδού της πολικής επιφάνειας ενός μορίου είναι με τη μέθοδο TPSA (*topological polar surface area*). Ο υπολογισμός με τη μέθοδο αυτή βασίζεται στην προσθετικότητα και γίνεται με άθροιση των μεγεθών των πολικών τμημάτων του μορίου από κατάλληλα διαμορφωμένη βιβλιοθήκη μοριακών θραυσμάτων που εμπεριέχουν άτομα οξυγόνου, αζώτου, φωσφόρου και θείου.[31]

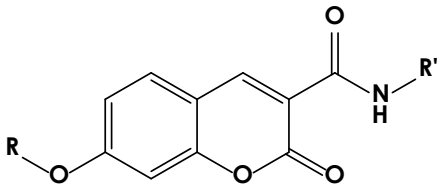
ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων υβριδικών κουμαρινικών μορίων προς μελέτη της δράσης τους ως αναστολείς του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση. Ο σχεδιασμός των νέων κουμαρινικών αναλόγων στηρίχθηκε σε ήδη γνωστά κουμαρινικά μόρια-οδηγούς που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ (**Εικόνα 35α**) και έχουν επιδείξει αξιόλογη ικανότητα αναστολής του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης, καθώς και στην τρέχουσα βιβλιογραφία[34] (**Εικόνα 35β**).



Εικόνα 35: Χημική δομή μορίων οδηγών.[34]

Ως εκ τούτου τα παραπάνω μόρια αποτέλεσαν ενώσεις-οδηγούς για τη σύνθεση νέων υβριδικών κουμαρινικών καρβοξαμιδίων συντηγμένου τύπου. Τα καρβοξαμίδια αυτά προέκυψαν μέσω αντιδράσεων τριών σταδίων με γενική δομή που φαίνεται στην **Εικόνα 36**.



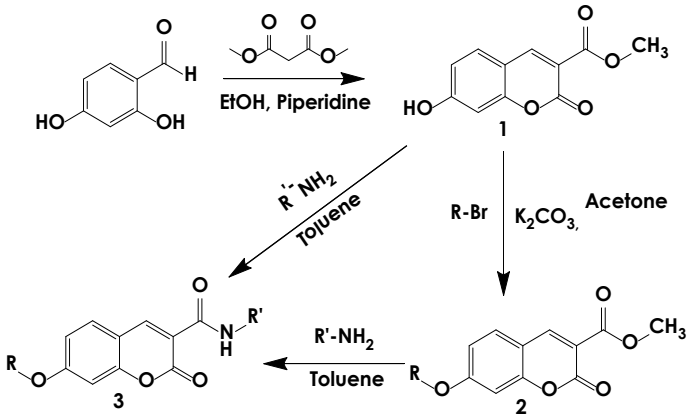
Εικόνα 36: Γενική δομή υβριδικών κουμαρινικών καρβοξαμιδίων.

Τα μόρια που συντέθηκαν ταυτοποιήθηκαν ως προς τη δομή τους μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Κατόπιν ταυτοποίησης, ακολούθησε *in vitro* μελέτη της ικανότητας αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση μέσω της τροποποιημένης μεθόδου Ellman από τους Rahman και Choudhary.[35] Ακόμα, έγινε πρόβλεψη ορισμένων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, σημαντικών για την εφαρμογή του κανόνα του Lipinski για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς κατά τη χορήγηση από του στόματος, καθώς εκτιμήθηκε και η ικανότητα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

ΣΥΝΘΕΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

1. Σύνθεση καρβοξαμιδίων

Η γενική πορεία σύνθεσης των κουμαρινικών καρβοξαμιδίων φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



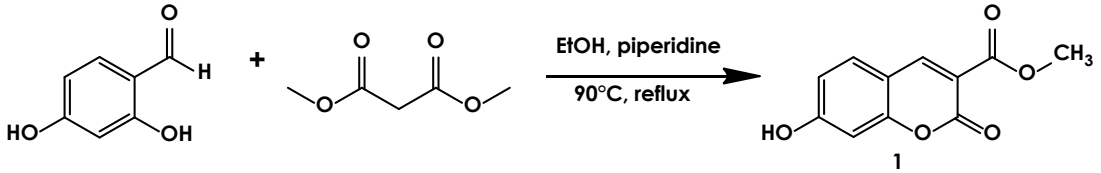
Όπου:

- **2:**
  - a: R=C_5H_9
  - b: R=C_7H_7
- **3:**
  - a: R=C_5H_9, R'=CH_3
  - b: R=C_5H_9, R'=C_7H_{15}
  - c: R=C_5H_9, R'=C_2H_5O
  - d: R=C_5H_9, R'=C_6H_6N
  - e: R=C_5H_9, R'=$C_3H_7O_2$
  - f: R=C_5H_9, R'= C_6H_5O
  - g: R=C_7H_7, R'=C_7H_{15}
  - h: C_7H_7, R'=C_6H_6N
  - i: R= C_7H_7, R'=C_8H_9O
  - j: R=H, R'=C_2H_5O

Σχήμα 2: Γενική πορεία σύνθεσης καρβοξαμιδίων.

Με αρχικά αντιδρώντα τη *2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΰδη* και το *μηλονικό διμεθυλεστέρα* ως πρώτο βήμα πραγματοποιείται συμπύκνωση Knoevenagel, η οποία δίνει ως προϊόν την *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη* (**1**). Ακολουθεί αντίδραση σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson, κατά την οποία η κουμαρίνη αντιδρά είτε με *πρενυλο-βρωμίδιο* (*1-βρωμο-3-μεθυλο-2-βουτένιο*), είτε με *βενζυλο-βρωμίδιο* (*βρωμο-μεθυλο-βενζόλιο*), με προϊόντα την *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνη* (**2a**) και την *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-κουμαρίνη* (**2b**) αντίστοιχα. Τα τελικά καρβοξαμίδια (**3a-3j**) προκύπτουν μέσω αντίδρασης με κατάλληλα υποκατεστημένες πρωτοταγείς αμίνες.

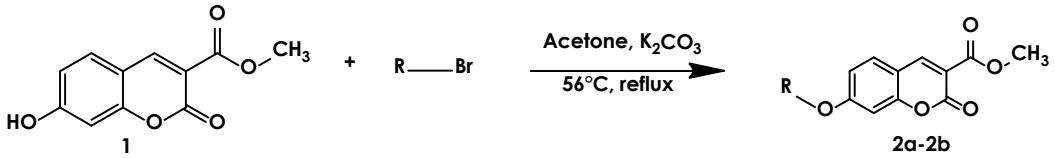
1.1. Σύνθεση 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (1)



Σχήμα 3: Σύνθεση 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης.

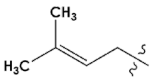
Η σύνθεση της *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης* επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης Knoevenagel μεταξύ της *2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΰδης* και του *μηλονικού διμεθυλεστέρα* σε αναλογία 1:1 σε διαλύτη αιθανόλη και παρουσία καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης.[36]

1.2. Σύνθεση 7-αλκοξυ κουμαρινικών παραγώγων (2a-2b)

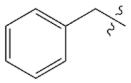


Όπου:

- a: R=C_5H_9



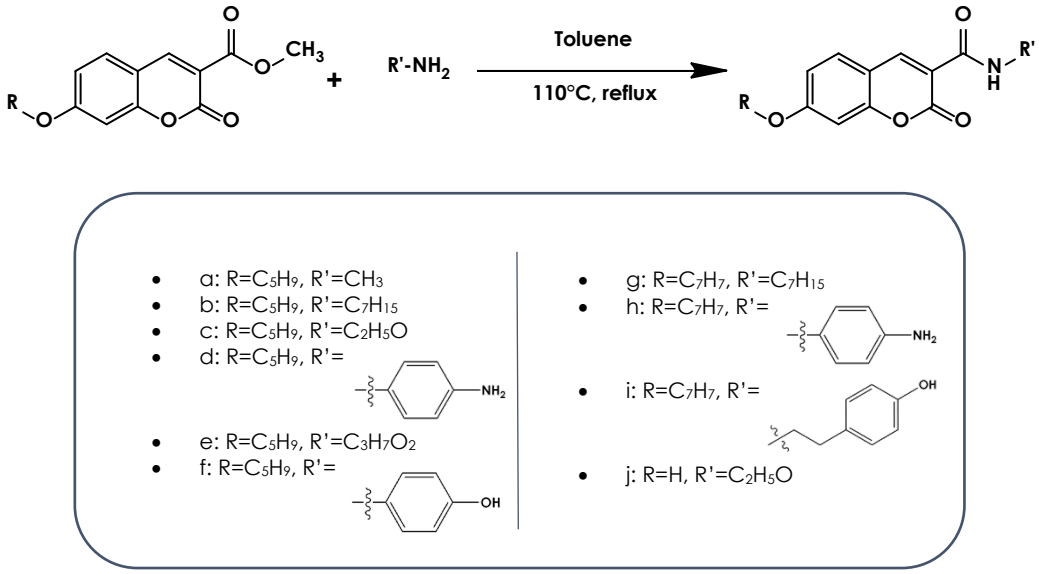
- b: R=C_7H_7



Σχήμα 4: Σύνθεση 7-αλκοξυ-κουμαρινικών παραγώγων.

Η σύνθεση των αλκοξυ-παραγώγων *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνη και 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-κουμαρίνη* επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson, κατά την οποία η *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη* αντιδρά με είτε *πρενυλο-βρωμίδιο* είτε *βενζυλο-βρωμίδιο* σε αναλογία 1:1.2, σε διαλύτη ακετόνη και παρουσία ανθρακικού καλίου προς δημιουργία βασικού περιβάλλοντος.[15]

1.3. Σύνθεση καρβοξαμιδίων (3a-3j)

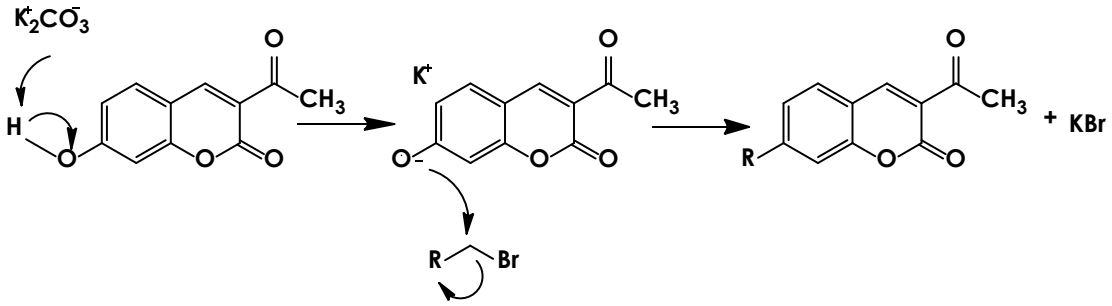


Σχήμα 5: Σύνθεση καρβοξαμιδίων.

Η σύνθεση των τελικών καρβοξαμιδίων επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης μεταξύ των εκάστοτε 7-αλκοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (ή της ίδιας της *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης*) και κατάλληλα υποκατεστημένων πρωτοταγών αμινών σε διαλύτη τολουόλιο και αναλογία 1:2. Έτσι προκύπτουν δέκα καρβοξαμιδικά κουμαρινικά παράγωγα.[37]

2. Μηχανισμός σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson

Η σύνθεση αιθέρων κατά Williamson αποτελεί την πιο γενική μέθοδο παρασκευής αιθέρων, κατά την οποία ιόντα αλκοξειδίου αντιδρούν με πρωτοταγή αλκυλαλογονίδια προς αιθέρες μέσω μηχανισμού S_N2. Ως πρώτο βήμα, τα ιόντα αλκοξειδίου προκύπτουν από την αρχική υδροξυ-κουμαρίνη παρουσία βάσης, στην προκειμένη ανθρακικού καλίου. Έπειτα το πυρηνόφιλο αλκοξείδιο προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του εκάστοτε βρωμιδίου και το τελικό προϊόν προκύπτει μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστασης.[38]



Σχήμα 6: Μηχανισμός σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson.

3. Ταυτοποίηση των νέων ενώσεων

3.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (*Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy* - NMR) βασίζεται στην παρατήρηση ισχυρών τοπικών ομογενών μαγνητικών πεδίων γύρω από ατομικούς πυρήνες. Η διέγερση των ατομικών πυρήνων οφείλεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, από περίπου 4 έως 900 MHz. Οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων μεταβαίνουν από καταστάσεις χαμηλότερης σε καταστάσεις υψηλότερης ενέργειας αναστρέφοντας την αυτοπεριστροφή (*spin*) τους και ως εκ τούτου συντονίζονται με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία.

Εικόνα 37: Όργανο NMR συχνότητας 600 MHz της εταιρείας Varian.[viii]

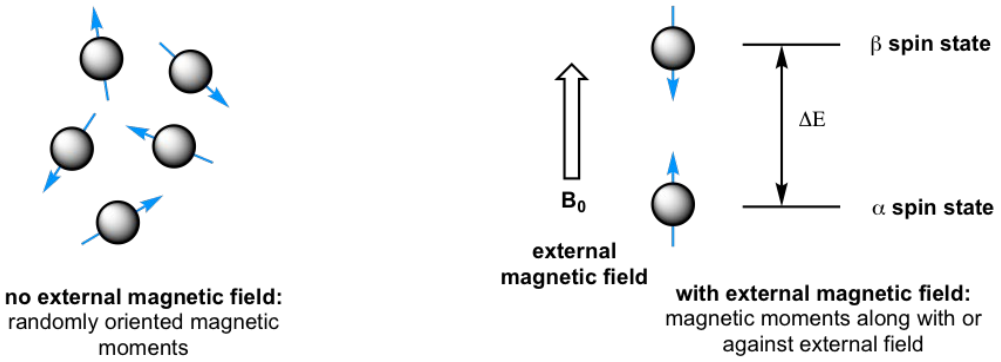
Η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, η οποία παρατηρείται κατόπιν αλληλεπίδρασης με τους πυρήνες του εκάστοτε δείγματος, είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα. Επομένως η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της δομής αλλά και της καθαρότητας οργανικών ενώσεων.

Για την ερμηνεία της συμπεριφοράς των πυρήνων γίνεται η υπόθεση ότι αυτοί περιστρέφονται γύρω από έναν άξονα κι επομένως διαθέτουν αυτοπεριστροφή (*spin*), δημιουργώντας δίπολο μαγνητικής ροπής (μ) κατά μήκος του πυρηνικού τους άξονα. Η γωνιακή στροφορμή του περιστρεφόμενου πυρήνα (I) χαρακτηρίζεται από έναν κβαντικό αριθμό spin, ο οποίος παίρνει τιμές 0, 1/2, 2/2, 3/2, κ.ο.κ. ανάλογα με το είδος του πυρήνα, σε μονάδες h/2π, όπου h η σταθερά του Planck. Η τιμή του αριθμού spin εξαρτάται από τον αριθμό των πρωτονίων και των νετρονίων και μπορεί να είναι μηδέν, ακέραιος και

ημιακέραιος αριθμός. Επομένως οι πυρήνες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με την τιμή του αριθμού spin:

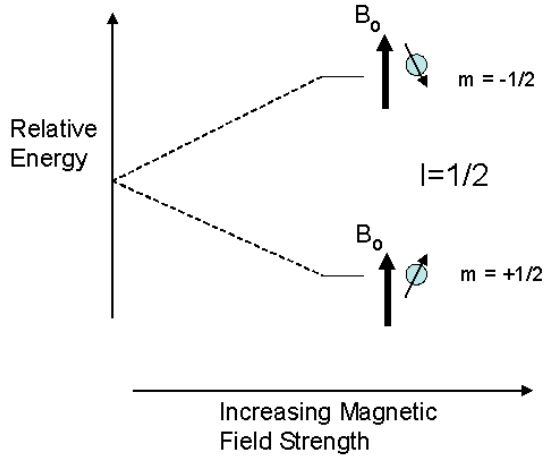
- **Πυρήνες με άρτιο μαζικό και ατομικό αριθμό ($^{12}_{6}C$, $^{16}_{8}O$, $^{32}_{16}S$):** δεν παρουσιάζουν γωνιακή στροφορμή (I=0), δεν εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και επομένως δεν δίνουν φάσματα NMR.
- **Πυρήνες με περιττό μαζικό αριθμό και άρτιο ή περιττό ατομικό αριθμό ($^{1}_{1}H$, $^{13}_{6}C$, $^{19}_{9}F$):** παρουσιάζουν αριθμούς spin οι οποίοι είναι περιττά ακέραια πολλαπλάσια του 1/2.
- **Πυρήνες με άρτιο μαζικό αριθμό και περιττό ατομικό αριθμό ($^{2}_{1}H$, $^{14}_{7}N$):** παρουσιάζουν αριθμούς spin οι οποίοι είναι άρτια ακέραια πολλαπλάσια του 1/2.

Πυρήνες με I>0 όταν βρεθούν σε εξωτερικό, ομογενές και στατικό μαγνητικό πεδίο (B_o), συμπεριφέρονται όπως μία μαγνητική ράβδος και το άνυσμα της στροφικής ορμής τους παίρνει 2I+1 προσανατολισμούς ως προς τη διεύθυνση του πεδίου. Σε κάθε προσανατολισμό αντιστοιχεί μία ορισμένη τιμή ενέργειας (E).



Εικόνα 38: Συμπεριφορά πυρήνων με I>0 απουσία και παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.[ix]

Οι τέσσερεις σημαντικότεροι πυρήνες που χρησιμοποιούνται κυρίως στη Χημεία και τη Βιοχημεία είναι οι $^{1}_{1}H$, $^{13}_{6}C$, $^{19}_{9}F$, $^{31}_{15}P$. Οι πυρήνες αυτοί εμφανίζουν σφαιρική, συμμετρική κατανομή του φορτίου τους και έχουν αριθμό spin ίσο με το 1/2. Για τους πυρήνες αυτούς είναι πιθανοί δύο προσανατολισμοί, παράλληλα με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (I=+1/2) και αντιπαράλληλα με αυτό (I=-1/2). Η πρώτη κατάσταση αντιστοιχεί στη βασική κατάσταση χαμηλής ενέργειας, ενώ η δεύτερη στη διεγερμένη κατάσταση υψηλής ενέργειας. Έτσι, τα φάσματα NMR προκύπτουν από διεγέρσεις από τη βασική στη διεγερμένη κατάσταση, υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ικανής να προκαλέσει συντονισμό.



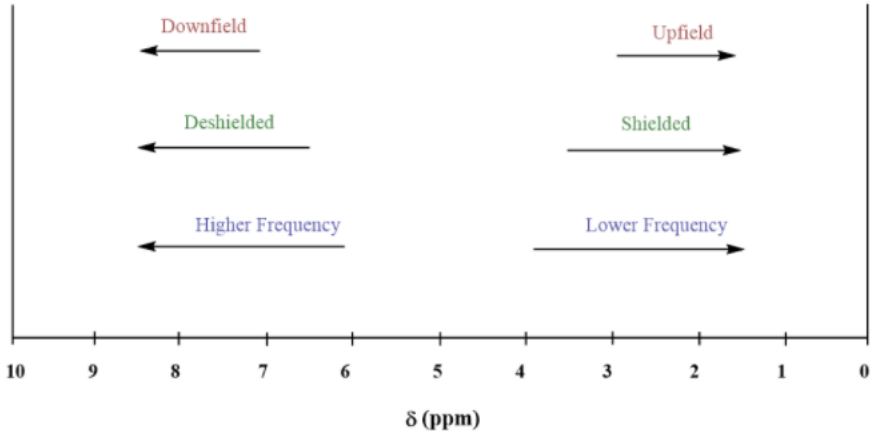
Εικόνα 39: Διαφορά ενέργειας πυρήνων με παράλληλο και αντιπαραλληλο spin σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο Bo.[x]

Η φασματοσκοπία NMR όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση της δομής μίας ένωσης, στην εύρεση των χαρακτηριστικών ομάδων της αλλά και πιθανών προσμίξεων και στη ποσοτική ανάλυση, η οποία συνήθως γίνεται με υπολογισμό της καθαρότητας της ένωσης. Χρησιμοποιείται επίσης για τον προσδιορισμό υδρογόνωσης σε πετροχημικές διεργασίες, καθώς και τον προσδιορισμό ύδατος σε έλαια, τρόφιμα και γεωργικά υλικά.[39], [40]

3.2. Χαρακτηριστικά Φασμάτων NMR

Τα φάσματα NMR βασίζονται στην ύπαρξη χημικής μετατόπισης, που συνίσταται στην εξάρτηση της συχνότητας συντονισμού των μαγνητικών πυρήνων από το χημικό τους περιβάλλον, καθώς και στο φαινόμενο spin-spin σύζευξης, δηλαδή το διαχωρισμό ορισμένων κορυφών συντονισμού σε ομάδες πολλαπλών συμμετρικών κορυφών λόγω της αλληλεπίδρασης των spin γειτονικών πυρήνων.

Η χημική μετατόπιση οφείλεται στο γεγονός ότι τα πρωτόνια συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες, ανάλογα με το είδος του δεσμού H-X και την ύπαρξη στο μόριο ομάδων που επηρεάζουν τη συμπεριφορά των πρωτονίων. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο ότι τα ηλεκτρόνια «θωρακίζουν» τον πυρήνα, δημιουργώντας με την επίδραση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου ένα μικρό τοπικό μαγνητικό πεδίο κατεύθυνσης αντίθετης από του εφαρμοζόμενου. Σε δεσμούς H→X, όπου X ο δέκτης ηλεκτρονίων, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον πυρήνα υδρογόνου είναι ελαττωμένη, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ηλεκτρονιακή προστασία και τη μετατόπιση του σήματος συντονισμού σε μεγαλύτερες τιμές συχνοτήτων (*downfield*). Αντίθετα, σε δεσμούς H←Y, όπου Y ο δότης ηλεκτρονίων, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον πυρήνα υδρογόνου είναι αυξημένη και η συχνότητα συντονισμού μετατοπισμένη σε χαμηλότερες τιμές συχνοτήτων (*upfield*). Εκτός από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα, η ύπαρξη πολλαπλών δεσμών επηρεάζει επίσης τη θωράκιση του πρωτονίου, λόγω εμφάνισης διαμαγνητικής ανισοτροπίας, δηλαδή λόγω της δυνατότητας περιστροφής των π-ηλεκτρονίων μόνο σε ορισμένες κατευθύνσεις.

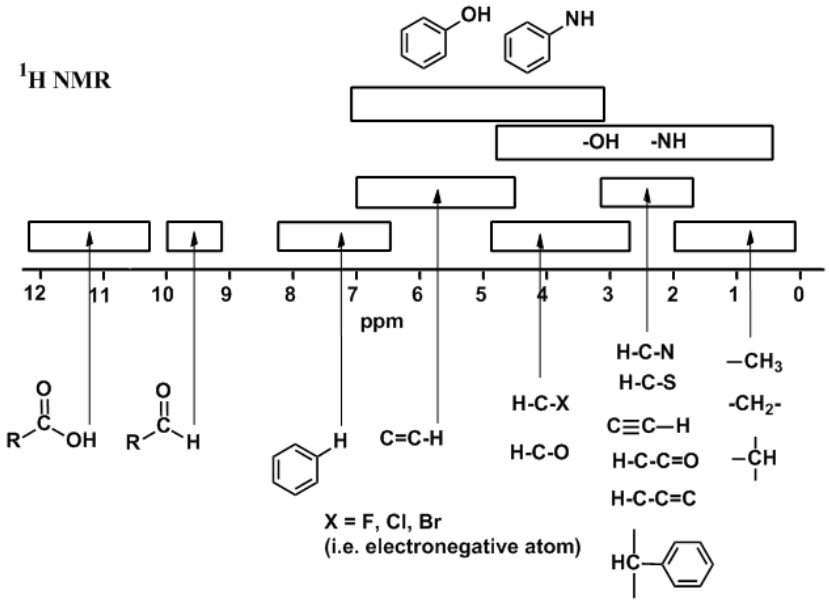


Εικόνα 40: Άξονας φάσματος NMR.[xi]

Η θέση συντονισμού ενός πρωτονίου εκφράζεται σε σχέση με μία πρότυπη ένωση. Εάν ν_δ και ν_σ είναι οι συχνότητες συντονισμού του εξεταζόμενου πρωτονίου (ή ομάδας πρωτονίων) του δείγματος και της ουσίας αναφοράς αντίστοιχα, και ν_o η βασική συχνότητα λειτουργίας του φασματόμετρου (σε Hz), τότε η χημική μετατόπιση εκφράζεται με την κλίμακα δ, όπου:

$$\delta = \frac{\nu_\delta - \nu_\sigma}{\nu_o} \cdot 10^6 \; ppm$$

Πρωτόνια που έχουν το ίδιο χημικό περιβάλλον και είναι χημικώς ισότιμα (ισοδύναμα), είναι συνήθως και μαγνητικώς ισότιμα. Επομένως, τα πρωτόνια αυτά δίνουν μία μόνο κορυφή. Όταν τα πρωτόνια είναι μεν χημικώς ισοδύναμα, αλλά όχι μαγνητικώς, παρατηρούνται διαφορετικά σήματα συντονισμού. Παραδείγματος χάριν, τα πρωτόνια μίας μεθοξυ-ομάδας υφίστανται μεγαλύτερη αποθωράκιση λόγω του ηλεκτρονιόφιλου οξυγόνου σε σχέση με τα μεθυλικά.



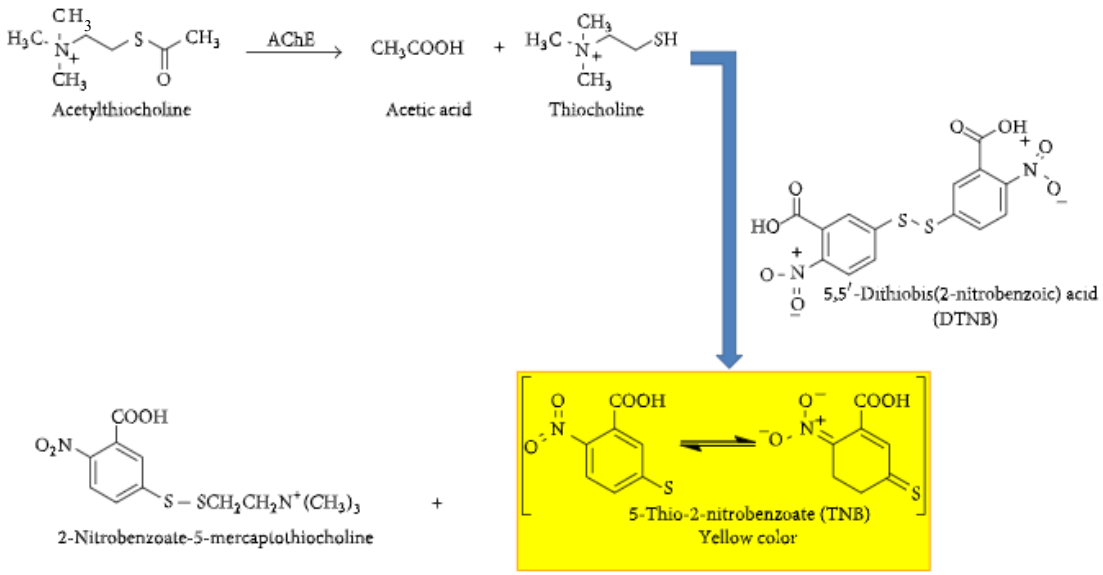
Εικόνα 41: Χημικές μετατοπίσεις κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα ¹H NMR.[xii]

Σε πολλά φάσματα ^{1}H NMR, οι κορυφές συντονισμού διαχωρίζονται σε συμμετρικές πολλαπλές ομάδες κορυφών (διπλές, τριπλές, κλπ.) λόγω της αλληλεπίδρασης των spin γειτονικών πρωτονίων. Η πολλαπλότητα αυτή καλείται spin-spin σύζευξη και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών μαγνητικών πυρήνων, η οποία διαδίδεται όχι μέσω του χώρου, αλλά μέσω των δεσμών του μορίου. Η σύζευξη μεταξύ δύο πυρήνων (ή δύο ομάδων ισότιμων πυρήνων) χαρακτηρίζεται από τη σταθερά συζεύξεως J, που είναι η απόσταση σε Hz των επιμέρους κορυφών κι είναι ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου, αλλά εξαρτάται από τη γεωμετρία του μορίου (ορθο-, μετα-, παρα- θέσεις υποκαταστατών). Όταν μία ομάδα μαγνητικώς ισοτίμων ^{1}H, δηλαδή πρωτονίων με ίδιο J, έχει n ισότιμα γειτονικά ^{1}H, τα ^{1}H της ομάδας δίνουν μία σύνθετη κορυφή στο φάσμα NMR με πολλαπλότητα (n+1).[40],[41]

4. Αξιολόγηση ικανότητας αναστολής της AChE

Η πιο κοινή μέθοδος *in vitro* αξιολόγησης της ικανότητας διαφόρων ενώσεων να αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση είναι η μέθοδος του Ellman. Πρόκειται για μια φωτομετρική μέθοδο, κατά την οποία η ενζυμική δράση της ακετυλοχολινεστεράσης συσχετίζεται με την παραγωγή κίτρινου χρώματος κατά την αντίδραση της θειοχολίνης με το *5,5'-διθειο-2-νιτροβενζοϊκό ιόν* (*5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate)*, το οποίο προέρχεται από το *5,5'-διθειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ* (*5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid* - DTNB). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται η ακετυλοθειοχολίνη (*acetylthiocholine* - ATCI), η οποία υφίσταται ενζυμική υδρόλυση από την ακετυλοχολινεστεράση προς θειοχολίνη και οξικό οξύ.

Η αρχή της μεθόδου έγκειται στη μέτρηση του ρυθμού παραγωγής θειοχολίνης κατά την υδρόλυση της ακετυλοθειοχολίνης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της συνεχούς αντίδρασης της θειοχολίνης με το DTNB, η οποία παράγει το κίτρινο *5-θειο-2-νιτροβενζοϊκό ιόν* (*5-thio-2-nitrobenzoate* - TNB). Ο ρυθμός της παραγωγής του κίτρινου χρώματος μετράται από φωτόμετρο στα 412 nm. Η εξαγωγή των μετρήσεων απορρόφησης του φωτόμετρου δίνει τα απαραίτητα δεδομένα για την ποσοτικοποίηση της ενζυμικής αναστολής.[42]



Εικόνα 42: Χημική αναπαράσταση μεθόδου Ellman.[43]

Η πειραματική μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία βασίστηκε στην τροποποίηση της μεθόδου του Ellman από τους Rahman και Choudhary, κατά την οποία πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης στα 412 nm σε χρόνους 0 και 10 min και η αναστολή ποσοτικοποιείται ως προς την απορρόφηση ενός δείγματος αναφοράς (control), στην προκειμένη δείγματος γαλανταμίνης.[35]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Όργανα και συσκευές οργανικής σύνθεσης

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων, καθώς και ένας αρχικός έλεγχος της καθαρότητας των ενώσεων που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκαν μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (*Thin Layer Chromatography* - TLC) σε πλάκες αλουμινίου της εταιρίας Merck, επιστρωμένες με Silica Gel F254 και εμβαπτισμένες σε κατάλληλες αναλογίες συστήματος διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα (*Petroleum Ether* - PE) / οξικού αιθυλεστέρα (*Ethyl Acetate* - EtOAc) ή διχλωρομεθανίου (*Dichloromethane* - DCM) / μεθανόλης (*Methanol* - MeOH). Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων TLC εμφανίστηκαν σε λάμπα υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας στα 254 nm κατόπιν εμποτισμού των πλακών σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (*Phosphomolybdic acid* - αιθανολικό διάλυμα PMA 7%) και θέρμανσής τους.

Η παραλαβή των τελικών καθαρών προϊόντων πραγματοποιήθηκε μέσω είτε ανακρυστάλλωσης είτε χρωματογραφίας στήλης, με την χρωματογραφία στήλης ταχείας ανάπτυξης (*Flash Column Chromatography* - FCC) να πραγματοποιείται με χρήση Silica Gel 60 (40-63 microns) της εταιρείας Merck.

Η εξάτμιση των οργανικών διαλυτών πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα Büchi Rotavapor® R-210 υπό ελαττωμένη πίεση και σε θερμοκρασίες 40-50°C. Η ξήρανση των στερεών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε αντλία υψηλού κενού Edwards (RV-5).

Εικόνα 43: Περιστροφικός εξατμιστήρας Buchi Rotavapor®.

Η δομική ταυτοποίηση και ο έλεγχος καθαρότητας των νέων ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (*Nuclear Magnetic Resonance* - NMR) πρωτονίου (^{1}H). Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν με τα όργανα Varian 300MHz και Varian 600 MHz του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Οι

χρησιμοποιούμενοι διαλύτες ήταν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($CDCl_3$) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm ως προς τη συχνότητα συντονισμού της ένωσης αναφοράς τετραμεθυλοσιλάνιο (*tetramethylsilane* - TMS), ενώ η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^{1}H NMR αναφέρεται ως εξής: s (*singlet*, απλό), d (*double,* διπλό), t (*triplet*, τριπλό), q (*quartet*, τετραπλό), m (*multiplet*, πολλαπλό), dd (*doublet of doublets*, διπλή διπλών), tt (*triplet of triplets,* τριπλή τριπλών) και br (*broad,* ευρύ). Οι σταθερές σύζευξης J δίνονται σε Hz.

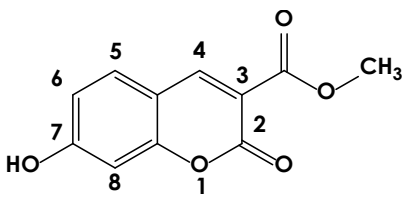
Τέλος, ο προσδιορισμός των σημείων τήξεως (Σ.Τ.) των ενώσεων έγινε σε ανοιχτούς τριχοδιαμετρικούς σωλήνες με τη χρήση συσκευής Gallenkamp.

Εικόνα 44: Συσκευή Gallenkamp.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich, Fluka, Alfa-Aesar και Acros και η χρήση τους έγινε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

2. Σύνθεση καρβοξαμιδίων

2.1. Σύνθεση 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-2Η-χρωμεν-2-όνης (1)



Σε σφαιρική φιάλη διαλύονται 7.24 mmol (1000 mg) 2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΰδης και 7.24 mmol (857.4 μL) μηλονικού μεθυλεστέρα σε 29.0 mL αιθανόλης και προστίθενται 14 σταγόνες πιπεριδίνης. Το μείγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες στους 90°C παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N_2. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, η σφαιρική φιάλη καταψύχεται μέχρις ότου να καθιζάνει στερεό, οπότε και πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό προϊόν του οποίου η καθαρότητα ελέγχεται μέσω φασματοσκοπίας ^{1}H NMR.

Απόδοση: 61%

Σημείο τήξεως: 260 ^{o}C (decomposed)

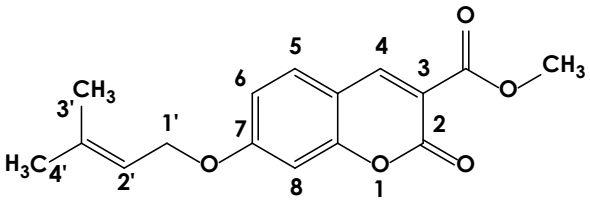
Σημείο τήξεως βιβλιογραφίας: 263-265 ^{o}C [44]

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 8.69 (s, 1H, H-4), 7.74 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, H-5), 6.83 (dd, *J*=8.7 Hz, *J*=2.1 Hz, 1H, H-6), 6.71 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, H-8), 3.79 (s, 3H, OCH_3-3).

2.2. Γενική μέθοδος σύνθεσης 7-αλκοξυ κουμαρινικών παραγώγων (2a-2b)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (1 eq) και κατάλληλη ποσότητα αλκυλο-βρωμιδίου (1.2 eq) παρουσία ξηρής βάσης ανθρακικού καλίου (K_2CO_3) σε διαλύτη ακετόνη. Το μείγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες στους 56°C παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N_2. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε κατάλληλη αναλογία συστήματος διαλυτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό προς απομάκρυνση της βάσης και παραλαβή του οργανικού διηθήματος, το οποίο εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση προς καθαρισμό του προϊόντος, του οποίου η καθαρότητα ελέγχεται μέσω φασματοσκοπίας ^{1}H NMR.

- ***3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-2Η-χρωμεν-2-όνη*** **(2a)**



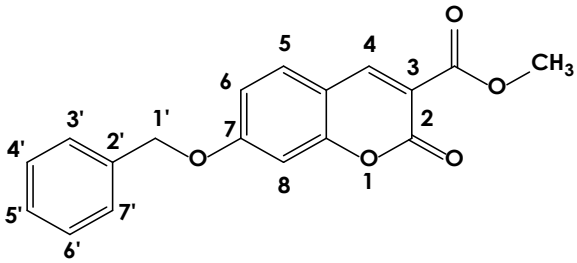
Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο, 2.73 mmol (600 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, 3.28 mmol (380.7 μL) πρενυλο-βρωμιδίου και 2.73 mmol (377.3 mg) K_2CO_3 προστίθενται σε 38.2 mL ακετόνης. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE) : 40% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 38%

Σημείο τήξεως: 107 ^{o}C

^{1}**H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.54 (s, 1H, H-4), 7.49 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, H-5), 6.89 (dd, *J*=8.7 Hz, J=2.1 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, H-8), 5.46 (t, *J*=6.6 Hz, 1H, H-2'), 4.61 (d, *J*=6.6 Hz, 2H, H-1'), 3.94 (s, 3H, OCH_3-3), 1.81 (s, 3H, CH_3-4'), 1.77 (s, 3H, CH_3-3').

- ***3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-2Η-χρωμεν-2-όνη*** **(2b)**



Σύμφωνα με την παράπανω γενική μέθοδο, 2.73 mmol (600 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, 3.28 mmol (389.6 μL) βενζυλο-βρωμιδίου και 2.73 mmol (377.3 mg) K_2CO_3 προστίθενται σε 38.2 mL ακετόνης. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαμβάνεται στερεό μωβ χρώματος.

Απόδοση: 30%

Σημείο τήξεως: 134 ^{o}C

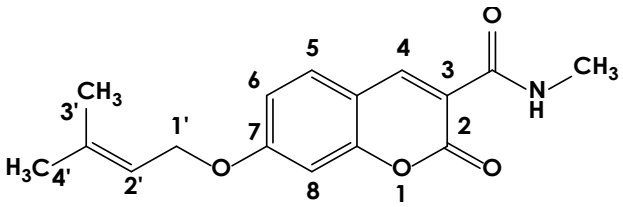
Σημείο τήξεως βιβλιογραφίας: 140 ^{o}C [45]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.54 (s, 1H, H-4), 7.51 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, H-5), 7.41 (m, 5H, H-2' & H-3' & H-4' & H-5' & H-6'), 6.97 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, H-6), 6.88 (s, 1H, H-8), 5.16 (s, 2H, H-1'), 3.94 (s, 3H, CH_3)

2.3. Γενική μέθοδος σύνθεσης καρβοξαμιδίων (3a-3j)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα (1 eq) της εκάστοτε 7-υποκατεστημένης κουμαρίνης (**1** ή **2a** ή **2b**) και κατάλληλη ποσότητα πρωτοταγούς αμίνης (2 eq) σε διαλύτη τολουόλιο. Το μείγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 48 ώρες στους 110°C παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N_2. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε κατάλληλη αναλογία συστήματος διαλυτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί κατάλληλη διεργασία καθαρισμού του τελικού προϊόντος, του οποίου η καθαρότητα ελέγχεται μέσω φασματοσκοπίας ^{1}H NMR.

- ***N-μεθυλο-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο*** **(3a)**



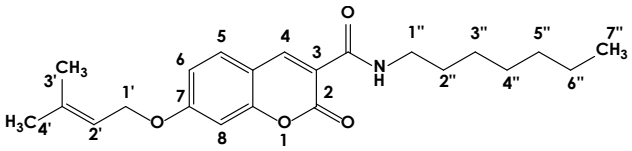
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.38 mmol (109.6 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.76 mmol (27.3 μL) μεθυλαμίνης προστίθενται σε 2.5 mL τολουόλιο. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν καταψύχεται μέχρις ότου να καθιζάνει στερεό, οπότε πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του. Το στερεό που παραλαμβάνεται υφίσταται καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 60% (PE) : 40% (EtOAc). Παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 26%

Σημείο τήξεως: 113-115 ^{o}C

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 8.82 (s, 1H, H-4), 8.58 (d, *J*=4.2 Hz, 1H, NH), 7.89 (d, *J*=9.0 Hz, 1H, H-5), 7.10 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, H-8), 7.02 (dd, *J*=9 Hz, *J*=1.8 Hz, 1H, H-6), 5.46 (t, *J*=6.6 Hz, 1H, H-2'), 4.68 (d, *J*=6.6 Hz, 1H, H-1'), 2.84 (d, 3H, CH_3-3), 1.76 (s, 3H, CH_3-4'), 1.73 (s, 3H, CH_3-3').

- ***Ν-επτυλο-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2Η-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο*** **(3b)**



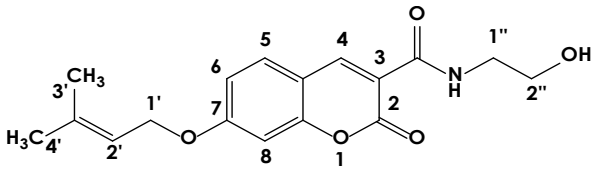
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.53 mmol (152.8 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 1.06 mmol (120.2 μL) επτυλαμίνης προστίθενται σε 3.5 mL τολουόλιο. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 90% (PE) : 10% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης γίνεται προσθήκη νερού στο μείγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με οξικό αιθυλεστέρα, ενώ το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με θειικό νάτριο (Na_2SO_4) και στη συνέχεια εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 23%

Σημείο τήξεως: 114-115 ^{o}C

^{1}**H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.83 (s, 1H, NH), 8.77 (s, 1H, H-4), 7.57 (d, *J*=9.0 Hz, 1H, H-5), 6.93 (dd, *J*=9.0 Hz, *J*=1.5 Hz, 1H, H-6), 6.86 (s, 1H, H-8), 5.48 (t, *J*=4.1 Hz, 1H, H-2’), 4.61 (d, *J*=6.6 Hz, 1H, H-1’), 3.45 (m, 2H, H-1”), 1.82 (s, 3H, CH_3-4’), 1.78 (s, 3H, CH_3-3’), 1.61 (m, 2H, H-2”), 1.31 (m, 8H, H-3” & H-4” & H-5” & H-6”), 0.88 (m, 3H, CH_3-7”).

- ***Ν-(2-υδροξυαιθυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2Η-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο*** **(3c)**



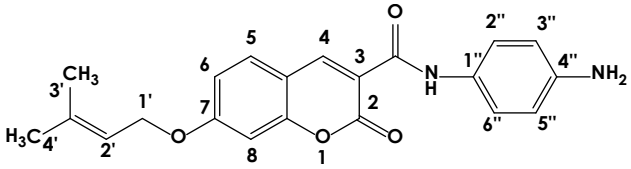
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.35 mmol (100.1 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.70 mmol (42.1 μL) αιθανολαμίνης προστίθενται σε 2.3 ml τολουόλιο. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν καταψύχεται μέχρις ότου να καθιζάνει στερεό, οπότε πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαμβάνεται στερεό λευκού χρώματος.

Απόδοση: 20%

Σημείο τήξεως: 157-158 ^{o}C

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 8.84 (s, 1H, H-4), 8.79 (t, *J*=3.9 Hz, 1H, NH), 7.89 (d, *J*=6.3, 1H, H-5), 7.11 (s, 1H, H-8), 7.02 (d, *J*=6.6 Hz, 1H, H-6), 5.46 (t, J=5.4 Hz, 1H, H-2'), 4.84 (t, *J*=2.7 Hz, 1H, OH), 4.68 (d, *J*=4.8 Hz, 2H, H-1'), 3.52 (br, 2H, H-1"), 3.40 (br, 2H, H-2"), 1.76 (s, 3H, CH_3-4'), 1.73 (s, 3H, CH_3-3').

- ***N-(4-αμινοφαινυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο* (3d)**



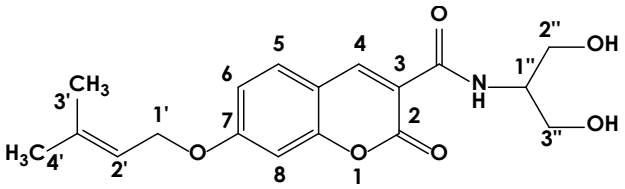
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.5 mmol (144.2 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 1 mmol (108.1 mg) 1,4-φαινυλενο-διαμίνης προστίθενται σε 3.3 ml τολουόλιο. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE) : 40% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν καταψύχεται μέχρις ότου να καθιζάνει στερεό, οπότε πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίουκαι παραλαμβάνεται στερεό κίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 27%

Σημείο τήξεως: 180-181 ^oC

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 10.34 (s, 1H, NH-1"), 8.87 (s, 1H, H-4), 7.92 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, H-5), 7.37 (d, *J*=8.7 Hz, 2H, H-2" & H-6"), 7.15 (s, 1H, H-8), 7.05 (dd, *J*=8.7 Hz, *J*=2.1 Hz, 1H, H-6), 6.56 (d, *J*=8.7 Hz, 2H, H-3" & H-5"), 5.47 (t, *J*=6.9 Hz, 1H, H-2'), 5.03 (s, 2H, NH_2-4"), 4.69 (d, *J*=6.9 Hz, 2H, H-1'), 1.76 (s, 3H, CH_3-4'), 1.74 (s, 3H, CH_3-3').

- ***N-(1,3-διϋδροξυπροπαν-2-υλ)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο* (3e)**



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.45 mmol (129.7 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.9 mmol (82.0 mg) σερινόλης προστίθενται σε 3 ml τολουόλιο. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 95% (DCM) : 5% (MeOH). Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν καταψύχεται μέχρις ότου να καθιζάνει στερεό,

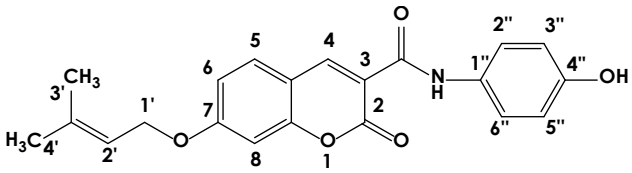
οπότε πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα διχλωρομεθανίου και μεθανόλης και παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 35%

Σημείο τήξεως: 120-122 ^{o}C

^{1}**H NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 8.74 (s, 1H, H-4), 8.31 (s, 1H, NH), 7.84 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, H-5), 7.04 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, H-8), 6.99 (dd, *J*=8.7 Hz, *J*=2.1 Hz, 1H, H-6), 5.45 (m, 1H, H-2'), 4.83 (m, 2H, OH-2' & OH-3'), 4.67 (d, *J*=6.6 Hz, 2H, H-1'), 4.51 (d, *J*=6.6 Hz, 2H, H-2" & H-3"), 4.27 (m, 2H, H-2" & H-3"), 3.60 (m, 1H, H-1"), 1.76 (s, 1H, CH_3-4'), 1.73 (s, 1H, CH_3-3').

- ***N-(4-υδροξυφαινυλ)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο* (3f)**

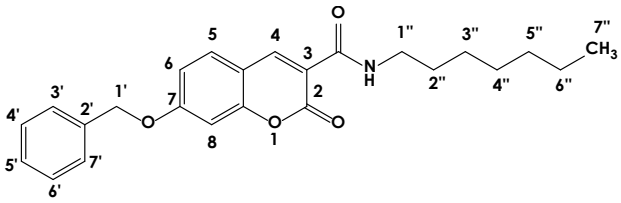


Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.53 mmol (152.8mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 1.06 mmol (115.7 mg) 4-αμινο-φαινόλης προστίθενται σε 3.6 ml τολουόλιο. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE) : 40% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν καταψύχεται μέχρις ότου να καθιζάνει στερεό, οπότε πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαμβάνεται στερεό λαδί χρώματος, το οποίο απαιτεί περαιτέρω καθαρισμό όπως διαπιστώθηκε από τη φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Απόδοση: 46%

Σημείο τήξεως: 180 ^{o}C (decomposed)

- ***7-(βενζυλοξυ)-N-επτυλο-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο* (3g)**



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.39 mmol (120.9 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-κουμαρίνης και 0.78 mmol (115.6 μL) επτυλαμίνης προστίθενται σε 2.6 ml τολουόλιο. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω

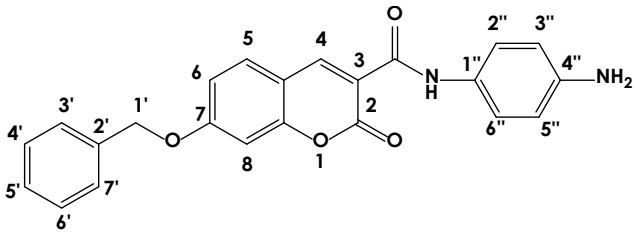
χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης γίνεται προσθήκη νερού στο μείγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με οξικό αιθυλεστέρα, ενώ το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με θειικό νάτριο (Na_2SO_4) και στη συνέχεια εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαμβάνεται στερεό κόκκινου χρώματος.

Απόδοση: 22%

Σημείο τήξεως: 141-142 ^{o}C

^{1}**H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.83 (s, 1H, H-4), 8.74 (t, *J*=5.1 Hz, 1H, NH), 7.59 (d, *J*=3.3 Hz, 1H, H-5), 7.40 (m, 5H, H-3' & H-4' & H-5' & H-6' & H-7'), 7.00 (dd, *J*=8.7 Hz, *J*=2.4 Hz, 1H, H-6), 6.93 (d, *J*=2.1 Hz, 1H, H-8), 5.17 (s, 1H, H-1'), 3.44 (q, *J*=6.6 Hz, 2H, H-1"), 1.62 (m, 2H, H-2"), 1.29 (m, 8H, H-3" & H-4" & H-5" & H-6"), 0.87 (m, 3H, CH_3-7").

- ***N-(4-αμινοφαινυλο)-7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο*** **(3h)**



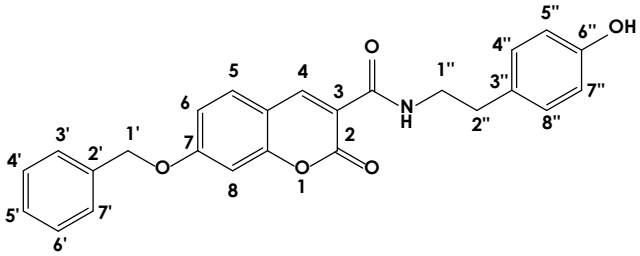
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.46 mmol (142.7 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-κουμαρίνης και 0.92 mmol (99.5 mg) 1,4-φαινυλενο-διαμίνης προστίθενται σε 3.1 ml τολουόλιο. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν καταψύχεται μέχρις ότου να καθιζάνει στερεό, οπότε πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαμβάνεται στερεό χρυσού χρώματος.

Απόδοση: 25%

Σημείο τήξεως: 218-219 ^{o}C

^{1}**H NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 10.34 (s, 1H, NH-1"), 8.87 (s, 1H, H-4), 7.95 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, H-5), 7.49 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, H-2" & H-6"), 7.40 (m, 5H, H-3' & H-4' & H-5' & H-6' & H-7'), 7.24 (s, 1H, H-8), 7.14 (dd, *J*=8.7 Hz, *J*=2.1 Hz, 1H, H-6), 6.57 (d, *J*=8.7 Hz, 2H, H-3" & H-5"), 5.28 (s, 2H, H-1'), 5.03 (s, 2H, NH_2-4").

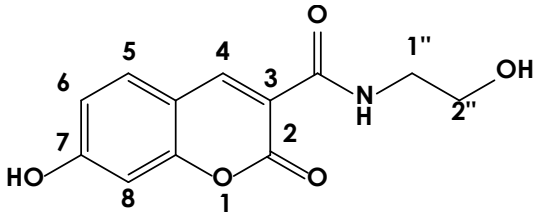
- ***7-(βενζυλοξυ)-N-(4-υδροξυφαιναιθυλο)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο*** **(3i)**



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.41 mmol (127.1 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-κουμαρίνης και 0.82 mmol (112.5 mg) τυραμίνης προστίθενται σε 2.7 ml τολουόλιο. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης γίνεται προσθήκη νερού στο μείγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με οξικό αιθυλεστέρα, ενώ το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με θειικό νάτριο (Na_2SO_4) και στη συνέχεια εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαμβάνεται στερεό ανοιχτού κίτρινου χρώματος, το οποίο απαιτεί περαιτέρω καθαρισμό όπως διαπιστώθηκε από τη φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Απόδοση: 15%

- ***7-υδροξυ-N-(2-υδροξυαιθυλο)- 2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο*** **(3j)**



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.70 mmol (155.0 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 1.4 mmol (84.2 μL) αιθανολαμίνης προστίθενται σε 4.7 ml τολουόλιο. Η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 90% (DCM) : 10% (MeOH). Μετά το πέρας της αντίδρασης γίνεται προσθήκη νερού στο μείγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με οξικό αιθυλεστέρα, ενώ το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με θειικό νάτριο (Na_2SO_4) και στη συνέχεια εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος το οποίο απαιτεί περαιτέρω καθαρισμό όπως διαπιστώθηκε από τη φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Απόδοση: 18%

3. Αναστολή AChE

3.1. Υλικά και όργανα

Τα απαιτούμενα υλικά για τον *in vitro* προσδιορισμό της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης από τα κουμαρινικά ανάλογα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Οργανολογία in vitro προσδιορισμού αναστολής AChE.

Αντιδραστήριο	**Εταιρεία**
5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	Fluorochem
Ακετυλοθειοχολίνη (*Acetylthiocholine* - ATCI)	Alfa Aesar
Ακετυλοχολινεστεράση *Electrophorus Electricus* (AChE)	Sigma-Aldrich
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (*Dimethylsulfoxide* - DMSO)	Fischer Scientific
Tris Base	Fischer Scientific

Το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης που χρησιμοποιείται στην παρούσα δοκιμή προέρχεται από τον οργανισμό *Electrophorus Electricus*, ο οποίος χρησιμοποιείται λόγω της υψηλής ομοιότητας του ενζύμου με την ανθρώπινη ακετυλοχολινεστεράση (60% ομοιότητα του ενεργού κέντρου).

Τα δείγματα υφίστανται προετοιμασία σε vortex ZX3 Advanced Vortex Mixer της εταιρείας Velp Scientifica. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε πλακίδιο (plate) 96 θέσεων και η ανάλυση πραγματοποιείται με τη συσκευή plate reader Epoch 2 Microplate Reader της εταιρείας Bio Tek Instruments.

Εικόνα 45: Συσκευή Epoch 2 Microplate Reader.

3.2. Πειραματική διαδικασία

Σε κάθε θέση του πλακιδίου προστίθενται 158μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (C=50mM, pH=8.0), 20 μL ακετυλοχολινεστεράσης *electrophorus electricus* και 2 μL της εκάστοτε ένωσης διαλυμένης σε DMSO. Ακολουθεί επώαση για 15 min και έπειτα προστίθενται 10 μL DTNB και 10 μL ATCI. Μετράται η απορρόφηση στα 412 nm για τις χρονικές στιγμές t=0 και t=10 min. Η απορρόφηση αυτή εξετάζεται ως προς τις αντίστοιχες απορροφήσεις του control, δείγματος που περιέχει 2 μL DMSO σε αντίθεση με τα προς εξέτασην δείγματα.

Η ποσοστιαία αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης υπολογίζεται ως εξής:

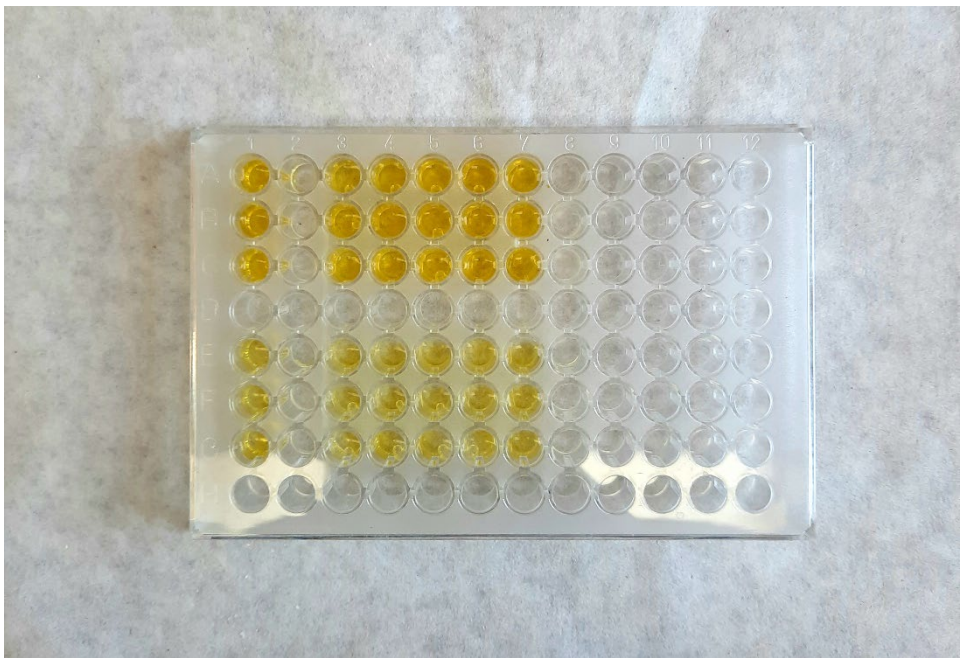
$$\%\,Inhibition = \left(1 - \frac{\Delta A_{sample}}{\Delta A_{control}}\right) \cdot 100$$

Όπου:

- $\Delta A_{sample} = A_{sample,t=10\,min} - A_{sample,t=0\,min}$
- $\Delta A_{control} = A_{control,t=10\,min} - A_{control,t=0\,min}$

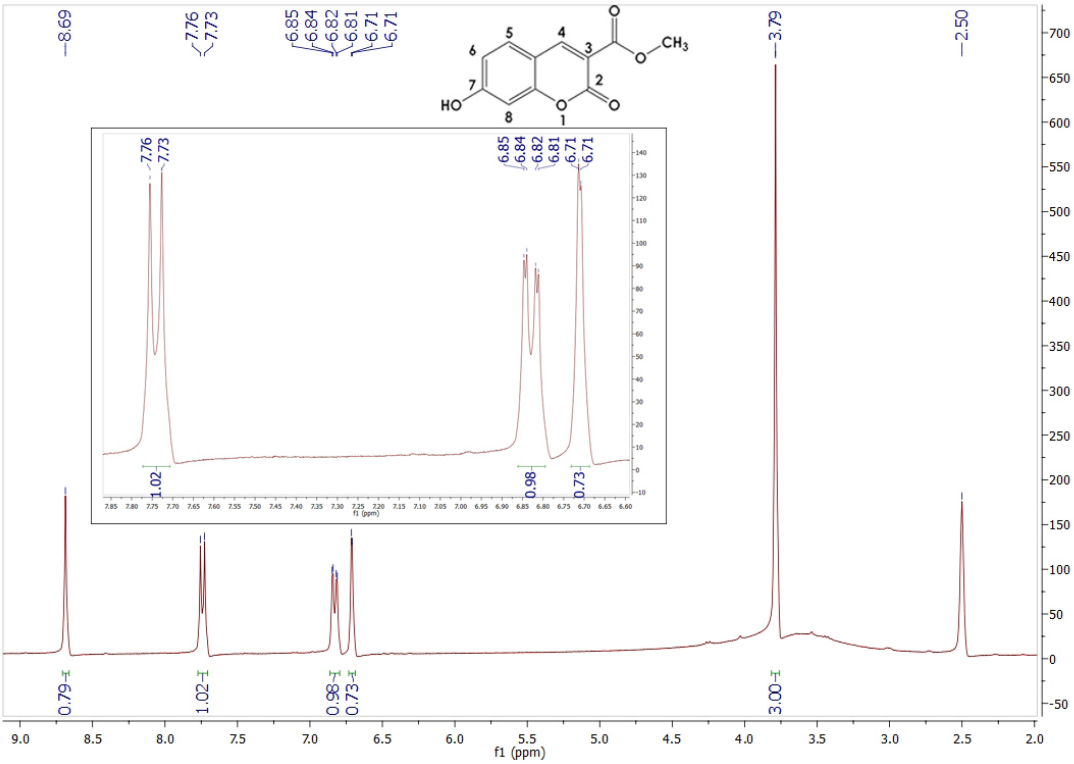
Τα προς εξέτασην δείγματα αραιώνονται κατάλληλα σε DMSO προς τελικές συγκεντρώσεις 100 μM, 80 μM, 60 μM, 40 μM και 20 μM.

Σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο του Ellman, τα δείγματα που αποκτούν ωχρό κίτρινο χρώμα αποτελούν ικανούς αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, ενώ τα δείγματα που εμφανίζουν έντονο κίτρινο χρώμα δεν εμφανίζουν ανασταλτική δράση. Τα παραπάνω προκύπτουν με χρήση της γαλανταμίνης ως ένωση αναφοράς, η οποία έχει IC_{50}=0.92 μM.



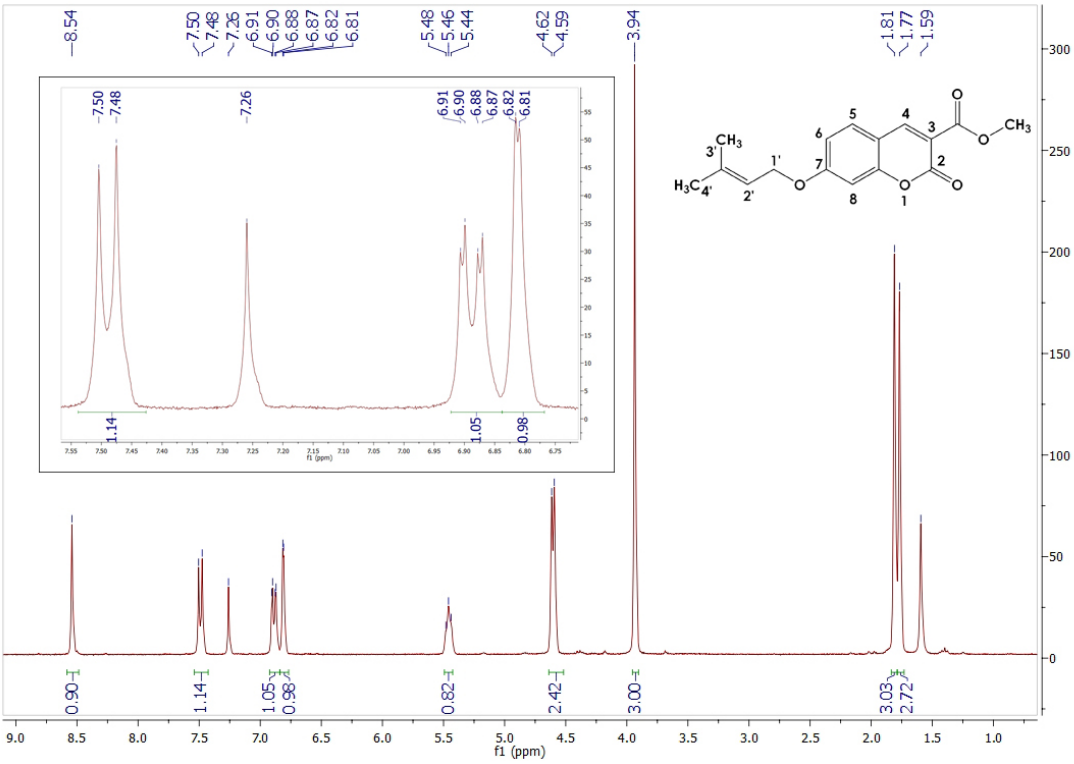
Εικόνα 46: Πλακίδιο 96 θέσεων.

1. Φασματοσκοπική μελέτη



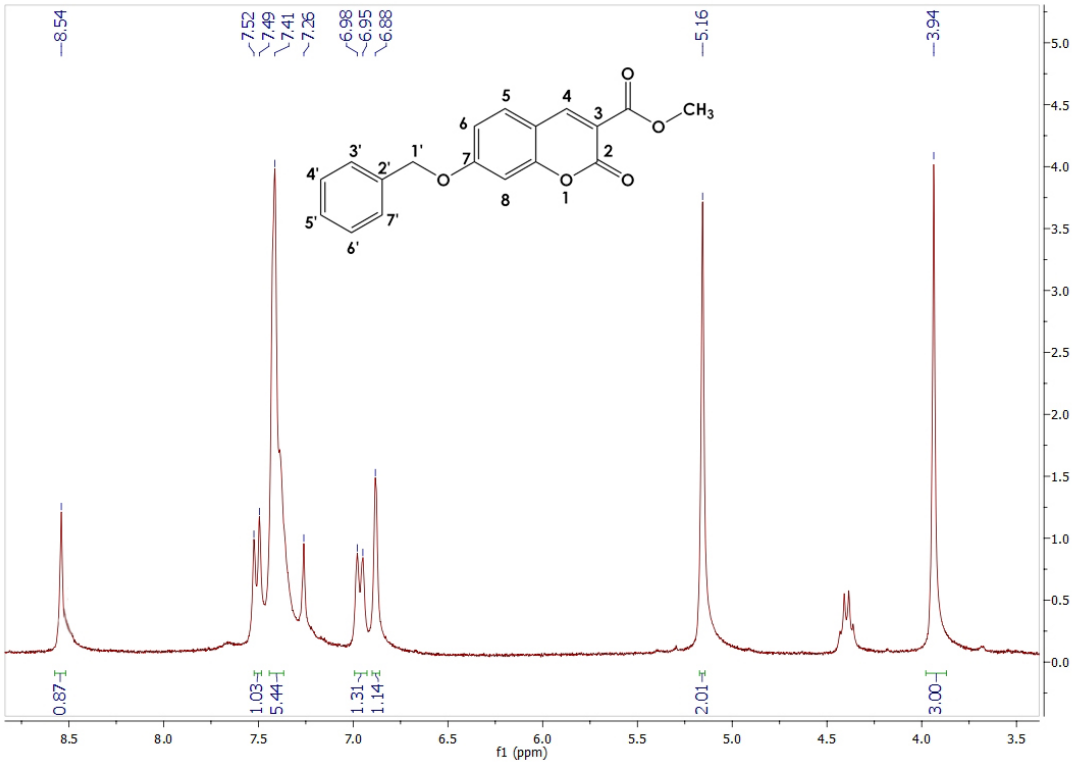
*Εικόνα 47: Φάσμα ^{1}H NMR της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-2Η-χρωμεν-2-όνης (**1**).*

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 3.79 ppm που αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας της θέσης 3. Η διπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 6.71 ppm αποδίδεται στο Η-8, καθώς αλληλεπιδρά με το Η-6, ενώ ταυτόχρονα ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο. Ακολουθεί μία διπλή διπλών κορυφή στα 6.83 ppm, η οποία αποδίδεται στο Η-6, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-5) και ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με το Η-8. Στη συνέχεια στα 7.74 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο Η-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-6). Τέλος η απλή κορυφή στα 8.69 ppm αποδίδεται στο Η-4.



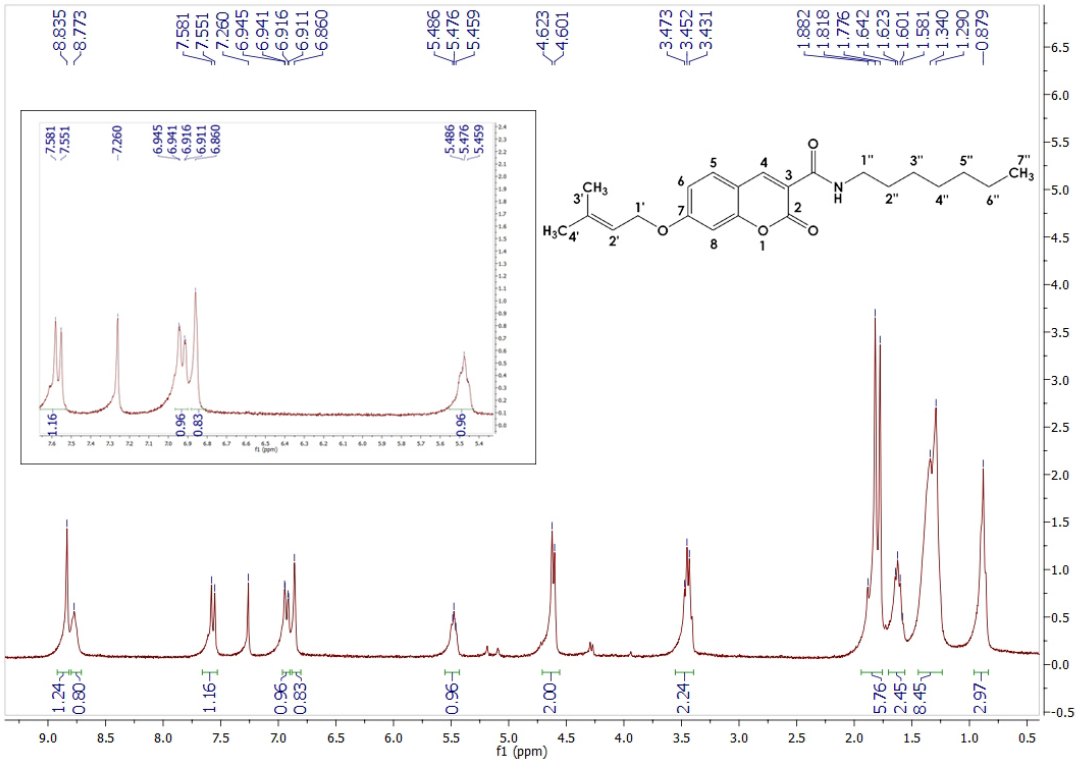
*Εικόνα 48: Φάσμα ^{1}H NMR της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-2Η-χρωμεν-2-όνης (**2α**).*

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο απλών κορυφών στα 1.77 και 1.81 ppm, οι οποίες αποδίδονται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια των μεθυλίων της πρενυλοξυ-ομάδας στις θέσεις 3’ και 4’ αντίστοιχα. Η απλή κορυφή που εμφανίζεται στα 3.94 ppm αντιστοιχεί στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας της θέσης 3. Στη συνέχεια, εμφανίζεται μία διπλή κορυφή στα 4.61 ppm η οποία αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1’, καθώς ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-2’), ενώ η τριπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 5.46 ppm αποδίδεται στο αλειφατικό πρωτόνιο της θέσης 2’, το οποίο διαθέτει δύο γειτονικά μη ισοδύναμα πρωτόνια (Η-1’). Η διπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 6.82 ppm αποδίδεται στο Η-8, καθώς αλληλεπιδρά με το Η-6, ενώ ταυτόχρονα ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο. Ακολουθεί μία διπλή διπλών κορυφή στα 6.89 ppm, η οποία αποδίδεται στο Η-6, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-5) και ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με το Η-8. Η διπλή κορυφή στα 7.49 ppm αποδίδεται στο Η-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο. Τέλος, η απλή κορυφή που εμφανίζεται στα 8.54 ppm αποδίδεται στο Η-4.



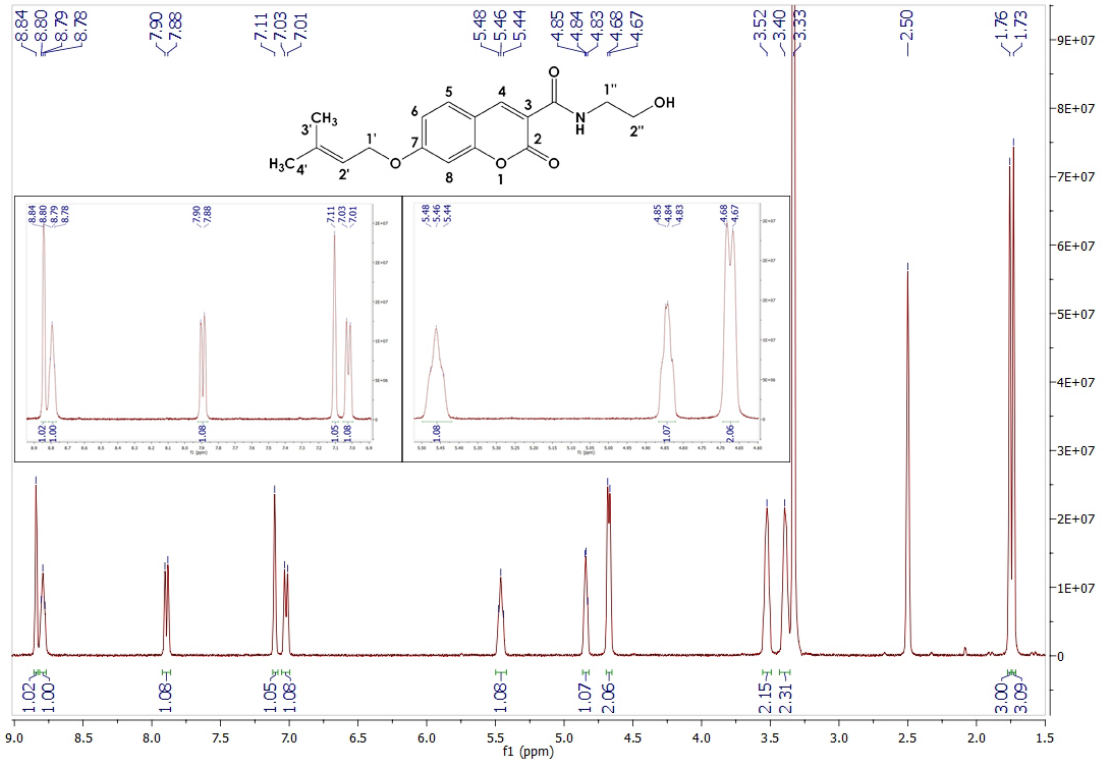
*Εικόνα 49: Φάσμα ^{1}H NMR της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-2Η-χρωμεν-2-όνης (**2b**).*

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 3.94 ppm, η οποία αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας της θέσης 3. Στη συνέχεια ακολουθεί μία απλή κορυφή στα 5.16 ppm, η οποία αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1’. Η απλή κορυφή που εμφανίζεται στα 6.88 ppm αποδίδεται στο Η-8, ενώ η διπλή κορυφή των 6.97 ppm αποδίδεται στο Η-6, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-5). Στη συνέχεια στα 7.41 ppm εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στα πέντε ισοδύναμα πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου στις θέσεις 2’-6’. Η διπλή κορυφή των 7.51 ppm αποδίδεται στο Η-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-6). Τέλος η απλή κορυφή στα 8.54 ppm αποδίδεται στο Η-4.



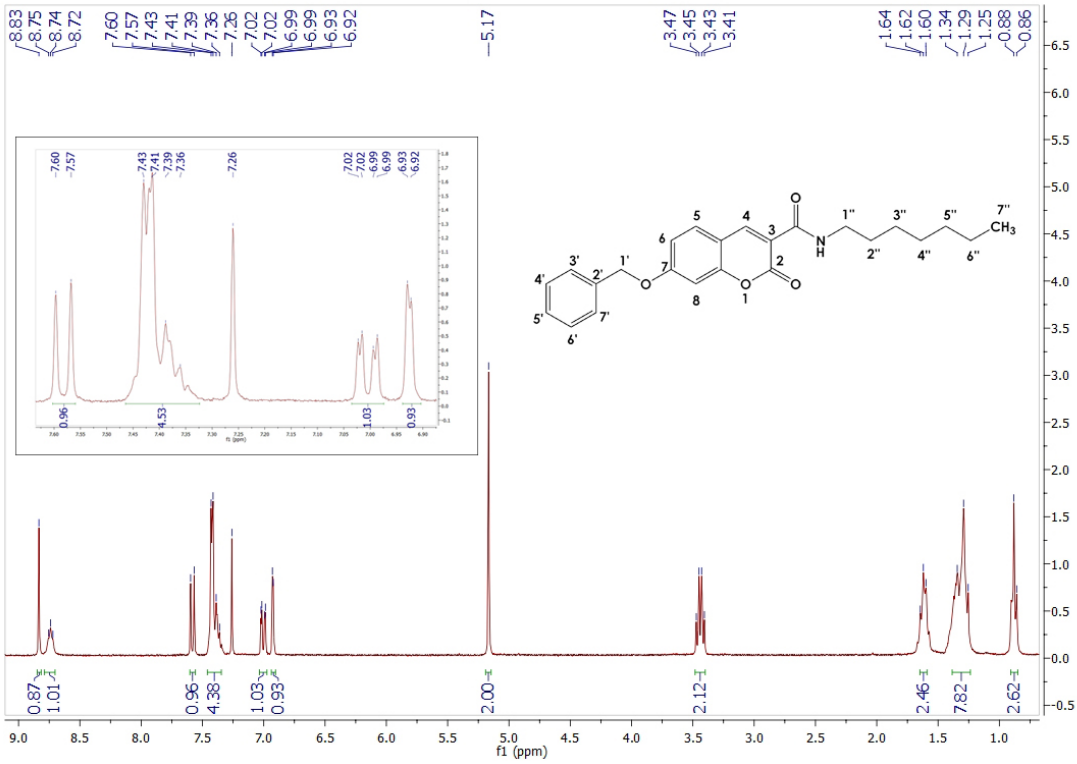
*Εικόνα 50: Φάσμα ^{1}H NMR N-επτυλο-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2Η-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (**3b**).*

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας πολλαπλής κορυφής στα 0.88 ppm, η οποία αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 7”. Ακολουθεί άλλη μία πολλαπλή κορυφή στα 1.31 ppm, η οποία αποδίδεται στα αλειφατικά πρωτόνια των θέσεων 3”-6”, καθώς ολοκληρώνεται για οκτώ πρωτόνια. Η πολλαπλή κορυφή των 1.61 ppm αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 2”. Η απλή κορυφή των 1.78 ppm αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του CH_3-3’, και αντίστοιχα η απλή κορυφή των 1.82 ppm στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του CH_3-4’. Στη συνέχεια εμφανίζεται μία ακόμα πολλαπλή κορυφή στα 3.45 ppm, η οποία αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1”. Η διπλή κορυφή των 4.61 ppm αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1’, καθώς ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα οποίαδιαθέτουν ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-2’). Στα 5.48 ppm εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 2’, το οποίο διαθέτει δύο γειτονικά μη ισοδύναμα πρωτόνια (Η-1’). Η απλή κορυφή των 6.86 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο αντιστοιχεί στο Η-8. Η διπλή διπλών κορυφή που εμφανίζεται στα 6.93 ppm αποδίδεται στο Η-6, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-5) και ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με το Η-8. Στα 7.57 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή και αποδίδεται στο Η-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-6), ενώ η απλή κορυφή στα 8.77 ppm αντιστοιχεί στο Η-4. Τέλος, η απλή κορυφή στα 8.83 ppm αποδίδεται στο αμιδικό πρωτόνιο.



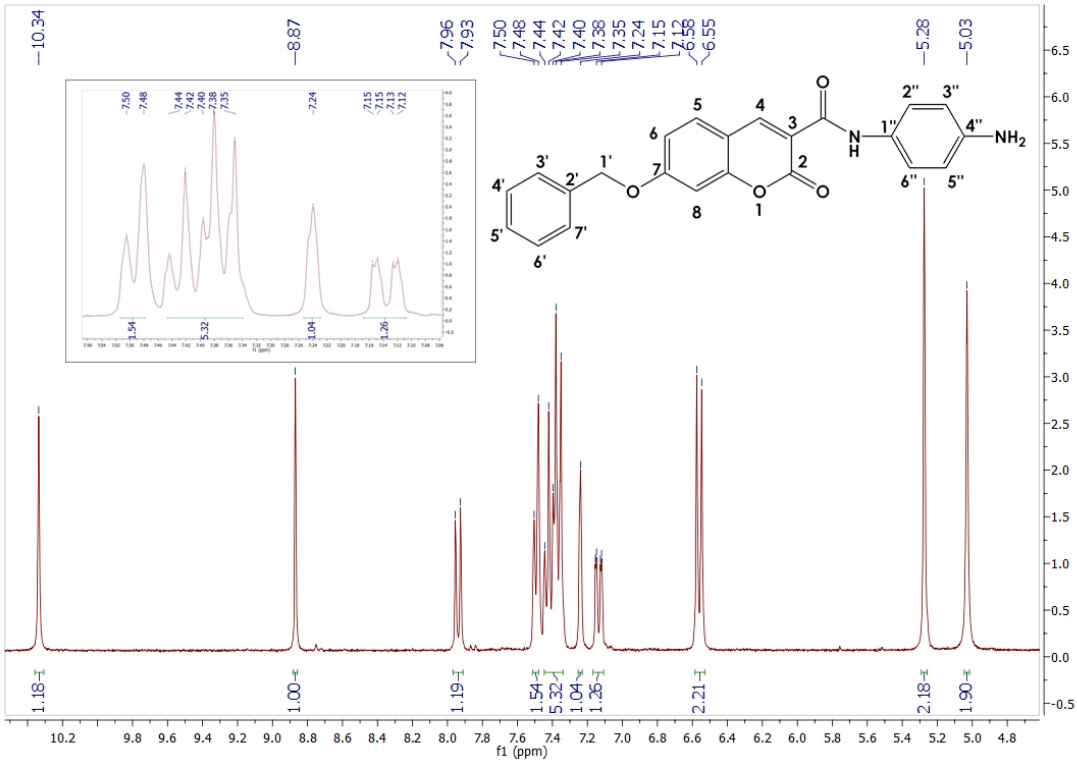
*Εικόνα 51: Φάσμα ^{1}H NMR N-(2-υδροξυαιθυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2Η-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (**3c**).*

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο απλών κορυφών στα 1.73 και 1.76 ppm, οι οποίες αποδίδονται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια των μεθυλίων της πρενυλοξυ-ομάδας στις θέσεις 3’ και 4’ αντίστοιχα. Ακολουθούν δύο ευρείες κορυφές στα 3.40 και 3.52 ppm αντίστοιχα, κάθε μία εκ των οποίων αποδίδεται σε δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια τα οποία βρίσκονται στις θέσεις 1’’ και 2’’. Η διπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 4.68 ppm αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1’, καθώς ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα οποία διαθέτουν ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-2’). Στα 4.84 ppm εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της υδροξυ-αιθυλο-αλυσίδας, το οποίο διαθέτει δύο γειτονικά μη ισοδύναμα πρωτόνια (Η-2’’). Επίσης μία τριπλή κορυφή εμφανίζεται στα 5.46 ppm, η οποία αποδίδεται στο αλειφατικό πρωτόνιο της θέσης 2’, το οποίο διαθέτει δύο γειτονικά μη ισοδύναμα πρωτόνια (Η-1’). Στη συνέχεια εμφανίζεται μία διπλή κορυφή στα 7.02 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο Η-6, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-5). Η απλή κορυφή των 7.11 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο αντιστοιχεί στο Η-8. Στα 7.89 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή και αποδίδεται στο Η-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-6), ενώ στα 8.79 μία τριπλή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο αμιδικό πρωτόνιο, το οποίο διαθέτει δύο γειτονικά μη ισοδύναμα πρωτόνια. Τέλος, η απλή κορυφή στα 8.84 ppm αποδίδεται στο Η-4.



*Εικόνα 52: Φάσμα ^{1}H NMR 7-(βενζυλοξυ)-N-επτυλο-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (**3g**).*

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας πολλαπλής κορυφής στα 0.87 ppm, η οποία αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 7’’. Ακολουθούν δύο πολλαπλές κορυφές, στα 1.29 και 1.62 ppm. Η πρώτη στα 1.29 ppm αντιστοιχεί στα αλειφατικά πρωτόνια των θέσεων 3”-6”, καθώς ολοκληρώνεται για οκτώ πρωτόνια. Η δέυτερη στα 1.62 ppm αντιστοιχεί στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 2”, καθώς ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια. Η τετραπλή κορυφή στα 3.44 ppm αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1’’, καθώς διαθέτουν τρία γειτονικά μη ισοδύναμα πρωτόνια. Στη συνέχεια, στα 5.17 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο αλειφατικό πρωτόνιο της θέσης 1’. Στα 6.93 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο H-8 καθώς αλληλεπιδρά με το H-6, ενώ ταυτόχρονα ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο. Η διπλή διπλών κορυφή που εμφανίζεται στα 7.00 ppm αποδίδεται στο H-6, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-5) και ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με το H-8. Στα 7.40 ppm εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου της βενζυλο-αλυσίδας (H-2’-H-7’), καθώς ολοκληρώνεται για πέντε πρωτόνια. Ακολουθεί μία διπλή κορυφή στα 7.59 ppm, η οποία αποδίδεται στο H-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-6). Η τριπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 8.74 ppm αποδίδεται στο αμιδικό πρωτόνιο,το οποίο διαθέτει δύο γειτονικά μη ισοδύναμα πρωτόνια (H-1’’). Τέλος, η απλή κορυφή στα 8.83 ppm αποδίδεται στο H-4.



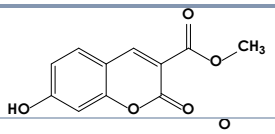
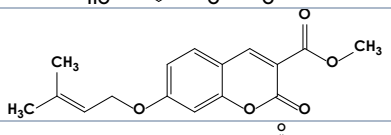
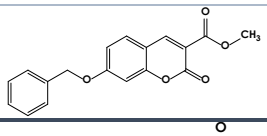
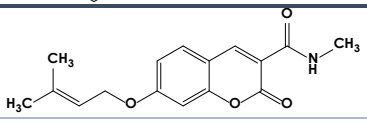
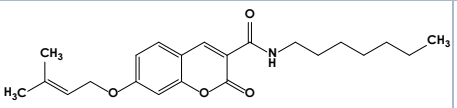
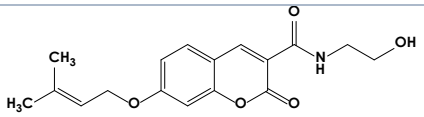
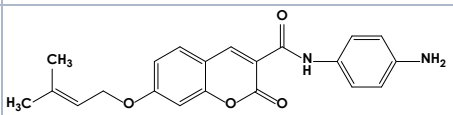
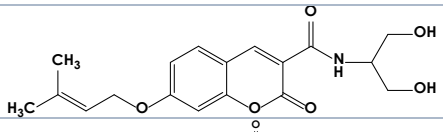
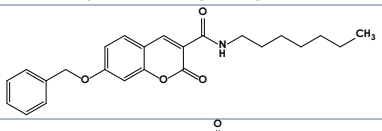
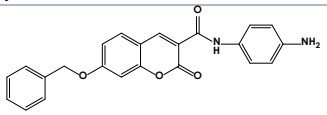
*Εικόνα 53: Φάσμα ^{1}H NMR N-(4-αμινοφαινυλο)-7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2Η-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (**3h**).*

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας απλής κορυφής στα 5.03 ppm, η οποία αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια της αμινομάδας της θέσης 4”, καθώς ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια. Ακολουθεί μία απλή κορυφή στα 5.28 ppm, η οποία αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1’. Η διπλή κορυφή των 6.57 ppm αντιστοιχεί στα δύο ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3” και 5”. Η διπλή διπλών κορυφή που εμφανίζεται στα 7.14 ppm αποδίδεται στο Η-6, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-5) και ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με το Η-8. Στη συνέχεια, ακολουθεί μία απλή κορυφή στα 7.24 ppm που αποδίδεται στο Η-8. Στα 7.40 ppm εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή που αποδίδεται στα πέντε ισοδύναμα πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου στις θέσεις 2’-6’. Η διπλή κορυφή των 7.49 ppm αντιστοιχεί στα δύο ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2” και 6”. Ακολουθεί ακόμα μία διπλή κορυφή στα 7.95 ppm η οποία αποδίδεται στο Η-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-6). Η απλή κορυφή των 8.87 ppm αποδίδεται στο Η-4. Τέλος, στα 10.34 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο αμιδικό πρωτόνιο της θέσης 1”.

2. Αξιολόγηση δράσης των νέων ενώσεων ως αναστολείς της AChE

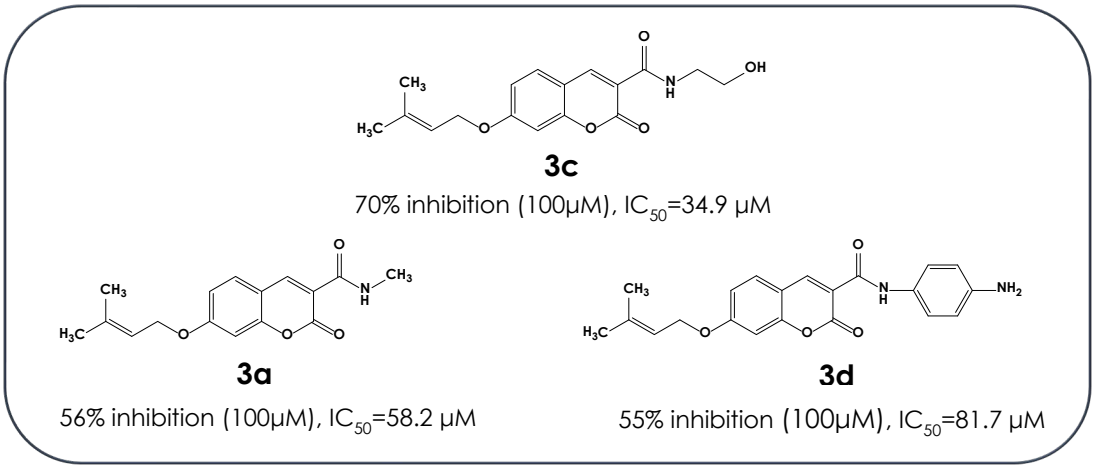
Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της δράσης των υβριδικών κουμαρινικών παραγώγων ως προς την αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

*Πίνακας 2: Ικανότητα αναστολής AChE %100μM και IC_{50} ενώσεων **3a-3j**.*

A/A	Χημική δομή	Αναστολή AChE %100 μM	AChE IC_{50} (μM)
1		36.9 ± 9.6	-
2a		41.0 ± 5.6	-
2b		40.2 ± 5.6	-
3a		55.9 ± 0.9	58.2 ± 4.1
3b		19.1 ± 0.5	-
3c		70.4 ± 2.0	34.9 ± 5.2
3d		55.4 ± 1.2	81.7 ± 1.6
3e		39.4 ± 5.8	-
3g		28.1 ± 3.4	-
3h		25.1 ± 2.3	-
-	Galantamine	-	0.92 ± 0.1

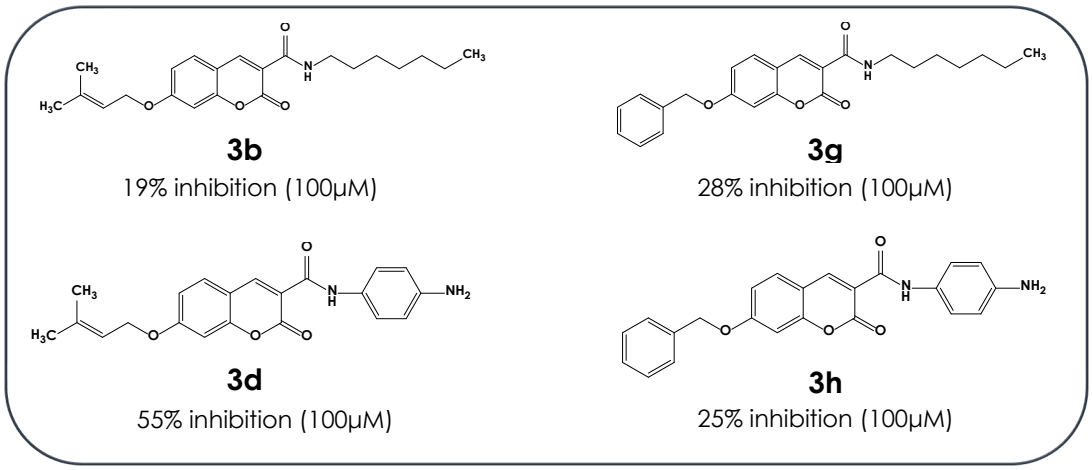
Αρχικά, διαπιστώνεται ότι οι αρχικές ενώσεις **1**, **2a** και **2b** εμφανίζουν σχετικά χαμηλή ικανότητα αναστολής του ενζύμου, καθώς για συγκέντρωση 100 μΜ το ποσοστό αναστολής κυμαίνεται από 36-40%. Σημειώνεται ότι η υποκατάσταση της υδροξυλιομάδας της ένωσης **1** με αλκοξυ-ομάδες αυξάνει το ποσοστό αναστολής, με την πρενυλίωση να φαίνεται να είναι η υποκατάσταση που οδηγεί σε αύξηση της δραστικότητας των μεθοξυ-καρβονυλο-κουμαρινών.

Από ότι φαίνεται και από τα αποτελέσματα που έδωσαν τα ανάλογα **3a-3h**, τα πρενυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα που συντέθηκαν αποτελούν στο μεγαλύτερο μέρος τους ικανότερους αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης από τα βενζυλοξυ-παράγωγα. Τα ποσοστά αναστολής για συγκέντρωση 100 μΜ κυμαίνονται από 40-70%, τιμές αρκετά υψηλές. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η ένωση **3b**, η οποία εμφανίζει ποσοστό αναστολής 19.1%. Η χαμηλή δράση της ένωσης αυτής πιθανόν να οφείλεται στο μεγάλο μήκος της πλευρικής ανθρακικής αλυσίδας, κάτι που πιθανόν να καθιστά δυσκολότερη την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Οι ενώσεις **3a** και **3d** εμφανίζουν ικανοποιητική δράση, με σχετικά υψηλές τιμές IC_{50}=58.2 και 81.7 μΜ αντίστοιχα. Αντίθετα, η ένωση **3c** αποτελεί τον ικανότερο αναστολέα που συντέθηκε. Η ένωση αυτή αναστέλλει το ένζυμο κατά 70.4% και εμφανίζει IC_{50}=34.9 μΜ, τιμή ικανοποιητική καθώς στόχο κατά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων αποτελεί η εμφάνιση θεραπευτικού αποτελέσματος με χορήγηση όσο το δυνατόν χαμηλότερης δόσης φαρμάκου



Εικόνα 54: Δραστικότερα πρενυλοξυ-ανάλογα.

Όσον αφορά τα βενζυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα **3g** και **3h** που συντέθηκαν, τα ποσοστά αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης που εμφανίζουν κυμαίνονται στο 25%, τιμή σχετικά χαμηλή. Συγκρίνοντάς την **3b** με το πρενυλοξυ-ανάλογό της, **3g**, παρατηρείται ότικαμία από τις δύο δεν θεωρείται ικανός αναστολέας, γεγονός που αποδεικνύει ότι η επτυλαμίνη αποτελεί ακατάλληλο υποκαταστάτη. Αντίθετα, για την ένωση **3h** και το πρενυλοξυ ανάλογό της, **3d**, οι οποίες περιέχουν την 1,4-φαινυλενο-διαμίνη, παρατηρείται ότι η υποκατάσταση με βενζυλομάδα μειώνει την ικανότητα αναστολής κατά 50%.

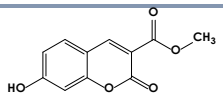
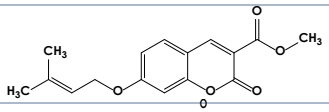
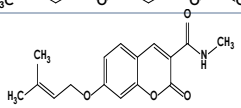
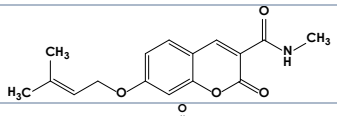
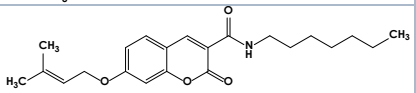
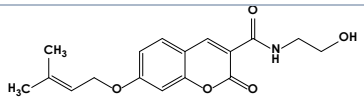
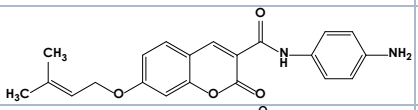
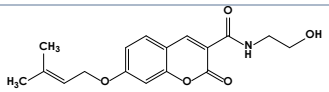
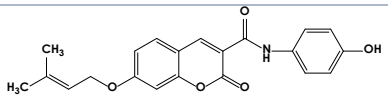
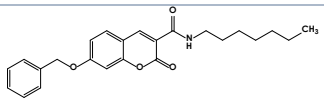
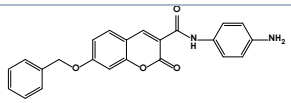
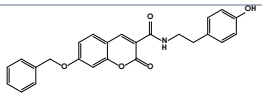
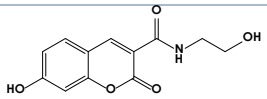


Εικόνα 55: Σύγκριση πρενυλοξυ- και βενζυλοξυ-αναστολέων.

3. Πρόβλεψη φαρμακολογικών ιδιοτήτων

Για την πρόβλεψη των φαρμακολογικών ιδιότητων των υβριδικών κουμαρινικών παραγώγων, έγινε χρήση των υπολογιστικών εργαλείων *molinspiration*[xiii], *pkCSM*[xiv] και *SwissADME*[xv]. Ειδικότερα, έγινε πρόβλεψη της λιποφιλίας, της δυνατότητας per os απορρόφησης βάσει του κανόνα του Lipinski και της διαπερατότητας του εγκεφαλικού φραγμού. Παρακάτω παρατίθενται οι απαραίτητες ιδιότητες για την εφαρμογή του κανόνα του Lipinski, όπως αυτές υπολογίστηκαν από το εργαλείο *molinspiration* για τα κουμαρινικά καρβοξαμίδια **3a-3j**. Με κόκκινο επισημαίνονται οι παραβιάσεις του κανόνα.

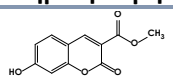
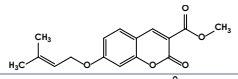
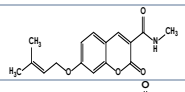
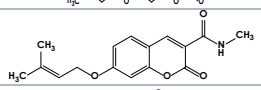
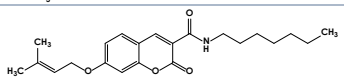
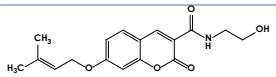
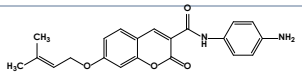
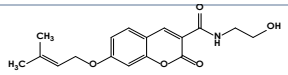
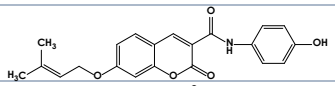
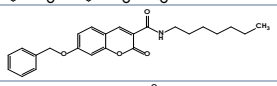
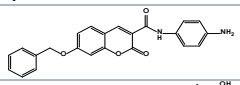
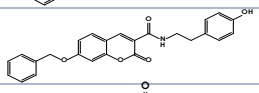
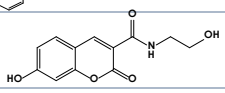
Πίνακας 3: Ιδιότητες ενώσεων 1-3j και εφαρμογή του κανόνα του Lipinski.

A/A	Χημική δομή	MW (g/mol)	logP	$N_{OH,NH}$	$N_{O,N}$	$N_{rot,b}$	TPSA	$N_{violations}$
1		220.18	1.37	1	5	2	76.74	0
2a		288.30	3.48	0	5	5	65.75	0
2b		310.31	3.40	0	5	5	65.75	0
3a		287.31	2.84	1	5	4	68.54	0
3b		371.48	5.80	1	5	10	68.54	1
3c		317.34	2.21	2	6	6	88.77	0
3d		364.40	3.62	3	6	5	94.57	0
3e		347.37	1.57	3	7	7	109.00	0
3f		365.38	4.06	2	6	5	365.38	0
3g		393.48	5.72	1	5	10	68.54	1
3h		368.41	3.54	3	6	5	94.57	0
3i		415.44	4.09	2	6	7	88.77	0
3j		249.22	0.00	3	6	3	99.74	0

Από τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται ότι και οι 3 αρχικές ενώσεις **1-2b** είναι κατάλληλες για χορήγηση από του στόματος, καθώς δεν παραβιάζουν τον κανόνα του Lipinski. Όσον αφορά τα κουμαρινικά καρβοξαμίδια, 2 εκ των 10 (οι ενώσεις **3b** και **3g**) εμφανίζουν μία παραβίαση του κανόνα του Lipinski, καθώς logP>5. Ειδικότερα, οι ενώσεις αυτές πρόκειντα για τα υβριδικά κουμαρινικά παράγωγα που περιέχουν την αμίνη επτυλαμίνη. Είναι φανερό ότι η επτυλαμίνη, λόγω του μεγάλου μήκους αλυσίδας, αυξάνει τη λιποφιλία του τελικού μορίου, ξεπερνώντας το κρίσιμο όριο (logP=5.00) και προσδίδοντας στις ενώσεις που την περιέχουν χαμηλή διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών, λόγω αυξημένης συγγένειας με αυτές. Εφόσον δεν εμφανίζουν και δεύτερη παραβίαση, η από του στόματος χορήγησή τους σε κάποιο μελλοντικό σκεύασμα δεν είναι απαγορευτική. Αντίστοιχα και τα λοιπά κουμαρινικά καρβοξαμίδια ενδείκνυνται για ενσωμάτωση σε κάποιο φαρμακευτικό σκεύασμα για χορήγηση από του στόματος, καθώς τόσο ο λιπόφιλος χαρακτήρας τους, όσο και οι υπόλοιπες εξεταζόμενες ιδιότητες κυμαίνονται στα επιθυμητά πλαίσια.

Ο υπολογισμός του συντελεστή μερισμού γίνεται επίσης μέσω των εργαλείων *pkCSM*[xiv] και *SwissADME*[xv], και η σύγκριση παρατίθεται στους παρακάτω πίνακες:

*Πίνακας 4: Σύγκριση logP για τις ενώσεις **1-3j**.*

A/A	Χημική δομή	$logP_{molinspiration}$	$logP_{pkCSM}$	$logP_{SwissADME}$
1		1.37	1.29	1.48
2a		3.48	2.92	3.05
2b		3.40	3.16	3.14
3a		2.84	2.50	2.67
3b		5.80	4.83	4.78
3c		2.21	1.86	2.29
3d		3.62	3.97	3.40
3e		1.57	1.22	1.80
3f		4.06	4.10	3.48
3g		5.72	5.07	4.86
3h		3.54	4.21	3.40
3i		4.09	4.05	3.92
3j		0.00	0.22	0.79

Και τα παραπάνω δεδομένα συγκλίνουν στο προηγούμενο συμπέρασμα, ότι δηλαδή η προσθήκη επτυλαμίνης (ενώσεις **3b, 3g**) προσδίδει αυξημένο συντελεστή μερισμού logP στα τελικά μόρια και άρα αυξημένη λιποφιλία, η οποία μπορεί να είναι προβληματική για τη φαρμακολογική συμπεριφορά του μορίου.

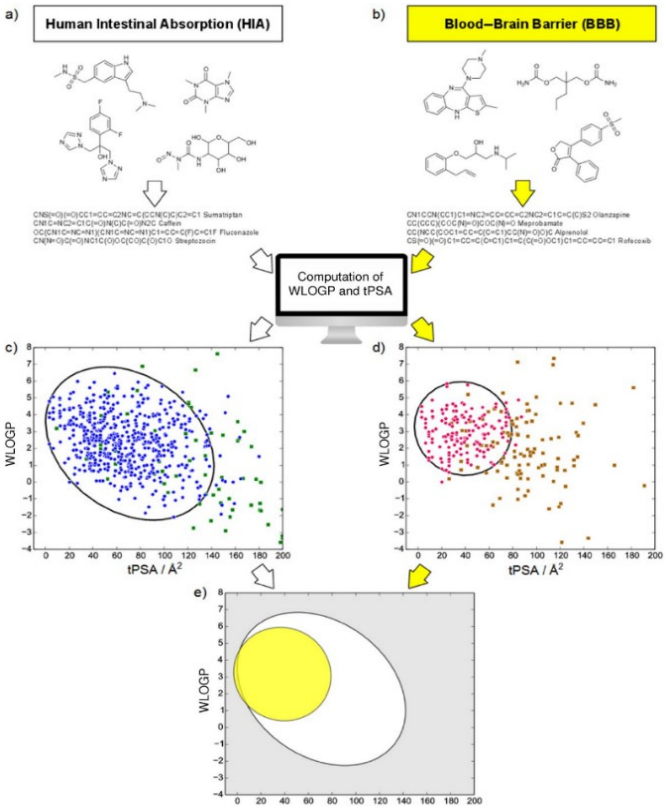
Η πρόβλεψη της διαπερατότητας του εγκεφαλικού φραγμού γίνεται σε πρώτη φάση μέσω των παραμέτρων logBB και logPS και το υπολογιστικό εργαλείο *pkCSM*[xiv] που αναπτύχθηκε από το Πανεπιστήμιο της Μελβούρνης σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο του Κέιμπριτζ (**Πίνακας 5**). Σύμφωνα με το εργαλείο, η αξιολόγηση των παραμέτρων αυτών γίνεται ως εξής:

Για το logBB:

- logBB>0.3: καλή διαπερατότητα ΑΕΦ
- logBB<-1: κακή εγκεφαλική κατανομή

Ενώ για το logPS:

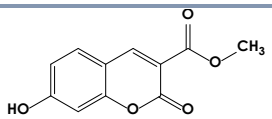
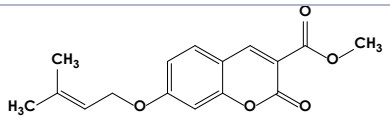
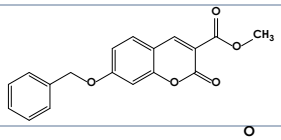
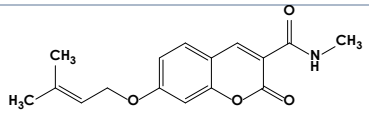
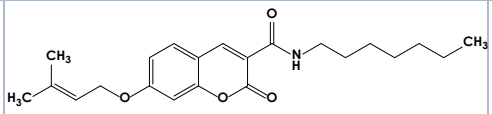
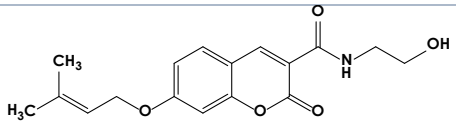
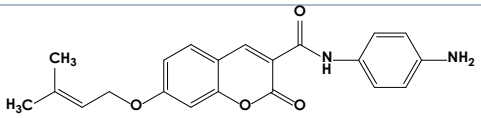
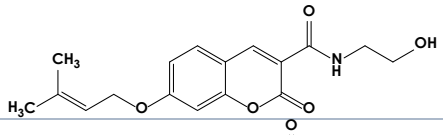
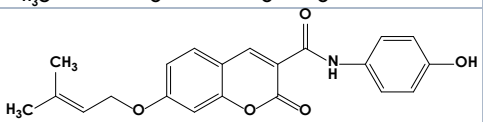
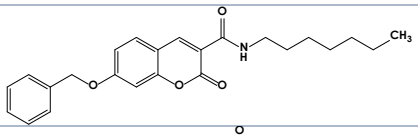
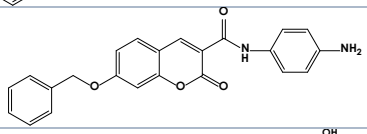
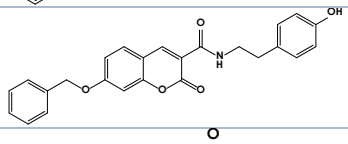
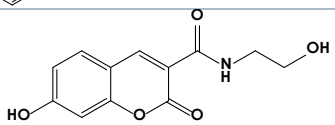
- log PS>-2: καλή διαπερατότητα ΚΝΣ
- log PS<-3: όχι διαπερατότητα ΚΝΣ



Εικόνα 56: Μέθοδος BOILED-Egg.[46]

Σε μία διαφορετική προσέγγιση για την πρόβλεψη της διαπερατότητας του ΑΕΦ, έγινε χρήση του υπολογιστικού εργαλείου *SwissADME*[xv], το οποίο αναπτύχθηκε από το *Molecular Modeling Group* του Ελβετικού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής (**Πίνακας 5**). Το συγκεκριμένο εργαλείο χρησιμοποιεί τη μέθοδο *Brain Or IntestinaL EstimateD permeation* method (ή BOILED-Egg), σύμφωνα με την οποία η γαστρεντερική και η εγκεφαλική απορρόφηση προβλέπονται σχηματικά, μέσω υπολογισμού του συντελεστή μερισμού logP και του εμβαδού της τοπολογικής πολικής επιφάνειας TPSA. Η γραφική αναπαράσταση των σημείων αυτών δίνει δύο ελλειπτικές περιοχές, με την εξωτερική (το «ασπράδι») να δίνει το φυσικοχημικό χώρο των μορίων με υψηλότερη πιθανότητα απορρόφησης από την γαστρεντερική οδό, και την εσωτερική (τον «κρόκο») το φυσικοχημικό χώρο των μορίων με την υψηλότερη πιθανή διαπερατότητα του ΑΕΦ.[46]

*Πίνακας 5: Πρόβλεψη εγκεφαλικής διαπερατότητας ενώσεων **1-3j**.*

Α/Α	Χημική δομή	logBB	logPS	Διαπερατότητα ΑΕΦ βάσει μεθόδου BOILED-Egg
1		-0.405	-2.871	X
2a		-0.046	-2.226	√
2b		0.051	-2.139	√
3a		-0.313	-2,324	√
3b		-0.346	-2.285	√
3c		-0.687	-2.763	X
3d		-0.257	-2.046	√
3e		-1.414	-3.161	X
3f		-0.305	-2.060	X
3g		-0.360	-2.198	√
3h		-0.238	-1.960	X
3i		-0.252	-2.160	X
3j		-0.931	-3.063	X

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, αρχικά γίνεται η παρατήρηση ότι τόσο η αρχική ένωση **1**, όσο και τα αλκοξυ-παράγωγα **2a** και **2b** εμφανίζουν τιμές logBB και logPS μεταξύ των κρίσιμων ορίων. Η μέθοδος BOILED-Egg όμως δείχνει ότι η ένωση **1** δεν έχει υψηλή πιθανότητα απορρόφησης από τον εγκέφαλο, σε αντίθεση με τις άλλες δύο. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στον υδρόφιλο χαρακτήρα της, καθώς φέρει υδροξύλιο στο μόριό της το οποίο στα αλκοξυ-παράγωγα της υποκαθίσταται, συμβάλλοντας στη λιποφιλία των ενώσεων **2a** και **2b**.

Όσον αφορά τα κουμαρινικά καρβοξαμίδια, είναι φανερό ότι η ένωση **3e**, σύμφωνα με όλα τα μοντέλα πρόβλεψης, ενδέχεται να μη διαπερνά τον ΑΕΦ. Μία πιθανή εξήγηση για τη συμπεριφορά αυτή είναι ο ιδιαίτερα υδρόφιλος χαρακτήρας της, λόγω της ύπαρξης υδροξυλίων στο μόριο της ένωσης. Υψηλή υδροφιλία συνεπάγεται ιδιαίτερα μειωμένο λιπόφιλο χαρακτήρια και άρα αδυναμία διαπέρασης των λιπόφιλων κυτταρικών μεμβρανών.

Οι τιμές των παραμέτρων logBB και logPS για τις υπόλοιπες ενώσεις είναι μεταξύ των κρίσιμων ορίων. Εξαίρεση αποτελεί η ένωση **3h**, η οποία εμφανίζει logPS>-1 και άρα αναμένεται να εμφανίζει καλή διαπερατότητα του ΚΝΣ.

Τέλος, η εφαρμογή της μεθόδου BOILED-Egg κρίνει ότι τα κουμαρινικά καρβοξαμίδια **3a**, **3b**, **3d** και **3g** εμφανίζουν την υψηλότερη πιθανότητα διαπερατότητας του ΑΕΦ. Πρόκειται για ενώσεις επαρκώς λιπόφιλες, χαρακτηριστικό που συμβάλλει στην ικανότητα τους να διαπερνούν τον ΑΕΦ.

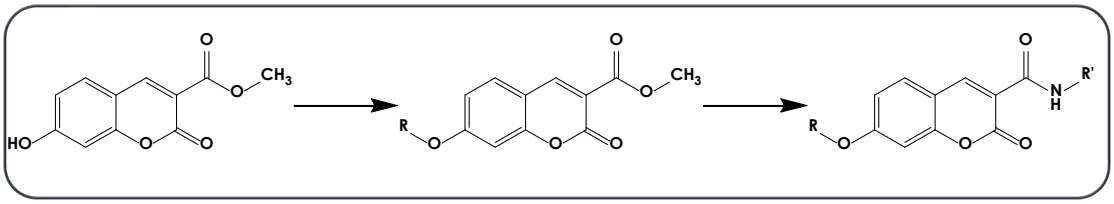
Γενικά, τα αποτελέσματα των παραπάνω προβλέψεων είναι αρκετά ενθαρρυντικά, καθώς μόνο μια από τις νέες ενώσεις φαίνεται να μη μπορεί να διαπεράσει τον ΑΕΦ σύμφωνα με όλα τα υπολογιστικά εργαλεία. Για τις υπόλοιπες, κατάλληλες δομικές τροποποιήσεις ή ενσωμάτωση στην κατάλληλη φαρμακομορφή ενδέχεται να βελτιώσουν τη συμπεριφορά τους ούτως ώστε η διέλευση του ΑΕΦ να γίνεται με ευκολία και να φτάνουν στους χολινεργικούς νευρώνες, αναστέλλοντας την ακετυλοχολινεστεράση επιτυχώς.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι κουμαρίνες και τα παράγωγά τους είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και εμφανίζουν πολλαπλές βιολογικές δράσεις, με κάποια κουμαρινικά ανάλογα είτε φυσικής είτε συνθετικής προέλευσης να αποτελούν ήδη υποψήφια φάρμακα. Ως εκ τούτου, αποτελούν πολλά υποσχόμενα δομικά υπόβαθρα για τη σύνθεση νέων βιοδραστικών ενώσεων.

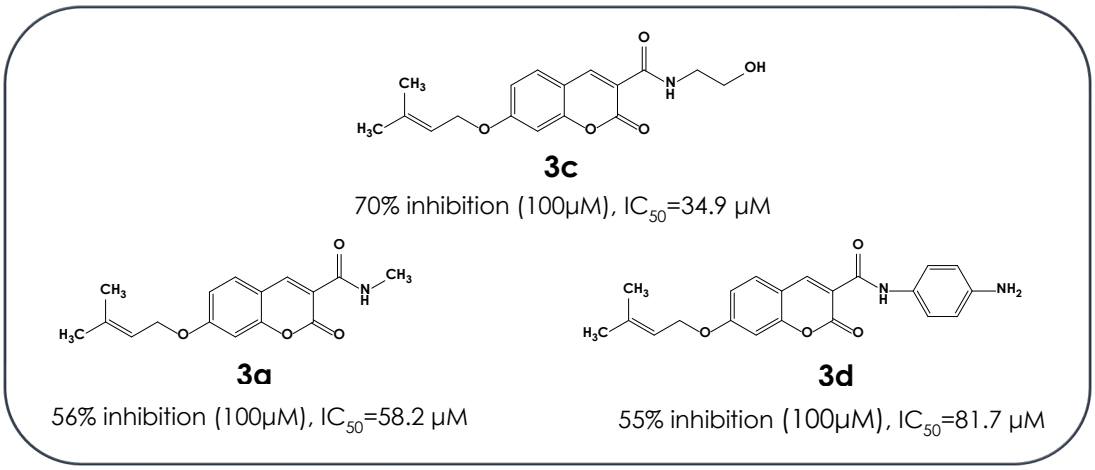
Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός δέκα νέων υβριδικών κουμαρινικών αναλόγων συντηγμένου τύπου. Ο σχεδιασμός των κουμαρινικών αναλόγων στηρίχθηκε σε ενώσεις-οδηγούς που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και έχουν επιδείξει σημαντική βιολογική δράση, καθώς και βάσει σχετικής βιβλιογραφίας, ώστε τα μόρια αυτά να αποτελέσουν ικανούς αναστολείς του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού, αρχικά συντέθηκε η *3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη* μέσω συμπύκνωσης Knoevenagel, η οποία αποτέλεσε και το δομικό υπόβαθρο για τα τελικά καρβοξαμίδια. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson, από την οποία προέκυψαν δύο αλκοξυ-παράγωγα με ικανοποιητικές αποδόσεις. Η αντίδραση των αλκοξυ-κουμαρινικών παραγώγων με κατάλληλα υποκατεστημένες πρωτοταγείς αμίνες οδήγησε σε δέκα νέα υβριδικά κουμαρινικά καρβοξαμίδια, τα οποία παραλήφθηκαν σε υψηλή καθαρότητα. Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^{1}H NMR.



Σχήμα 7: Συνθετική πορεία υβριδικών κουμαρινικών παραγώγων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της ικανότητας αναστολής του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης από τα υβριδικά κουμαρινικά παράγωγα με τη χρήση της τροποποιημένης μεθόδου του Ellman. Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διαπιστώθηκε ότι τα πρενυλοξυ-κουμαρινικά ανάλογα εμφανίζουν υψηλότερη δράση από τα αντίστοιχα βενζυλοξυ-ανάλογα. Τρία νέα υβριδικά μόρια εμφάνισαν αξιόλογη ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, εκ των οποίων η ένωση **3c** αποτέλεσε τον ικανότερο αναστολέα, με IC_{50}=34.9 μM.



Εικόνα 57: Νέες ενώσεις-αναστολείς.

Τέλος, έγινε πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των νέων αναλόγων με τη χρήση των υπολογιστικών εργαλείων *molinspiration*[xiii], *pkCSM*[xiv] και *SwissADME*[xv]. Εξετάστηκε η δυνατότητα από του στόματος χορήγησης των νέων ενώσεων ως φαρμακευτικά σκευάσματα βάσει του κανόνα των 5 του Lipinski, ενώ ακόμα εκτιμήθηκε η λιποφιλία τους και η ικανότητα διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, παράμετρος σημαντική για μόρια που δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Τα αποτελέσματα των προβλέψεων ήταν συνολικά ενθαρρυντικά, καθώς καμία από τις ενώσεις δεν κρίθηκε ακατάλληλη για χορήγηση από του στόματος, ενώ όλες πλην μίας (**3e**) δύνανται να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη σύνθεση και τη μελέτη των νέων υβριδικών κουμαρινικών αναλόγων αποτελούν τη βάση για περαιτέρω έρευνα και μελέτη στον τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας.

Αρχικά, προτείνεται η σύνθεση περισσότερων δομικά τροποποιημένων υβριδικών κουμαρινικών παραγώγων, τα οποία θα διαφέρουν είτε ως προς το μήκος της πρενυλοξυ-αλυσίδας (γερανυλοξυ- και φαρνεσυλοξυ-υποκαταστάτες) στη θέση 7 του κουμαρινικού δακτυλίου, είτε ως προς την υποκατάσταση στη θέση 3 (χρήση διαφορετικών αμινομάδων). Τα παραπάνω μόρια θα αξιολογηθούν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης *in vitro*, με στόχο τον εμπλουτισμό της σχετικής χημικής βιβλιοθήκης και την περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης δομής-δράσης.

Κρίνεται σκόπιμο επίσης να μελετηθεί η ικανότητα των υβριδικών κουμαρινικών αναλόγων να εμφανίζουν συνδυαστική δράση αναστέλλοντας και το ένζυμο της βουτυρυλοχολινεστεράσης, αποτελώντας μια αρκετά υποσχόμενη προσέγγιση για τη θεραπεία του Αλτσχάιμερ. Παράλληλα η *in silico* μελέτη της μοριακής πρόσδεσης των παραπάνω μορίων στο ενεργό κέντρο των προαναφερθέντων ενζύμων θα συνεισφέρει σε μία πιο ολοκληρωμένη αξιολόγηση του νευροπροστατευτικού προφίλ των νέων ενώσεων.

Μελλοντικό στόχο αποτελεί ο χαρακτηρισμός των νέων μορίων με περαιτέρω φασματοσκοπικές και φασματομετρικές μεθόδους (^{13}C NMR και HR-MS αντίστοιχα). Επιπλέον, θα μπορούσε να μελετηθεί η σύνθεση των κουμαρινικών καρβοξαμιδίων είτε με εναλλακτικές μεθόδους σύνθεσης ή/και με χρήση τεχνικών υψηλής ενέργειας (χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων) με στόχο τη μείωση του χρόνου αντίδρασης και την αύξηση της απόδοσης.

Τέλος, αντικείμενο μελλοντικής έρευνας θα μπορούσε να αποτελέσει ο εγκλεισμός των κουμαρινικών παραγώγων που επέδειξαν αξιόλογη *in vitro* ανασταλτική δράση του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης σε διάφορους νανο/μικρο-φορείς προκειμένου να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητά τους και να εξεταστεί αν η διεργασία του εγκλεισμού συνέβαλε στη διατήρηση ή και στη βελτίωση της δράσης τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stefanachi A., Leonetti F., Pisani L. et al. (**2018**). "Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds", *Molecules*, *23*(2), 1–34.
2. Wu L., Wang X., Xu W. et al. (**2009**). "The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives", *Current Medicinal Chemistry*, *16*(32), 4236–4260.
3. Borges F., Roleira F., Milhazes N. et al. (**2005**). "Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity", in *Current Medicinal Chemistry*, 887–916.
4. Bräse S., Gläser F., Hurrle T. (**2015**). "Chapter 11: Coumarins", in *Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: Design, Synthesis, Evaluation.*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
5. Bouhaoui A., Eddahmi M., Dib M. et al. (**2021**). "Synthesis and Biological Properties of Coumarin Derivatives. A Review", *ChemistrySelect*, *6*(24), 5848–5870.
6. Kostova I. (**2006**). "Synthetic and Natural Coumarins as Antioxidants", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, *6*(4), 365–374.
7. Detsi A., Kontogiorgis C., Hadjipavlou-Litina D. (**2017**). “Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016)”, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *27*(11), 1201-1226.
8. Hoult J.R.S., Payá M. (**1996**). "Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential", *General Pharmacology*, *27*(4), 713–722.
9. Vekariya R.H., Patel H.D. (**2014**). "Recent advances in the synthesis of coumarin derivatives via Knoevenagel condensation: A review", *Synthetic Communications*, *44*(19), 2756–2788.
10. Kapoor D., Singh S., Kumar V. et al. (**2019**). "Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS)", *Plant Gene*, *19*(April), 100182.
11. Kavetsou E., Katopodi A., Argyri L. et al. (**2020**). "Novel 3-aryl-5-substituted-coumarin analogues: Synthesis and bioactivity profile", *Drug Development Research*, *81*(4), 456–469.
12. Roussaki M., Zelianaios K., Kavetsou E. et al. (**2014**). "Structural modifications of coumarin derivatives: Determination of antioxidant and lipoxygenase (LOX) inhibitory activity", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *22*(23), 6586–6594.
13. Okuyama S., Minami S., Shimada N. et al. (**2013**). "Anti-inflammatory and neuroprotective effects of auraptene, a citrus coumarin, following cerebral global ischemia in mice", *European Journal of Pharmacology*, *699*(1–3), 118–123.
14. Wambuguh O. (**2019**). "Endocrine and Immune System Disorders", in *Examining the Causal Relationship Between Genes, Epigenetics, and Human Health*, IGI Global, Hershey P.A., U.S.A.
15. Gkionis L., Kavetsou E., Kalospyros A. et al. (**2021**). "Investigation of the cytotoxicity of bioinspired coumarin analogues towards human breast cancer cells", *Molecular Diversity*, *25*(1), 307–321.

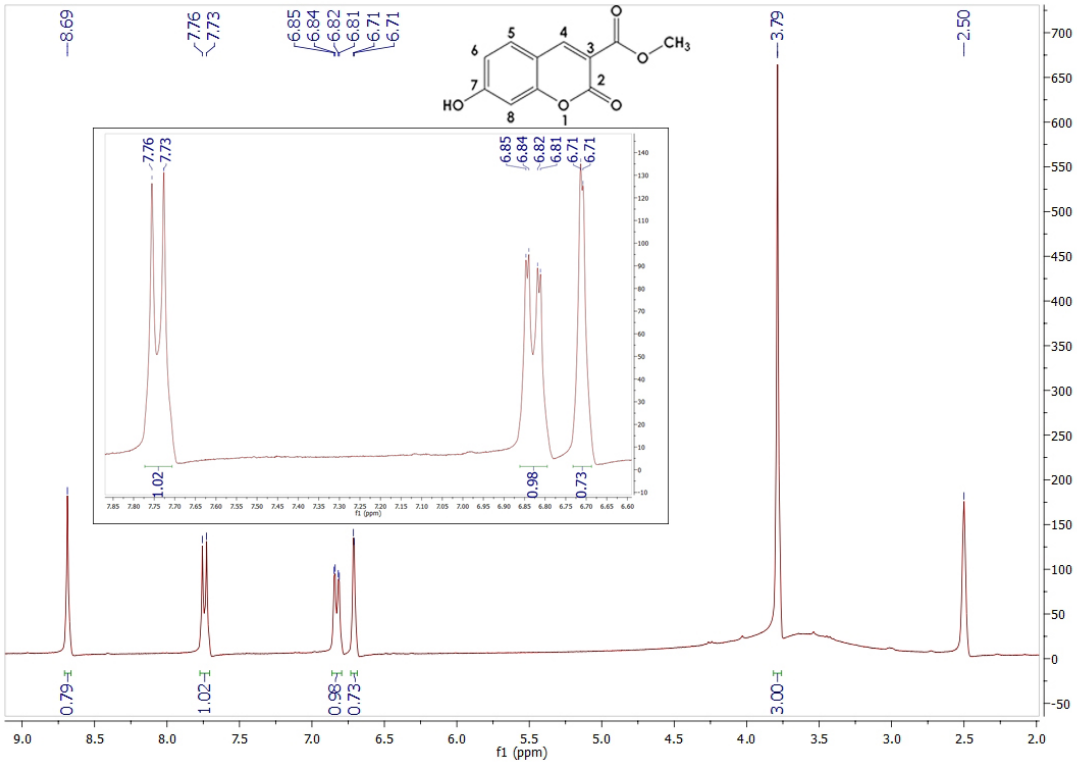
16. Kavetsou E., Gkionis L., Galani G. et al. (**2017**). "Synthesis of prenyloxy coumarin analogues and evaluation of their antioxidant, lipoxygenase (LOX) inhibitory and cytotoxic activity", *Medicinal Chemistry Research*, *26*(4), 856–866.
17. Johnson G., Moore S. (**2005**). "The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design", *Current Pharmaceutical Design*, *12*(2), 217–225.
18. Colovic M.B., Krstic D.Z., Lazarevic-Pasti T.D. et al. (**2013**). "Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology", *Current Neuropharmacology, 11*(3), 315–335.
19. Cavalcante S.F. d. A., Simas A.B.C., Barcellos M.C. et al. (**2020**). "Acetylcholinesterase: The "Hub" for Neurodegenerative Diseases and chemical weapons convention", *Biomolecules*, *10*(3), 1–22.
20. Silman I., Sussman J.L. (**2005**). "Acetylcholinesterase: "Classical" and "non-classical" functions and pharmacology", *Current Opinion in Pharmacology*, *5*(3 SPEC. ISS.), 293–302.
21. Tanoli N.U., Tanoli S.A.K., Ferreira A.G. et al. (**2018**). "Characterization of the interactions between coumarin-derivatives and acetylcholinesterase: Examination by NMR and docking simulations", *Journal of Molecular Modeling*, *24*(8), 1-11.
22. Long J.M., Holtzman D.M. (**2019**). "Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies", *Cell*, *179*(2), 312–339.
23. Anand P., Singh B., Singh N. (**2012**). "A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *20*(3), 1175–1180.
24. Hampel H., Mesulam M.M., Cuello A.C. et al. (**2017**). "Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: Emerging evidence from translational and clinical research", *Alzheimer's & Dementia*, 1–14.
25. Ali M.Y., Jannat S., Jung H.A. et al. (**2016**). "Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from Angelica decursiva and Artemisia capillaris and structure-activity analysis", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *9*(2), 103–111.
26. Dos Santos T.C., Gomes T.M., Pinto B.A.S. et al. (**2018**). "Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy", *Frontiers in Pharmacology*, *9*(OCT), 1–14.
27. Hostettmann K., Borloz A., Urbain A., Marston A. (**2006**). "Natural Product Inhibitors of Acetylcholinesterase", *Current Organic Chemistry*, *10*, 1-23.
28. Ortiz Villamizar M.C., Puerto Galvis C.E., Vargas Méndez L.Y. et al. (**2018**). "Coumarin-Based Molecules as Suitable Models for Developing New Neuroprotective Agents Through Structural Modification", in *Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products: Natural Product Drug Discovery*, Elsevier Inc, 149–235.
29. Mekky A.E.M., Sanad S.M.H. (**2020**). "Synthesis and in vitro study of new coumarin derivatives linked to nicotinonitrile moieties as potential acetylcholinesterase inhibitors", *Journal of Heterocyclic Chemistry*, *57*(12), 4278–4290.
30. Hasan A.H., Amran S.I., Saeed Hussain F.H. et al. (**2019**). "Molecular Docking and Recent Advances in the Design and Development of Cholinesterase Inhibitor Scaffolds: Coumarin Hybrids", *ChemistrySelect*, *4*(48), 14140–14156.

31. Τσαντίλη-Κακουλίδου Α., Δημόπουλος Β. (**2015**). «Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων», Αποθετήριο Κάλλιπος.
32. Decker M. (**2016**). "Design of Hybrid Molecules for Drug Development.", Elsevier Inc.
33. Carpenter T.S., Kirshner D.A., Lau E.Y. et al. (**2014**). "A Method to Predict Blood-Brain Barrier Permeability of Drug-Like Compounds Using Molecular Dynamics Simulations", *Biophysical Journal*, *107*(3), 630–641.
34. Ghanei-Nasab S., Khoobi M., Hadizadeh F., et al. (**2016**). “Synthesis and anticholinesterase activity of coumarin-3-carboxamides bearing tryptamine moiety”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, *121*, 40–46.
35. Hasnat M.A., Pervin M., Lim B.O. (**2013**). "Acetylcholinesterase inhibition and in vitro and in vivo antioxidant activities of ganoderma lucidum grown on germinated brown rice", *Molecules*, *18*(6), 6663–6678.
36. Draoui N., Schicke O., Fernandes A. et al. (**2013**). "Synthesis and pharmacological evaluation of carboxycoumarins as a new antitumor treatment targeting lactate transport in cancer cells", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *21*(22), 7107–7117.
37. Detsi A., Bouloumbasi D., Prousis K.C. et al. (**2007**). "Design and Synthesis of Novel Quinolinone-3-aminoamides and Their α-Lipoic Acid Adducts as Antioxidant and Anti-inflammatory Agents", *Journal of Medicinal Chemistry*, *50*(10), 2450–2458.
38. McMurry J. (**2017**). «Οργανική Χημεία», Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης.
39. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. (**2007**). «Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού», Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 6η Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα.
40. Όξενκιουν-Πετροπούλου Μ. (**2006**). «Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού», Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης: Φασματομετρικές Μέθοδοι, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα.
41. Χατζηιωάννου Θ.Π., Κούππαρη Μ.Α. (**2003**). «Φασματοσκοπία Πυρηνικόυ Μαγνητικού Συντονισμού», Ενόργανη Ανάλυση, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα.
42. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr V., Featherstone R.M. (**1961**), “A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity”, *Biochemical Pharmacology*, *7*, 88-95.
43. Badawy M.E.I., El-Aswad A.F. (**2014**). "Bioactive paper sensor based on the acetylcholinesterase for the rapid detection of organophosphate and carbamate pesticides", *International Journal of Analytical Chemistry*, 2014.
44. Keshavarzipour F., Tavakol H. (**2016**). "The synthesis of coumarin derivatives using choline chloride/zinc chloride as a deep eutectic solvent", *Journal of the Iranian Chemical Society*, *13*(1), 149–153.
45. Swaroop D., Sharma, R. B., Kapil R. S. *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry*, **1983**, *vol. 22*, p. 105 - 108
46. Daina A., Zoete V. (**2016**). "A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules", *ChemMedChem*, 1117–1121.

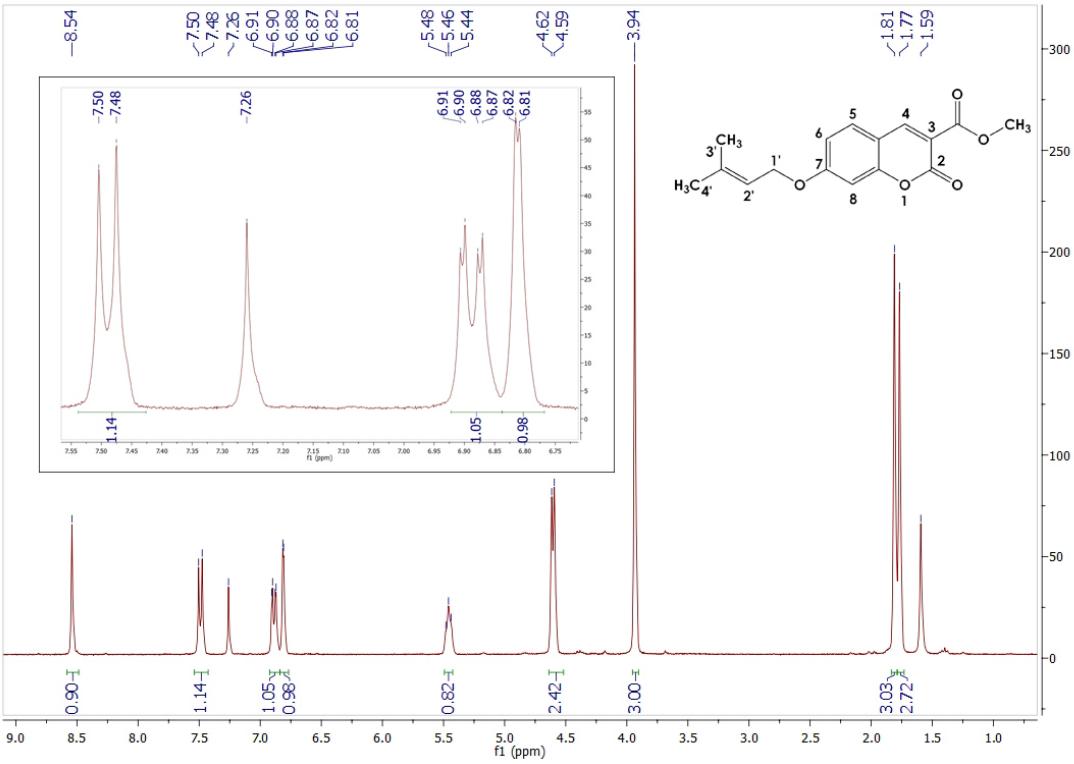
Ιστότοποι που αξιοποιήθηκαν στην εργασία:

i. "Why you should be cooking with Tonka Beans", foodrepublic.com (https://www.foodrepublic.com/2015/02/02/why-you-should-be-cooking-with-tonka-beans/)
ii. "Tonka Beans - Dipteryx odorata Wild", alivingproof.com (https://www.alivingproof.com/products/tonka-beans)
iii. "Neural Probes for Acetylcholine", Laboratory for Design of Medical and Analytical Devices, Department of Biomedical Engineering, University of Southern California (https://sites.usc.edu/mousavi/research/neural-probes-for-acetylcholine/)
iv. "Acetylcholinesterase Activity Assay Kit", boosterbio.com (https://www.bosterbio.com/acetylcholinesterase-activity-assay-kit-100-assays-ar4001-boster.html)
v. Bright Focus Foundation, The Progression of Alzheimer's Disease (https://www.brightfocus.org/alzheimers-disease/infographic/progression-alzheimers-disease)
vi. «Διαδικασία Ανάπτυξης», Pfizer (https://www.pfizer.gr/el/%CE%B4%CE%B9%CE%B1%CE%B4%CE%B9%CE%BA%CE%B1%CF%83%CE%B9%CE%B1-%CE%B1%CE%BD%CE%B1%CF%80%CF%84%CF%85%CE%BE%CE%B7%CF%83-0)
vii. «Αιματοεγκεφαλικός Φραγμός και Σκλήρυνση κατά Πλάκας», Δρ. Σταύρος Πασιαρδής, Τμήμα Μοριακής Ιολογίας, Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου (https://slideplayer.gr/slide/2623341/)
viii. "600 MHz 54 mm NMR System - Cold Probe", National High Magnetic Field Laboratory (https://nationalmaglab.org/user-facilities/nmr-mri/nmr-instruments/agilent600-coldprobe-amris)
ix. "NMR Theory and Experiment", Kwantlen Polytechnic University (https://kpu.pressbooks.pub/organicchemistry/chapter/6-5-the-nmr-theory/)
x. "Principles of NMR", Process NMR Associates LLC (https://www.process-nmr.com/principles-of-nmr/)
xi. "NMR Chemical Shift - ppm, Upfield, Downfield", Chemistrysteps.com (https://www.chemistrysteps.com/nmr-chemical-shift/)
xii. "H-NMR Chemical Shifts", Department of Chemistry, University of Calgary (https://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch13/ch13-nmr-3b.html)
xiii. "Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score", molinspiration.com (https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties)
xiv. "Pharmacokinetic properties - pkCSM", University of Melbourne (http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction)
xv. "SwissADME", Swiss Institute of Bioinformatics (http://www.swissadme.ch/index.php)

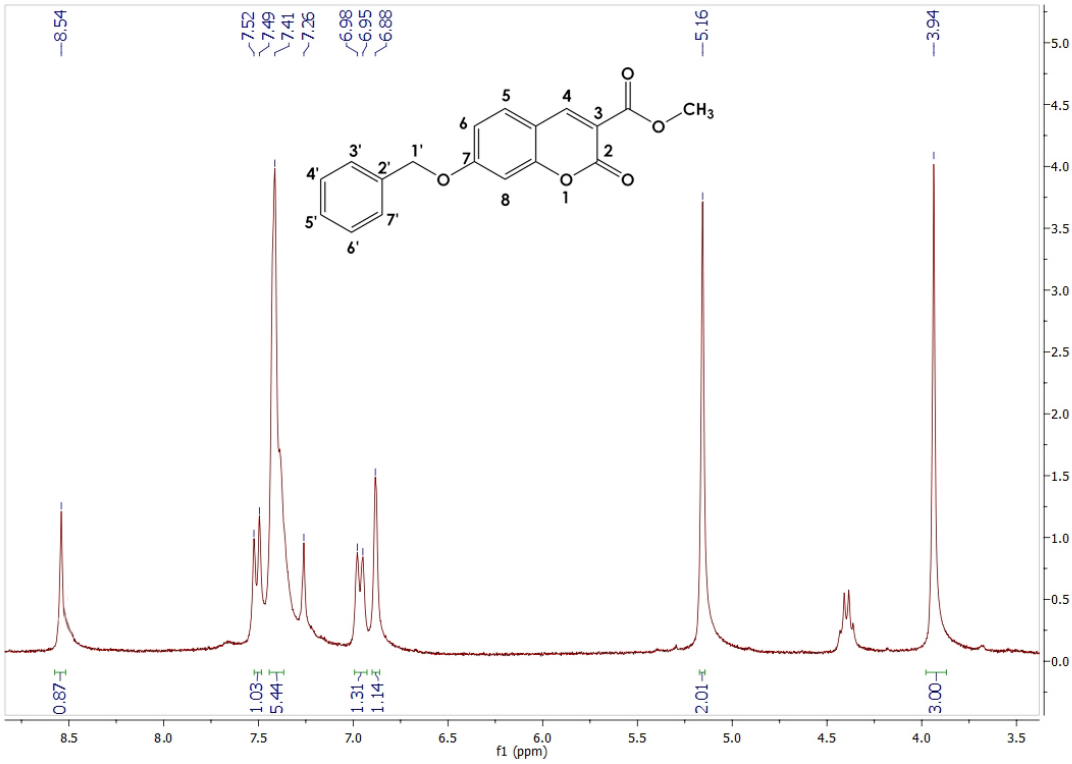
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ^{1}H NMR



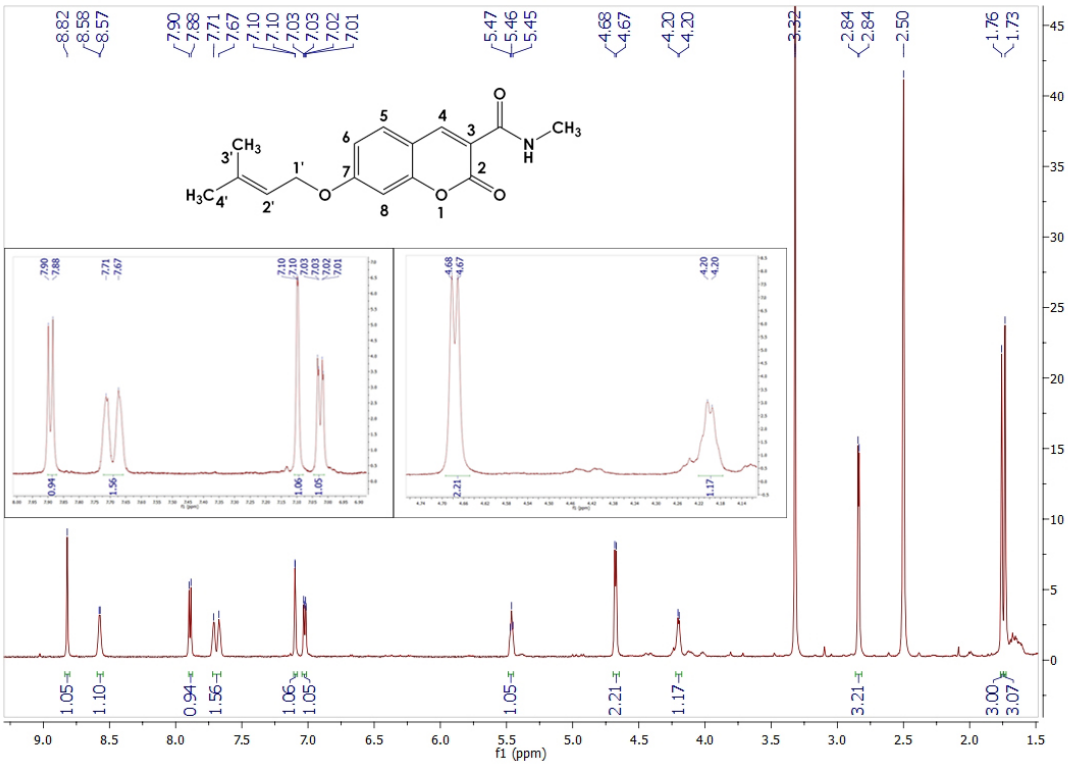
*Εικόνα 58: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης **1**.*



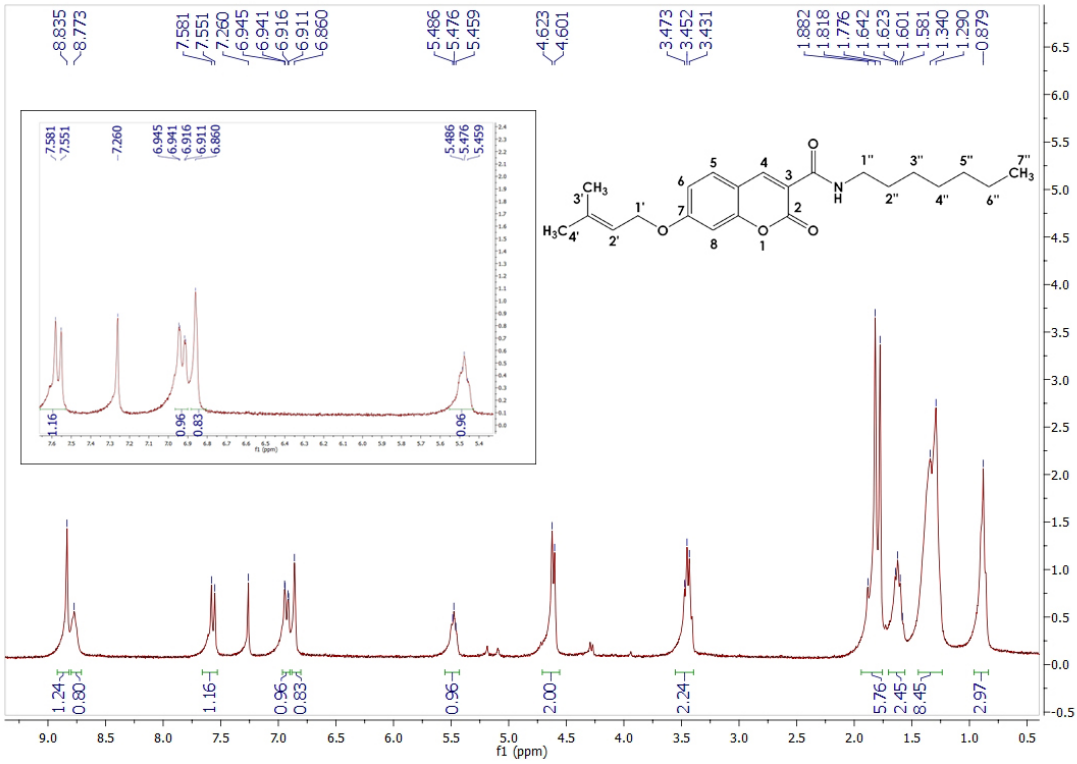
*Εικόνα 59: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης **2α**.*



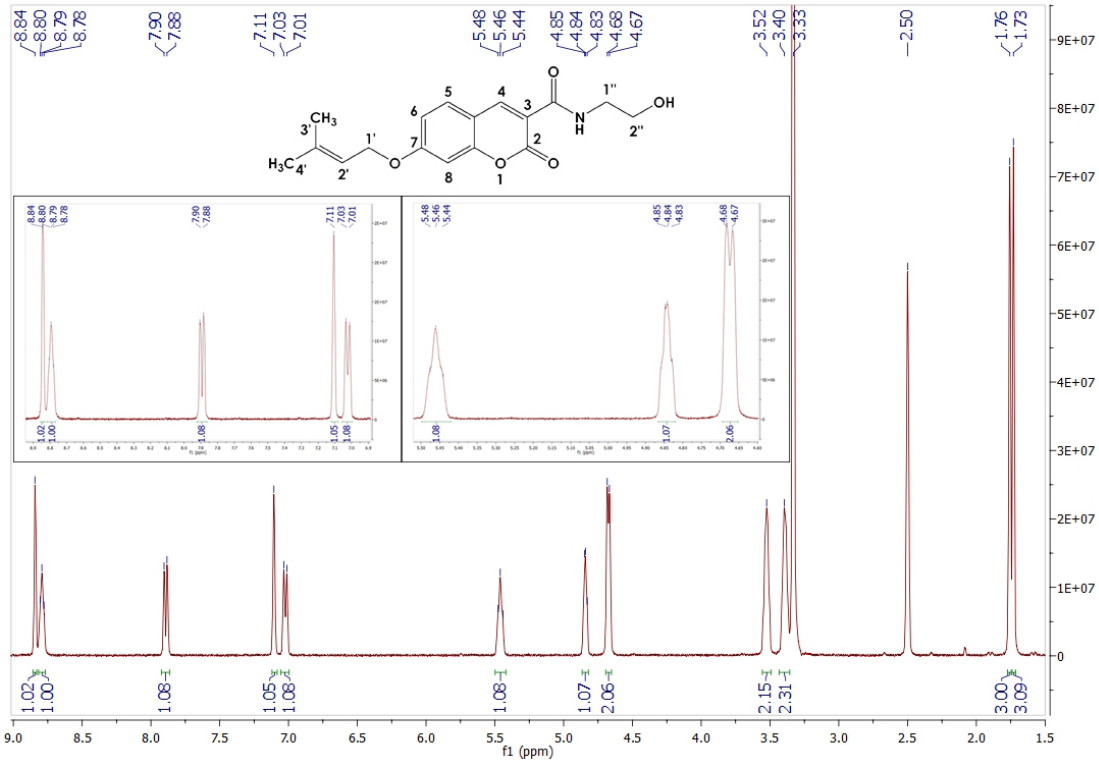
*Εικόνα 60: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης **2b**.*



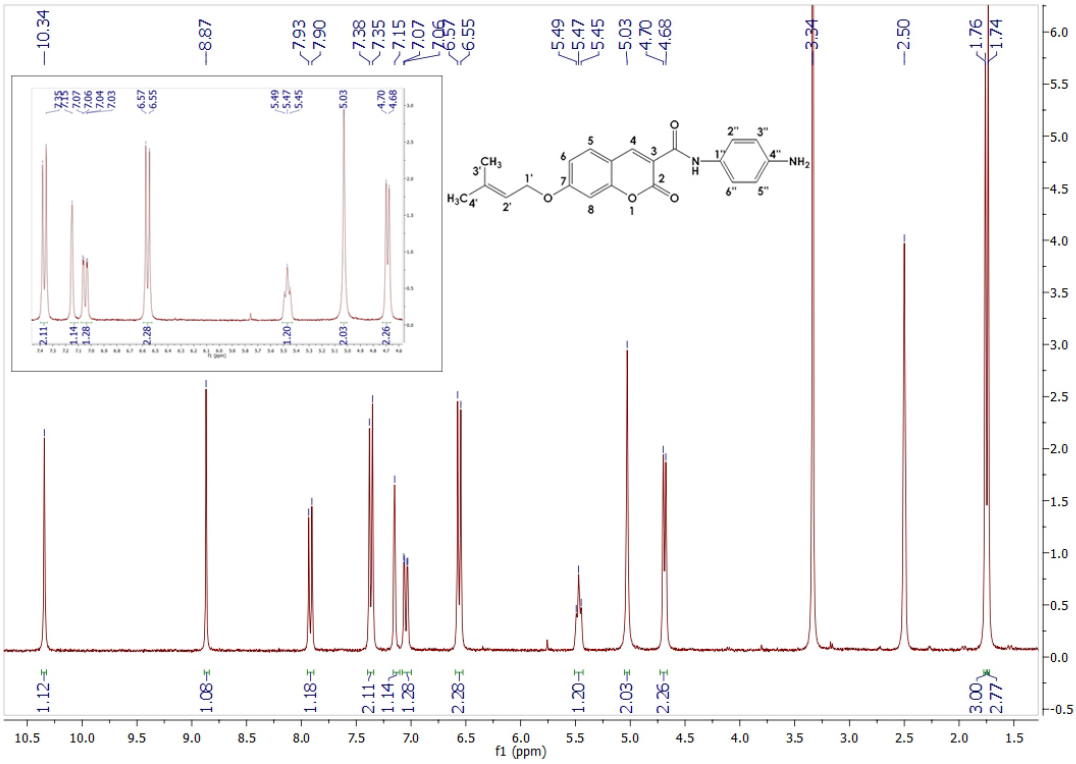
*Εικόνα 61: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης **3α**.*



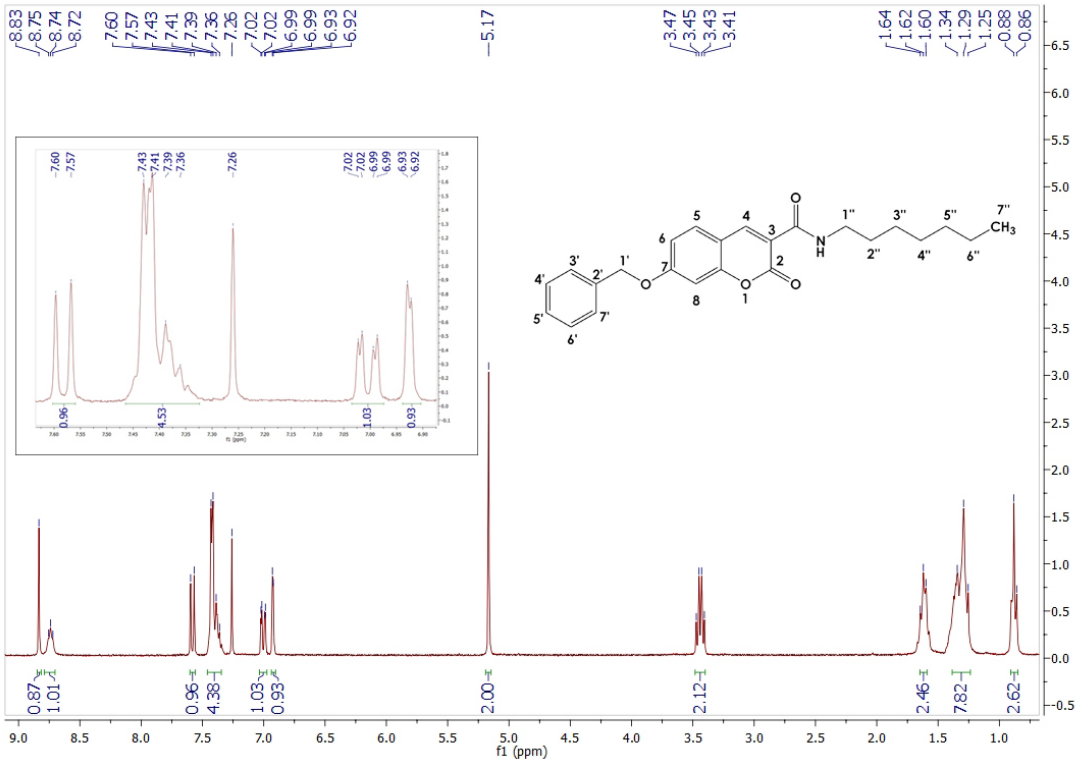
*Εικόνα 62: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης **3b**.*



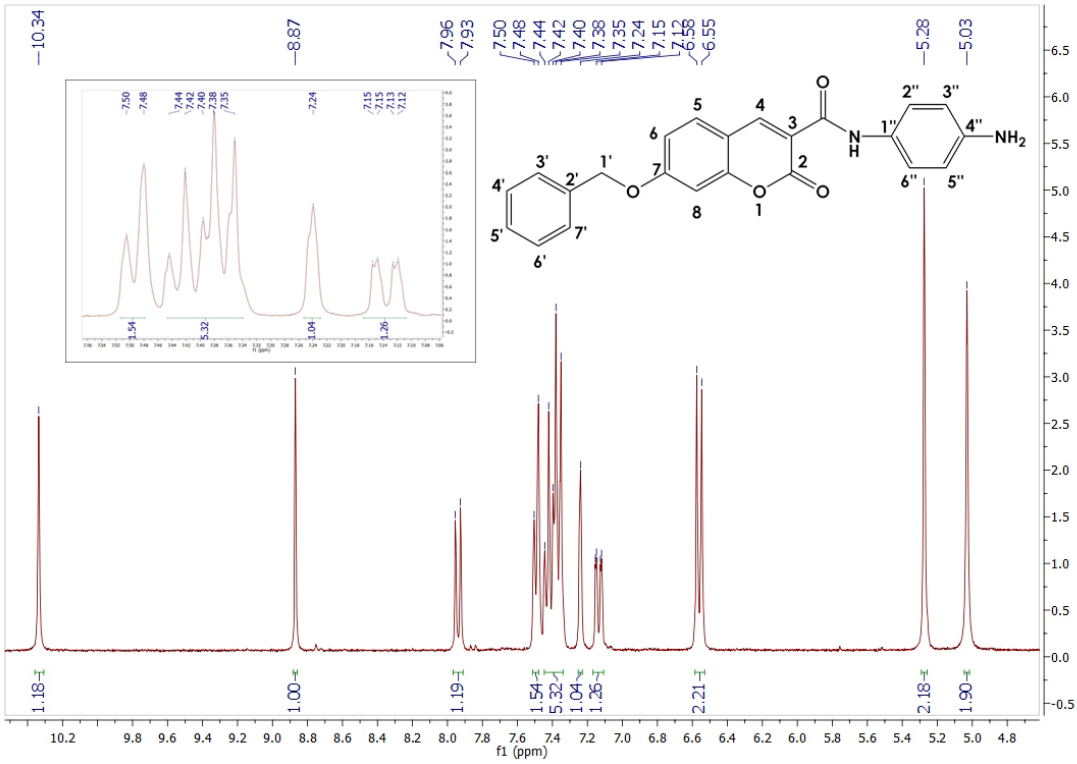
*Εικόνα 63: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης **3c**.*



*Εικόνα 64: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης **3d**.*



*Εικόνα 65: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης **3g**.*



*Εικόνα 66: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης **3h**.*

ΕΥΡΕΤΗΡΙΑ

1. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Tonka beans (α) και Dipteryx odorata (β)..... 10
Εικόνα 2: Χημική δομή βενζο-α-πυρονών (α) και βενζο-γ-πυρονών (β).....11
Εικόνα 3: Χημική δομή ουμπελιφερόνης.....13
Εικόνα 4: Χημική δομή ψωραλενίου (α), ξανθοτοξίνης (β) και αγγελικίνης (γ).....13
Εικόνα 5: Χημική δομή ξανθυτελίνης (α) και σεσελίνης (β).....13
Εικόνα 6: Χημική δομή βαρφαρίνης (α) και δικουμαρόλης (β).....14
Εικόνα 7: Χημική δομή ammoresinol (α) και ostruthin (β).....15
Εικόνα 8: Χημική δομή νοβοβιοκίνης (α) και χλωροβιοκίνης (β).....16
Εικόνα 9: Χημική δομή phenprocoumon (α) και BPRHIV001 (β).....17
Εικόνα 10: Θεμιτές και μη δράσεις των δραστικών μορφών στον οργανισμό.....18
Εικόνα 11: Χημική δομή 5-γερανυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης.....19
Εικόνα 12: Χημική δομή εσκουλετίνης.....20
Εικόνα 13: Μηχανισμός φλεγμονής σε επιθηλιακά κύτταρα.....20
Εικόνα 14: Χημική δομή ωραπτένης.....21
Εικόνα 15: Χημική δομή EdN.....22
Εικόνα 16: Χημική δομή geiparvin.....23
Εικόνα 17: Χημική δομή ουμπελιπρενίνης.....23
Εικόνα 18: Χημική δομή 7-[(3-χλωροβενζυλ)οξυ]-4-[(μεθυλαμινο)μεθυλο-κουμαρίνης.....25
Εικόνα 19: Κύκλος ζωής της ακετυλοχολίνης στον νευρομυικό κόμβο.....26
Εικόνα 20: Μηχανισμός υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης.....27
Εικόνα 21: Δομή ακετυλοχολινεστεράσης Torpedo Californica.....28
Εικόνα 22: Τρισδιάστατη απεικόνιση ανθρώπινης AChE μέσω του λογισμικού PyMOL.....29
Εικόνα 23: Απεικόνιση ανθρώπινου εγκεφάλου στα διαφορετικά στάδια της νόσου Αλτσχάιμερ..... 31
Εικόνα 24: Χημική δομή δονεπεζίλης.....34
Εικόνα 25: Χημική δομή ριβαστιγμίνης.....35
Εικόνα 26: Χημική δομή γαλανταμίνης.....35
Εικόνα 27: Φυσικές ενώσεις-αναστολείς της AChE και σημεία πρόσδεσής τους στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης.....36
Εικόνα 28: Χημική δομή decursinol.....37
Εικόνα 29: Χημική δομή ensaculin.....37
Εικόνα 30: Κατάλληλες θέσεις υποκατάστασης στον κουμαρινικό δακτύλιο για αναστολή της AChE.....38
Εικόνα 31: Διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων.....39
Εικόνα 32: Κατηγορίες υβριδικών μορίων.....41
Εικόνα 33: Προσδιορισμός τιμής IC_{50}.....42
Εικόνα 34: Αιματοεγκεφαλικός φραγμός.....44
Εικόνα 35: Χημική δομή μορίων οδηγών.....46
Εικόνα 36: Γενική δομή υβριδικών κουμαρινικών καρβοξαμιδίων.....46
Εικόνα 37: Όργανο NMR συχνότητας 600 MHz της εταιρείας Varian.....50
Εικόνα 38: Συμπεριφορά πυρήνων με I>0 απουσία και παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.....51

Εικόνα 39: Διαφορά ενέργειας πυρήνων με παράλληλο και αντιπαραλληλο spin σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο Bo.....52
Εικόνα 40: Άξονας φάσματος NMR.....53
Εικόνα 41: Χημικές μετατοπίσεις κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα ^{1}H NMR..... 53
Εικόνα 42: Χημική αναπαράσταση μεθόδου Ellman.....54
Εικόνα 43: Περιστροφικός εξατμιστήρας Buchi Rotavapor®.....56
Εικόνα 44: Συσκευή Gallenkamp.....57
Εικόνα 45: Συσκευή Epoch 2 Microplate Reader.....66
Εικόνα 46: Πλακίδιο 96 θέσεων.....67
Εικόνα 47: Φάσμα ^{1}H NMR της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (1).....68
Εικόνα 48: Φάσμα ^{1}H NMR της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (2a)..69
Εικόνα 49: Φάσμα ^{1}H NMR της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (2b)..70
Εικόνα 50: Φάσμα ^{1}H NMR N-επτυλο-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (3b)..... 71
Εικόνα 51: Φάσμα ^{1}H NMR N-(2-υδροξυαιθυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (3c)..... 72
Εικόνα 52: Φάσμα ^{1}H NMR 7-(βενζυλοξυ)-N-επτυλο-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (3g)..... 73
Εικόνα 53: Φάσμα ^{1}H NMR N-(4-αμινοφαινυλο)-7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (3h)..... 74
Εικόνα 54: Δραστικότερα πρενυλοξυ-ανάλογα..... 76
Εικόνα 55: Σύγκριση πρενυλοξυ- και βενζυλοξυ-αναστολέων..... 77
Εικόνα 56: Μέθοδος BOILED-Egg.....80
Εικόνα 57: Νέες ενώσεις-αναστολείς.....84
Εικόνα 58: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης 1..... 90
Εικόνα 59: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης 2α..... 91
Εικόνα 60: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης 2b..... 92
Εικόνα 61: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης 3a..... 93
Εικόνα 62: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης 3b.....94
Εικόνα 63: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης 3c.....95
Εικόνα 64: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης 3d.....96
Εικόνα 65: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης 3g.....97
Εικόνα 66: Φάσμα ^{1}H NMR ένωσης 3h..... 98

2. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Υδρόλυση ακετυλοχολίνης από την ακετυλοχολινεστεράση.....26
Σχήμα 2: Γενική πορεία σύνθεσης καρβοξαμιδίων.....47
Σχήμα 3: Σύνθεση 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης.....48
Σχήμα 4: Σύνθεση 7-αλκοξυ-κουμαρινικών παραγώγων.....48
Σχήμα 5: Σύνθεση καρβοξαμιδίων.....49
Σχήμα 6: Μηχανισμός σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson.....49
Σχήμα 7: Συνθετική πορεία υβριδικών κουμαρινικών παραγώγων.....83

3. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Ταξινόμηση φαινολικών ενώσεων.....12
Διάγραμμα 2: Ταξινόμηση κουμαρινών και χαρακτηριστικότερες ενώσεις κάθε κατηγορίας.12
Διάγραμμα 3: Κυριότερες βιολογικές δράσεις κουμαρινών και δραστικότερες κουμαρίνες ανά κατηγορία.....14
Διάγραμμα 4: Υπάρχοντα φάρμακα για τη νόσο του Αλτσχάιμερ και χημικές δομές τους.....33
Διάγραμμα 5: Βασική πορεία ανακάλυψης νέων φαρμακομορίων και υποστηρικτικές διεργασίες.....39

4. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οργανολογία in vitro προσδιορισμού αναστολής AChE..... 66
Πίνακας 2: Ικανότητα αναστολής AChE %100μM και IC_{50} ενώσεων 3a-3j.....75
Πίνακας 3: Ιδιότητες ενώσεων 1-3j και εφαρμογή του κανόνα του Lipinski.....78
Πίνακας 4: Σύγκριση logP για τις ενώσεις 1-3j..... 79
Πίνακας 5: Πρόβλεψη εγκεφαλικής διαπερατότητας ενώσεων 1-3j..... 81