

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (I) Χημικών Επιστημών



**«Σχεδιασμός και σύνθεση νέων κουμαρινικών  
αναλόγων ως πιθανών αναστολέων του ενζύμου  
ακετυλοχολινεστεράση (AChE)»**

*Διπλωματική εργασία*

**ΠΑΠΑΚΩΣΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

Επιβλέπουσα:

Αναστασία Δέτση

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Δρ. Αναστασίας Δέτση, Καθηγήτριας Ε.Μ.Π., κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022.

Αρχικά, οφείλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Αναστασία Δέτση, επιστημονική υπεύθυνη της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Η πολύτιμη βοήθειά της, η επίβλεψη και η καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα στην ολοκλήρωσή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Ευαγγελία Παυλάτου και στον Καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Χαράλαμπο Σαρίμβη 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 στον υποψήφιο διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., Αλέξανδρο Καλοσπύρο. Η καθοδήγησή του, οι επιστημονικές του γνώσεις και δεξιότητες και οι καίριες παρατηρήσεις του συνέβαλλαν δραστικά στην αντιμετώπιση κάθε προβλήματος που προέκυπτε και στην επίτευξη αυτού του αποτελέσματος. Τον ευχαριστώ από καρδιάς τόσο για την άριστη συνεργασία μας, όσο και για την συνεχή του στήριξη σε αυτήν την προσπάθεια.

Ένα εξίσου μεγάλο ευχαριστώ αποδίδω στην υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., Αννίτα Κατωπόδη για τη σημαντική της συμβολή με τη μεταλαμπάδευση τόσο πρακτικών όσο και θεωρητικών γνώσεων, για τη συνεχή βοήθειά της σε κάθε τι που χρειαζόταν και για τη σημαντική στήριξή της στο εγχείρημα αυτό.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες και μέλη ΕΔΙΠ για την αρμονική συνεργασία μας στο πλαίσιο της διπλωματικής μου εργασίας. Το πάντα ευχάριστο κλίμα διευκόλυνε τη διεκπεραίωση των πειραμάτων.

Τέλος, βαθιά ευγνωμοσύνη αποδίδω στην οικογένειά μου για την αμέριστη στήριξη, υπομονή και συμπαράστασή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π. Ευχαριστώ, επίσης, το φιλικό μου περιβάλλον για τη στήριξή τους.

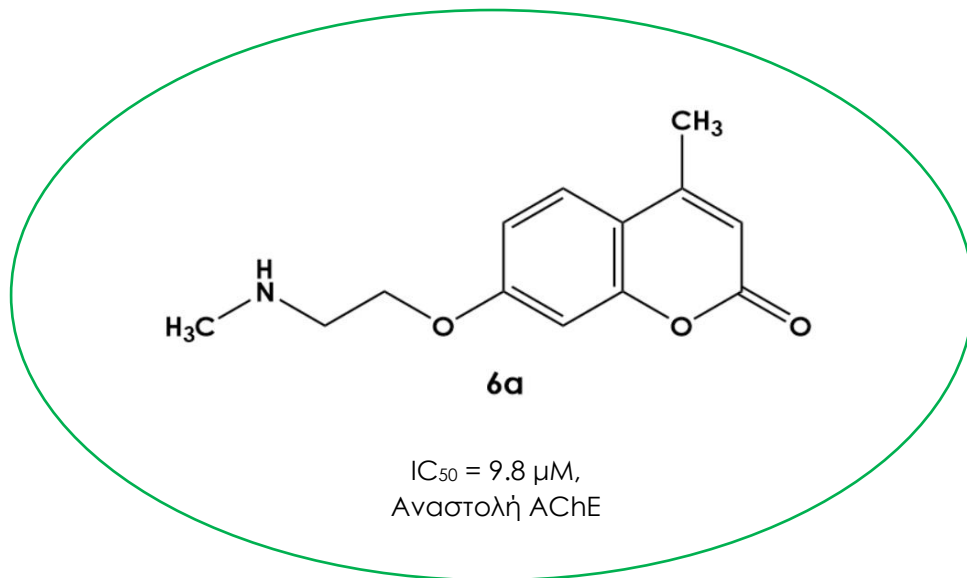
## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κουμαρίνες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών και απαντώνται σε πολλά είδη φυτών, είτε σε ελεύθερη μορφή, είτε υπό μορφή γλυκοζιδίων. Παρουσιάζουν πληθώρα βιολογικών δράσεων, μεταξύ των οποίων η αντιμικροβιακή, η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιμυκητιακή, η αντικαρκινική, η αντιπηκτική και η νευροπροστατευτική κεντρίζοντας συνεχώς το επιστημονικό ενδιαφέρον. Επίσης, δομικές τροποποιήσεις στο σκελετό πολλών φυσικών κουμαρινών έχουν οδηγήσει σε μόρια με αξιόλογη βιολογική δράση. Οι κουμαρίνες που απομονώνονται από φυσικές πηγές αποτελούν μόρια-οδηγούς για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών παραγόντων.

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα ένζυμο που ανήκει στις α/β υδρολάσες και καταλύει την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη σε χολίνη και οξικό οξύ. Έχει παρατηρηθεί ότι μειωμένα επίπεδα ακετυλοχολίνης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα συνδέονται με απώλεια μνήμης και ειδικότερα με τη νόσο Αλτσχάιμερ και για αυτό το λόγο τρία από τα τέσσερα εγκεκριμένα φαρμακευτικά σκευάσματα κατά του Αλτσχάιμερ στην Ευρώπη, στηρίζονται στην αναστολή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση. Ωστόσο, μέχρι στιγμής οι εγκεκριμένοι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης επιφέρουν μεν ανακούφιση των συμπτωμάτων αλλά δεν έχουν καταφέρει να επιβραδύνουν ή να αντιμετωπίσουν επιτυχώς τη νόσο Αλτσχάιμερ.

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών αναλόγων ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης. Στο πλαίσιο αυτό, συντέθηκαν 12 ενώσεις, μεταξύ των οποίων οκτώ νέα αμινοαιθοξυ-κουμαρινικά παράγωγα που προέκυψαν ύστερα από αντιδράσεις τριών σταδίων. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν δύο ανάλογα της φυσικής κουμαρίνης ουμπελιφερόνη, μέσω αντίδρασης Pechmann, τα οποία στη συνέχεια μέσω δομικής τροποποίησης στο υδροξύλιο της θέσης 7 οδήγησαν σε δύο βρωμοαιθοξυ-παράγωγα μέσω αντίδρασης σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson. Από τα βρωμοαιθοξυ-παράγωγα και με αντίδραση υποκατάστασης του βρωμίου από κατάλληλες υποκατεστημένες πρωτοταγείς αμίνες προέκυψαν τελικά οκτώ νέα αμινοαιθοξυ-κουμαρινικά ανάλογα, τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού  $^1\text{H NMR}$ .

Τα νέα αμινοαιθοξυ-κουμαρινικά ανάλογα μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης μέσω της τροποποιημένης μεθόδου του Ellman. Τα νέα αυτά κουμαρινικά παράγωγα επέδειξαν σημαντική ικανότητα αναστολής, η οποία κυμάνθηκε από 53 έως 95% για συγκέντρωση 100  $\mu\text{M}$ , και  $\text{IC}_{50}$  από 9.8-94.2  $\mu\text{M}$ . Δραστικότερο αναστολέα αποτελεί η ένωση **6a** με ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης 94.8% για συγκέντρωση 100  $\mu\text{M}$  και  $\text{IC}_{50} = 9.8 \mu\text{M}$ .



Δραστικότερος αναστολέας, ένωση **6a**

**Επιστημονική περιοχή:** Φαρμακευτική Χημεία, Οργανική Σύνθεση, Αναστολή Ακετυλοχολινεστεράσης

**Λέξεις-κλειδιά:** Κουμαρίνες, Αναστολείς Ακετυλοχολινεστεράσης, Νόσος Αλτσχάιμερ

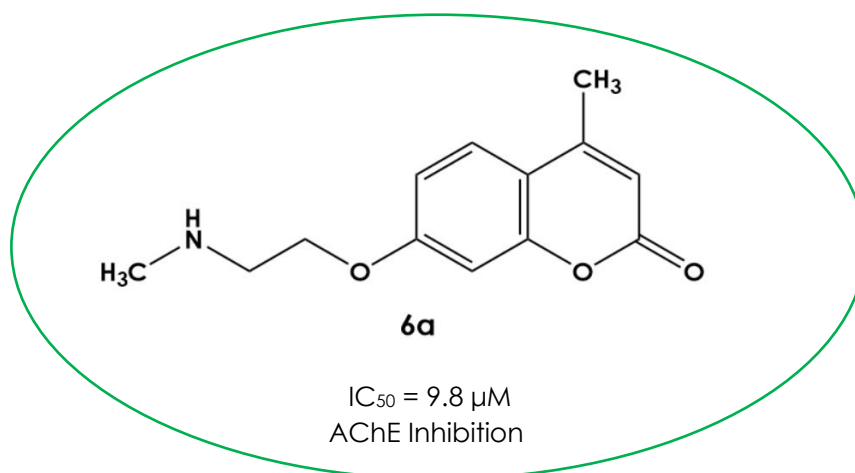
## ABSTRACT

Coumarins are heterocyclic compounds that belong to the benzopyrone chemical class and can be found in many plants, either in a free state or as glycosides. They possess a wide range of biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, anti-cancer, and neuroprotective, constantly stimulating scientific interest. Also, structural modifications of the coumarin scaffold have led to molecules with remarkable biological activity.

Acetylcholinesterase is an enzyme that belongs to the  $\alpha / \beta$  hydrolases and catalyzes the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine into choline and acetic acid. It has been observed that low levels of acetylcholine in the Central Nervous System are associated with memory loss and more specifically with Alzheimer's Disease. Three out of the four approved medicines by the European Medicines Agency for Alzheimer's Disease up to today, are acetylcholinesterase inhibitors which however can only partially relieve the symptoms and do not delay the disease's progression or consist a therapeutic treatment.

The aim of this thesis is the design, synthesis, and characterization of novel aminoethoxy-coumarin analogues that act as acetylcholinesterase inhibitors. In this context, twelve compounds were synthesized, eight out of which are novel aminoethoxy- coumarin derivatives, synthesized after three steps. Specifically, two analogues of the natural coumarin umbelliferone were synthesized using Pechmann condensation, which led to two bromoethoxy-substituted derivatives using Williamson ether synthesis. These derivatives were then left to react with primary amines, which led to the synthesis of eight novel aminoethoxy-coumarin analogues, which were identified via  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR).

The new coumarin molecules were evaluated for their ability to inhibit acetylcholinesterase enzyme via a modified Ellman's method. These new molecules showed significant inhibition capacity, ranging from 53 to 95% for a concentration of 100  $\mu\text{M}$ , and  $\text{IC}_{50}$  from 9.8-94.2  $\mu\text{M}$ . The most potent inhibitor is compound **6a**, with an ability to inhibit acetylcholinesterase 94.8% at a concentration of 100  $\mu\text{M}$  and  $\text{IC}_{50}=9.8 \mu\text{M}$ .



*Most potent inhibitor, compound 6a*

**Scientific area:** Pharmaceutical Chemistry, Organic Synthesis, Acetylcholinesterase Inhibition

**Keywords:** Coumarins, Acetylcholinesterase Inhibitors, Alzheimer's Disease

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
ABSTRACT.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1. ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ.....	8
1.1. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΩΝ.....	8
1.2. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΩΝ.....	10
1.2.1. ΑΠΛΕΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ.....	11
1.2.2. ΦΟΥΡΑΝΟΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ.....	11
1.2.3. ΠΥΡΑΝΟΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ.....	12
1.2.4. ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΕΣ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΙΚΟ ΔΑΚΤΥΛΙΟ.....	12
1.3. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΩΝ.....	13
1.3.1. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	13
1.3.2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	15
1.3.3. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΗ.....	17
1.3.4. ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	18
1.3.5. ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	19
1.3.6. ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	21
1.3.7. ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	22
2. ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ (AChE).....	24
2.1. ΔΟΜΗ AChE.....	24
2.2. ΔΡΑΣΗ AChE.....	26
2.1. ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ.....	27
3. ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER.....	29
4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ.....	31
3.1. ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΦΑΡΜΑΚΑ-ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ.....	32
3.2. ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ AChE.....	35
5. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ.....	38
5.1.1. ΕΝΩΣΗ-ΟΔΗΓΟΣ.....	38
5.1.2. IC <sub>50</sub> .....	38
ΣΚΟΠΟΣ.....	40
ΣΥΝΘΕΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	41
1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	41
1.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΟΥΜΠΕΛΙΦΕΡΟΝΗΣ (3α-3b).....	41
1.2. ΣΥΝΘΕΣΗ 7-ΒΡΩΜΟΑΙΘΟΕΥ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ (4α-4b).....	41
1.3. ΣΥΝΘΕΣΗ 7-(ΑΛΚΥΛΟ)- Η 7-(ΑΡΥΛΟ)-ΑΜΙΝΟΑΙΘΟΕΥ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ (6α-6h).....	42
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΩΝ.....	42
2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ RECHMANN.....	42
2.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΑΙΘΕΡΩΝ ΚΑΤΑ WILLIAMSON.....	43
3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	44
3.1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR).....	44
3.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR.....	46
4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ AChE.....	49

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	50
1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	50
1.1. ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	50
1.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΟΥΜΠΕΛΙΦΕΡΟΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ RECHMANN (3α-3b).....	51
1.3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ 7-ΒΡΩΜΟΑΙΘΟΞΥ-ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ (4α-4b).....	52
1.4. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΝΕΩΝ ΑΜΙΝΟΑΙΘΟΞΥ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ (6α-6h).....	53
2. ΑΝΑΣΤΟΛΗ AChE.....	59
2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ.....	59
2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	60
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	61
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	61
2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ AChE.....	71
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	75
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ

### 1.1. Προέλευση κουμαρινών

Οι κουμαρίνες αρχικά εντοπίστηκαν στα φυτά και η ονομασία τους προέρχεται από το φυτικό είδος *Coumarouna odorata*. Ο Vogel, το 1820, απομόνωσε την πρώτη ένωση κουμαρίνης από τους καρπούς τόνκα (tonka beans) του φυτού (*Dipteryx odorata*).<sup>[2]</sup> Πρώτη φορά, ο Von Werder, το 1936, συσχέτισε τις κουμαρίνες με θεραπευτικούς παράγοντες, ενώ το 1958 ο Bose διαπίστωσε την πλειονότητα των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, οι επιστήμονες στράφηκαν στη φαρμακολογική τους δράση, αλλά και στην απομόνωση, το δομικό χαρακτηρισμό και τη σύνθεσή τους. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 1300 φυσικές κουμαρίνες.<sup>[1], [2]</sup>



Εικόνα 1: *Dipteryx odorata* (α) και Tonka beans (β).

Τουλάχιστον 150 είδη κουμαρινών εντοπίζονται σε άνω των 30 είδη φυτών, με τα Εσπεριδοειδή (*Rutaceae*), να κατατάσσονται στην πρώτη θέση και στη συνέχεια να ακολουθούν η οικογένεια των Σελινοειδών (*Umbelliferae*), των Ελαιοειδών (*Oleaceae*) και των Νυκταγινιδών (*Nyctaginaceae*). Αναλυτικότερα, 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.<sup>[3]</sup> Υπάρχουν και διάφορα φυσικά κουμαρινικά παράγωγα, τα οποία αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και βρίσκονται σε αυτά σε ελεύθερη μορφή ή ως γλυκοζίτες. Συχνά, βρίσκονται 5-10 διαφορετικές κουμαρίνες σ' ένα φυτό, όμως συνήθως μόνο ένα είδος παράγωγης ένωσης βρίσκεται σ' ένα είδος φυτού. 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

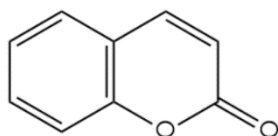
περιεκτικότητα σε κουμαρίνες όταν βλαστάνουν, ενώ σε νεαρότερα φύλλα η ποσότητα είναι μεγαλύτερη από ότι στα πιο γηραιά.<sup>[4]</sup> Έχουν, επίσης, ταυτοποιηθεί περίπλοκες κουμαρίνες ως μεταβολικά προϊόντα βακτηρίων και μυκήτων.<sup>[5]</sup>

Παρόλο που οι κουμαρίνες είναι ευρέως διαδεδομένες στα φυτά, δεν είναι εντελώς ξεκάθαρος ο ρόλος τους. Υπάρχουν ενδείξεις πως επηρεάζουν τη βιοχημεία και τη φυσιολογία τους δρώντας ως αντιοξειδωτικά ή αναστολείς ενζύμων, όπως και την ανάπτυξή τους, επηρεάζοντας τη δράση αυξητικών και ρυθμιστικών ορμονών. Πιο συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί πως ότι κουμαρίνες σε χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξεως  $10^{-12}$ - $10^{-4}$  mol/l) συμβάλλουν στην ανάπτυξη των φυτών, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (της τάξεως  $10^{-4}$ - $10^{-2}$  mol/l) την καταστέλλουν. Για παράδειγμα, η απλή κουμαρίνη σε συγκέντρωση  $1,3 \cdot 10^{-3}$  mol/l διαπιστώθηκε 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. Η σχέση αυτή πιθανόν είναι μια σχέση ισορροπίας, με τη δράση να αντιστρέφεται όταν η κουμαρίνη απομακρύνεται. Επιπλέον, οι κουμαρίνες ενδέχεται να υποβοηθούν στον έλεγχο της αναπνοής και της φωτοσύνθεσης, αλλά και στην προστασία των φυτών από μικροοργανισμούς και ασθένειες.<sup>[4], [6]</sup>

Λόγω της ευχάριστης μυρωδιάς τους, οι κουμαρίνες χρησιμοποιούνταν ως αρωματικά σε τρόφιμα ή καλλυντικά σκευάσματα. Έπειτα από την ανακάλυψη της ηπατοτοξικής τους δράσης, περιορίστηκαν και αντικαταστάθηκαν από τα 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, αποτελώντας κίνδυνο ηπατοτοξικής και καρκινογενετικής επίδρασης, ενώ διαπιστώθηκε ότι η κατανάλωση κουμαρινών σε υψηλές δόσεις από πειραματόζωα είχε ως αποτέλεσμα τοξική δράση στο ήπαρ, καρδιαγγειακά προβλήματα, μέχρι και κώμα ή θάνατο. Ως εκ τούτου απαγορεύτηκε η χρήση τους σε τρόφιμα στις ΗΠΑ. Δεν είναι σαφείς, εντούτοις, μέχρι στιγμής οι παρατηρήσεις που αναφέρονται στην τοξικότητα των κουμαρινών με αποτέλεσμα να προκύπτει η ανάγκη περαιτέρω τοξικολογικών, βιολογικών και φαρμακολογικών μελετών.<sup>[2], [4]</sup>

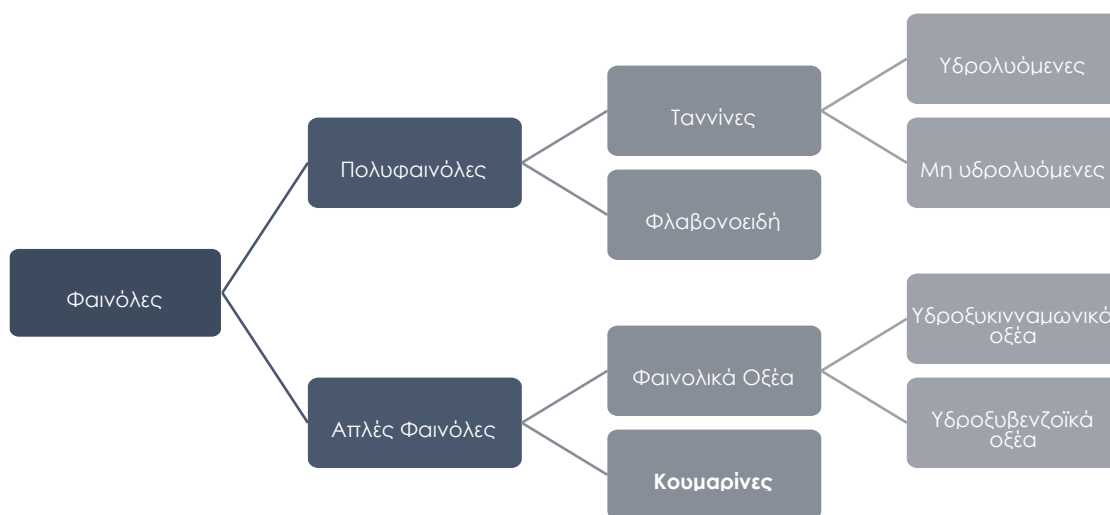
## 1.2. Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών

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. Αρχικά, η κουμαρίνη θεωρούταν παράγωγο του βενζοϊκού οξέος. Η σύνθεσή της όμως από τον Perkin από σαλικυλαλδεΐδη απέδειξε την προέλευσή της από το ουδροξυκινναμωμικό οξύ, καθιστώντας τις κουμαρίνες και τα παράγωγά τους μία ομάδα λακτονών προερχόμενη από τα κινναμωμικά οξέα.<sup>[7]</sup>



Εικόνα 2: Χημική δομή 2H-χρωμεν-2-όνης.

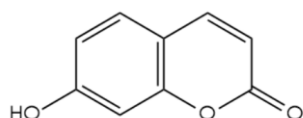
Η απλούστερη κουμαρίνη ονομάζεται επίσης κατά IUPAC 2H-χρωμεν-2-όνη ή 1,2-βενζοπυρόνη, ή ακόμα 2H-βενζοπυραν-2-όνη. Έχει διακριθεί στη φαρμακευτική χημεία και έχει χαρακτηριστεί ως προνομιούχος δομικός σκελετός της αφού είναι δυνατόν να υποκατασταθεί σε πολλά σημεία όπως και να συζευχθεί με άλλα μόρια με αποτέλεσμα να αποδώσει 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.<sup>[2], [8]</sup>



Διάγραμμα 1: Ταξινόμηση φαινολικών ενώσεων.

### 1.2.1. Απλές κουμαρίνες

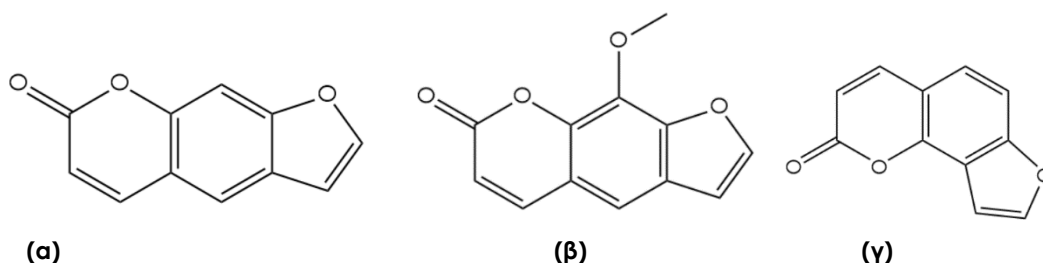
Οι απλές κουμαρίνες αποτελούνται από την ίδια την κουμαρίνη, τα υδροξυ-, αλκοξυ- και αλκυλο- υποκατεστημένα στο βενζολικό δακτύλιο παράγωγά της, καθώς και τους γλυκοζίτες τους. Η πιο κοινή απλή κουμαρίνη είναι η 7-υδροξυ-κουμαρίνη ή ουμπελιφερόνη (*umbelliferone*), η οποία αποτελεί βιολογικό προκάτοχο πιο σύνθετων κουμαρινών. Η ουμπελιφερόνη βρίσκεται στα καρότα, τον κόλιανδρο και το βότανο αγγελική (*garden angelica*) και έχει συμπεριληφθεί σε αντηλιακά, καθώς και έχει χρησιμοποιηθεί ως φθορίζουσα ουσία.<sup>[9], [10]</sup>



Εικόνα 3: Χημική δομή ουμπελιφερόνης.

### 1.2.2. Φουρανοκουμαρίνες

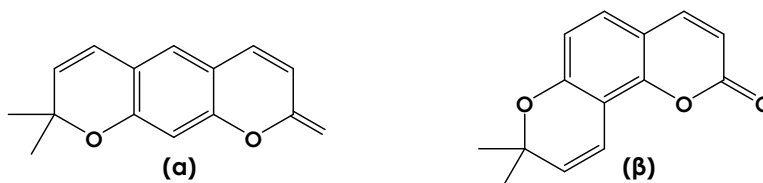
Οι φουρανοκουμαρίνες αποτελούν ομάδα κουμαρινών που περιέχουν έναν πενταμελή φουρανικό δακτύλιο, συνδεδεμένο με τον κουμαρινικό πυρήνα. Ο δακτύλιος αυτός μπορεί να συνδεθεί είτε γραμμικά είτε υπό γωνία με τον πυρήνα της κουμαρίνης στον οποίο μένουν δύο θέσεις προς υποκατάσταση. Τα τρία πιο γνωστά παράγωγα είναι το ψωραλένιο (*psoralen*), η ξανθοτοξίνη (*xanthotoxin*) και η αγγελικίνη (*angelicin*). Τα ψωραλένια αποτελούν φωτοευαίσθητες ενώσεις και δύνανται να προκαλέσουν δερματικά προβλήματα σε ζώα που τρέφονται με τα φυτά τα οποία τα συμπεριλαμβάνουν. Υπάρχουν, όμως ψωραλένια τα οποία συμβάλλουν στην αντιμετώπιση φλεγμονωδών δερματικών νόσων, όπως η ψωρίαση.<sup>[8], [10]</sup>



Εικόνα 6: Χημική δομή ψωραλενίου (α), ξανθοτοξίνης (β) και αγγελικίνης (γ).

### 1.2.3. Πυρανοκουμαρίνες

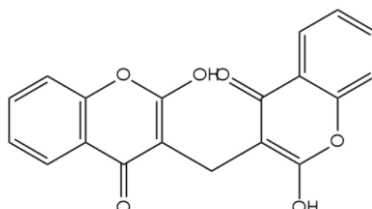
Οι πυρανοκουμαρίνες είναι παρόμοιες με τις φουρανοκουμαρίνες όσον αφορά τη δομή και τον τρόπο σύνδεσης του δακτυλίου. Διαφέρουν, όμως, διότι πρόκειται για έναν εξαμελή πυρονικό δακτύλιο ο οποίος συνδέεται με τον πυρήνα της κουμαρίνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ξανθυλετίνη (*xanthyletin*-γραμμική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



Εικόνα 4: Χημική δομή ξανθυλετίνης (α) και σεσελίνης (β).

### 1.2.4. Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο

Περιλαμβάνονται οι υποκατεστημένες κουμαρίνες στην 3- ή στην 4- ή και στις δύο θέσεις του δακτυλίου, οι 3,4-συμπυκνωμένες κουμαρίνες και οι 4-υδροξυκουμαρίνες. Η βαρφαρίνη (*warfarin*) ανήκει στην τελευταία κατηγορία, η οποία είναι μία φυσική κουμαρίνη που απομονώθηκε από το γάλιο το αρωματικό (*woodruff*) και τη λεβάντα και χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό με σκοπό την αποφυγή θρομβώσεων στις φλέβες, τους πνεύμονες και την καρδιά, αλλά και ως ποντικοφάρμακο. Λόγω της μελέτης των τάσεων αιμορραγίας βοοειδών τα οποία έπασχαν από δηλητηρίαση από γλυκό τριφύλλι (*sweet clover disease*) ανακαλύφθηκε και η δράση αυτή. 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.<sup>[8], [10]</sup>



Εικόνα 5: Χημική δομή δικουμαρόλης.

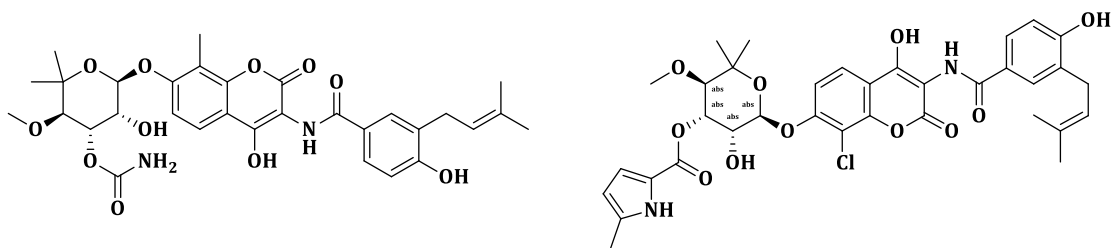
### 1.3. Φαρμακευτικές δράσεις των κουμαρινών

Οι κουμαρίνες και τα παράγωγά τους είναι βιολογικά και φαρμακευτικά ενεργές ενώσεις με ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων όπως αντιμικροβιακές-αντιβιοτικές, αντιμυκητιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιπηκτικές, αντιοξειδωτικές και νευροπροστατευτικές.

Επίσης, αξιοσημείωτη είναι η δράση τους ως οιστρογόνα, μαλακιοκτόνα, ηρεμιστικά, υπνωτικά και ως φωτοευαίσθητοι παράγοντες που συμβάλλουν σε δερματικές παθήσεις. Επίσης, έχουν αγγειοδιασταλτική, ανοσοκατασταλτική και υποθερμική δράση.<sup>[8], [9]</sup>

#### 1.3.1 Αντιμικροβιακή-αντιβιοτική δράση

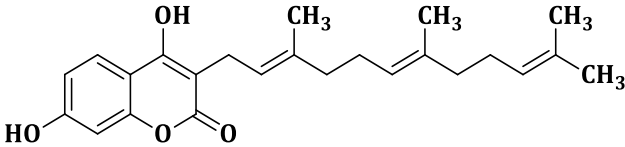
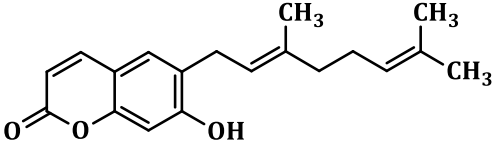
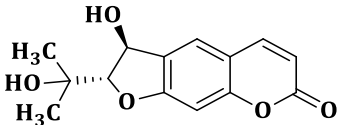
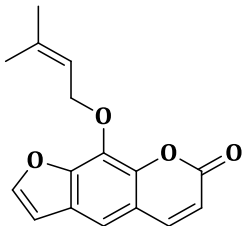
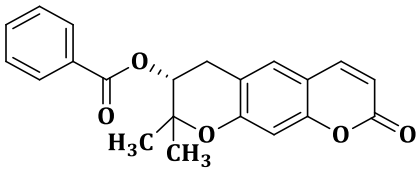
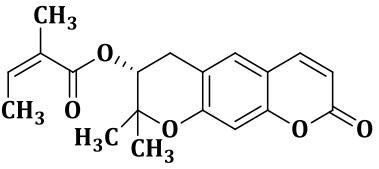
Η απλή κουμαρίνη από μόνη της δεν είναι ικανή να παρουσιάσει αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο, διάφορα ανάλογα της και κυρίως αυτά που φέρουν στο μόριο τους μακριές αλυσίδες υδρογονανθράκων εμφανίζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Η νοβοβιοκίνη, η χλωροβιοκίνη καθώς και άλλα συνθετικά ανάλογα τους αποτελούν παράγωγα κουμαρινών που χαρακτηρίζονται τόσο από αντιβιοτικές όσο και από αντιβακτηριδιακές ιδιότητες. Οι Musicic et al. μελέτησαν τις σχέσεις δομής-δράσης μιας σειράς κουμαρινών ως αναστολέων της γυράσης του DNA. Τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης οδήγησαν στη στερεοεκλεκτική σύνθεση 5-μονοαλκυλ- και 5,5-διαλκυλ-υποκατεστημένης νοβιόσης (noviose) και την ανάπτυξη δύο σειρών αναστολέων της DNA γυράσης που δρουν εναντίον θετικών κατά gram βακτηρίων, όπως είναι ο *Staphylococcus aureus*.<sup>[40], [41], [42]</sup>

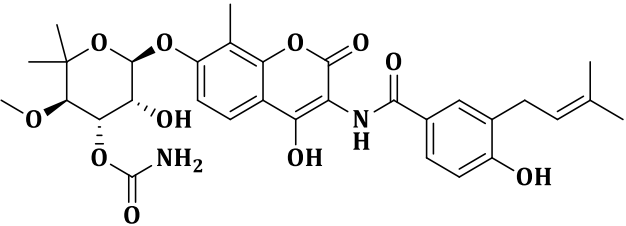


Εικόνα 6: α)Νοβοβιοκίνη β)Χλωροβιοκίνη.

Έχουν βρεθεί και μελετηθεί πολλές κουμαρίνες για την αντιμικροβιακή και αντιβιοτική τους δράση. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι σημαντικότερες από τις κουμαρίνες με αντιμικροβιακή δράση, η χημική δομή τους καθώς και τα μικρόβια εναντίον των οποίων δρουν.

Πίνακας 1. Κουμαρίνες και η αντιμικροβιακή τους δράση [40]

Όνομασία κουμαρινικού παραγώγου	Χημική δομή	Μικρόβια εναντίον των οποίων δρα
Αμμορεσινόλη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus megaterium</i></li> <li>• <i>Micrococcus luteus</i></li> <li>• <i>Micrococcus lysodeikticus</i></li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> </ul>
Οστροθίνη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus megaterium</i></li> <li>• <i>Micrococcus luteus</i></li> <li>• <i>Micrococcus lysodeikticus</i></li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> </ul>
Ανθογενόλη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Enterococcus</i></li> </ul>
Ιμπερατορίνη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Shigella dysenteriae</i></li> </ul>
Αιγελινόλη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Salmonella typhi</i></li> <li>• <i>Enterobacter cloacae</i></li> <li>• <i>Enterobacter aerogenes</i></li> </ul>
Αγασουλίνη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Salmonella typhi</i></li> <li>• <i>Enterobacter cloacae</i></li> <li>• <i>Enterobacter aerogenes</i></li> </ul>

<p><b>Νοβοβιοκίνη</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Corinebacterium diphtheria</i></li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Streptomyces pneumoniae</i></li> </ul>
---------------------------	--	---

### 1.3.2. Αντιοξειδωτική δράση

Η σταθερότητα ενός οργανισμού εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ σχηματισμού και καταστροφής ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα που διαθέτουν μονήρη ηλεκτρόνια κι είναι πολύ δραστικές καθώς εύκολα αντιδρούν με άλλα χημικά είδη οδηγώντας στη δημιουργία αλυσιδωτών αντιδράσεων. Στα βιολογικά συστήματα, συνήθως προέρχονται από μόρια που περιέχουν, άζωτο, οξυγόνο και θείο. Οι ελεύθερες ρίζες ανήκουν σε ομάδες μορίων που ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) και δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulphur Species, RSS). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) παράγονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού κι έχουν σημαντικό ρόλο σε αντιδράσεις μεταγωγής σήματος στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, στην έκφραση γονιδίων, στη μεταφορά ιόντων, αλλά και σε άλλες λειτουργίες του οργανισμού. Ωστόσο, εάν οι συγκεντρώσεις του αυξηθούν σημαντικά μπορεί να έχουν αρνητικές επιδράσεις σε πολλά μόρια, όπως σε πρωτεΐνες, λιπίδια, μόρια DNA ή RNA καθώς είναι μικρά και πολύ δραστικά μόρια. Με στόχο τη μείωση ή και την αποφυγή τέτοιων επιπτώσεων, τόσο ο ανθρώπινος οργανισμός όσο και άλλοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα αντιοξειδωτικό σύστημα που εξουδετερώνει αυτές τις ρίζες.

Τα αντιοξειδωτικά, λοιπόν, είναι μόρια που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, καθώς αποδέχονται ή προσφέρουν ηλεκτρόνια ώστε να εξαλείψουν την ύπαρξη μονήρων ηλεκτρονίων. Μπορεί να αντιδρούν απευθείας με τις ελεύθερες ρίζες και να μετατρέπονται τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες, που είναι όμως λιγότερο δραστικές κι επικίνδυνες. Στη συνέχεια μπορεί κι αυτές να εξουδετερωθούν από νέα αντιοξειδωτικά. <sup>[43]</sup>

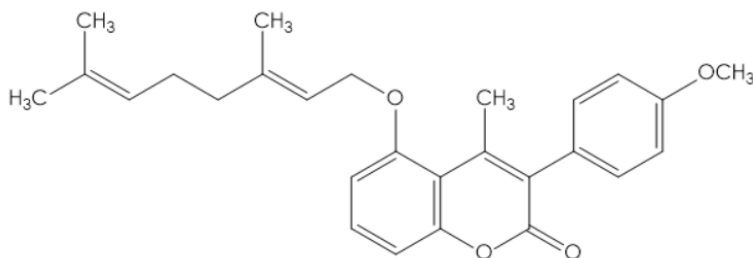
Σήμερα υπάρχει ένα ολοένα κι αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα αντιοξειδωτικά, είτε αυτά αποσκοπούν στο να αποτρέψουν πιθανές τοξικές επιδράσεις ελεύθερων ριζών στο ανθρώπινο σώμα είτε αποτρέπουν την οξείδωση των λιπαρών κι άλλων συστατικών των τροφίμων. Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι τα αντιοξειδωτικά μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος ή καρδιακά νοσήματα. Σε όλες τις περιπτώσεις, υπάρχει μία προτίμηση για αντιοξειδωτικά που προέρχονται από φυσικές πηγές. Κυριότερες φυσικές πηγές αντιοξειδωτικών αποτελούν τα δημητριακά ολικής άλεσης, τα φρούτα και τα λαχανικά. Επομένως, τα περισσότερα αντιοξειδωτικά σε μία τυπική



διατροφή είναι φυτικής προελεύσεως και ανήκουν σε πολλές διαφορετικές οικογένειες ενώσεων. Οι κουμαρίνες αποτελούν χημικές ενώσεις που όπως προαναφέρθηκε, προέρχονται από φυτά και διαθέτουν ποικίλες φαρμακευτικές δράσεις, μεταξύ των οποίων και αντιοξειδωτική. [44]

Επίσης, η ίδια η κουμαρίνη συμβάλλει στην απουσία του νεφρικού οξειδωτικού στρες και της τοξικότητας, τα οποία προέκυψαν από την ευνοημένη παραγωγή οξειδάσης της ξανθίνης, υπεροξειδίου του υδρογόνου και λιπιδικής υπεροξειδωσης από βρωμικό κάλιο σε ποντικούς Wistar. Ιδιαίτερα οφέλη έδειξε και η συμπελιφερόνη, 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 κινάσων της τυροσίνης.

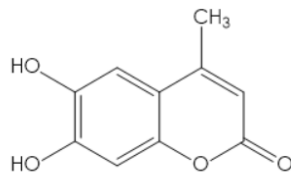
Έχουν, επίσης, μελετηθεί αρκετές συνθετικές κουμαρίνες με στόχο να ανιχνευθούν οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Συγκεκριμένα, όταν συγκρίθηκε η αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών με κουμαρίνες, εξήχθησαν συμπεράσματα για τη συσχέτιση δομής και ιδιοτήτων. Ειδικότερα, εντοπίστηκε ότι η παρουσία υδροξυλίων στον κουμαρινικό πυρήνα εντείνει τη δραστηριότητα, ενώ η υποκατάσταση με μεθοξυ-ομάδες στην ίδια θέση την εξαφανίζει. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε επρόκειτο για τη μελέτη της αναστολής της υπεροξειδωσης 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 είναι αποτέλεσμα της παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων. [6]



Εικόνα 7: 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 tBHP. Η συγκεκριμένη ένωση δημιουργεί υπεροξειδωση λιπιδίων καθώς μεταβολίζεται σε ελεύθερη ρίζα και

οδηγεί σε συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου και άρα τοξικότητα. Επιπλέον, 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 υδροϋππεροξειδίο του λινολεϊκού οξέος.<sup>[6]</sup>

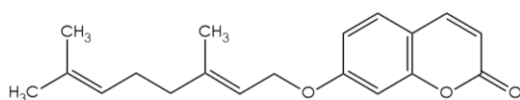


Εικόνα 8: Χημική δομή 4-μεθυλο-εσκουλετίνης.

### 1.3.3. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή είναι ένας μηχανισμός αυτοπροστασίας του οργανισμού έναντι επιβλαβών παραγόντων είτε ενδογενών (καρκίνος, ισχαιμία, αυτοάνοσα νοσήματα) είτε εξωγενών (τραύμα, ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις). Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορεί να εξελιχθούν σε διάφορες σοβαρές ασθένειες όπως είναι τα αυτοάνοσα νοσήματα, κοκκιωματώδεις καταστάσεις, ρευματοειδής αρθρίτιδα, χρόνια άσθμα και ψωρίαση. Έτσι, ο σχεδιασμός αντιφλεγμονωδών φαρμάκων αποτελεί καίρια ανάγκη για την πρόληψη ή και τη θεραπεία τέτοιων ασθενειών.<sup>[45]</sup> Οι κουμαρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ισχυρά αντιφλεγμονώδη φάρμακα τα οποία κατευθύνονται ενάντια στα μόρια προσκόλλησης των κυττάρων με αποτέλεσμα να προλαμβάνουν τη φλεγμονή. Η δράση τους στοχεύει στη θεραπεία του οιδήματος απομακρύνοντας το υγρό του οιδήματος από τον τραυματισμένο ιστό μέσω ενεργοποίησης της φαγοκυττάρωσης, παραγωγής κυττάρων και πρωτεόλυσης.<sup>[40], [46]</sup>

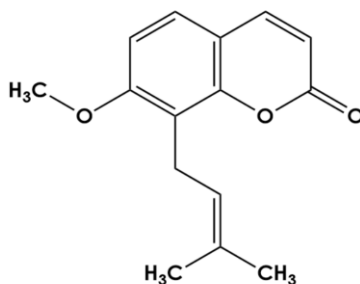
Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλεγμονής στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι η ισχαιμία, κατά την οποία φλεγμονώδη κύτταρα συσσωρεύονται εντός των εγκεφαλικών ιστών, δημιουργώντας πληγή. Η ωραπτίνη (*auraptene* - 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη) αποτελεί φυσικό κουμαρινικό παράγωγο που εντοπίζεται σε εσπεριδοειδή και παρουσιάζει σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση στους περιφερειακούς ιστούς του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η συγκεκριμένη 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 ωραπτίνη αποτελεί πιθανή ένωση-οδηγό για μελλοντικά νευροπροστατευτικά φάρμακα.<sup>[14]</sup>



Εικόνα 9: Χημική δομή ωραππένης.

#### 1.3.4. Αντιμυκητιακή δράση

Οι ολοένα και αυξανόμενες μυκητιακές μολύνσεις που παρατηρούνται στις μέρες μας, η δημιουργία μυκήτων ανθεκτικών στα υπάρχοντα φάρμακα, καθώς και η τοξικότητα και το υψηλό κόστος αυτών, οδήγησε στην ενίσχυση της έρευνας για φυσικά προϊόντα με αντιμυκητιακή δράση. [47] Τέτοια προϊόντα λοιπόν, αποτελούν κι οι κουμαρίνες και μάλιστα η οσθόλη (7-μεθοξυ-8-πρενυλοκουμαρίνη), αποτελεί παραδοσιακό βότανο που χρησιμοποιείται στην Κίνα εδώ και πολλά χρόνια εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως ο *Rhizoctonia solani*. [48]



Εικόνα 10: Χημική δομή οσθόλης.

Επιπροσθέτως, σε έρευνα του Rodrigo S. A. de Araújo και των συνεργατών του [47] όπου μελετάται η σχέση της δομής της 6-υδροξυκουμαρίνης και της 7-υδροξυ-κουμαρίνης, καθώς και των αντίστοιχων υποκατεστημένων κουμαρινών από πρενυλο-, γερανυλο- και αλλυλο- ομάδες, με τη δράση τους κατά των μυκήτων *Aspergillus fumigatus* και *A. flavus*, βρέθηκε ότι στην περίπτωση της 6-υδροξυ-κουμαρίνης, η υποκατάστασή της με μία από τις παραπάνω ομάδες δεν οδήγησε σε ενίσχυση της αντιμυκητιακής της δράσης. Αντιθέτως, στην περίπτωση της 7-υδροξυ-κουμαρίνης, η μείωση του μεγέθους της πλευρικής αλυσίδας οδηγεί σε βελτιωμένη δράση. Συνεπώς, η 7-γερανυλοξυκουμαρίνη

θεωρείται ανενεργή, η 7-πρενυλοξυ-κουμαρίνη έχει μέτρια προς ισχυρή δράση, ενώ η ένωση με τη μικρότερη αλειφατική αλυσίδα έδειξε και τη μεγαλύτερη ενεργότητα. Η έρευνα αυτή επομένως κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η Ο-υποκατάσταση είναι απαραίτητη για ενίσχυση της αντιμικροβιακής δράσης, ενώ η ύπαρξη μίας ηλεκτρονιόφιλης ομάδας, όπως NO<sub>2</sub> ή ακετυλομάδας, ενισχύει ακόμη περισσότερο τη δράση αυτή. Τέλος, η αμμορεζινόλη (ammosesinol) ή 3-φαρνεσυλο-4,7-διυδροξυκουμαρίνη κι η ostruthin (6-γερανυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη) έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση απέναντι σ' ένα πλήθος θετικών κατά gram βακτηρίων, μεταξύ των οποίων ανήκουν οι *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus megaterium*. [40]

### 1.3.5. Αντικαρκινική δράση

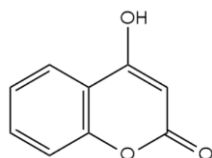
Μια από τις ασθένειες που αποτελούν μάστιγα στη σημερινή κοινωνία είναι ο καρκίνος. Ο όρος «καρκίνος» υποδηλώνει μια πληθώρα ασθενειών που συνδέονται με διάφορους παράγοντες και αρκετές μεταλλάξεις. Τα περισσότερα αντικαρκινικά φάρμακα έχουν ως μηχανισμό δράσης να εντοπίσουν τα κύτταρα εκείνα που διαταράσσουν την κυτταρική διαίρεση. Οι πιο αποτελεσματικές θεραπείες μέχρι σήμερα για τον καρκίνο είναι οι χημειοθεραπείες και οι ακτινοβολίες, που έχουν ωστόσο πολλές παρενέργειες στον οργανισμό. Άρα καθίσταται ζωτικής σημασίας ζήτημα η σύνθεση νέων φαρμάκων λιγότερο τοξικών και επιβλαβών για τον ανθρώπινο οργανισμό. [46], [49]

Η κακοήθης αγγειογένεση είναι μια ακόμη περίπτωση που μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση θανατηφόρων ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, η αγγειοανεπάρκεια και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Η αγγειογένεση σε φυσιολογικά επίπεδα μπορεί να επιτελέσει σημαντικό ρόλο στην επούλωση πληγών, την εμβρυική ανάπτυξη, το γυναικείο αναπαραγωγικό κύκλο, αλλά όταν αυτή γίνει σε ανεξέλεγκτο βαθμό οδηγεί στην ανάπτυξη στερεών όγκων και στη μετάσταση αυτών. [50], [51]

Οι κουμαρίνες έχουν αποδειχθεί ότι μπορεί να εμφανίζουν αντικαρκινική δράση αλλά επίσης και θεραπευτικές ιδιότητες στις παρενέργειες που προκαλούν οι ακτινοθεραπείες. Μέχρι σήμερα, οι κουμαρίνες έχουν μελετηθεί ευρέως για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, των νεφρών καθώς και της λευχαιμίας. Επίσης, επιφέρουν πολύ θετικά αποτελέσματα στην περίπτωση των μελανωμάτων και στην αναστολή της εξάπλωσης των όγκων. Το μεγάλο πεδίο μελέτης όσον αφορά τις κουμαρίνες βασίζεται στη μη τοξική και αντιπηκτική ιδιότητα τους.

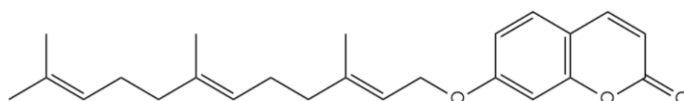
Έχει μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο δρουν τα κουμαρινικά παράγωγα ενάντια σε καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η 4-υδροξυκουμαρίνη φαίνεται να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης σε διάφορες πρωτεΐνες κυττάρων μελανώματος, ενώ η 7-υδροξυκουμαρίνη αναστέλλει την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (*Myosine 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 οι υδροξυκουμαρίνες με αζωτούχα ομάδα στον αρωματικό δακτύλιο φαίνεται να είναι εκλεκτικοί αντι-πολλαπλασιαστικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την απόπτωση σε νεφρικά κύτταρα καρκινώματος μέσω τροποποίησης πρωτεϊνικών κινάσων που ενεργοποιούνται από τη μίτωση (*Mitogen-activated Protein Kinases*).<sup>[11],[9]</sup> Οι ακετυλοξυκουμαρίνες αποδείχτηκαν πως είναι ικανοί κυτταροτοξικοί παράγοντες, με τη δραστηριότητά τους να οφείλεται στη βελτίωση της λιποφιλίας και της ικανότητας διέλευσης από μεμβράνες χάρη στην παρουσία βρωμίου στο φαινολικό δακτύλιο.<sup>[11], [12]</sup>



Εικόνα 11: 4-υδρόξυ-κουμαρίνη.

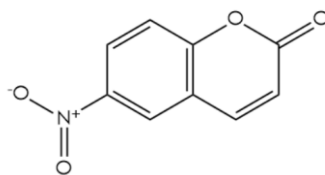
Μετά από πολλές μελέτες εντοπίστηκαν κουμαρινικά παράγωγα, τα οποία φαίνονται να έχουν καλές λειτουργίες στη φαρμακοθεραπεία του καρκίνου του μαστού. Μία σειρά αλκοξυ-κουμαρινών συντέθηκε και μελετήθηκε ως προς την κυτταροτοξικότητά τους έναντι κυττάρων ενδοθηλιακού καρκινώματος, το οποίο αποτελεί την πιο κοινή περίπτωση κακοήθειας στο μαστό. Η πιο ισχυρή κυτταροτοξική δράση εντοπίστηκε στην ωραππίνη, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν τοξικότητα σε υγιείς ινοβλάστες. Επιπλέον, μελέτες διεξήχθησαν και για τις νέες αυτές ενώσεις σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, υπό τις οποίες τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχύτερα, με την ουμπελλιπρενίνη (*umbelliprenin* - 7-φαρνεσυλοξυκουμαρίνη) να αποτελεί την πιο δραστική κουμαρίνη. Τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης υποδεικνύουν ότι οι αλκοξυ-κουμαρίνες αποτελούν μια σειρά ισχυρών ενώσεων-οδηγών για μελλοντικές θεραπείες μεταστατικών όγκων.<sup>[12]</sup>



Εικόνα 12: Χημική δομή ουμπελλιπρενίνης.

Άλλες κουμαρίνες με αντικαρκινική δράση είναι η εσκουλετίνη και η 6-νιτροκουμαρίνη.<sup>[9]</sup> Η κουμαρίνη *rhenprocoumon* αποδείχτηκε πως αναστέλλει τη δημιουργία αυθόρμητων μεταστάσεων στους πνεύμονες πειραματόζωων, ενώ η παρουσία πολικών υποκαταστατών στις θέσεις 3, 4 και 7 του κουμαρινικού σκελετού αναστέλλει τη μεταλλαξιογένεση. Γενικά, τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί εκτεταμένες μελέτες με στόχο την τροποποίηση των ήδη

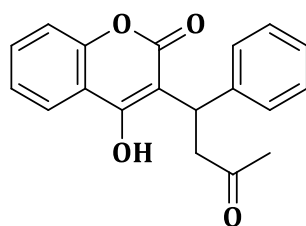
υπαρχόντων δομών προς καλύτερη δράση, όπως και την ταυτοποίηση νέων υποψηφίων φαρμάκων από μόρια που βασίζονται δομικά στην κουμαρίνη.<sup>[1], [4]</sup>



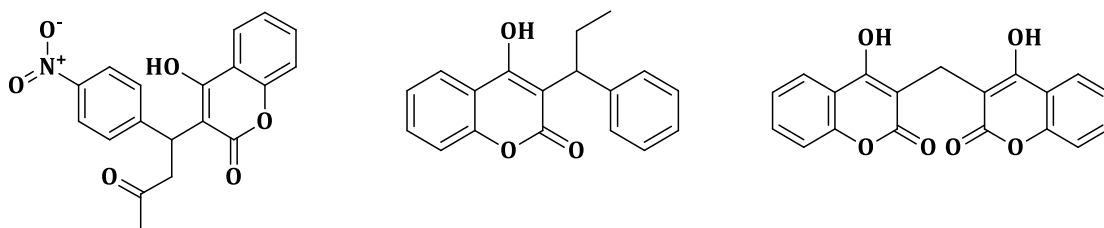
Εικόνα 13: Χημική δομή 6-νιτροκουμαρίνης.

### 1.3.6. Αντιπηκτική δράση

Οι κουμαρίνες εμφανίζουν ισχυρή αντιπηκτική δράση καθώς θεωρούνται ανταγωνιστές της Βιταμίνης Κ, δηλαδή του πηκτικού παράγοντα που βρίσκεται στο ήπαρ. Η βιταμίνη Κ είναι ένας συμπαραγόντας ενός μικροσωμικού ενζύμου, της 2,3-εποξειδικής αναγωγάσης, το οποίο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία και σύνθεση της προθρομβίνης, των παραγόντων VII, IX και X καθώς και των πρωτεϊνών C και S. Η αντιπηκτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητα τους να αναστέλλουν τη σύνθεση της βιταμίνης Κ καθώς επίσης να ελέγχουν τη ροή του αίματος μέσω της παρέμβασης τους στην κυκλική αλληλομετατροπή της βιταμίνης Κ και του 2,3 εποξειδίου της. Η διαδικασία της πήξης περιλαμβάνει πολυμερισμό και διασύνδεση μιας διαλυτής πρωτεΐνης ορού, την προθρομβίνη, σε ένα σκληρό αδιάλυτο πολυπεπίδιο γνωστό ως ινώδες. Η βαρφαρίνη είναι το πιο γνωστό αντιπηκτικό και χρησιμοποιείται ευρέως. Ωστόσο, μερικές ακόμα κουμαρίνες γνωστές για τις αντιπηκτικές τους ιδιότητες είναι η ακενοκουμαρόλη, η φαινοπρόμνη και η δικουμαρόλη. Συνολικά από όλες τις κουμαρίνες, η βαρφαρίνη είναι η πιο δραστική καθώς έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής με αποτέλεσμα να είναι πιο σταθερή.<sup>[40], [41], [46], [52]</sup>



Εικόνα 14: Χημική δομή βαρφαρίνης.

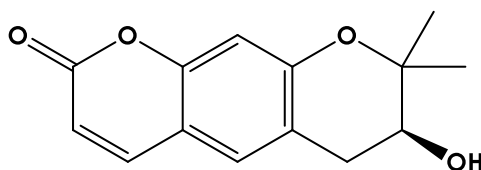


Εικόνα 15: Ακενοκουμαρόλη, φαινοπρόμνη και δικουμαρόλη.

### 1.3.7. Νευροπροστατευτική δράση

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως οι νόσοι Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον, είναι διαδεδομένες στις μεγαλύτερες ηλικίες λόγω αύξησης του προσδόκιμου ηλικίας, καθιστώντας επιτακτική ανάγκη την εύρεση νέων φαρμάκων για την αντιμετώπισή τους. Οι φυσικές και συνθετικές κουμαρίνες ανήκουν στις ενώσεις με νευροπροστατευτική δράση, με αγνώστους όμως μηχανισμούς δράσης μέχρι στιγμής.

Η δράση αυτή των κουμαρινών εντοπίζεται αρχικά στα φυτά. Συγκεκριμένα, 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 δραστηριότητα να φθίνει με αυτή τη σειρά. Επίσης οι πρενυλοξυ-κουμαρίνες εμφανίζουν ικανή νευροπροστατευτική δράση και φαίνεται να αποτελούν υποψήφιες ενώσεις-οδηγοί για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά νευροεκφυλιστικών ασθενειών.<sup>[3]</sup>

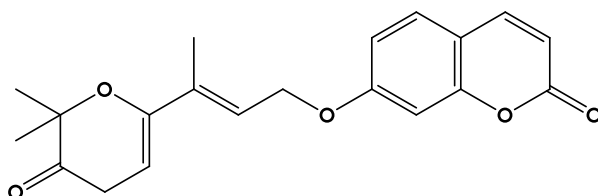


Εικόνα 16: Δομή *decursinol*.

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. Οι κουμαρίνες, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μεταξύ των οποίων και η αναστολή του ενζύμου AChE. Οι επιστήμονες τα τελευταία χρόνια έχουν προσπαθήσει να συνθέσουν κουμαρινικά παράγωγα τα οποία, εκτός από την αναστολή του ενζύμου AChE, να εμφανίζουν και περαιτέρω φαρμακολογικές ιδιότητες όπως η μείωση απόθεσης του β-αμυλοειδούς και η αναστολή της β-σεκρετάσης (*beta-secretase*) που είναι πολύ σημαντικές για την προσέγγιση της θεραπείας της νόσου Αλτσχάιμερ. Τα περισσότερα κουμαρινικά ανάλογα που συντίθενται για τον σκοπό αυτό περιλαμβάνουν υποκατάσταση στη θέση 3- ή 4- του κουμαρινικού σκελετού με χαρακτηριστική ομάδα αμίνης συμπεριλαμβανομένων ομάδων βενζυλαμίνης, φαινυλπιπεραζίνης ή ανιλίνης.<sup>[53], [54]</sup>

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 της 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 δραστηριότητας 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 MAO-α και -β υψηλής εκλεκτικότητας με βάση την κουμαρίνη.<sup>[2]</sup>



Εικόνα 17: Δομή *geiparvarin*.



## 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 μετά την ενεργοποίησή τους. Η ακετυλοχολινεστεράση φαίνεται να μοιάζει αρκετά με τη βουτυρυλοχολινεστεράση, ενώ εμφανίζει ομοιογένεια με αρκετές μη ενζυμικές πρωτεΐνες όπως η νευρολιγνίνη και η θυρογλοβουλίνη.

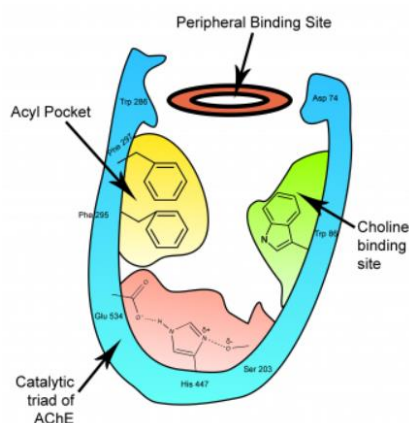
Η ίδια η ακετυλοχολινεστεράση εντοπίζεται σε όλα τα θηλαστικά και κάποιες οικογένειες ασπόνδυλων, ενώ υπάρχουν επίσης αναφορές σε πρωτεΐνες ανάλογες της σε φύκη, το πρωτόζωο παραμήκιο και τη μούχλα *Dictyostelium*. Ειδικότερα, η ανθρώπινη ακετυλοχολινεστεράση εντοπίζεται σε πολλούς τύπους ιστών όπως 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 ανιχνεύεται, 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 είναι υπεύθυνη 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. Επιπλέον, έχουν γίνει εκτενείς μελέτες 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.<sup>[16], [17], [18]</sup>

### 2.1. Δομή AChE

Η ακετυλοχολινεστεράση(AChE) είναι μια υδρολάση της σερίνης, που παρουσιάζεται κατά κύριο λόγο σε νευρομυικούς κόμβους και χολινεργικές εγκεφαλικές συνάψεις. Επίσης, ανιχνεύεται σε πληθώρα μοριακών μορφών, οι οποίες διαφοροποιούνται τόσο ως προς την τεταρτοταγή τους δομή, όσο και ως προς τον τρόπο σύνδεσης με τη εκάστοτε σύναψη. Οι συγκεκριμένες διαφορές ποικίλλουν από ιστό σε ιστό ακόμα και στον ίδιο οργανισμό, με

αποτέλεσμα να ικανοποιούν τις διαφορετικές προϋποθέσεις σε διαφορετικούς τύπους συνάψεων.<sup>[19]</sup>

Ειδικότερα, το μόριο της ακετυλοχολινεστεράσης εμφανίζει 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 ιδιαίτερο 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 τέσσερις επιμέρους υπομονάδες.



Εικόνα 18: Δομή AChE

Η καταλυτική τριάδα των αμινοξέων που περιέχονται στην εστερατική υπομονάδα (*esteratic subsite*) απαρτίζει 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). 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). Συγκεκριμένα, είναι ουδέτερα φορτισμένα και λιπόφιλη και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την 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. Εξ αυτών, η τρυπτοφάνη 84 είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η αντικατάστασή της, για παράδειγμα από αλανίνη, είναι δυνατόν να δημιουργήσει μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 3000 φορές.

Η *oxyanion hole* αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη 118 (121), γλυκίνη 119 (122) και αλανίνη 201 (204). Ο ρόλος της είναι ιδιαίτερα σημαντικός, διότι παρέχει δότες δεσμού υδρογόνου που δημιουργούν σταθεροποίηση της τετραεδρικής μεταβατικής δομής του υποστρώματος.

Το *acyl pocket* αποτελείται από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη 288 (295) και φαινυλαλανίνη 290 (297). Ευθύνεται για την εκλεκτικότητα του ενζύμου ως προς τα διάφορα υποστρώματα, αφού συμβάλλει στην αποτροπή της εισόδου της χολίνης σε μεγαλύτερους εστέρες.

Εκτός των τεσσάρων υπομονάδων 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. Αρχικά, το πρώτο βήμα του καταλυτικού μονοπατιού είναι η πρόσδεση της ακετυλοχολίνης, η οποία 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 σύνδεση, την ανάπτυξη νευριτών αναπτυσσόμενων ή μετασχηματιζόμενων νευρικών κυττάρων, καθώς και στην αμυλοείδωση μέσω αλληλεπίδρασης με το β-αμυλοειδές πεπτιδίο (Aβ) στη νόσο Αλτσχάιμερ. Το συμπέρασμα που δημιουργείται από την δομή του περιφερειακού ανιονικού κέντρου και τον αριθμό λειτουργιών που του αντιστοιχούν είναι ότι αποτελεί μια περιοχή μεγάλης πολυπλοκότητας και χρηστικότητας.

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.<sup>[16], [17]</sup>

## 2.2. Δράση AChE

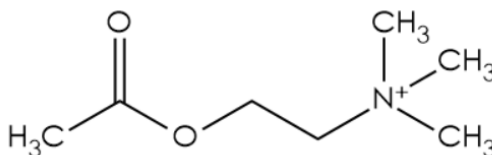
Η κύρια λειτουργία της ακετυλοχολινεστεράσης, όπως προαναφέρθηκε, είναι η ταχεία υδρόλυση της ακετυλοχολίνης σε συναπτικούς και νευρομυικούς κόμβους, οδηγώντας σε τερματισμό της νευρωνικής μετάδοσης και σηματοδότησης μεταξύ συνάψεων. Η εξελικτική πίεση ως προς την τελειοποίηση αυτού του σημαντικού ρόλου έχει οδηγήσει την ακετυλοχολινεστεράση στο να γίνει ένα από τα πιο ισχυρά και αποτελεσματικά γνωστά ένζυμα, με ένα ρυθμό ανανέωσης (*turnover rate*)  $10^4 \text{ s}^{-1}$ . Το συγκεκριμένο ένζυμο παρουσιάζει υψηλή εξειδικευμένη καταλυτική δράση, ειδικά για μία υδρολάση της σερίνης. Πιο συγκεκριμένα, η απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης στο νευρομυικό κόμβο (η πορεία της μετάδοσης σήματος), 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, ολοκληρώνεται στη διάρκεια λίγων milliseconds, με κάθε μόριο ενζύμου να αποδομεί περίπου 25000 μόρια ακετυλοχολίνης/s, πλησιάζοντας το ρυθμό μιας αντίδρασης, η οποία ελέγχεται από το στάδιο της διάχυσης.<sup>[16], [17], [19]</sup>

Η ακετυλοχολινεστεράση, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, είναι υπεύθυνη για την διαβίβαση νευρικών ερεθισμάτων και τη σωστή μυική λειτουργία στους συναπτικούς κόμβους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος των έμβιων οργανισμών. Σε περιπτώσεις, όμως, χολινεργικής απώλειας, δηλαδή μείωσης των επιπέδων ακετυλοχολίνης στη συναπτική σχισμή, εμφανίζεται παθογένεια που συσχετίζεται με την απώλεια της διεγερτικής ικανότητας των νευρώνων και άλλες διαταραχές συμπεριφοράς. Παράλληλα, το ότι συσχετίστηκε η ακετυλοχολινεστεράση με την 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.<sup>[20]</sup>

### 2.3. Ακετυλοχολίνη

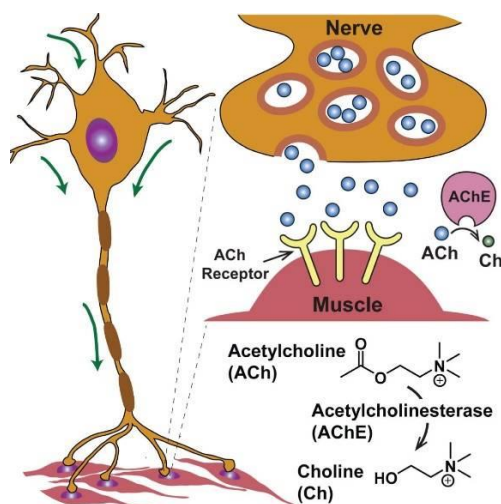
Η ακετυλοχολίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής που εντοπίζεται στους νευρομυικούς κόμβους του Περιφερειακού Νευρικού Συστήματος, μεταξύ των κινητικών νευρών και των σκελετικών μυών. Οι νευρώνες που χρησιμοποιούν την ακετυλοχολίνη ως νευροδιαβιβαστή χαρακτηρίζονται ως χολινεργικοί. Στο Κεντρικό Νευρικό σύστημα, η ακετυλοχολίνη εντοπίζεται κυρίως στους διαμεσολαβητικούς νευρώνες, ενώ έχουν εντοπιστεί και άλλα χολινεργικά μονοπάτια. Αξίζει να αναφερθεί η χολινεργική προβολή από το βασικό νευρώνα του Magnert (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: Χημική δομή ακετυλοχολίνης.

Η σύνθεση της ακετυλοχολίνης γίνεται μέσω μιας αντίδρασης ενός σταδίου, καταλυόμενης από το βιοσυνθετικό ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης. Στην περίπτωση παρουσίας 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.<sup>[17]</sup>



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση του ρόλου της ακετυλοχολίνης.

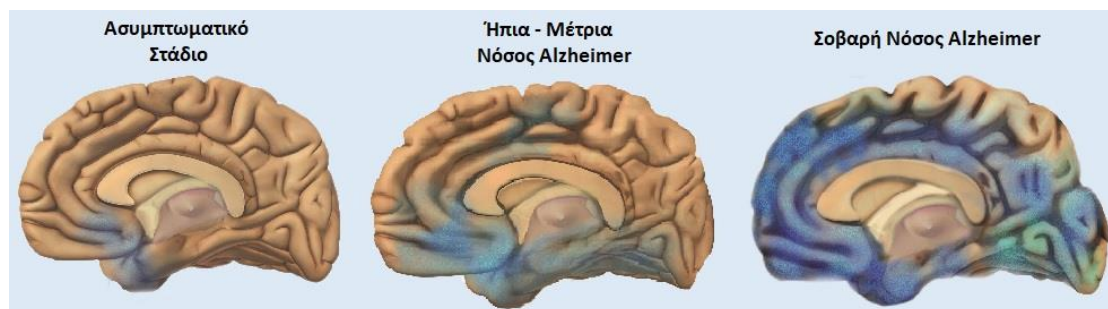
### 3. ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER

Η νόσος Alzheimer (AD-Alzheimer Disease) προσδιορίστηκε πρώτη φορά από τον Alois Alzheimer και αποτελεί τον πιο διαδεδομένο τύπο άνοιας όπου υφίσταται μεγάλος εκφυλισμός της μνήμης και συνοδεύεται από απραξία, διαταραχές ομιλίας αλλά και από σύνδρομα ψυχικών διαταραχών. Η πλειονότητα των ασθενών είναι άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών. 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). Σύμφωνα με επιστημονικές εκτιμήσεις συμπεραίνεται ότι περίπου το 4.5% του πληθυσμού ηλικίας άνω των 70 πάσχει από τη νόσο Αλτσχάιμερ, ποσοστό που αναμένεται να αυξηθεί λόγω της αύξησης του προσδόκιμου ζωής. Η νόσος οφείλεται σε κληρονομικά αίτια (περίπου 1-2% των περιπτώσεων της) και υπάρχει περίπτωση να ξεκινήσει σε μικρή ηλικία όπως και να εξελιχθεί ταχύτατα.

Βιολογικά, η νόσος Αλτσχάιμερ απαρτίζεται από νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία οδηγούν σε εκφυλισμό ή ατροφία των χολινεργικών νευρώνων του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου, σε εξωκυτταρικές εναποθέσεις β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Αβ) στη μορφή νευριτικών πλακών και στην 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 μπορεί να διαρκέσει πολλά χρόνια. Στο συγκεκριμένο, 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 πρόσφατα γεγονότα έκτασης λεπτών έως ετών <<επεισοδιακή μνήμη>>, με το πιο συνηθισμένο σύμπτωμα να είναι η συχνή επανάληψη των ίδιων ερωτήσεων. Τέλος, στο κλινικό στάδιο τα συμπτώματα γίνονται ολοένα και πιο έντονα με αποτέλεσμα να επιβαρύνονται οι νοητικές λειτουργίες και να γίνεται απαραίτητη η ανάγκη για φροντίδα και επιτήρηση των ασθενών. 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 είναι πλήρως εξαρτώμενοι από το περιβάλλον τους που τους φροντίζει, ακόμα και για τις πιο βασικές λειτουργίες. Πιο γενικά, οι σποραδικές μορφές της νόσου Αλτσχάιμερ έχουν πολλές μεταβλητές, η κάθε μία με ξεχωριστά κλινικά και γενετικά χαρακτηριστικά. Συμπερασματικά, 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.<sup>[21], [22]</sup>



Εικόνα 21: Εξέλιξη των ιστολογικών αλλοιώσεων της νόσου Αλτσχάιμερ.

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. Αποτέλεσμα της απώλειας των χολινεργικών αυτών κυττάρων, είναι η μειωμένη συναπτική διαθεσιμότητα της ακετυλοχολίνης και άρα η 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. Ταυτόχρονα, έρευνες που διενεργήθηκαν, άρχισαν να ξεκαθαρίζουν τη σχέση ακετυλοχολίνης-μνήμης, με το βασικό πυρήνα του Magnett να ταυτοποιείται ως πηγή της χολινεργικής νεύρωσης στο φλοιό του κυρίως εγκεφάλου. Το ίδιο διάστημα, έγινε γνωστό ότι η χορήγηση υψηλών δόσεων φυσοστιγμίνης, η οποία αποτρέπει την αποικοδόμηση της ακετυλοχολίνης, βελτίωσε τη μνήμη γηραιών θηλαστικών, οδηγώντας στην πρόταση σχετικής θεραπείας. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η σοβαρότητα της άνοιας που οφείλεται στη νόσο του Αλτσχάιμερ συσχετίζεται με την έκταση της χολινεργικής απώλειας.<sup>[23]</sup> 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.<sup>[22]</sup> 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.<sup>[24]</sup>

Όπως προαναφέρθηκε, η ακετυλοχολινεστεράση είναι υπεύθυνη για αρκετές μη καταλυτικές δράσεις, με μία από αυτές να είναι η συμβολή στη συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Πιο ειδικά, η ακετυλοχολινεστεράση αλληλοεπιδρά

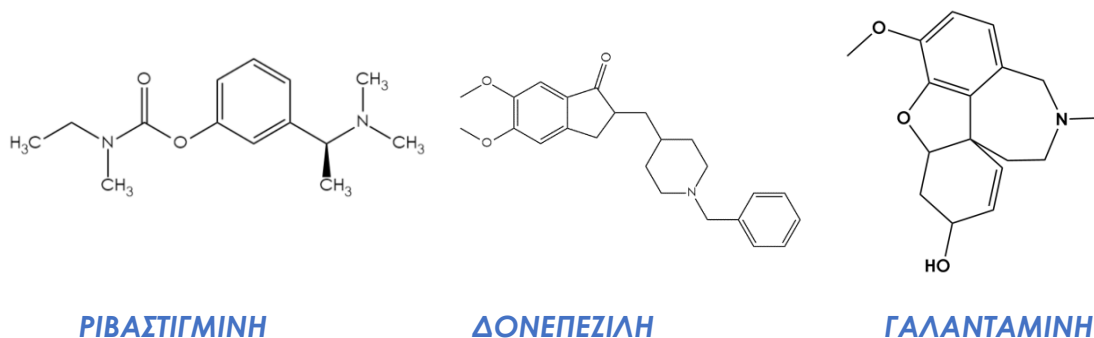
με το Αβ, ευνοώντας το σχηματισμό ινιδίων αμυλοειδούς από ένα σύνολο αμινοξέων, τα οποία έχουν εντοπιστεί κοντά στο περιφερειακό ανιονικό κέντρο του ενζύμου. Τα μόρια που αλληλοεπιδρούν είτε αποκλειστικά με το περιφερειακό ανιονικό κέντρο, είτε με τα καταλυτικά ή περιφερειακά σημεία πρόσδεσης της ακετυλοχολινεστεράσης 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. Συμπερασματικά, ενώσεις με ταυτόχρονη πρόσδεση στα καταλυτικά και περιφερειακά κέντρα της ακετυλοχολινεστεράσης αποτελούν νέα θεραπευτικά μέσα για την επιτυχή αντιμετώπιση της νόσου Αλτσχάιμερ.<sup>[2]</sup>

#### 4.ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων που αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση. Κάποιες από αυτές τις ενώσεις προσδένονται άμεσα και ανταγωνιστικά στη σερίνη του ενεργού κέντρου του ενζύμου, όπως οι οργανοφωσφορικές και καρβαμιδικές ενώσεις. Κάποιες άλλες, όπως το εδροφώνιο (*edrophonium*), προσδένονται στο ανιονικό τμήμα, ενώ άλλες προσδένονται μη ανταγωνιστικά στο περιφερειακό ανιονικό κέντρο.<sup>[16]</sup> 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 εφαρμόζονται 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.<sup>[17]</sup>



#### 4.1. ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΦΑΡΜΑΚΑ - ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ



**ΡΙΒΑΣΤΙΓΜΙΝΗ**

**ΔΟΝΕΠΕΖΙΛΗ**

**ΓΑΛΑΝΤΑΜΙΝΗ**

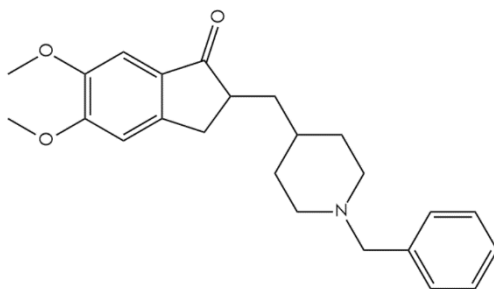
Εικόνα 22: Υπάρχοντα φάρμακα για τη νόσο του Αλτσχάιμερ και χημικές δομές τους.

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 μπορούν να συμβάλλουν μόνο με ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου, υπάρχουν κάποια δεδομένα που συνιστούν ότι μπορούν να επηρεάσουν και την πρόοδό της. Για παράδειγμα, μελέτη μίας ασθενούς έκφρασης της νόσου σε ασθενή έδειξε σταθεροποίηση της νοητικής λειτουργίας κατόπιν ενός χρόνου θεραπείας με αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, ενώ έρευνες μακράς διάρκειας έδειξαν συνεχή πλεονεκτήματα για ασθενείς που λαμβάνουν αντίστοιχη θεραπεία για εκτεταμένο χρονικό διάστημα.<sup>[23]</sup>

Προς το παρόν, οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης είναι αυτοί που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα και αποτελούν αντιστρεπτούς αναστολείς, οι οποίοι διατηρούν τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης μειώνοντας το ρυθμό υδρόλυσής της. Με αυτόν τον τρόπο πετυχαίνουν την ενίσχυση της χολινεργικής νευροδιαβίβασης στον πρόσθιο εγκέφαλο, ενώ παράλληλα εξισορροπούν 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 δονεπεζιλή (*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*) δέχθηκε έγκριση το 1993 και αποτέλεσε τον πρώτο αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης και κυκλοφόρησε υπό την εμπορική ονομασία *Cognex®*. Έκτοτε η χρήση της έχει σταματήσει καθώς εμφανίζονταν συχνά παρενέργειες, με πιο κοινές τη ναυτία, εμετό, διάρροια, πονοκεφάλους, ζαλάδα, δυσπεψία και κοιλιακοί πόνοι, μυαλγία, αϋπνία,

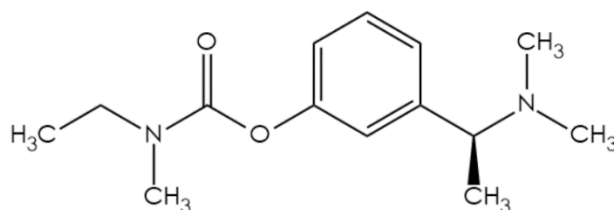
κόπωση, παραισθήσεις και σπανιότερα ηπατοτοξικότητα, ωτοτοξικότητα και επιληπτικές κρίσεις.

Η δονεπεξίλη είναι ένας εκλεκτικός αντιστρεπτός αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης, ο οποίος προσδένεται στο περιφερειακό ανιονικό κέντρο και επιφέρει ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου Αλτσχάιμερ, ενώ παράλληλα προκαλεί μείωση του ρυθμού απόθεσης πλακών β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Το φάρμακο αυτό παράγεται από τις φαρμακευτικές εταιρείες Eisai και Pfizer με το όνομα Aricept® και σε μορφή δισκίου ή διαλύματος που χορηγείται από το στόμα με βιοδιαθεσιμότητα 100% και καλή διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η δονεπεξίλη 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.



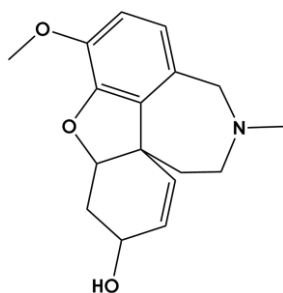
Εικόνα 23: Χημική δομή δονεπεξίλης.

Η ριβαστιγμίνη είναι ένας ισχυρός αντιστρεπτός καρβαμικός αναστολέας 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 δονεπεξίλη, η οποία αναστέλλει την ακετυλοχολινεστεράση εκλεκτικά, η ριβαστιγμίνη αναστέλλει τόσο την ακετυλο- όσο και τη βουτυρυλο- χολινεστεράση. Καθίσταται ιδιαίτερα χρήσιμη για την θεραπεία ήπιων έως μέτριων περιπτώσεων της νόσου του Αλτσχάιμερ και κυκλοφορεί σε μορφή κάψουλας ή και σε υγρή μορφή, με καλή απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα περίπου ίση με 40%. Η έγκαιρη και συνεχόμενη θεραπεία του Αλτσχάιμερ με ριβαστιγμίνη κάνει πιο έντονη την δράση και τα οφέλη ως προς τη 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. Τέλος, η ριβαστιγμίνη χορηγείται και για τη θεραπεία άνοιας προκαλούμενης από τη νόσο Πάρκινσον ή τα σωμάτια Lewey.



Εικόνα 24: Χημική δομή ριβαστιγμίνης.

Η γαλανταμίνη είναι 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. Επιπλέον, 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 με την 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 χορηγείται ως θεραπεία σε ήπιες έως μέτριες περιπτώσεις της νόσου Αλτσχάιμερ και κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Radazyn® ή Nivalin® σε μορφή δισκίων, καψουλών ή διαλύματος χορηγούμενου εκ 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 είναι δυνατόν να ξεπεραστεί με προσεκτική και σταδιακή χορήγηση διάρκειας τριών μηνών και άνω. Λόγω της επιπρόσθετης αλλοστερικής της δράσης στους νικοτινικούς υποδοχείς, η γαλανταμίνη μπορεί να εφαρμοστεί με στόχο τη βελτίωση της γνωστικής δυσλειτουργίας σε παθήσεις όπως σχιζοφρένεια, κατάθλιψη και διπολική διαταραχή.<sup>[17]</sup>



Εικόνα 25: Χημική δομή γαλανταμίνης.

Συμπερασματικά, όσον αφορά τα ποσοστά επιτυχίας φαρμάκων κατά της νόσου Αλτσχάιμερ σε κλινικές φάσεις, παρουσιάζονται ιδιαίτερα χαμηλά, και μάλιστα ακόμα χαμηλότερα από αυτά των φαρμάκων κατά του καρκίνου ή άλλων περίπλοκων ασθενειών. Σε συνδυασμό με τα υψηλά ποσοστά εμφάνισης της νόσου στις μεγαλύτερες ηλικίες, το δεδομένο αυτό, καθιστά απαραίτητη τη σύνθεση νέων ενώσεων οι οποίες να αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση και τη συσσωρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου με υψηλή δραστικότητα.<sup>[23]</sup>

## 4.2. Κουμαρίνες ως αναστολείς της AChE

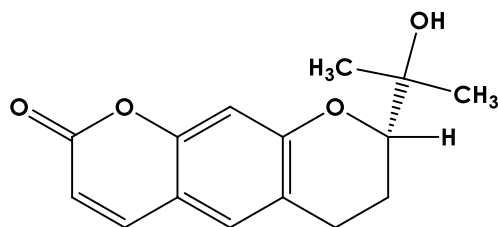
Ικανοί αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης βρίσκονται στη φύση, με τη διεκπεραίωση ανάλογων μελετών να έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση και απομόνωση φυσικών προϊόντων ικανών να αποτελέσουν τη βάση για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Αυτά ανήκουν στις κατηγορίες των αλκαλοειδών, των τερπενίων, των πολυφαινολών και των κουμαρινών. 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.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι κουμαρίνες προσδένονται τόσο στο εστερατικό όσο και στο περιφερειακό ανιονικό κέντρο του ενζύμου. Σε μελέτη που έγινε ως προς την ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης από φυσικές ενώσεις, εντοπίστηκαν δύο κουμαρίνες με δράση μεγαλύτερη από αυτή της γαλανταμίνης. Ειδικότερα, η διυδροπυρανοκουμαρίνη *decursinol*, η οποία απομονώνεται από το φυτό *Angelica gigas Nakai* εμφάνισε την πιο ισχυρή δράση (με  $IC_{50}=0.28 \mu M$ , ενώ για τη γαλανταμίνη  $IC_{50}=4.82 \mu M$ , όπου  $IC_{50}$  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.<sup>[25]</sup>

Επίσης ικανοποιητική τιμή  $IC_{50}$  εμφανίζει το φυτικό κουμαρινικό παράγωγο *mesuagenin*, του οποίου το εκχύλισμα που προέρχεται από το φυτό *Mesua elegans* έδωσε  $IC_{50}=0.7 \mu M$ .

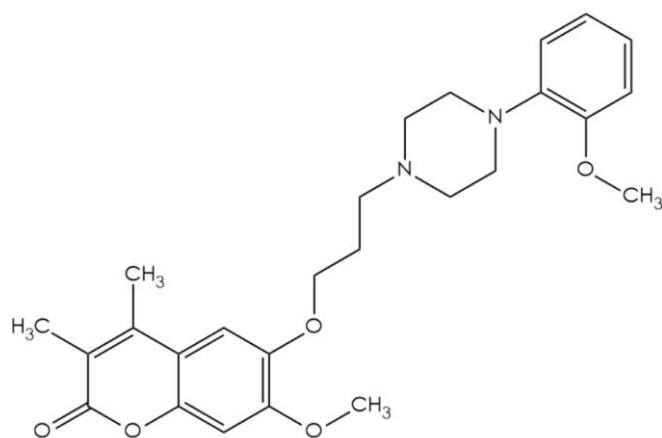
Στην κατηγορία των κουμαρινών φυσικής προέλευσης με ικανή ανασταλτική δράση, ανήκουν και η σκοπολετίνη, η σκοπολίνη, η ξανθοτοξίνη, το ψωραλένιο και το ισοψωραλένιο.<sup>[22]</sup> Η κουμαρίνη εσκουλετίνη, η οποία απομονώθηκε από το φυτό *Angelica decursiva*, διαπιστώθηκε ότι αναστέλλει ικανοποιητικά τόσο την ακετυλο- όσο και τη βουτυρυλο- χολινεστεράση, με τιμές  $IC_{50}= 6.13 \mu M$  και

9.29  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα.<sup>[24]</sup> Εκτός από τη *decursinol*, υπάρχουν τρία παράγωγα του φυτού *Angelica gigas Nakai*, τα οποία είναι κουμαρίνες-αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, οι *marmesin*, *nodakenin* και *isoimperatorin*. Τέλος, το φυτό *Murraya paniculata Jack* παράγει δύο κουμαρίνες-αναστολείς, τις *murranganone* και *paniculatin*.<sup>[28]</sup>



Εικόνα 26: Χημική δομή *marmesin*

Όσον αφορά τις κουμαρίνες 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. Πιο ειδικά, το συνθετικό παράγωγο *ehsaculin* το οποίο προέκυψε με σύνδεση μίας δομής πιπεραζίνης στη θέση 6 μέσω μίας ανθρακικής αλυσίδας μήκους τριών μορίων άνθρακα, έδωσε  $\text{IC}_{50}=0.36 \mu\text{M}$  και αποτελεί αντικείμενο κλινικών μελετών ως υποψήφια θεραπεία κατά της νόσου του Αλτσχάιμερ, διότι και αναστέλλει την ακετυλοχολινεστεράση, αλλά και δρα ως ανταγωνιστής του υποδοχέα NMDA.<sup>[22]</sup> Επιπλέον, συνθετικές κουμαρίνες που φέρουν διάφορες δραστικές ομάδες και συνδέονται με τον κουμαρινικό σκελετό στη θέση 3 ως N-αιθυλοκαρβοξαμίδια ή απλά καρβοξαμίδια, φαίνεται να έχουν ικανή ανασταλτική δράση, ιδιαίτερα όταν έφεραν βρωμο-, νιτρο- ή μεθοξυ- υποκαταστάτες.<sup>[27]</sup> Σε άλλη έρευνα, συντέθηκαν υβριδικά μόρια κουμαρινών με δομή παρόμοια αυτής της δονεπεζιλής, τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση και ορισμένα υβρίδια που έφεραν ομάδες 4-χλωροφαινυλίου ή 4-νιτροφαινυλίου στη θέση 6 παρουσίασαν ικανότητα αναστολής μεγαλύτερη από αυτή της δονεπεζιλής.<sup>[28]</sup> Τέλος, η υποκατάσταση με αλκοξυ-βρωμίδια στη θέση 7 του κουμαρινικού σκελετού φαίνεται να δίνει αρκετά δραστικά κουμαρινικά παράγωγα.<sup>[29]</sup>



Εικόνα 27: Χημική δομή ensaculin.

Πιο γενικά, έχουν διενεργηθεί πολλές μελέτες της σχέσης δομής-δράσης ως προς τα κουμαρινικά παράγωγα που αποτελούν ικανούς αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, εκ των οποίων, εξάγονται ορισμένα συμπεράσματα για τη δομή των κουμαρινικών αναστολέων. Συγκεκριμένα, βασική προϋπόθεση του κουμαρινικού πυρήνα είναι να παραμένει άθικτος για τη διατήρηση της δραστηριότητας. Η ίδια η κουμαρίνη, όπως έχει προαναφερθεί, αλληλεπιδρά με το περιφερειακό ανιονικό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η προσθήκη διαφορετικών δομών που αλληλεπιδρούν με την καταλυτική τριάδα του ενζύμου, όπως βενζυλαμινο-ομάδες, φαινυλοπιπεραζίνες και ανιλίνες να οδηγεί σε υβριδικά κουμαρινικά παράγωγα ικανά να αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα με περισσότερα από ένα σημεία του ενεργού κέντρου. Οι συγκεκριμένες ενώσεις, αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση, αλλά και αποτρέπουν τη συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Όταν υπάρχουν τέτοια παράγωγα, το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας που ενώνει τις δύο δομές, αποτελεί επίσης σημαντική παράμετρο, με βέλτιστη δραστηριότητα 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 δραστηριότητα λόγω υψηλής λιποφιλίας.<sup>[22]</sup>

## 5. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

### 5.1. Βασικοί ορισμοί και έννοιες

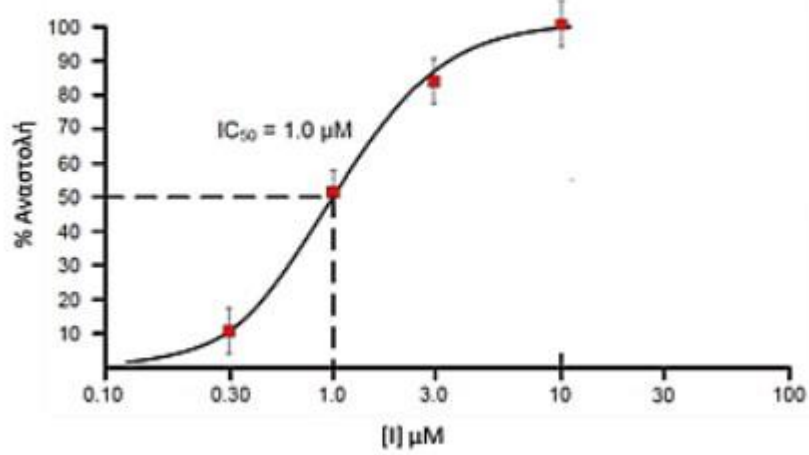
Η Φαρμακολογία ορίζεται ως ο κλάδος της Φαρμακευτικής που μελετά τις ουσίες που έχουν την ικανότητα να προκαλούν λειτουργικές μεταβολές στα κύτταρα και στους οργανισμούς και κατηγοριοποιείται στη Φαρμακοδυναμική και τη Φαρμακοκινητική. Η Φαρμακοδυναμική εξετάζει τα αποτελέσματα του φαρμάκου στον ανθρώπινο 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. Η Φαρμακοκινητική μελετά τα αποτελέσματα που επιφέρει το φάρμακο στο σώμα 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.

#### 5.1.1. 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.

#### 5.1.2. IC<sub>50</sub>

Το IC<sub>50</sub> ορίζεται ως η μοριακή συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί το 50% της ενζυμικής αναστολής. Η τιμή του IC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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<sub>50</sub>, τόσο δραστικότερος είναι ο αναστολέας. Για να θεωρηθεί μια ένωση ότι μπορεί να αποτελέσει ένωση-οδηγό επιδιώκεται η IC<sub>50</sub> να είναι σε μονοψήφιος μικρομοριακές συγκεντρώσεις (IC<sub>50</sub><10<sup>-5</sup> M), ενώ η βελτιστοποίηση στοχεύει σε μείωση της IC<sub>50</sub> σε νανομοριακές συγκεντρώσεις (IC<sub>50</sub>< 10<sup>-8</sup> M).

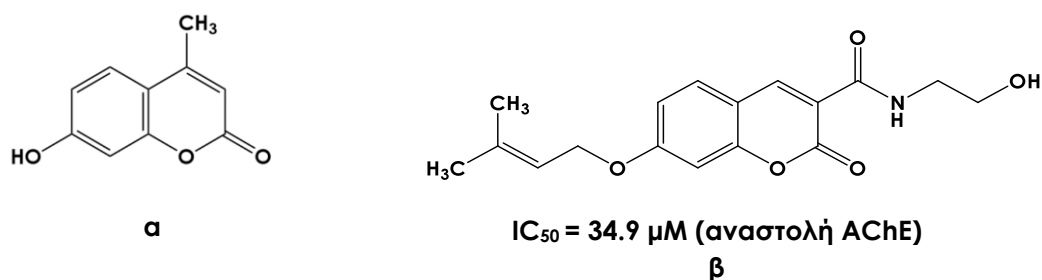


Εικόνα 28: Προσδιορισμός τιμής IC<sub>50</sub>.<sup>[31]</sup>



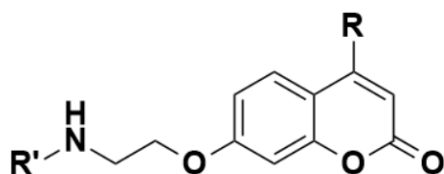
## ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε με σκοπό τον σχεδιασμό, τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό νέων κουμαρινικών αναλόγων με πιθανή δράση έναντι του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση. Ο σχεδιασμός των νέων κουμαρινικών παραγώγων στηρίχθηκε σε ενώσεις με αξιόλογη βιολογική δράση που είτε αποτελούν φυσικά προϊόντα, όπως η 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνη (**Εικόνα 29 α**), είτε πρόκειται για κουμαρινικά μόρια-οδηγούς που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ (**Εικόνα 29, β**).



Εικόνα 29: Χημική δομή μορίων-οδηγών

Ως εκ τούτου τα παραπάνω μόρια αποτέλεσαν ενώσεις-οδηγούς για τη σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων, τα οποία προέκυψαν μέσω αντιδράσεων τριών σταδίων με γενική δομή που φαίνεται στην **Εικόνα 30**.



Εικόνα 30: Γενική δομή νέων κουμαρινικών αναλόγων.

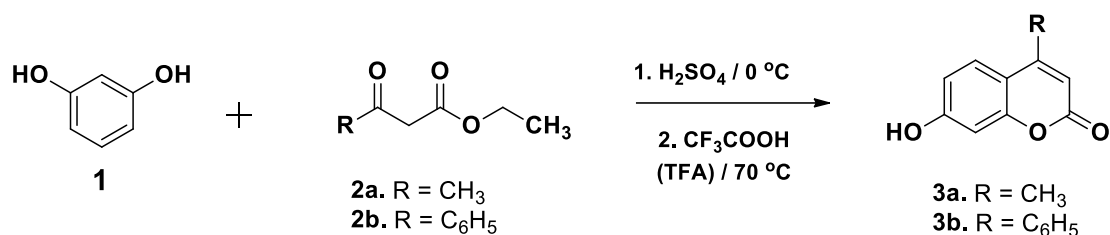
Τα νέα μόρια που συντέθηκαν ταυτοποιήθηκαν ως προς τη δομή τους μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού πρωτονίου ( $^1H$  NMR). Τέλος πραγματοποιήθηκε η μελέτη της ικανότητας αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση μέσω της τροποποιημένης μεθόδου Ellman από τους Rahman και Choudhary *in vitro*, ως ένδειξη της νευροπροστατευτικής τους δράσης.<sup>[35]</sup>

# ΣΥΝΘΕΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

## 1. Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων

### 1.1. Σύνθεση αναλόγων της ουμπελιφερόνης (**3a-3b**)

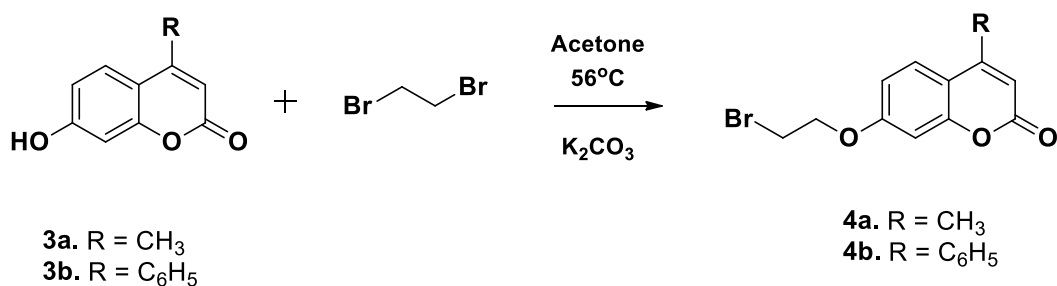
Αρχικά, συντέθηκαν δύο 7-υδροξυ-4-υποκατεστημένα παράγωγα (**3a, 3b**) της ουμπελιφερόνης μέσω αντίδρασης Pechmann μεταξύ της ρεσορκινόλης και του κατάλληλου β-κετο-εστέρα (Σχήμα 37).



Σχήμα 1 : Σύνθεση αναλόγων ουμπελιφερόνης με τη μέθοδο Pechmann.

### 1.2. Σύνθεση 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (**4a-4b**)

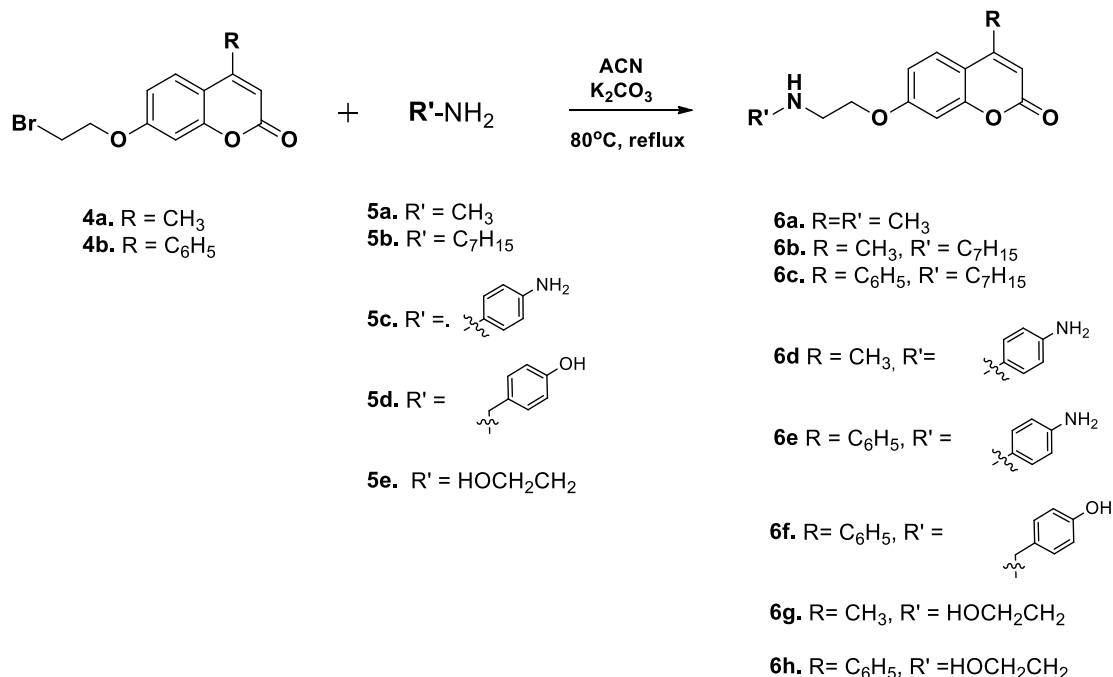
Τα μόρια **3a** και **3b** αντέδρασαν, στη συνέχεια, μέσω σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson, με το διβρωμοαιθάνιο, παρουσία διαλύτη ακετόνης και βάσης ανθρακικού καλίου ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ).



Σχήμα 2: Σύνθεση 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων.

### 1.3. Σύνθεση 7-(αλκυλο)- ή 7-(αρυλο)- αμινοαιθοξυ- κουμαρινικών αναλόγων (**6a-6h**)

Τα τελικά κουμαρινικά μόρια (**6a-6h**) προκύπτουν μέσω αντίδρασης με κατάλληλα υποκατεστημένες πρωτοταγείς αμίνες. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιείται αντίδραση μεταξύ των εκάστοτε 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων και κατάλληλα υποκατεστημένων αμινών σε αναλογία 1.6:1.5 με προσθήκη ανθρακικού καλίου σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Έτσι προκύπτουν οκτώ νέα αμινοαιθοξυ-κουμαρινικά παράγωγα.



Σχήμα 3: Σύνθεση νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών αναλόγων

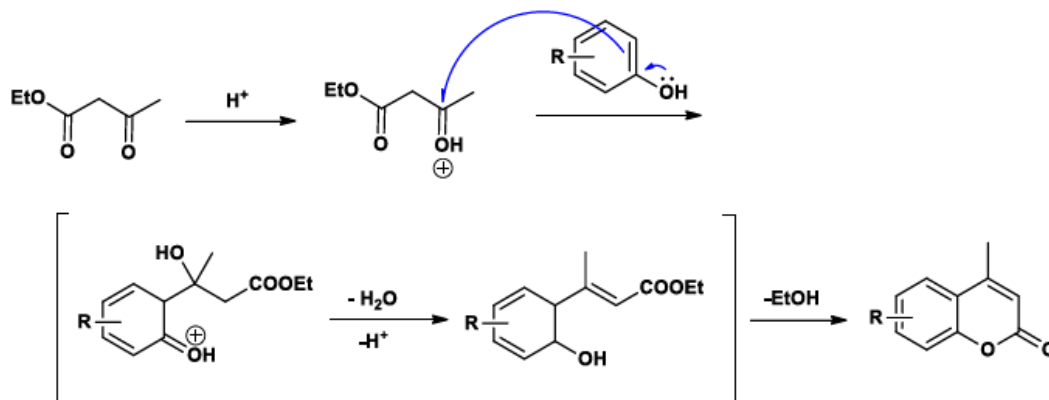
## 2. Μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών

### 2.1. Αντίδραση Pechmann

Η αντίδραση Pechmann είναι μία από τις κοινές μεθόδους σύνθεσης κουμαρινών με πολύ μεγάλη απόδοση. Συμπεριλαμβάνει την αντίδραση μιας φαινόλης με έναν εστέρα παρουσία καταλύτη. Οι κύριοι καταλύτες που χρησιμοποιούνται για τη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης αντίδρασης είναι οξικοί καταλύτες όπως: θειικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ, τριφθοροξικό οξύ, πεντοξείδιο του φωσφόρου και άλλα. Άλλοι οξικοί καταλύτες είναι οξέα κατά Lewis όπως είναι ο χλωριούχος ψευδάργυρος, ο χλωριούχος σίδηρος, το χλωριούχο αργίλιο και άλλα. Πολλές φορές όταν στην αντίδραση

χρησιμοποιούνται ακετο-οξικοί εστέρες η αντίδραση αυτή αναφέρεται ως αντίδραση Pechman-Duisberg. [41]

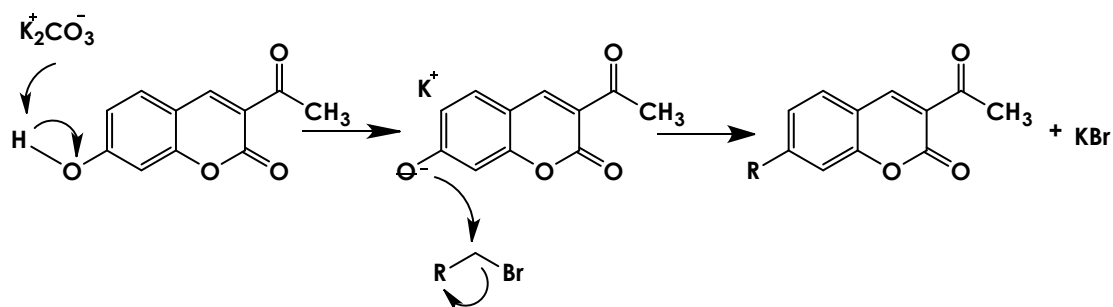
Ο μηχανισμός σύνθεσης μέσω αντίδρασης Pechmann έγκειται στην ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στη φαινόλη από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του β-κετο-εστέρα προς σχηματισμό των ενδιάμεσων. Στη συνέχεια πραγματοποιείται λακτονοποίηση με απόσπαση νερού και αιθανόλης προκειμένου να σχηματιστεί ο κουμαρινικός σκελετός. [55]



Σχήμα 4: Μηχανισμός σύνθεσης κουμαρίνης μέσω αντίδρασης Pechmann.

## 2.2. 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 περίπτωση ανθρακικού καλίου. Έπειτα το πυρηνόφιλο αλκοξείδιο προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του εκάστοτε βρωμιδίου και το τελικό προϊόν προκύπτει μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστασης. [31]



Σχήμα 5: 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 31: Όργανο NMR συχνότητας 600 MHz της εταιρείας Ascend.

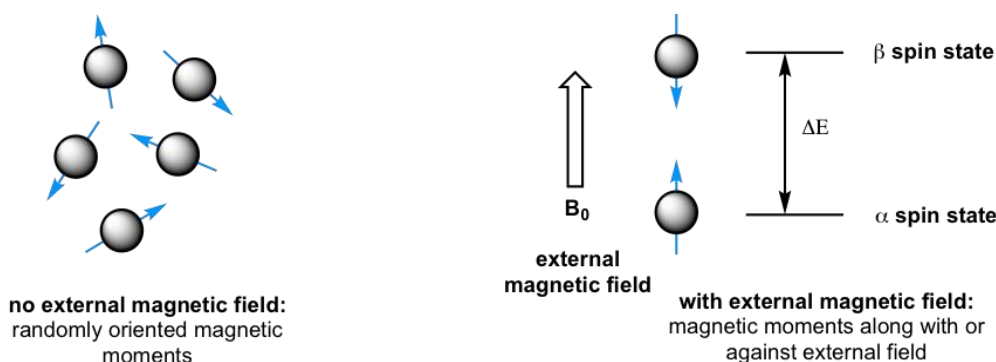
Η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, η οποία παρατηρείται κατόπιν αλληλεπίδρασης με τους πυρήνες του εκάστοτε δείγματος, είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα. Επομένως η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται τόσο για την ταυτοποίηση της δομής όσο και για την καθαρότητα οργανικών ενώσεων.

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 ( $\mu$ ) 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  $h/2\pi$ , 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 ( $^{12}_6\text{C}, ^{16}_8\text{O}, ^{32}_{16}\text{S}$ ):** 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 ( $^1_1\text{H}, ^{13}_6\text{C}, ^{19}_9\text{F}$ ):** παρουσιάζουν αριθμούς spin οι οποίοι είναι περιττά ακέραια πολλαπλάσια του 1/2.
- **Πυρήνες με άρτιο μαζικό αριθμό και περιττό ατομικό αριθμό ( $^2_1\text{H}, ^{14}_7\text{N}$ ):** παρουσιάζουν αριθμούς spin οι οποίοι είναι άρτια ακέραια πολλαπλάσια του 1/2.

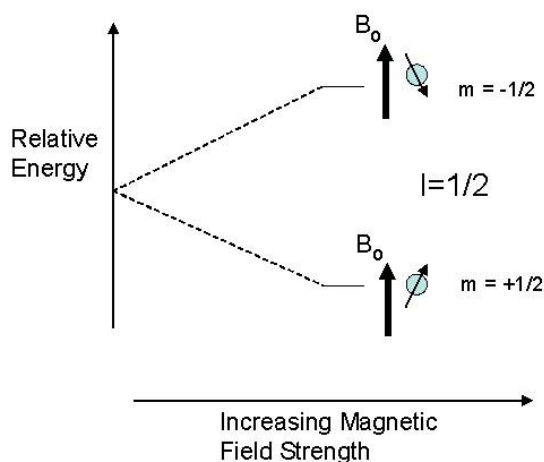
Πυρήνες με  $I > 0$  όταν βρεθούν σε εξωτερικό, ομογενές και στατικό μαγνητικό πεδίο ( $B_0$ ), συμπεριφέρονται όπως μία μαγνητική ράβδος και το άνυσμα της στροφικής ορμής τους παίρνει  $2I+1$  προσανατολισμούς ως προς τη διεύθυνση του πεδίου. Σε κάθε προσανατολισμό αντιστοιχεί μία ορισμένη τιμή ενέργειας ( $E$ ).



Εικόνα 32: Συμπεριφορά πυρήνων με  $I > 0$  απουσία και παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Οι τέσσερις σημαντικότεροι πυρήνες που χρησιμοποιούνται κυρίως στη Χημεία και τη Βιοχημεία είναι οι  $^1_1\text{H}, ^{13}_6\text{C}, ^{19}_9\text{F}, ^{31}_{15}\text{P}$ . 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 33: Διαφορά ενέργειας πυρήνων με παράλληλο και αντιπαράλληλο spin σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο  $B_0$ .

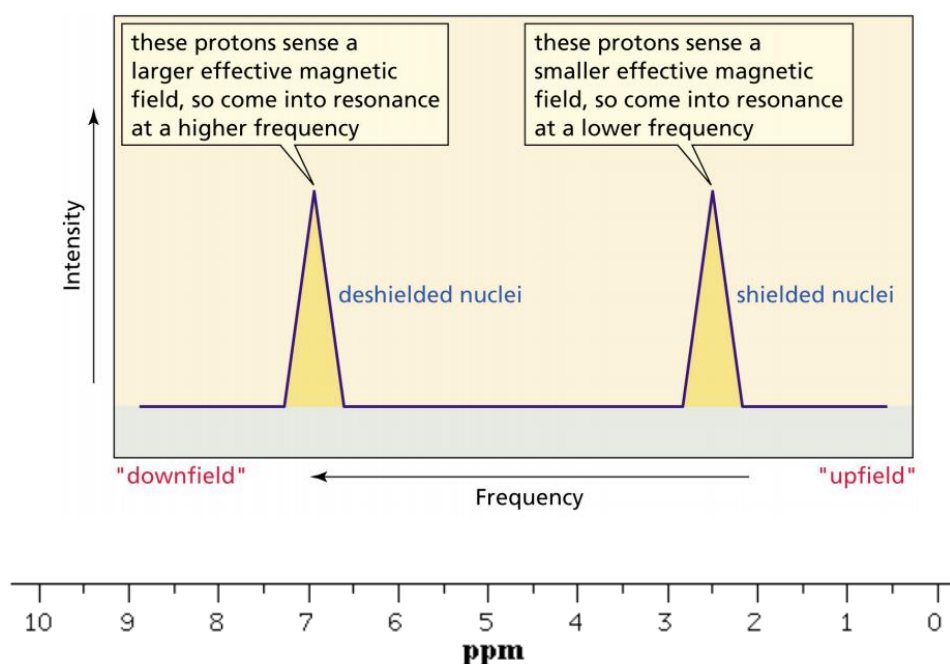
Η φασματοσκοπία NMR όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση της δομής μίας ένωσης, στην εύρεση των χαρακτηριστικών ομάδων της αλλά και πιθανών προσμίξεων και στη ποσοτική ανάλυση, η οποία συνήθως γίνεται με υπολογισμό της καθαρότητας της ένωσης. Χρησιμοποιείται επίσης για τον προσδιορισμό υδρογόνωσης σε πετροχημικές διεργασίες, καθώς και τον προσδιορισμό ύδατος σε έλαια, τρόφιμα και γεωργικά υλικά.[32], [33]

### 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 34: Άξονας φάσματος NMR.

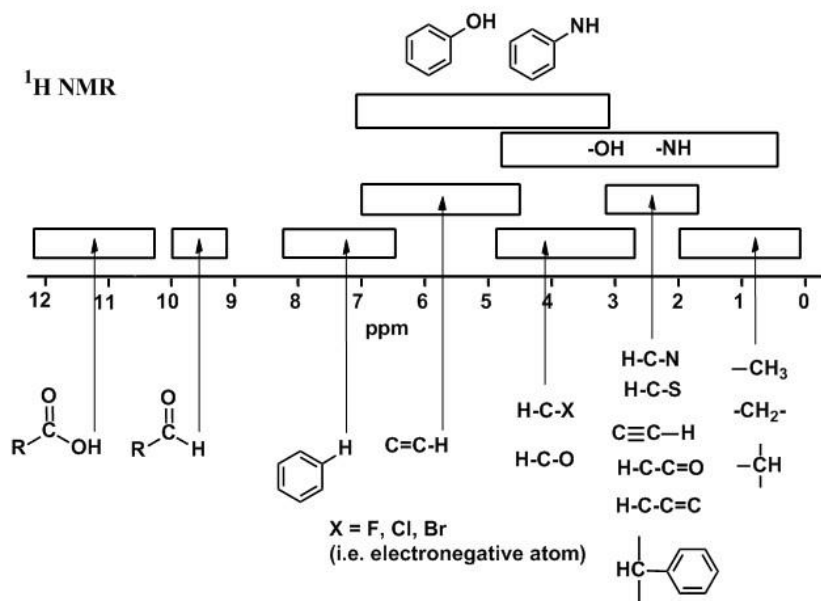
Η θέση συντονισμού ενός πρωτονίου εκφράζεται σε σχέση με μία πρότυπη ένωση. Εάν  $\nu_\delta$  και  $\nu_\sigma$  είναι οι συχνότητες συντονισμού του εξεταζόμενου πρωτονίου (ή ομάδας πρωτονίων) του δείγματος και της ουσίας αναφοράς αντίστοιχα, και  $\nu_0$  η βασική συχνότητα λειτουργίας του φασματόμετρου (σε Hz), τότε η χημική μετατόπιση εκφράζεται με την κλίμακα  $\delta$ , όπου:

$$\delta = \frac{\nu_\delta - \nu_\sigma}{\nu_0} \cdot 10^6 \text{ ppm}$$

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.



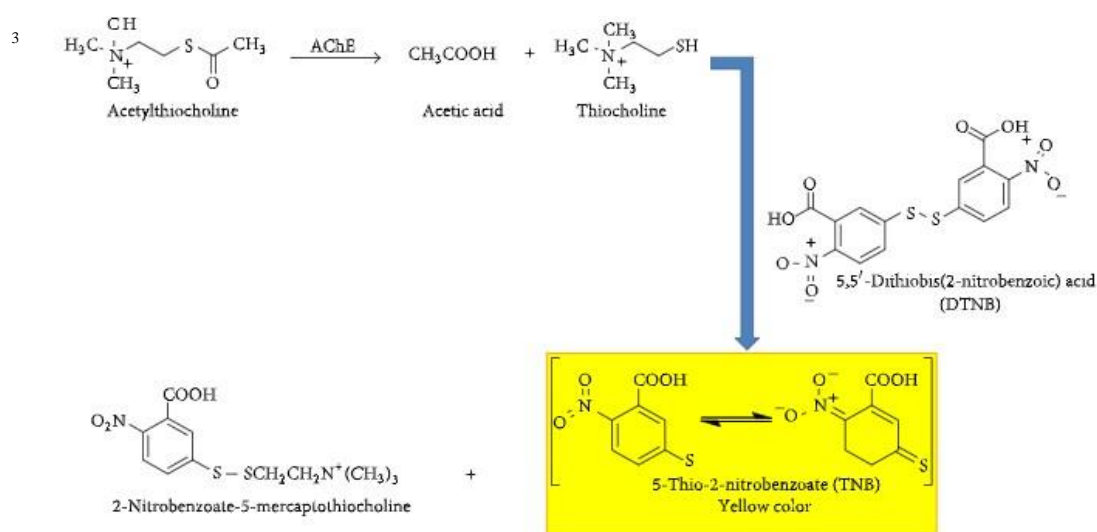
Εικόνα 35: Χημικές μετατοπίσεις κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR.

Σε πολλά φάσματα <sup>1</sup>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 <sup>1</sup>H, δηλαδή πρωτονίων με ίδιο J, έχει n ισότιμα γειτονικά <sup>1</sup>H, τα <sup>1</sup>H της ομάδας δίνουν μία σύνθετη κορυφή στο φάσμα NMR με πολλαπλότητα (n+1).<sup>[33],[34]</sup>

#### 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 - ATCl), 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.<sup>[35]</sup>



Εικόνα 36: Χημική αναπαράσταση μεθόδου Ellman<sup>[39]</sup>

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.<sup>[36]</sup>

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

#### 1.1. Όργανα και συσκευές οργανικής σύνθεσης

Η πορεία των αντιδράσεων καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητας των ενώσεων επιτηρήθηκε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC) σε πλάκες αλουμινίου, επιστρωμένες με Silica Gel F254 της εταιρίας Merck και εμβαπτισμένες σε κατάλληλες αναλογίες συστήματος διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα (*Petroleum Ether* - PE) / οξικού αιθυλεστέρα (*Ethyl Acetate* - EtOAc) ή διχλωρομεθανίου (*Dichloromethane* - DCM) / μεθανόλης (*Methanol* - MeOH). Η μελέτη των TLC έγινε κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα 254 nm, όπου εμφανίστηκαν οι κηλίδες των TLC, εν συνεχεία με εμποτισμό των πλακών σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (PMA) σε αναλογία (αιθανολικό διάλυμα PMA 7%) και θέρμανσής τους.

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

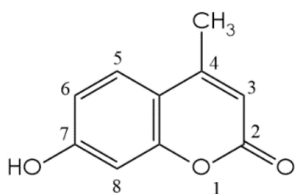
Η εξάτμιση των οργανικών διαλυτών πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα Büchi Rotavapor® R-210 υπό ελαττωμένη πίεση και σε θερμοκρασίες 40-60°C. Η ξήρανση των στερεών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε αντλία υψηλού κενού Edwards (RV-5).

Η δομική ταυτοποίηση και ο έλεγχος καθαρότητας των νέων προϊόντων πραγματοποιήθηκε μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (*Nuclear Magnetic Resonance* - NMR) πρωτονίου (<sup>1</sup>H). Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν με τα όργανα Varian 300 MHz και Varian 600 MHz του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub>) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d<sub>6</sub>). 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 <sup>1</sup>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.

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.

## 1.2. Παρασκευή αναλόγων της ουμπελιφερόνης με τη μέθοδο Pechmann (3a-3b)

### 7-υδροξυ-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (3a)

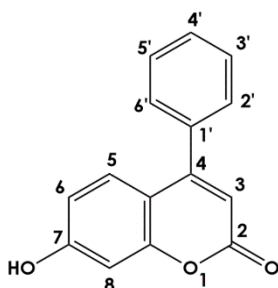


Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 100 mL πυκνού θειικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) υπό ψύξη στους 0 °C. Παρασκευάζεται διάλυμα 90.82 mmol (10g) ρεσορκινόλης σε 92.10 mmol (12mL) 3-οξοβουτανοϊκού αιθυλεστέρα, το οποίο προστίθεται στάγδην και υπό ανάδευση στη σφαιρική φιάλη σε θερμοκρασία κάτω των 10 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα προστίθεται σε πάγο υπό έντονη ανάδευση και το στερεό που καταβυθίζεται διηθείται υπό κενό με ποσότητα παγωμένου νερού. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από ανακρυστάλλωση από διαλύτη μεθανόλη σε μορφή υποκίτρινου στερεού. Η δομή του προϊόντος ταυτοποιείται με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR. [37]

**Απόδοση:** 70 %

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) 10.50 (br, 1H, OH-7), 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.79 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.70 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.12 (s, 1H, H-3), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

### 7-υδροξυ-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη(3b)



Σε σφαιρική φιάλη διαλύονται 4.54 mmol ρεσορκινόλης (500 mg) και 4.54 mmol οξικού αιθυλεστέρα (784 μL) σε 1.14 ml τριφθοροξικού οξέος (CF<sub>3</sub>COOH) υπό ανάδευση στους 70°C. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται, ενώ ανακατεύεται διαρκώς για 24 ώρες στους 70°C, σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N<sub>2</sub> και με παρουσία κάθετου ψυκτήρα. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα προστίθεται σε πάγο υπό έντονη ανάδευση και το στερεό που καταβυθίζεται διηθείται υπό κενό. Το τελικό καθαρό προϊόν, το οποίο έχει μείνει στον ηθμό, τοποθετείται στην αντλία υψηλού κενού Edwards (RV-5) για ξήρανση. Τέλος, παραλαμβάνεται πορτοκαλί στερεό προϊόν, όπου η καθαρότητα του διενεργείται μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR. [38]

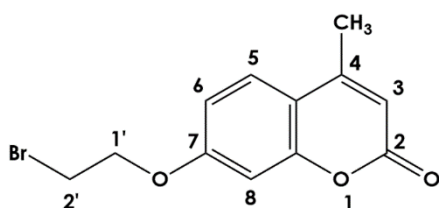
**Απόδοση:** 80%

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) 10.66 (br, 1H, OH-7), 7.54 (m, 5H, H-2' & H-3' & H-4' & H-5' & H-6'), 7.28 (d, J = 9 Hz, 1H, H-5), 6.81 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-8), 6.78 (dd, J = 9 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.15 (s, 1H, H-3)

### 1.3. Γενική μέθοδος σύνθεσης 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (4a-4b)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα της 4-υποκατεστημένης-7-υδροξυ-κουμαρίνης (1 eq) και επαρκής ποσότητα διβρωμοαιθάνιου (10 eq) παρουσία ξηρής βάσης ανθρακικού καλίου (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) σε διαλύτη ακετόνη. Το μείγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες στους 56°C παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N<sub>2</sub>. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε κατάλληλη αναλογία συστήματος διαλυτών. Μετά το τέλος της αντίδρασης διενεργείται διήθηση υπό κενό με στόχο την απομάκρυνση της βάσης και την παραλαβή του οργανικού διηθήματος, το οποίο εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης με χρήση Silica Gel 60 (40-63 microns) της εταιρείας Merck για τον καθαρισμό του προϊόντος, του οποίου η καθαρότητα ελέγχεται μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR.

#### • 7-(2-βρωμοαιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη(4a)



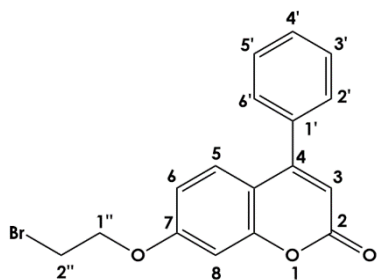
Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο 1.42 mmol (250 mg) της 4-μέθυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, 14.20 mmol (1123μL) διβρωμοαιθάνιου και 1.42 mmol (196.3 mg) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> προστίθενται σε 19.90 mL ακετόνης.

Η εξέλιξη της πορείας της αντίδρασης διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με τη μέθοδο dry-rack σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc) και παραλαμβάνεται στερεό λευκού χρώματος.

**Απόδοση:** 44%

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.89 (dd, *J* = 8.7 Hz & *J* = 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.16 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H, H-3), 4.35 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, H-1'), 3.67 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, H-2'), 2.40 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-4)

• 7-(2-βρωμοαιθοξυ)-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη(4b)



Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, 1.78 mmol (425 mg) 4-φαινυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 17.80 mmol διβρωμοαιθανίου διαλύονται σε 25 mL ακετόνης με προσθήκη 246 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Η εξέλιξη της πορείας της αντίδρασης επιτυγχάνεται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με τη μέθοδο dry-rack σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30%(EtOAc) και παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

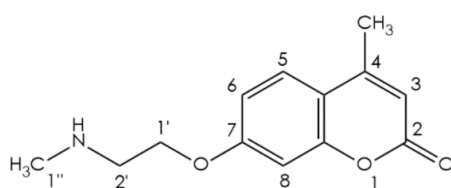
**Απόδοση: 50%**

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.53 (m, 3H, H-5 & H-2' & H-6'), 7.42 (m, 3H, H-3' & H-4' & H-5'), 6.89 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-8), 6.82 (dd, *J* = 7.9 Hz & *J* = 2.3 Hz, 1H, H-6), 6.24 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-3), 4.37 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H-1''), 3.68 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, H-2'').

#### 1.4. Γενική μέθοδος σύνθεσης νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών αναλόγων (6a-6h)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα (1.6 eq) των εκάστοτε 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων και ενδεδειγμένη ποσότητα πρωτοταγούς αμίνης (1.5 eq), παρουσία ξηρής βάσης ανθρακικού καλίου (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Το μείγμα αφήνεται, ενώ αναμειγνύεται διαρκώς για 48 ώρες στους 80°C σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N<sub>2</sub> και με παρουσία κάθετου ψυκτήρα. Η εξέλιξη της αντίδρασης διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε κατάλληλη αναλογία συστήματος διαλυτών. Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης με τη μέθοδο dry-rack για καθαρισμό του τελικού προϊόντος, του οποίου η καθαρότητα ελέγχεται μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR.

• 4-μεθυλο-7-(2-(μεθυλαμινο)αιθοξυ)-2H-χρωμεν-2-όνη(6a)

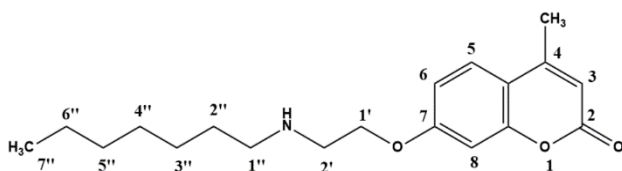


Σύμφωνα με τη παραπάνω γενική μέθοδο, 0.19 mmol (53 mg) 4-μεθυλο-7-βρωμο-κουμαρίνης, 0.28 mmol (10μL) μεθυλ-αμίνης και 0.20 mmol (28mg) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> προστίθενται σε 1.8 mL ακετονιτρίλιο. Η εξέλιξη της πορείας της αντίδρασης διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται διήθηση για να απομακρυνθεί η βάση και εν συνεχεία εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό λευκού χρώματος. Όμως, όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

**Απόδοση:** 88.6%

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.72 (d, J = 4.8 Hz, 1H, H-5), 7.10 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H-8), 7.03 (dd, J = 4.8 Hz & J = 3.6 Hz, 1H, H-6), 6.25 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H-3), 4.69 (br, 2H, H-1'), 4.10 (br, 2H, H-2'), 3.38 (s, 1H, NH), 2.41 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-4)

• 7-(2-(επτυλαμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη(6b)



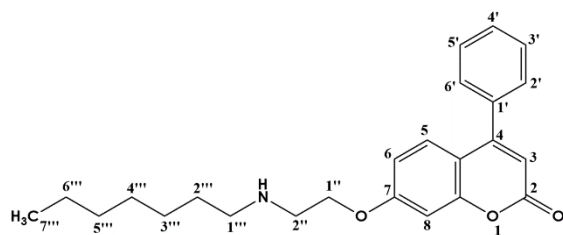
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης, 0.31 mmol (87.3mg) 4-μεθυλο-7-βρωμο-κουμαρίνης, 0.29mmol (43μL) επτυλαμίνης και 0.33 mmol (45.5mg) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> προστίθενται σε 2.9 mL ακετονιτρίλιο. Η εξέλιξη της πορείας της αντίδρασης διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται διήθηση για να απομακρυνθεί η βάση και εν συνεχεία εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που παραλαμβάνεται υφίσταται καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 40% (PE) : 60% (EtOAc). Παραλαμβάνεται στερεό λευκού χρώματος.

**Απόδοση:** 50%

**<sup>1</sup>H NMR** (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 8.10-8.12 (br, 1H, NH), 8.02 (d, J = 5.6, 1H, H-6) 7.30 (d, J = 3.0 Hz, 2H, H-5 & H-8), 6.59 (s, 1H, H-3), 4.55 (t, J = 3.2 Hz, 2H, H-1'), 3.32 (t, J = 2.9 Hz, 2H, H-2'), 2.92 (br, 2H, H-1''), 2.78 (d, J=2.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-4), 1.61-1.82 (br, 10H, H-2''-H-6''), 1.24 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-7'')



• 7-(2-(επτυλαμινο)αιθοξυ)-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη(6c)



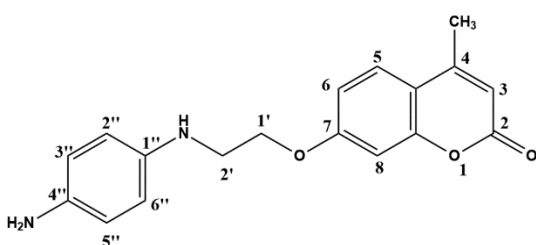
Σύμφωνα με τη παραπάνω γενική μέθοδο, 1.11 mmol (150.2 mg) 4-φαινυλο-7-βρωμο-κουμαρίνης, 1.04 mmol (154.91μL) επτυλαμίνης και 1.18 mmol (163mg) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> προστίθενται σε 10.41 mL ακετονιτρίλιο. Η εξέλιξη της πορείας

της αντίδρασης διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται εκχύλιση με νερό και EtOAc, όπου συλλέγεται η οργανική φάση, την οποία τοποθετούμε σε σφαιρική φιάλη για να εξατμιστεί στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το στερεό που παραλαμβάνεται υφίσταται καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 96% (DCM) : 4% (MeOH). Παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

**Απόδοση:** 20%

**<sup>1</sup>H NMR** (300MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.32-7.51 (m, 5H, H-2'-H-6'), 6.76-6.97 (m, 2H, H-6 & H-8), 6.22 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H, H-3 & H-5), 4.45 (br, 1H, H-2''), 4.24 (br, 1H, H-2''), 3.78-3.89 (m, 1H, H-1''), 3.50-3.59 (m, 1H, H-1''), 3.33 (br, 1H, H-1'''), 2.98 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-1'''), 1.68-1.82 (br, 2H, H-6'''), 1.25-1.33 (m, 8H, H-2'''-H-5'''), 0.85 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-7''')

• 7-(2-((4-αμινοφαινυλο)αμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη(6d)



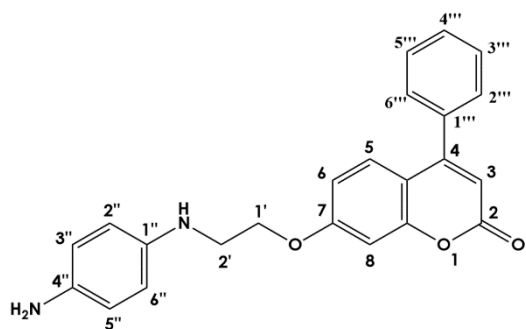
Σύμφωνα με τη παραπάνω γενική μέθοδο, 0.85 mmol (150 mg) 4-μεθυλο-7-βρωμο-κουμαρίνης, 0.8 mmol (86.3 mg) 1,4-φαινυλενοδιαμίνης και 0.9 mmol (124.8mg) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> προστίθενται σε 8 mL ακετονιτρίλιο. Η εξέλιξη της πορείας της αντίδρασης

διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 90% (DCM) : 10% (MeOH). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται διήθηση για να απομακρυνθεί η βάση και εν συνεχεία εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που παραλαμβάνεται υφίσταται καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 20% (PE) : 80% (EtOAc).



Παραλαμβάνεται στερεό λευκού χρώματος. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

• 7-(2-((4-αμινοφαινυλο)αμινο)αιθοξυ)-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη(6e)

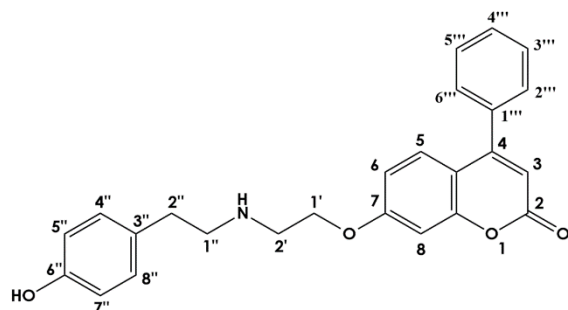


Σύμφωνα με τη παραπάνω μέθοδο, 0.36 mmol (125.5 mg) 4-φαινυλο-7-βρωμο-κουμαρίνης, 0.34 mmol (36.5 mg) 1,4-φαινυλενο-διαμίνης και 0.38 mmol (52.87mg)  $K_2CO_3$  προστίθενται σε 3.4 mL ακετονιτρίλιο. Η εξέλιξη της πορείας της αντίδρασης διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) :

30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται διήθηση για να απομακρυνθεί η βάση και εν συνεχεία εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που παραλαμβάνεται υφίσταται καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

**$^1H$  NMR** (300MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 9.75 (br, 2H,  $NH_2-4''$ ), 7.68 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H, H-5), 7.54 (br, 5H, H-2'''-H-6'''), 7.36 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, H-6), 7.11 (d, 2H, H-3'' & H-5''), 6.97 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-8) , 6.73 (d, 2H, H-2'' & H-6''), 6.26 (s, 1H, H-3), 4.17-4.25 (m, 2H, H-1'), 3.47 (br, 2H, H-2')

• 7-(2-((4-υδροξυβενζυλο)αμινο)αιθοξυ)-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη(6f)

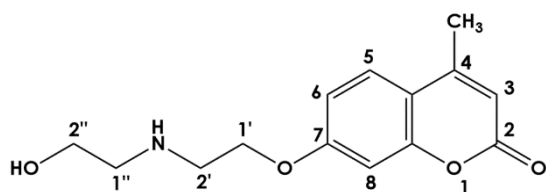


Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο, 0.72 mmol (97 mg) 4-φαινυλο-7-βρωμο-κουμαρίνης, 0.67 mmol (92.2 mg) τυραμίνης και 0.76 mmol (105.3 mg)  $K_2CO_3$  προστίθενται σε 6.7 mL ακετονιτρίλιο. Η εξέλιξη της πορείας της αντίδρασης διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας

(TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται διήθηση για να απομακρυνθεί η βάση και εν

συνεχία εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που παραλαμβάνεται υφίσταται καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Παραλαμβάνεται στερεό καφέ χρώματος. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

• 7-(2-((2-υδροξυαιθυλ)αμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (6g)



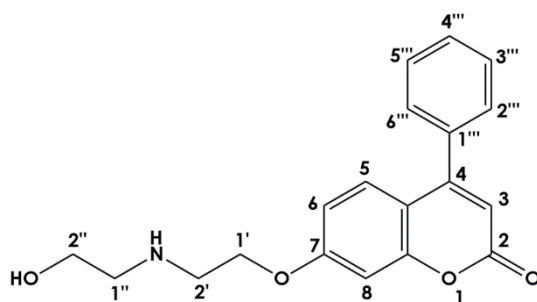
Σύμφωνα με τη παραπάνω γενική μέθοδο, 0.29 mmol (81 mg) 4-μεθυλο-7-βρωμο-κουμαρίνης, 0.29 mmol (16  $\mu$ L) αιθανολαμίνης και 0.30 mmol (42 mg)  $K_2CO_3$  προστίθενται σε 2.7 mL ακετονιτρίλιο. Η εξέλιξη της πορείας της αντίδρασης διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται διήθηση για να απομακρυνθεί η βάση και εν συνεχεία εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που παραλαμβάνεται υφίσταται καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

**Απόδοση:** 61%

**$^1H$  NMR** (600MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7.69 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.97-6.99 (m, 2H, H-6 & H-8), 6.21 (d,  $J$  = 0.6 Hz, 1H, H-3), 4.16 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 2H, H-1'), 3.49 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 2H, H-2''), 2.97 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 2H, H-2'), 2.70 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 2H, H-1''), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-4).

**$^{13}C$  NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 161.70, 160.42, 154.82, 153.68, 126.63, 113.32, 112.63, 111.28, 101.35, 67.79, 59.87, 51.35, 47.67, 18.29

• 7-(2-((2-υδροξυαιθυλο)αμινο)αιθοξυ)-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (6h)



Σύμφωνα με τη παραπάνω γενική μέθοδο, 0.57 mmol (196.3 mg) 4-φαινυλο-7-βρωμο-κουμαρίνης, 0.53 mmol (32  $\mu$ L) αιθανολαμίνης και 0.60 mmol (83.7 mg)  $K_2CO_3$  προστίθενται σε 5.4 mL ακετονιτρίλιο. Η εξέλιξη της πορείας της αντίδρασης διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα

διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται διήθηση για να απομακρυνθεί η βάση και εν συνεχεία εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που παραλαμβάνεται υφίσταται καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

## 2.Αναστολή AChE

### 2.1.Υλικά και όργανα

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

Πίνακας 2: Οργανολογία *in vitro* προσδιορισμού αναστολής AChE.

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	Fluorochem
Ακετυλοθειοχολίνη (Acetylthiocholine - ATCl)	Alfa Aesar
Ακετυλοχολινεστεράση <i>Electrophorus Electricus</i> (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 37: Συσκευή Epoch 2 Microplate Reader.

## 2.2. 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 ATCl. 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 εξέταση δείγματα.

Η ποσοστιαία αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης υπολογίζεται ως εξής:

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

Όπου:

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

Τα προς εξέταση 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<sub>50</sub>=0.92 μM.



Εικόνα 38:

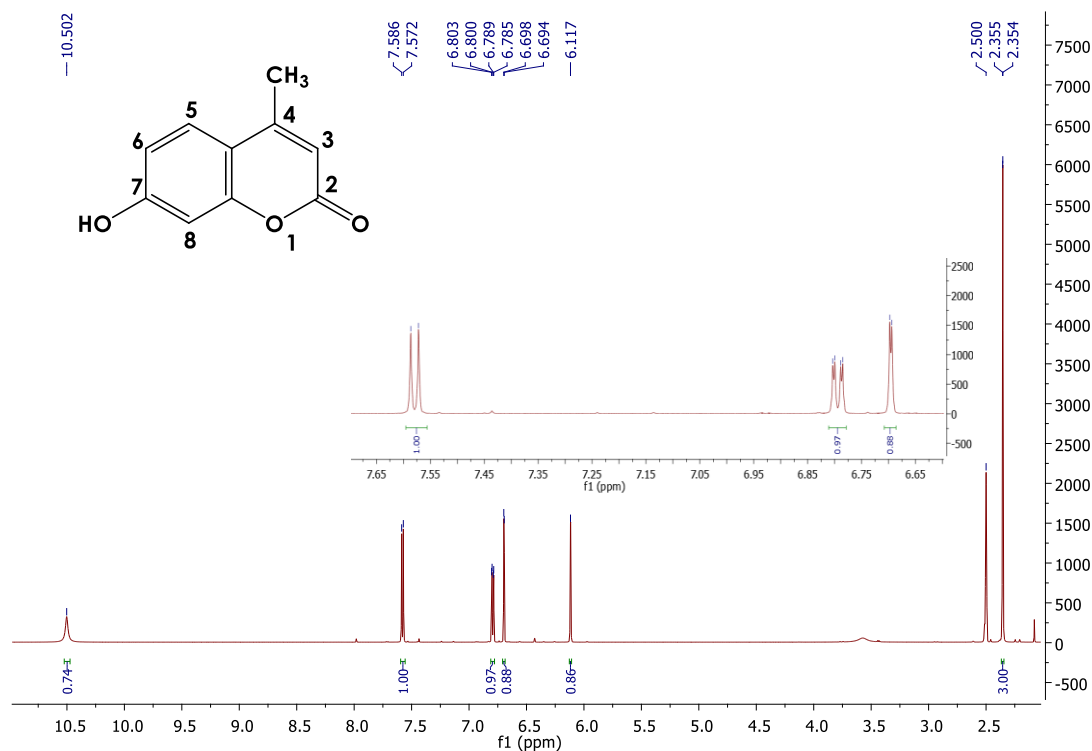
Πλακίδιο 96 θέσεων.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1. Αποτελέσματα σύνθεσης και φασματοσκοπική μελέτη των κουμαρινικών αναλόγων

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν δώδεκα νέα κουμαρινικά ανάλογα και ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR. Τα δύο υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα συντέθηκαν σε υψηλές αποδόσεις-της τάξεως 70-80 %-μέσω αντίδρασης Reckmann. Τα δύο βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικά παράγωγα συντέθηκαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις-της τάξεως 50%- μέσω αντίδρασης σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson απαιτώντας καθαρισμό με μέθοδο χρωματογραφίας στήλης. Τα οκτώ νέα αμινοαιθοξυ-κουμαρινικά ανάλογα, που απαιτούν τρία στάδια αντιδράσεων για τη σύνθεσή τους, συντέθηκαν σε διαφορετικές αποδόσεις που έχουν εύρος από 20-90 % αφού πραγματοποιήθηκε καθαρισμός μέσω μεθόδου χρωματογραφίας στήλης.

Ακολουθεί φασματοσκοπική μελέτη των κυριότερων μορίων που προαναφέρθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, θα αναλυθούν τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR των ενώσεων (**3a**), (**3b**), (**4a**), (**4b**), (**6a**), (**6b**), (**6c**), (**6e**) και (**6g**).

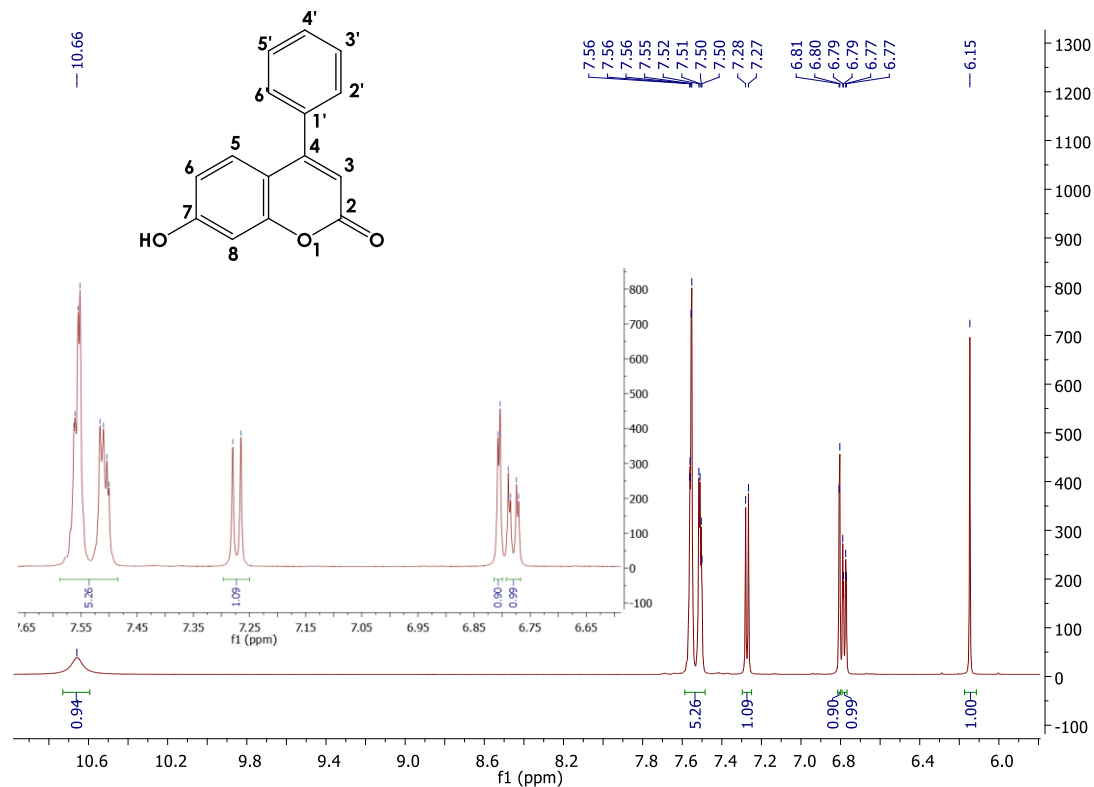


Εικόνα 39: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**3a**)

Το παραπάνω φάσμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 2.39 ppm που ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας της θέσης 4. Εν συνεχεία, στα 6.12 ppm εμφανίζεται άλλη μία απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, αυτό της θέσης 3.

Έπειτα, στα 6.70 ppm παρατηρείται μια διπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-8, ως αποτέλεσμα της σύζευξης του με το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6. Στα 6.79 ppm εμφανίζεται μια διπλή διπλών κορυφή που αποδίδεται στο H-6, λόγω της σύζευξης του με τα H-5 και H-8, αντίστοιχα. Στα 7.58 ppm παρατηρείται μία διπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, αυτό της θέσης 5.

Τέλος, εμφανίζεται μία ευρεία κορυφή στα 10.50 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο υδροξύλιο της θέσης 7.

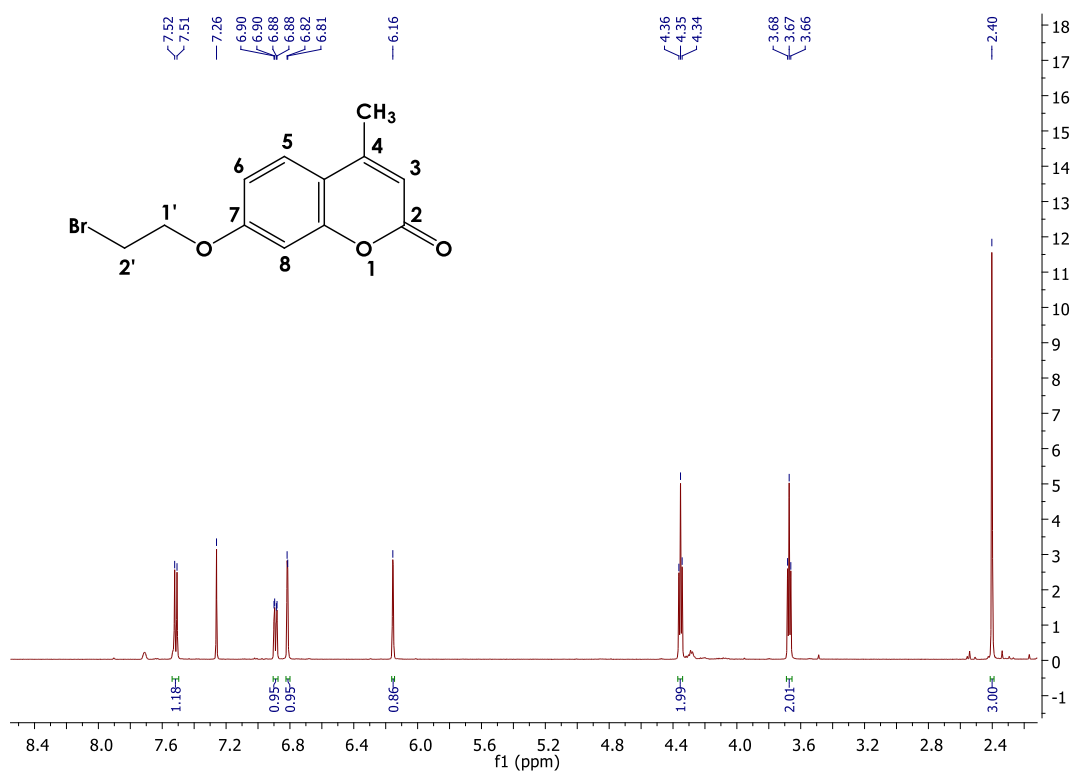


Εικόνα 40: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 7-υδροξυ-4-φαινολο-2H-χρωμεν-2-όνης (3b)

Το παραπάνω φάσμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας απλής κορυφής στα 6.15 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-3. Εν συνεχεία, στα 6.78 ppm εμφανίζεται μία διπλή διπλών κορυφή και αποδίδεται στο H-6 λόγω της σύζευξης του με το H-5 και το H-8 αντίστοιχα. Στα 6.81 ppm παρατηρείται μία διπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-8, ως αποτέλεσμα της σύζευξης του με το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6. Ακολουθεί μία διπλή κορυφή στα 7.28 ppm, η οποία αποδίδεται στο H-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-6).

Στα 7.54 ppm παρατηρείται μία πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για πέντε πρωτόνια, τα οποία ανήκουν στο αρωματικό δακτύλιο της θέσης 4 (H-2'-H-6'). Τέλος, εμφανίζεται μία ευρεία κορυφή στα 10.66 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο υδροξύλιο της θέσης 7.

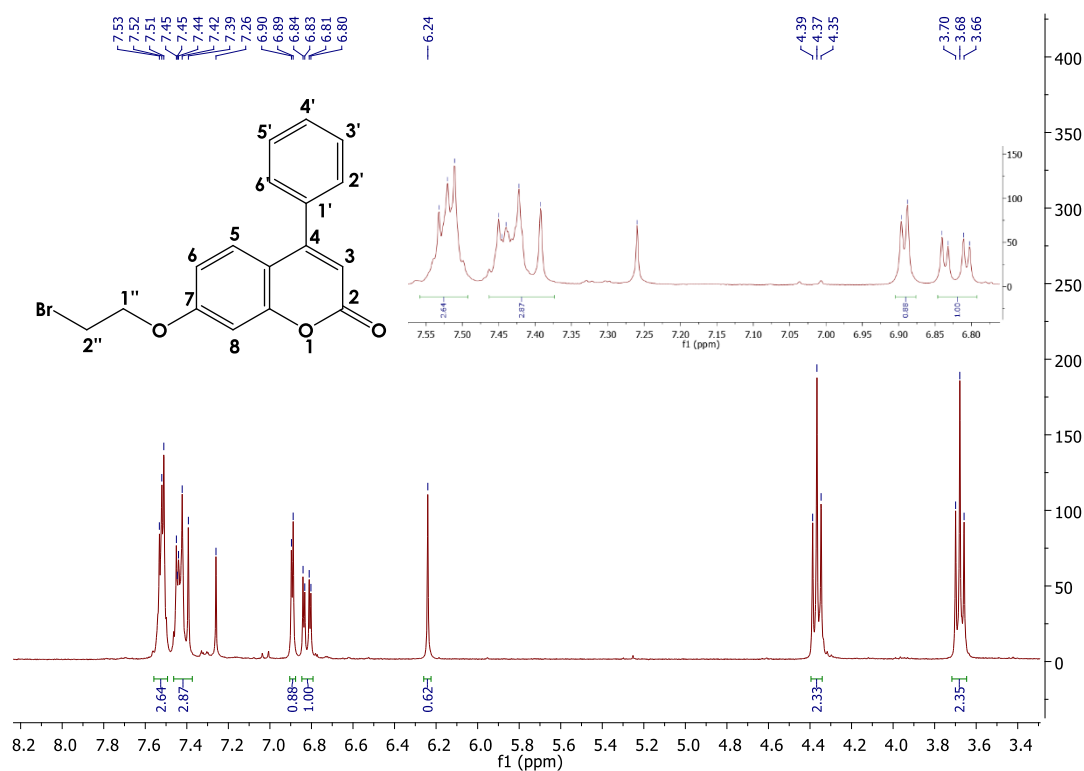




Εικόνα 41: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 7-(2-βρωμοαιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**4a**).

Στα 2.40 ppm παρατηρείται μία διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στη μεθυλομάδα. Στη συνέχεια, στα 3.67 ppm εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια της θέσης 2'. Στα 4.35 ppm εμφανίζεται επίσης μία τριπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αντιστοιχεί στη θέση 1'.

Στα 6.16 ppm παρατηρείται μια διπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 3. Στα 6.82 ppm η διπλή κορυφή αποδίδεται στο H-8, ως αποτέλεσμα της σύζευξης του με το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6. Στα 6.89 ppm εμφανίζεται μια διπλή διπλών κορυφή που αποδίδεται στο H-6, λόγω της σύζευξης του με τα H-5 και H-8, αντίστοιχα. Τέλος, η διπλή κορυφή στα 7.51 ppm αποδίδεται στο H-5 καθώς διαθέτει ένα μη ισοδύναμο γειτονικό πρωτόνιο.

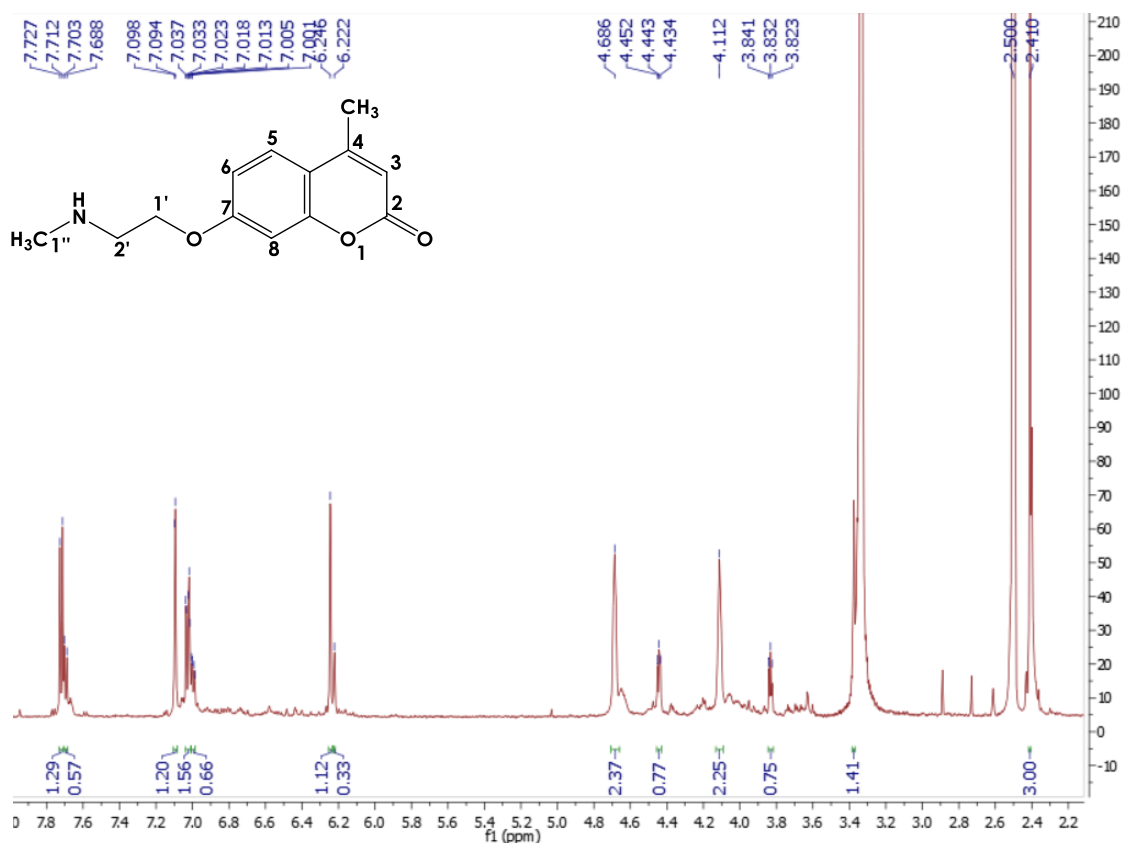


Εικόνα 42: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 7-(2-βρωμοαιθοξυ)-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**4b**).

Στα 3.68 ppm εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια της θέσης 2'. Στα 4.37 ppm εμφανίζεται επίσης μία τριπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αντιστοιχεί στη θέση 1'.

Στα 6.24 ppm παρατηρείται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 3. Στα 6.82 ppm εμφανίζεται μια διπλή διπλών κορυφή που αποδίδεται στο H-6, λόγω της σύζευξης του με τα H-5 και H-8, αντίστοιχα. Στα 6.89 ppm η διπλή κορυφή αποδίδεται στο H-8, ως αποτέλεσμα της σύζευξης του με το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6.

Στα 7.42 ppm εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή που αποδίδεται στα τρία αρωματικά πρωτόνια H-3', H-4', H-5'. Τέλος, παρατηρείται μία πολλαπλή κορυφή στα 7.53 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για τρία αρωματικά πρωτόνια, το H-5 και τα υπόλοιπα του φαινολικού δακτυλίου (H-2', H-6').

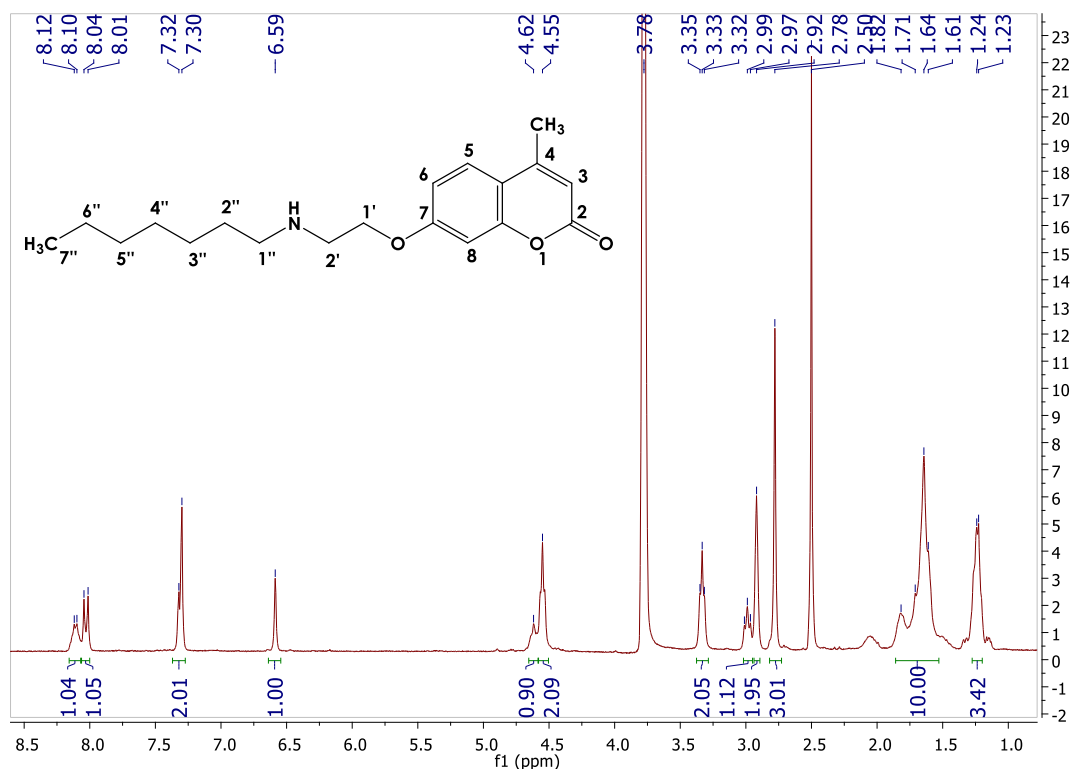


Εικόνα 43: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 4-μεθυλο-7-(2-(μεθυλαμινο)αιθοξυ)-2H-χρωμεν-2-όνης (6a)

Το συγκεκριμένο φάσμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας διπλής κορυφής στα 2.41 ppm, η οποία αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 4. Ακολουθεί μία απλή κορυφή στα 3.38 ppm που ολοκληρώνεται για το αμινο-πρωτόνιο. Στη συνέχεια, εμφανίζεται μία ευρεία κορυφή στα 4.10 ppm που αποδίδεται στα δύο αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 2'. Μία επίσης ευρεία κορυφή στα 4.69 ppm αποδίδεται στα άλλα δύο αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1'.

Ακολουθεί μια διπλή κορυφή στα 6.25 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-3. Στα 7.03 ppm εμφανίζεται μια διπλή διπλών κορυφή που αποδίδεται στο H-6, λόγω της σύζευξης του με τα H-5 και H-8, αντίστοιχα. Στα 7.10 ppm η διπλή κορυφή αποδίδεται στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 8, λόγω της σύζευξης του με το H-6. Τέλος, ακολουθεί μία διπλή κορυφή στα 7.72 ppm, η οποία αποδίδεται στο H-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-6).

Το παραπάνω φάσμα πιστοποιεί το γεγονός ότι η αναλογία προϊόντος-αντιδρώντος είναι 1 : 0.4, χρειάζεται δηλαδή περαιτέρω καθαρισμός για την παραλαβή καθαρού προϊόντος.

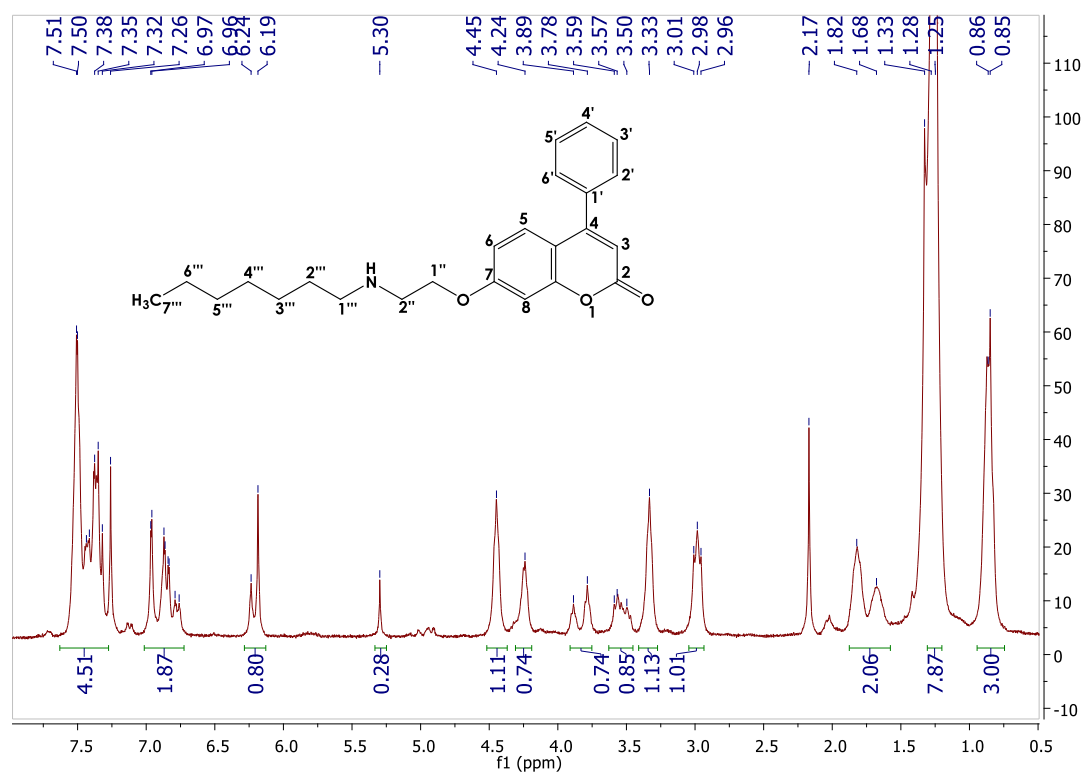


Εικόνα 44: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 7-(2-(εptulamino)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**6b**).

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας πολλαπλής κορυφής στα 1.24 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 7''. Ακολουθεί μία ευρεία κορυφή στα 1.61-1.82 ppm, η οποία αντιστοιχεί στα αλειφατικά πρωτόνια που ανήκουν στις θέσεις 2'' έως 6'', καθώς ολοκληρώνεται για 10 πρωτόνια.

Στα 2.78 ppm παρατηρείται μία διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στη μεθυλομάδα της θέσης 4. Ακολουθεί μία ευρεία κορυφή στα 2.92 ppm η οποία αποδίδεται στα δύο αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1''. Στα 3.32 ppm και στα 4.55 ppm εμφανίζονται δύο τριπλές κορυφές, που ολοκληρώνονται για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδίδονται στα πρωτόνια των θέσεων 2' και 1' αντίστοιχα.

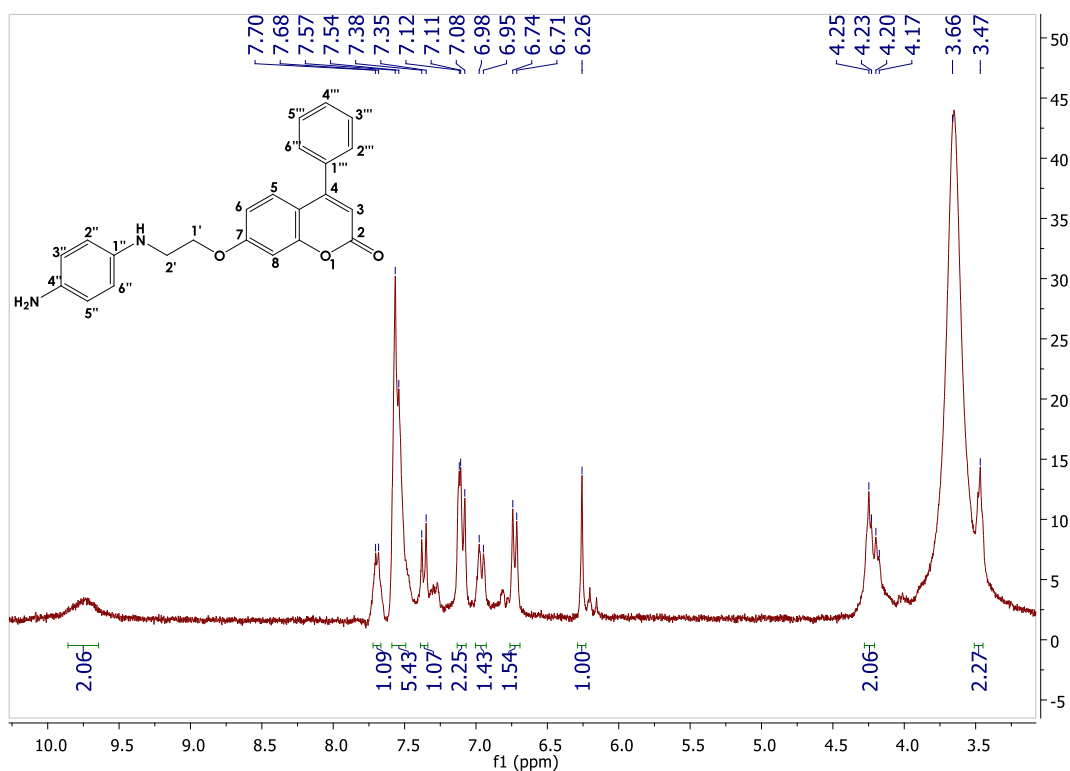
Στα 6.59 ppm παρατηρείται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-3. Στα 7.30 ppm η διπλή κορυφή αποδίδεται τόσο στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 8 όσο και στο H-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-6). Στα 8.02 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που αποδίδεται στο H-6, λόγω της σύζευξης του με τα H-5 και H-8, αντίστοιχα. Τέλος, στα 8.10-8.12 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αμινομάδας.



Εικόνα 45: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 7-(2-(επτυλαμινο)αιθοξυ)-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**6c**).

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας πολλαπλής κορυφής στα 0.85 ppm, η οποία αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 7'''. Ακολουθεί μία πολλαπλή κορυφή στα 1.25-1.33 ppm, η οποία αντιστοιχεί στα αλειφατικά πρωτόνια που ανήκουν στις θέσεις 2'''-5''', καθώς ολοκληρώνεται για 8 πρωτόνια. Στα 1.68-1.82 ppm εμφανίζεται μία ευρεία κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, αυτά της θέσης 6'''. Στα 2.98 ppm εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα αλειφατικό πρωτόνιο της θέσης 1'''. Στα 3.33 ppm παρατηρείται μία ευρεία κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για το άλλο ένα πρωτόνιο της θέσης 1'''. Στα 3.50-3.59 ppm εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα αλειφατικό πρωτόνιο της θέσης 1'', ενώ το άλλο πρωτόνιο της θέσης 1'' ακολουθεί σε μια πολλαπλή κορυφή στα 3.78-3.89. Στη συνέχεια, στα 4.24 ppm και 4.45 ppm εμφανίζονται δύο ευρείες κορυφές που ολοκληρώνονται για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν στα δύο πρωτόνια της θέσης 2''.

Στα 6.22 ppm παρατηρείται μια διπλή κορυφή που αποδίδεται στα H-3 και H-5. Στα 6.76-6.97 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που αποδίδεται στο H-6 και στο H-8. Τέλος, στα 7.32-7.51 ppm εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου της βενζυλοαλυσίδας (H-2' έως H-6'), καθώς ολοκληρώνεται για πέντε πρωτόνια.

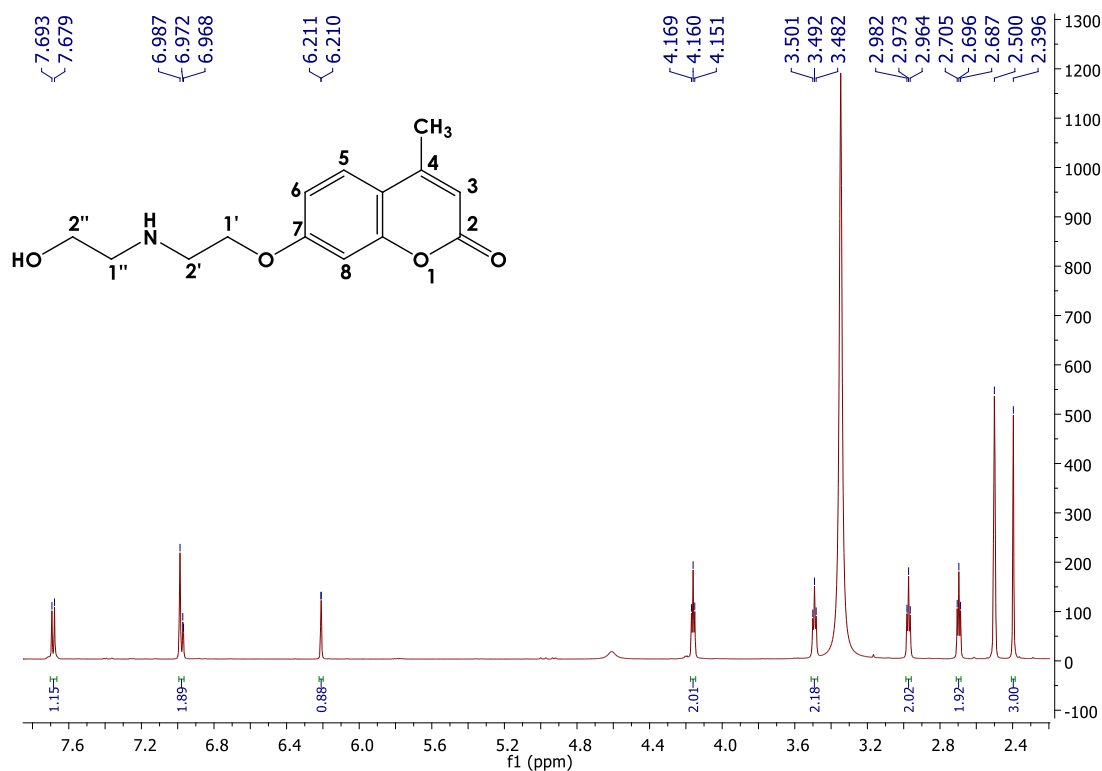


Εικόνα 46: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 7-(2-((4-αμινοφαινυλο)αμινο)αιθοξυ)-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνης(6e)

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας ευρείας κορυφής στα 3.47 ppm, η οποία αποδίδεται στα δύο αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 2'. Ακολουθεί μία πολλαπλή κορυφή στα 4.17-4.25 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια της θέσης 1'.

Στη συνέχεια, η απλή κορυφή στα 6.26 ppm αποδίδεται στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 3. Οι διπλές κορυφές που εμφανίζονται στα 6.73 ppm και στα 7.11 ppm, ολοκληρώνονται συνολικά για τέσσερα πρωτόνια και αποδίδονται στα ισοδύναμα πρωτόνια των θέσεων H-2'', H-6'' και H-3'', H-5''. Στα 6.97 ppm παρατηρείται μια διπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-8, ως αποτέλεσμα της σύζευξης του με το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6. Στα 7.36 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που αποδίδεται στο H-6. Ακολουθεί μία ευρεία κορυφή στα 7.54 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για πέντε πρωτόνια, αυτά του αρωματικού δακτυλίου της βενζυλοαλυσίδας(2'''-6'''). Η διπλή κορυφή στα 7.68 ppm αποδίδεται στο H-5 καθώς διαθέτει ένα μη ισοδύναμο γειτονικό πρωτόνιο.

Τέλος, η ευρεία κορυφή στα 9.75 ppm ολοκληρώνεται για τα δύο πρωτόνια της αμινομάδας της θέσης 4'.



Εικόνα 47: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 7-(2-((2-υδροξυαιθυλ)αμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**6g**)

Το συγκεκριμένο φάσμα χαρακτηρίζεται από μία απλή κορυφή στα 2.40 ppm, η οποία αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 4.

Ακολουθεί μία τριπλή κορυφή στα 2.70 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για τα δύο πρωτόνια της θέσης 1'. Στη συνέχεια, στα 2.97 ppm εμφανίζεται άλλη μία τριπλή κορυφή που αποδίδεται στα δύο αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 2'. Στα 3.49 ppm παρατηρείται μία επίσης τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για τα δύο πρωτόνια της θέσης 2'. Η τέταρτη στη σειρά τριπλή κορυφή στα 4.16 ppm ολοκληρώνεται για τα άλλα δύο αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1'.

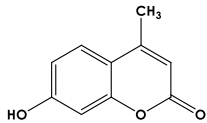
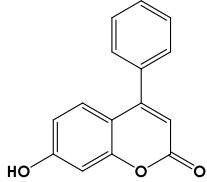
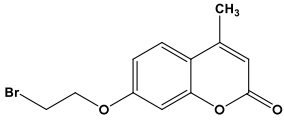
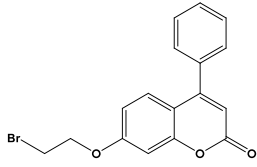
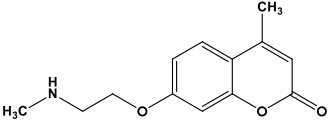
Ακολουθεί μια διπλή κορυφή στα 6.21 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-3. Στα 6.97-6.99 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για τα δύο αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 6 και 8. Τέλος, ακολουθεί μία διπλή κορυφή στα 7.69 ppm, η οποία αποδίδεται στο H-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-6).

## 2. Αξιολόγηση δράσης των νέων ενώσεων ως αναστολείς της AChE

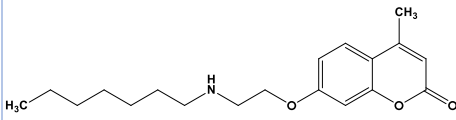
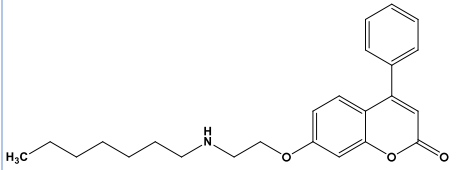
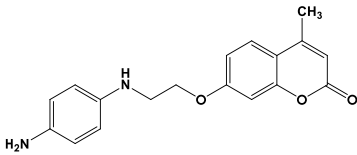
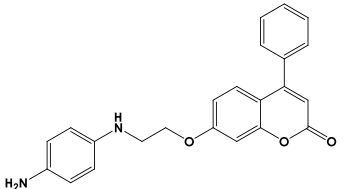
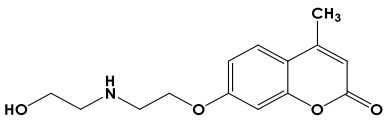
Τα νέα αμνοαιθοξυ-κουμαρινικά παράγωγα που συντέθηκαν καθώς και οι 4,7 διυποκατεστημένες κουμαρίνες που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιδρώντα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης *in vitro*. Τα κουμαρινικά παράγωγα εξετάστηκαν στη συγκέντρωση των 100  $\mu\text{M}$  και όσα υπέδειξαν δράση >50% εξετάστηκαν σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων 100  $\mu\text{M}$  - 5  $\mu\text{M}$ , προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο υπολογισμός της συγκέντρωσης  $\text{IC}_{50}$ .

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

Πίνακας 3: Ικανότητα αναστολής AChE %100 $\mu\text{M}$  και  $\text{IC}_{50}$  των ενώσεων **3a**, **3b**, **4a**, **4b** και **6a-6g**.

A/A	Χημική δομή	Αναστολή AChE %100 $\mu\text{M}$	AChE $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>3a</b>		39.1 $\pm$ 4.8	-
<b>3b</b>		39.9 $\pm$ 2.6	-
<b>4a</b>		39.7 $\pm$ 2.2	-
<b>4b</b>		28.3 $\pm$ 1.5	-
<b>6a</b>		94.8 $\pm$ 2.9	9.8 $\pm$ 0.7

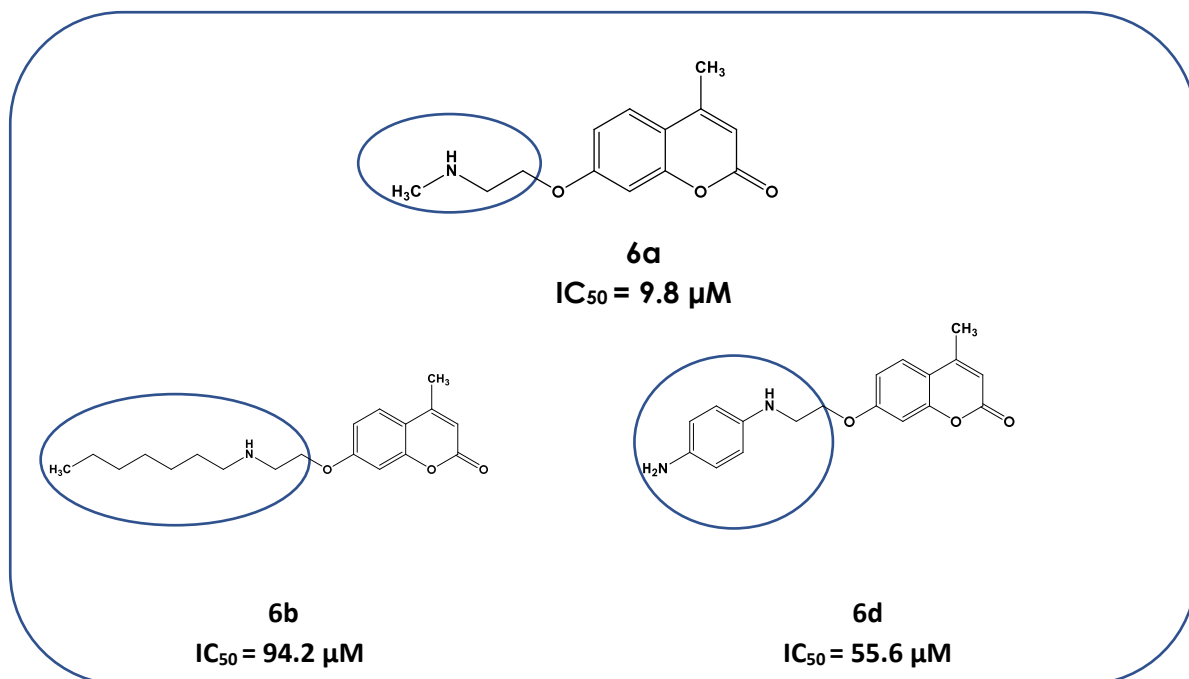


<b>6b</b>		$54.3 \pm 4.3$	$94.2 \pm 5.5$
<b>6c</b>		n.t. <sup>1</sup>	$45.4 \pm 1.3$
<b>6d</b>		$73.5 \pm 0.5$	$55.6 \pm 2.9$
<b>6e</b>		$53.4 \pm 5.3$	$92.6 \pm 6.6$
<b>6g</b>		$71.8 \pm 2.3$	$41.5 \pm 1.9$
-	<b>Galantamine</b>	-	$0.92 \pm 0.1$

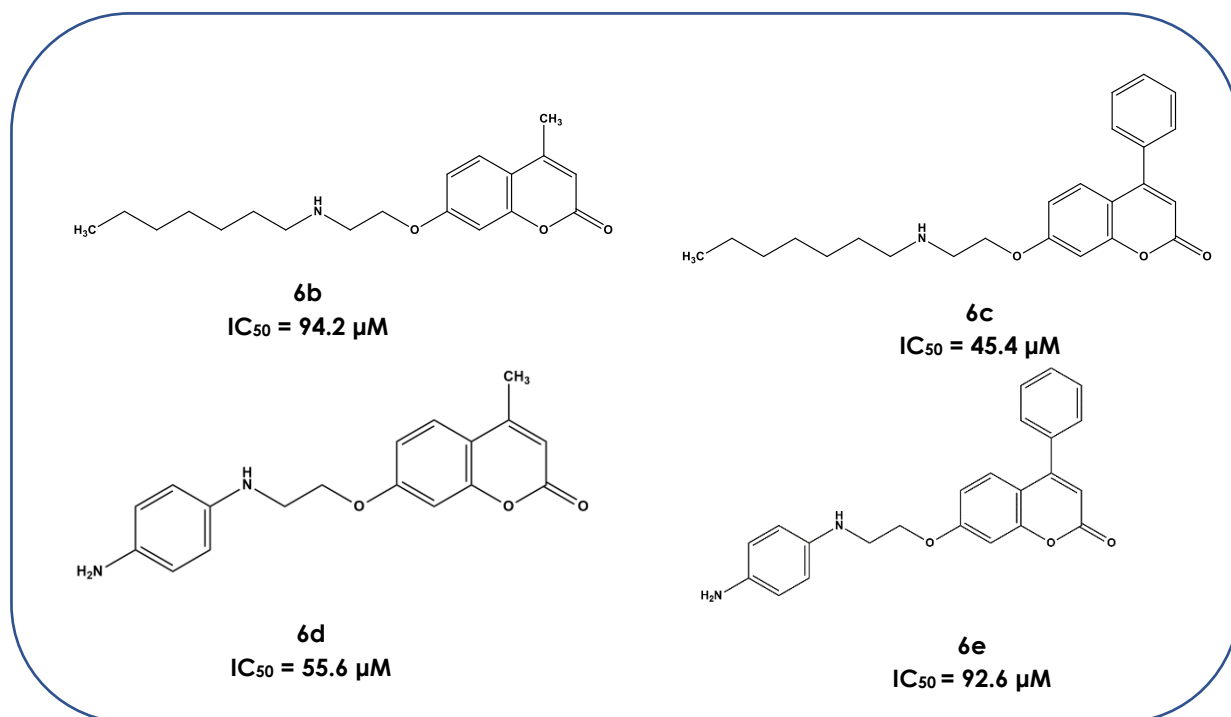
<sup>1</sup>n.t. = not tested

Αρχικά, διαπιστώνεται ότι οι αρχικές ενώσεις **3a**, **3b**, **4a** και **4b** εμφανίζουν σχετικά χαμηλή ικανότητα αναστολής του ενζύμου, καθώς για συγκέντρωση 100  $\mu\text{M}$  το ποσοστό αναστολής κυμαίνεται από 28-40%.

Η ένωση **6a** αποτελεί τον ικανότερο αναστολέα που συντέθηκε, καθώς αναστέλλει το ένζυμο κατά 94.8% και εμφανίζει  $\text{IC}_{50} = 9.8 \mu\text{M}$ , τιμή πολύ ικανοποιητική, καθώς η εμφάνιση θεραπευτικού αποτελέσματος με χορήγηση όσο το δυνατόν χαμηλότερης δόσης φαρμάκου αποτελεί βασικό στόχο κατά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, ενώ το πρότυπο παρουσιάζει τιμή  $\text{IC}_{50} = 0.92 \mu\text{M}$ . Τα επίσης 4-μεθυλο-υποκατεστημένα κουμαρινικά παράγωγα **6b**, **6d** και **6g** εμφανίζουν χαμηλότερη ικανότητα αναστολής από το **6a** που πιθανώς οφείλεται στο μεγαλύτερο μήκος της **πλευρικής αλυσίδας** της θέσης 7, καθιστώντας δυσκολότερη την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Επιπλέον, η ένωση **6g** εμφανίζει ικανοποιητική τιμή  $\text{IC}_{50} = 41.5 \mu\text{M}$ , επιβεβαιώνοντας την υπόθεση της συσχέτισης του μήκους της πλευρικής αλυσίδας με την ικανότητα αναστολής.

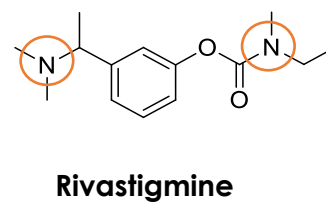
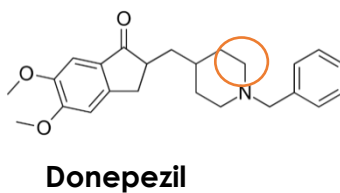
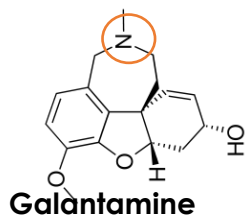


Συγκρίνοντας την ένωση **6d** με το φαινυλο-ανάλογό της **6e**, διαπιστώνεται ότι η υποκατάσταση με φαινυλομάδα στη θέση 4 οδηγεί σε μείωση του ποσοστού αναστολής του ενζύμου, ενώ αυξάνεται η τιμή IC<sub>50</sub>. Αντίθετα, το 4-φαινυλο-υποκατεστημένο ανάλογο **6c** εμφάνισε βελτιωμένη τιμή IC<sub>50</sub> σε σχέση με το 4-μεθυλο-ανάλογο **6b**. Συνεπώς, δεν καθίσταται ευκρινής σχέση μεταξύ της υποκατάστασης με μεθυλο ή φαινυλο ομάδα στη θέση 4 του κουμαρινικού σκελετού και την ικανότητα αναστολής της δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης.



Συνοψίζοντας, η ύπαρξη της αμινομάδας αποτελεί βασικό παράγοντα ενίσχυσης της δράσης, καθώς τα μόρια **3a**, **3b**, **4a**, **4c** που δε φέρουν αμινομάδα, εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερη δράση σε σχέση με τα αντίστοιχα κουμαρινικά ανάλογα **6a-6g**.

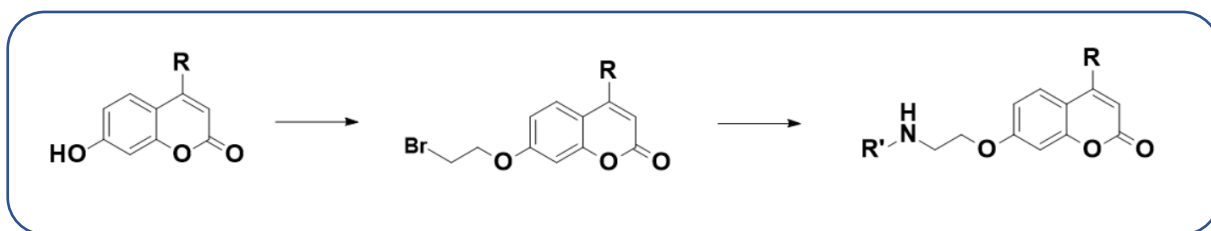
Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, από τα οποία προκύπτει η σημασία της παρουσίας αμινομάδας στο εν δυνάμει φαρμακομόριο στην ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη δομή των χορηγούμενων φαρμάκων για τη νόσο του Αλτσχάιμερ.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

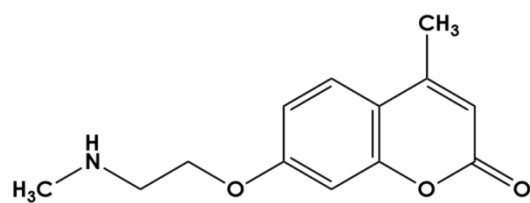
Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός οκτώ νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων. Ο σχεδιασμός των κουμαρινικών αναλόγων στηρίχθηκε σε ενώσεις-οδηγούς που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και έχουν επιδείξει σημαντική βιολογική δράση, καθώς και σε βιβλιογραφικά δεδομένα, με σκοπό τα μόρια αυτά να αποτελέσουν ικανούς αναστολείς του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης.

Τα νέα κουμαρινικά παράγωγα προέκυψαν ύστερα από τρία στάδια. Αρχικά, συντέθηκαν δύο 4-υποκατεστημένα ανάλογα της ουμπελιφερόνης μέσω αντίδρασης Pechmann, σε υψηλές αποδόσεις – της τάξης του 70-80% – και σε ήπιες συνθήκες. Στη συνέχεια, μέσω αντίδρασης σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson προέκυψαν δύο βρωμοαιθοξυ-ανάλογά τους με αποδόσεις της τάξης του 50%. Η αντίδραση των βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων με κατάλληλα υποκατεστημένες πρωτοταγείς αμίνες οδήγησε σε οκτώ νέα αμινοαιθοξυ-κουμαρινικά ανάλογα σε αποδόσεις από 20-90%. Το μεγάλο εύρος των αποδόσεων οφείλεται στον καθαρισμό που υπέστησαν τα νέα κουμαρινικά ανάλογα, κατά τον οποίο υπήρξαν απώλειες της ποσότητάς τους. Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού  $^1\text{H NMR}$ .



Σχήμα 6: Συνθετική πορεία των αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η *in vitro* αξιολόγηση της ικανότητας των κουμαρινικών παραγώγων να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης με τη χρήση της τροποποιημένης μεθόδου του Ellman. Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διαπιστώθηκε ότι η παρουσία αμινομάδας στα κουμαρινικά μόρια βελτιώνει σημαντικά το ποσοστό αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του μήκους της πλευρικής αλυσίδας της θέσης 7 οδηγεί σε μείωση της ικανότητας αναστολής του ενζύμου. Το σύνολο των νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών αναλόγων επέδειξε ικανοποιητική τιμή  $\text{IC}_{50}$  (μικρότερη των 100  $\mu\text{M}$ ), ενώ η ένωση **6a** αποτέλεσε τον ισχυρότερο αναστολέα, με  $\text{IC}_{50} = 9.8 \mu\text{M}$ .



**6a**  
**IC<sub>50</sub> = 9.8 μM**

Εικόνα 48: Χημική δομή του ισχυρότερου αναστολέα, **6a**.

## ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

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

Αρχικά, προτείνεται η σύνθεση περισσότερων νέων δομικά τροποποιημένων κουμαρινικών παραγώγων, τα οποία θα διαφέρουν ως προς το μήκος της πλευρικής αλυσίδας στη θέση 7 του κουμαρινικού δακτυλίου. Τα παραπάνω μόρια προτείνεται να αξιολογηθούν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης *in vitro*, με στόχο την περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης δομής-δράσης.

Επιπλέον, θεωρείται χρήσιμο να πραγματοποιηθεί μελέτη της ικανότητας των νέων κουμαρινικών αναλόγων να αναστέλλουν και το ένζυμο της βουτυρυλοχολινεστεράσης (BuChE), το οποίο φέρεται να σχετίζεται επίσης με τη νόσο του Αλτσχάιμερ.

Παράλληλα, προτείνεται η *in silico* μελέτη της μοριακής μοντελοποίησης και πρόσδεσης των μορίων στο ενεργό κέντρο τόσο της ακετυλο- όσο και της βουτυρυλοχολινεστεράσης.

Ακόμα, κρίνεται αναγκαίο να πραγματοποιηθεί ο χαρακτηρισμός των νέων μορίων με περαιτέρω φασματοσκοπικές και φασματομετρικές μεθόδους ( $^{13}\text{C}$  NMR και HR-MS αντίστοιχα).

Τέλος, θα μπορούσε να μελετηθεί η σύνθεση των νέων αμινοαιθοξυκουμαρινικών παραγώγων με χρήση:

- Διαλυτών που θα φέρουν περισσότερο πράσινο χαρακτήρα, όπως οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες και τα ιοντικά υγρά και
- Τεχνικών υψηλής ενέργειας, όπως η χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας και υπερήχων, στοχεύοντας στην πιθανή μείωση του χρόνου αντίδρασης και την αύξηση της απόδοσης.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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.
2. Stefanachi A., Leonetti F., Pisani L. et al. (2018). "Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds", *Molecules*, 23(2), 1–34.
3. Bräse S., Gläser F., Hurre T. (2015). "Chapter 11: Coumarins", in *Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: Design, Synthesis, Evaluation.*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
4. Feuer G. (1974). "The Metabolism and Biological Actions of Coumarins", *Progress in Medicinal Chemistry*, 10, 85–158.
5. Soine T.O. (1964). "Naturally Occuring Coumarins and Related Physiological Activities", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(3), 369–373.
6. Kostova I. (2006). "Synthetic and Natural Coumarins as Antioxidants", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 6(4), 365–374.
7. Setena S.M., Shah N.M. (1945). "The chemistry of coumarins", *Chemical Reviews*, 36(1), 1–62.
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. 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.
10. 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.
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. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
  17. Colovic M.B., Krstic D.Z., Lazarevic-Pasti T.D. et al. (2013). "Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology", *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335.
  18. 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.
  19. Silman I., Sussman J.L. (2005). "Acetylcholinesterase: "Classical" and "non-classical" functions and pharmacology", *Current Opinion in Pharmacology*, 5(3 SPEC. ISS.), 293–302.
  20. 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.
  21. Long J.M., Holtzman D.M. (2019). "Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies", *Cell*, 179(2), 312–339.
  22. 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.
  23. 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.
  24. 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.
  25. 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.
  26. Hostettmann K., Borloz A., Urbain A., Marston A. (2006). "Natural Product Inhibitors of Acetylcholinesterase", *Current Organic Chemistry*, 10, 1–23.
  27. 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.
  28. 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.
  29. 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.
30. Τσαντίλη-Κακουλίδου Α., Δημόπουλος Β. (2015). «Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων», Αποθετήριο Κάλλιπος.
  31. McMurry J. (2017). «Οργανική Χημεία», Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης.
  32. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. (2007). «Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού», Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 6η Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα.
  33. Όξενκιουν-Πετροπούλου Μ. (2006). «Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού», Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης: Φασματομετρικές Μέθοδοι, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα.
  34. Χατζηγιάννου Θ.Π., Κούππαρη Μ.Α. (2003). «Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού», Ενόργανη Ανάλυση, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα.
  35. 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.
  36. 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.
  37. Kissin, Y. V., Brandolini, A. J., & Garlick, J. L. (2008). Kinetics of ethylene polymerization reactions with chromium oxide catalysts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 46(16), 5315-5329.
  38. Olmedo, D. A., López-Pérez, J. L., Del Olmo, E., Bedoya, L. M., Sancho, R., Alcamí, J., ... & Gupta, M. P. (2017). Neoflavonoids as inhibitors of HIV-1 replication by targeting the tat and NF-κB pathways. *Molecules*, 22(2), 321.
  39. 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.
  40. Venugopala, K. N.; Rashmi, V.; Odhav, B. (2013). "Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity", *BioMed research international*, 2013.
  41. Kaye PT, Musa MA. (2003). "Application of Baylis-Hillman methodology in the synthesis of coumarin derivatives", *Synth Commun.*, 33(10), 1755-1770.
  42. Matos MJ, Vazquez-Rodriguez S, Santana L, et al. (2013). "Synthesis and structure-activity relationships of novel amino/nitro substituted 3-arylcoumarins as antibacterial agents", *Molecules*, 18(2), 1394-1404.
  43. Lü, J. M.; Lin, P. H.; Yao, Q.; Chen, C. (2010). "Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems", *Journal of cellular and molecular medicine*, 14 (4), 840-860.

44. Al-Ayed, A. S. (2011). "Synthesis of new substituted chromen [4, 3-c] pyrazol-4-ones and their antioxidant activities", *Molecules*, 16 (12), 10292-10302.
45. Panel G.Z., Feuerstein R.R., Ruffolo C., Coughlin J. WDM. *Encyclopedia of Stress*. 2nd ed.; 2007
46. Rohini K SP (2014). "Therapeutic Role of Coumarins and Coumarin-Related Compounds", *J Biofertilizers Biopestic*, 05(01), 5-7.
47. De Araújo, R. S.; Guerra, F. Q.; de O Lima, E.; De Simone, C. A.; Tavares, J. F.; Scotti, L.; Scotti, M. T.; De Aquino, T. M.; De Moura, R. O.; Mendonça, F. J. (2013). "Synthesis, structure-activity relationships (SAR) and in silico studies of coumarin derivatives with antifungal activity", *International journal of molecular sciences*, 14 (1), 1293-1309.
48. Zhang, M.-Z.; Zhang, Y.; Wang, J.-Q.; Zhang, W.-H. (2016). "Design, Synthesis and Antifungal Activity of Coumarin Ring-Opening Derivatives", *Molecules*, 21 (10), 1387.
49. Annunziata F, Pinna C, Dallavalle S, Tamborini L, Pinto A. (2020). "An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities".
50. Lee S, Sivakumar K, Shin WS, Xie F, Wang Q. (2006). "Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives", *Bioorganic Med Chem Lett.*, 16(17), 4596-4599.
51. Kim J, Park C, Ok T, et al. (2012). "Discovery of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones with inhibitory activity against HIV-1 replication", *Bioorganic Med Chem Lett.*, 22(5), 2119-2124.
52. J.W. Suttie PCP (1986). "Studies of the Vitamin K- Dependent Carboxylase and Vitamin K Epoxide Reductase in Rat Liver", Published online, 193-215.
53. Anand P, Singh B, Singh N. (2012). "Bioorganic & Medicinal Chemistry A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease", *Bioorg Med Chem.*, 20(3), 1175-1180.
54. Baruah P, Basumatary G, Yesylevskyy SO, Aguan K, Bez G, Mitra S. (2019). "Novel coumarin derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors: insight into efficacy, mode and site of inhibition", *J Biomol Struct Dyn.*, 37(7), 1750-1765.
55. Daru J, Stirling A. (2011). "Mechanism of the Pechmann reaction: A theoretical study", *J Org Chem.*, 76(21), 8749-8755.