

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
Τομέας (I) Χημικών Επιστημών



**«ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ
ΥΔΡΑΖΟΝΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ»**

Διπλωματική Εργασία
ΤΣΑΚΑΛΙΔΗΣ ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ

Επιβλέπουσα:
Αναστασία Δέτση
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας
Αθήνα 2023

Ευχαριστίες

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 2022-2023.

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Αναστασία Δέτση, επιστημονική υπεύθυνη της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα που συνδυάζει δύο από τα πεδία ενδιαφέροντός μου, την Οργανική Σύνθεση και τη Φαρμακευτική Χημεία. 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.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο Δρ. Αλέξανδρο Καλοσπύρο του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. για τη συνεχή στήριξή του, τις συμβουλές του, καθώς και τον χρόνο που αφιέρωσε τόσο στο εργαστήριο όσο και στη μελέτη αυτή.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Σχολής Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. Ευαγγελία Εμμανουηλίδου για την βοήθεια που μου προσέφερε στην επιτυχία της οργανικής σύνθεσης.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω των Επίκουρο Καθηγητή της Σχολής Φαρμακευτικής του Ε.Κ.Π.Α. Βασίλειο Μυριανθόπουλο, καθώς και την υποψήφια Δρ. Ακράνη Ιφιγένεια, για την βοήθεια που μου προσέφεραν στη χρήση της υπολογιστικής σουίτας Schrödinger®.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

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.

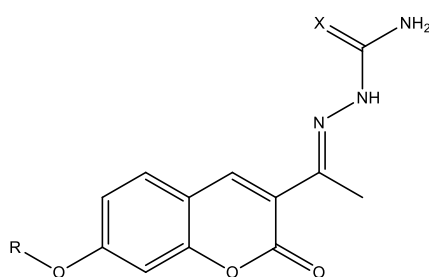
Τέλος, βαθιά ευγνωμοσύνη αποδίδω στην οικογένειά και στο φιλικό μου περιβάλλον για την αμέριστη στήριξη, υπομονή και συμπαράστασή τους και στα δύο χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

Περίληψη

Οι κουμαρίνες είναι φυτοχημικές ετεροκυκλικές φαινολικές ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών. Απαντώνται σε πολλά είδη φυτών και είναι γνωστό ότι διαθέτουν πολλές βιολογικές δράσεις, όπως αντιφλεγμονώδη, αντιπηκτική, αντιβακτηριδιακή, αντιική, αντικαρκινική και νευροπροστατευτική εφαρμογή. Λόγω της δραστηρότητάς τους και της πληθώρας δράσεων που παρουσιάζουν, αποτελούν χρήσιμο σκελετό για τη σύνθεση νέων φαρμακευτικών ενώσεων για ένα μεγάλο εύρος παθήσεων και φαρμακευτικών στόχων.

Ένας τέτοιος φαρμακευτικός στόχος είναι η ακετυλοχολινεστεράση, ένα ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, ενός από τους σημαντικότερους νευροδιαβιβαστές τόσο στο κεντρικό, όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Η δράση του ενζύμου προκαλεί τον τερματισμό του σήματος της ακετυλοχολίνης και συμβάλλει στην ρύθμιση της χολινεργικής διαβίβασης. Η παθογενής διατάραξη της χολινεργικής διαβίβασης είναι υπεύθυνη για ασθένειες όπως η μυασθένεια Gravis, ενώ παρατηρείται και σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η νόσος Alzheimer. Η χρήση αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης μπορεί να συμβάλλει στην ενίσχυση του χολινεργικού σήματος, με αποτέλεσμα την άμβλυση των συμπτωμάτων των νόσων αυτών.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων κουμαρινικών ενώσεων με νευροπροστατευτική δράση, ειδικά ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης. Μέσω συμπύκνωσης Knoevenagel συντέθηκε η 3-ακετυλο-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνη, η οποία αποτέλεσε βάση για τη σύνθεση μίας σειράς παραγώγων ενώσεων. Από την ένωση αυτή έγινε αρχικά, μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστασης Williamson στη θέση 7, σύνθεση τεσσάρων διαφορετικών αλκοξυ-παραγώγων. Στη συνέχεια, μέσω αμινικής προσθήκης υδραζονών στο καρβονύλιο της θέσης 3, συντέθηκαν 10 ακόμη κουμαρινικά παράγωγα.

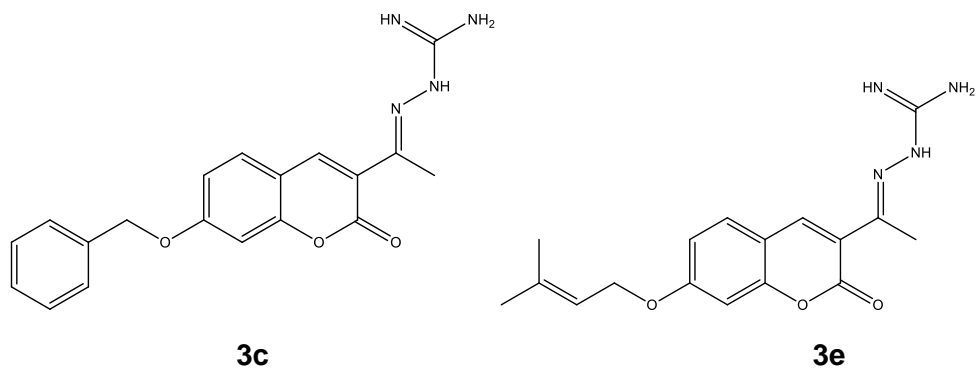


Γενική χημική δομή συντεθειμένων κουμαρινικών παραγώγων

Οι ενώσεις που συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H NMR. Στη συνέχεια μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης και της συγγενούς βουτυρυλοχολινεστεράσης μέσω της τροποποιημένης μεθόδου Ellman. Επίσης προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση, μέσω μελέτης της ικανότητας αναστολής της ρίζας DPPH.

Από τις ενώσεις που μελετήθηκαν, ως δραστικότεροι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης αναδείχθηκαν οι ενώσεις **3c** και **3e**, με $\text{IC}_{50} = 9.7\mu\text{M}$ και

9.6μM αντίστοιχα. Οι ενώσεις αυτές είχαν ακόμα ισχυρότερη δράση ως αναστολείς της βουτυρυλοχολινεστεράσης, με $IC_{50} = 6.6\mu M$ και $5,6\mu M$ αντίστοιχα. Στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής τους δράσης, οι ενώσεις που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν σημαντική δραστηριότητα.



Χημική δομή ενώσεων με την ισχυρότερη δράση

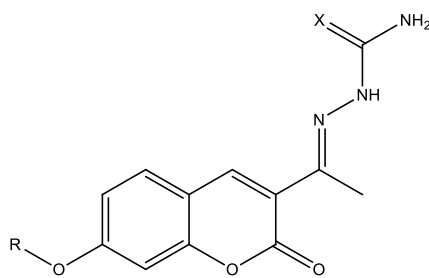
Τέλος, υπολογίστηκε η θέση πρόσδεσης των ενώσεων **3c** και **3e** στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης, μέσω της σουίτας Schrödinger[®].

Abstract

Coumarins are heterocyclic phenolic phytochemicals, belonging to the family of benzopyrones. They are present in multiple plant species and are known for their vast biological activity, including anti-inflammatory, anti-coagulating, antibacterial, antiviral, anti-cancer, and neuroprotective applications. Because of their high activity and wide application, they present a very useful scaffold for the synthesis of novel pharmaceutical compounds, pertaining to a wide range of conditions and pharmaceutical targets.

One such pharmaceutical target is acetylcholinesterase, an enzyme that catalyzes the hydrolysis of acetylcholine, one of the most significant neurotransmitters on both the central and peripheral nervous system. The enzyme's activity causes termination of the acetylcholine signal and regulates cholinergic signaling. Cholinergic signaling disruption is the cause of diseases such as myasthenia Gravis and is also present on neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. Inhibitors of acetylcholinesterase can be used to strengthen cholinergic signaling, resulting in improvement of symptoms of such conditions.

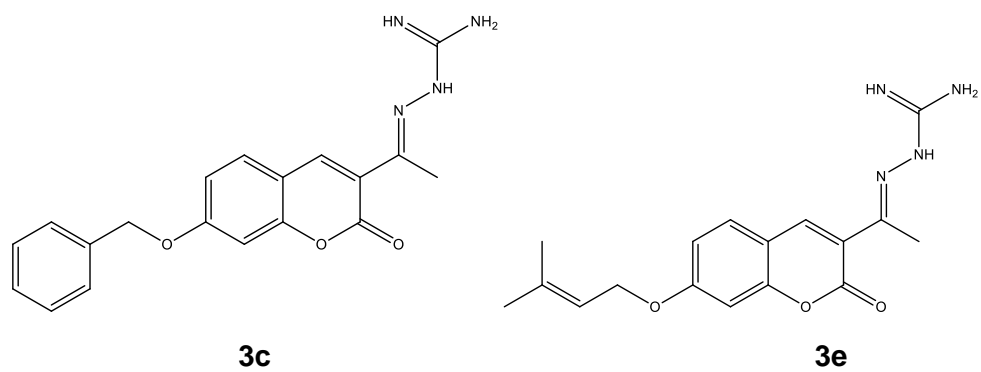
The aim of the present thesis is the design, synthesis, and characterization of novel coumarin compounds with neuroprotective activity, particularly as acetylcholinesterase inhibitors. Using Knoevenagel condensation, 3-acetyl-7-hydroxy-2H-chromen-2-one was synthesized and used as the base for the synthesis of a series of compounds. Initially, using Williamson nucleophilic substitution at the 7-position, 4 alkoxy-substituted derivatives of the base compound were synthesized. Then, using amine addition of hydrazones at the carbonyl in position 3, 10 more new coumarin derivatives were synthesized.



General chemical structure of the synthesized coumarin derivatives

The 15 compounds that were synthesized were characterized via Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ^1H NMR. Then they were evaluated for their ability to inhibit acetylcholinesterase, as well as the related butyrylcholinesterase, via modified Ellman method. Their anti-oxidant activity was also evaluated via a DPPH inhibition assay.

Of the tested compounds, strongest acetylcholinesterase inhibition activity was shown by compounds **3c** and **3e**, with $\text{IC}_{50} = 9.6\mu\text{M}$ and $9.7\mu\text{M}$ respectively. These compounds had an even stronger butyrylcholinesterase inhibition activity, with $\text{IC}_{50} = 6.6\mu\text{M}$ and $5.6\mu\text{M}$ respectively. In the anti-oxidant activity evaluation, the tested compounds did not show any significant activity.



Chemical structures of the compounds with the strongest activity

Finally, in silico docking of the compounds **3c** and **3e** on the active site of acetylcholinesterase was performed with the software suite Schrödinger®.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	4
Abstract	6
1. Εισαγωγή.....	11
1.1 Κουμαρίνες.....	11
1.1.1 Χημική Δομή και Ταξινόμηση.....	11
1.1.2 Βιοδραστικότητα κουμαρινών.....	13
1.2 Νευροδιαβίβαση ακετυλοχολίνης.....	20
1.2.1 Ακετυλοχολίνη.....	20
1.2.2 Χολινεργικές συνάψεις.....	21
1.2.3 Ακετυλοχολινεστεράση.....	22
1.3 Στοιχεία φαρμακευτικής.....	31
1.3.1 Βασικές έννοιες φαρμακευτικής.....	31
1.3.2 Ανακάλυψη νέων φαρμάκων.....	33
1.4 Φασματοσκοπία NMR.....	34
1.4.1 Αρχή της φασματοσκοπίας NMR.....	34
1.4.2 Ερμηνεία φασμάτων ¹ H NMR.....	36
1.5 Προσδιορισμός ικανότητας αναστολής των ενζύμων AChE και BuChE.....	37
1.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης.....	38
2. Σκοπός.....	40
3. Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων.....	41
3.1 Σύνθεση 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης.....	41
3.2 Σύνθεση 3-ακετυλο-7-αλκοξυ-κουμαρινικών παραγώγων.....	41
3.3 Σύνθεση κουμαρινικών υδραζονών.....	42
3.4 Μηχανισμοί αντιδράσεων.....	43
3.4.1 Μηχανισμός αντίδρασης Knoevenagel.....	43
3.4.2 Μηχανισμός σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson.....	45
3.4.3 Μηχανισμός πυρηνόφιλης προσθήκης αμινών στο καρβονύλιο.....	46
4. Μέθοδοι.....	48
4.1 Όργανα και συσκευές οργανικής σύνθεσης.....	48
4.2 Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων.....	50
4.2.1 Σύνθεση 3-ακετυλο-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (1a).....	50
4.2.2 Σύνθεση 7-αλκοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (Γενική μέθοδος A).....	50
4.2.2 3-ακετυλο-7-βενζυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (2a).....	50
4.2.4 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (2b).....	51

4.2.5 3-ακετυλο-7-κινναμυλοξυ-2 <i>H</i> -χρωμεν-2-όνη (2c).....	51
4.2.6 3-ακετυλο-7-(3-φαινυλ-προπαν)οξυ-2 <i>H</i> -χρωμεν-2-όνη (2d)	52
4.2.7 3-ακετυλο-7-βουτυλοξυ-2 <i>H</i> -χρωμεν-2-όνη (2e)	52
4.2.8 3-ακετυλο-7-οκτυλοξυ-2 <i>H</i> -χρωμεν-2-όνη (2f)	52
4.2.9 3-ακετυλο-7-(2-βρωμο-αιθυλ)οξυ-2 <i>H</i> -χρωμεν-2-όνη (2g).....	53
4.2.10 3-ακετυλο-7-(4-υδροξυ-βενζυλ)οξυ-2 <i>H</i> -χρωμεν-2-όνη (2g)	53
4.2.11 Σύνθεση κουμαρινικών υδραζονών (Γενική μέθοδος B).....	53
4.2.12 (<i>E</i>)-2(1-(7-υδροξυ-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3a)	54
4.2.13 (<i>E</i>)-2(1-(7-υδροξυ-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξαμίδιο (3b)	54
4.2.14 (<i>E</i>)-2(1-(7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3c).....	55
4.2.15 (<i>E</i>)-2(1-(7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3d)	55
4.2.16 (<i>E</i>)-2(1-(7-(πρενυλοξυ)-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3e).....	56
4.2.17 (<i>E</i>)-2(1-(7-(πρενυλοξυ)-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3f)	56
4.2.18 (<i>E</i>)-2(1-(7-(κινναμυλοξυ)-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3g).....	57
4.2.19 (<i>E</i>)-2(1-(7-(κινναμυλοξυ)-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3h)	57
4.2.20 (<i>E</i>)-2(1-(7-((3-φαινυλ-προπαν)οξυ)-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3i).....	58
4.2.21 (<i>E</i>)-2(1-(7-((3-φαινυλ-προπαν)οξυ)-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3j)	58
4.3 Αναστολή AChE.....	59
4.3.1 Υλικά και Όργανα.....	59
4.3.2 Πειραματική Διαδικασία	59
4.4 Αναστολή BuChE.....	61
4.4.1 Υλικά και όργανα:	61
4.4.2 Πειραματική διαδικασία	61
4.5 Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης	61
4.5.1 Υλικά και όργανα	61
4.5.2 Πειραματική διαδικασία	62
4.6 In silico ligand binding	62
4.6.1 Λογισμικό.....	62

4.6.2 Μεθοδολογία	62
5. Αποτελέσματα-Συζήτηση	65
5.1 Φασματοσκοπική μελέτη	65
5.2 Αξιολόγηση δράσης αναστολής AChE	72
5.3 Αξιολόγηση δράσης ως αναστολείς BuChE	77
5.4 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης.....	81
5.5 Ligand Docking.....	83
6. Συμπεράσματα	85
7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	87
Βιβλιογραφία.....	88
Παράρτημα Φασμάτων ¹ H NMR.....	95
Ευρετήρια	108
Ευρετήριο Εικόνων	108
Ευρετήριο Σχημάτων	108
Ευρετήριο Πινάκων	109

1.Εισαγωγή

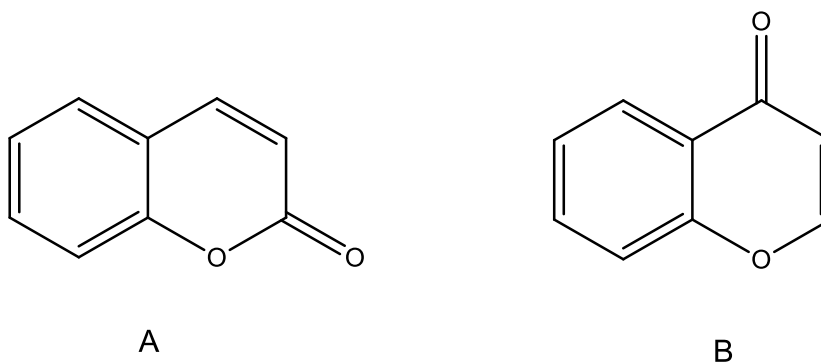
1.1 Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες είναι μία τάξη πολυφαινολικών ενώσεων, οι οποίες απαντώνται κυρίως σε φυτά. Απομονώθηκαν πρώτη φορά από τον Vogel το 1820 σε καρπούς τόνκα (tonka beans), του φυτού Διπτέρυξ η εύοσμος (*Dipteryx odorata*), γνωστό στην καθομιλουμένη και ως “coumaroun” [1].

Συνολικά, 800 κουμαρινικά παράγωγα έχουν εντοπιστεί σε 600 διαφορετικά είδη φυτών, κυρίως σε εσπεριδοειδή (Rutaceae) και σεληνοειδή (Ariaceae). Αν και σχεδόν όλες οι φυσικές κουμαρίνες εντοπίζονται σε φυτά, κάποιες κουμαρίνες όπως η νοβοβιοκίνη έχουν απομονωθεί από μικροβιακές πηγές.

1.1.1 Χημική Δομή και Ταξινόμηση

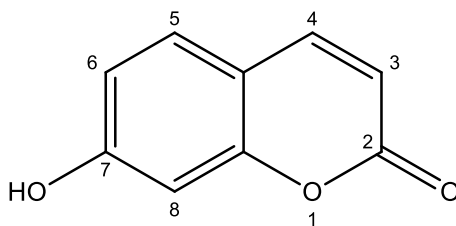
Οι κουμαρίνες ανήκουν στις βενζοπυρόνες, δηλαδή πολυκυκλικές ενώσεις που προκύπτουν από τη συμπύκνωση πυρονών και βενζολίου. Οι πυρόνες είναι κετονικά παράγωγα του πυρανίου και αποτελούν συχνά τον σκελετό φυτοχημικών ενώσεων [1]. Ανάλογα με τη θέση της καρβονυλικής ομάδας στον εξαμελή δακτύλιο, διακρίνονται σε α-πυρόνες και γ-πυρόνες. Από τις ενώσεις αυτές προκύπτουν δευτερογενείς μεταβολίτες από συμπύκνωση με το βενζόλιο, οι κουμαρίνες (βένζο-α-πυρόνες) και οι χρωμόνες (βένζο-γ-πυρόνες) [2],[3].



Σχήμα 1: Χημική δομή κουμαρίνης (A) και χρωμόνης (B)

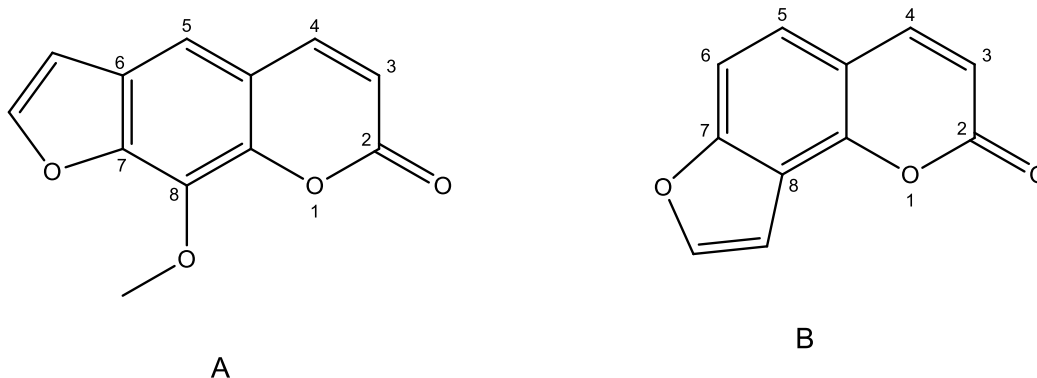
Οι κουμαρίνες κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες, απλές κουμαρίνες, φουρανοκουμαρίνες, πυρανοκουμαρίνες και κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο [4].

Οι απλές κουμαρίνες αποτελούνται από υδροξυλιωμένα, αλκοξυλιωμένα και αλκυλιωμένα παράγωγα της κουμαρίνης (Σχήμα 1A), καθώς και τους γλυκοζίτες τους [4]. Παράδειγμα τέτοιας ένωσης είναι η ουμπελιφερόνη, η οποία χρησιμοποιείται σε αντιηλιακά [5], ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι έχει αντιμεταλλαξιογόνο, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονική δράση [6][7]



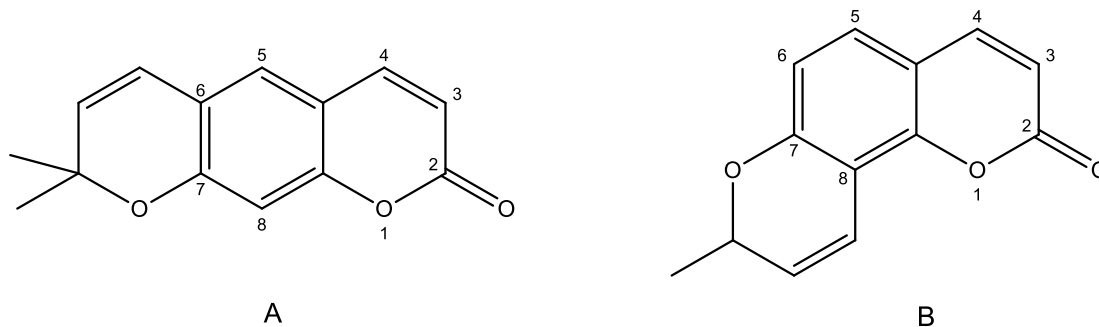
Σχήμα 2: Χημική δομή ουμπελιφερόνης (7-υδροξυ-κουμαρίνης)

Οι φουρανοκουμαρίνες είναι κουμαρινικές ενώσεις συνδεδεμένες με έναν πενταμελή δακτύλιο φουρανίου. Ανάλογα με τη θέση πρόσδεσης του φουρανίου στην κουμαρίνη διακρίνονται σε γραμμικές (συνδεδεμένες στην C6/C7 θέση) και γωνιακές (συνδεδεμένες στην C7/C8 θέση) [8]. Παράδειγμα γραμμικής φουρανοκουμαρίνης είναι η ξανθοτοξίνη, ενώ παράδειγμα γωνιακής φουρανοκουμαρίνης είναι η αγγελικίνη. Και οι δύο αυτές ενώσεις χρησιμοποιούνται για την θεραπεία ασθενειών όπως η ψωρίαση [9][10].



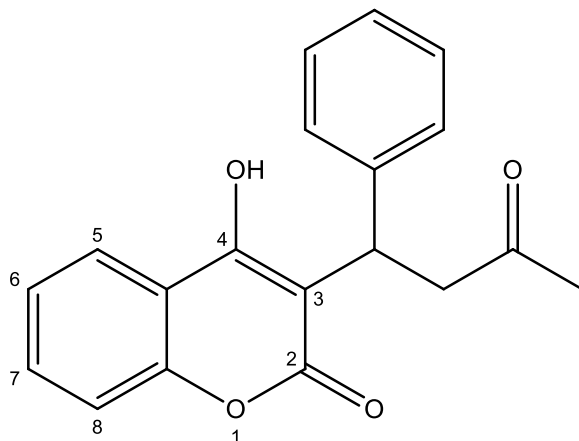
Σχήμα 3: Χημική δομή ξανθοτοξίνης (A) και αγγελικίνης (B)

Η πυρανοκουμαρίνες είναι κουμαρινικές ενώσεις συνδεδεμένες με έναν εξαμελή δακτύλιο πυρανόσιου, είτε γραμμικά στην C6/C7 θέση, είτε γωνιακά στην C7/C8 θέση [11]. Παραδείγματα πυροκουμαρινών είναι η ξανθιλετίνη (γραμμική) και η σεσελίνη (γωνιακή).



Σχήμα 4: Χημική δομή ξανθιλετίνης (A) και σεσελίνης (B)

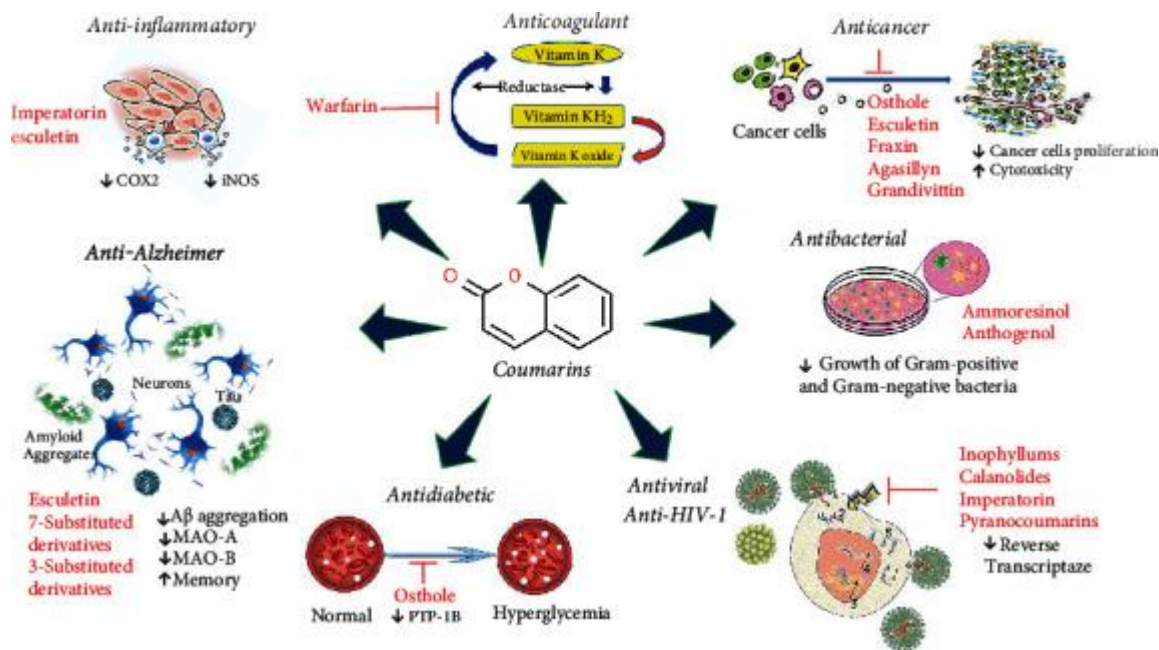
Οι κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο μπορεί να είναι υποκατεστημένες στη θέση 3, στη θέση 4 ή και στις δύο θέσεις. Μπορεί επίσης να προκύψουν από συμπύκνωση βενζολίου στον 3-4 δεσμό [8]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας ένωσης είναι η βαρφαρίνη, μία 4-υδρόξυ κουμαρίνη, η οποία χρησιμοποιείται σαν αντιπηκτικό, λόγω της δράσης της ως αναστολέας της βιταμίνης Κ [12].



Σχήμα 5: Χημική δομή βαρφαρίνης

1.1.2 Βιοδραστικότητα κουμαρινών

Οι κουμαρίνες έχουν μελετηθεί για ευρεία φαρμακολογική δράση τους. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 6, οι κουμαρίνες έχουν μεταξύ άλλων αντιφλεγμονώδη, αντιπηκτική, αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή, αντιική, και νευροπροστατευτική δράση [13][14][15][16][17][18][19]

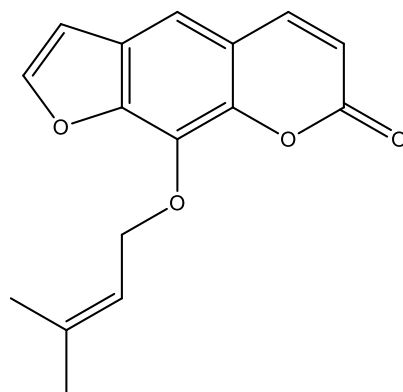


Εικόνα 1: Σύνοψη φαρμακολογικής δράσης κουμαρινών [19]

1.1.2.1 Αντιφλεγμονώδης δράση

Φλεγμονή είναι η ανοσολογική απόκριση σε επιβλαβή ερεθίσματα, όπως παθογενείς μικροοργανισμούς, κυτταρική ζημιά, τοξικές ενώσεις ή ακτινοβολία [20]. Χαρακτηρίζεται από τοπικό πόνο, διόγκωση του παθόντος ιστού, ερυθρότητα, τοπική αύξηση της θερμοκρασίας και απώλεια λειτουργικότητας του ιστού [21]. Προκαλείται από την έκκριση φλεγμονωδών ουσιών, οι οποίες προκαλούν αύξηση της περατότητας των αιμοφόρων αγγείων στην περιοχή και εισβολή λευκοκυττάρων [22]. Χρόνιες φλεγμονές φαίνεται επίσης να σχετίζονται με την εμφάνιση πολλών μορφών καρκίνου, συνεπώς η αντιμετώπιση φλεγμονών κρίνεται σημαντική για την πρόληψη σοβαρότερων νοσημάτων [23].

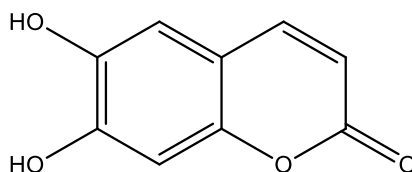
Οι κουμαρίνες φαίνεται να έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, μέσω της αναστολής ενζύμων που παράγουν φλεγμονώδεις ουσίες. Ένα παράγωγο της κουμαρίνης η ιμπερατορίνη έχει φανεί να έχει αντιφλεγμονώδη δράση, τόσο σε *in vitro* μοντέλα με μακροφάγα ποντικού (RAW264.7), καθώς και σε *in vivo* μοντέλο ποντικών με οίδημα λόγω έκθεσης σε καραγενάνη.



Σχήμα 6: Χημική δομή ιμπερατορίνης

Ο μηχανισμός δράσης φαίνεται να ήταν η αναστολή της έκφρασης των ενζύμων COX-2 και iNOS στα ενεργοποιημένα κύτταρα RAW264.7 [24], τα οποία ένζυμα είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση φλεγμονωδών ενώσεων όπως η προσταγλανδίνη E-2 και του αγγειοδιασταλτικού NO αντίστοιχα.

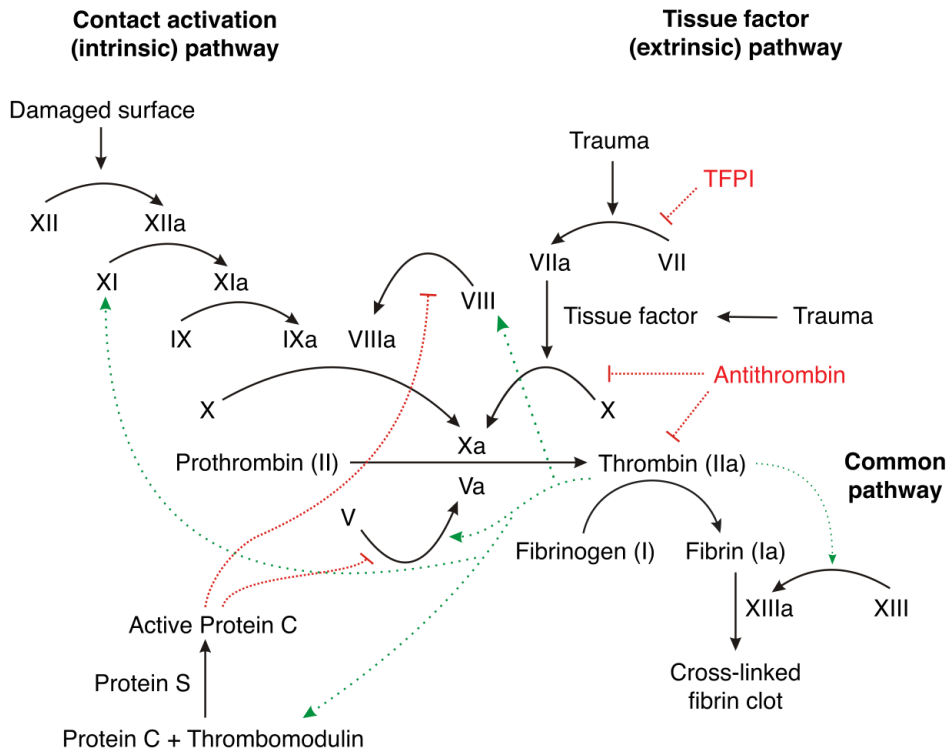
Ένα άλλο κουμαρινικό παράγωγο με φαινόμενη αντιφλεγμονώδη δράση είναι η εσκουλετίνη, η οποία έχει φανεί να έχει αντιφλεγμονώδη δράση σε *in vivo* μοντέλα ποντικών με κολίτιδα λόγω έκθεσης σε τρινιτροβενζυλο-σουλφονικό οξύ και χρησιμοποιείται σαν ένωση οδηγός για άλλες αντιφλεγμονώδεις ενώσεις [25]. Ο μηχανισμός δράσης της φαίνεται να είναι η αναστολή της 5-λιποξυγενάσης, η οποία καταλύει την οξειδωση λιπαρών οξέων σε υπεροξειδία [26]. Οι κουμαρίνες γενικότερα φαίνεται να έχουν αντιοξειδωτική δράση, η οποία σχετίζεται και με την αντιφλεγμονώδη δράση τους [27]



Σχήμα 7: Χημική δομή εσκουλετίνης

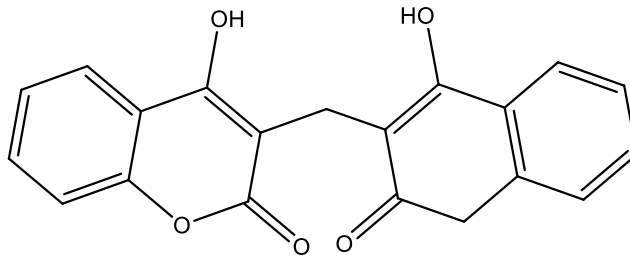
1.1.2.2 Αντιπηκτική δράση

Η πήξη του αίματος προκαλείται σαν συνέπεια τραυματισμού αιμοφόρων αγγείων και οδηγεί στην μετατροπή του αίματος σε θρόμβο. Η διεργασία αυτή περιλαμβάνει αφενός την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και αφετέρου τον σχηματισμό ινικής (fibrin), η οποία σχηματίζει ένα πλέγμα, πάνω στο οποίο τα αιμοπετάλια εναποτίθενται για τον σχηματισμό θρόμβου. Η διαδικασία παραγωγής της ινικής ονομάζεται καταρράκτης πήξης και περιλαμβάνει ένα περίπλοκο σύστημα αλληλεπιδράσεων μεταξύ παραγόντων πήξης.



Εικόνα 2: Καταρράκτης πήξης [28]. Οι λατινικοί αριθμοί αναφέρονται σε διαφορετικούς παράγοντες πήξης, ενώ η κατάληξη α αναφέρεται σε ενεργοποιημένη μορφή τους.

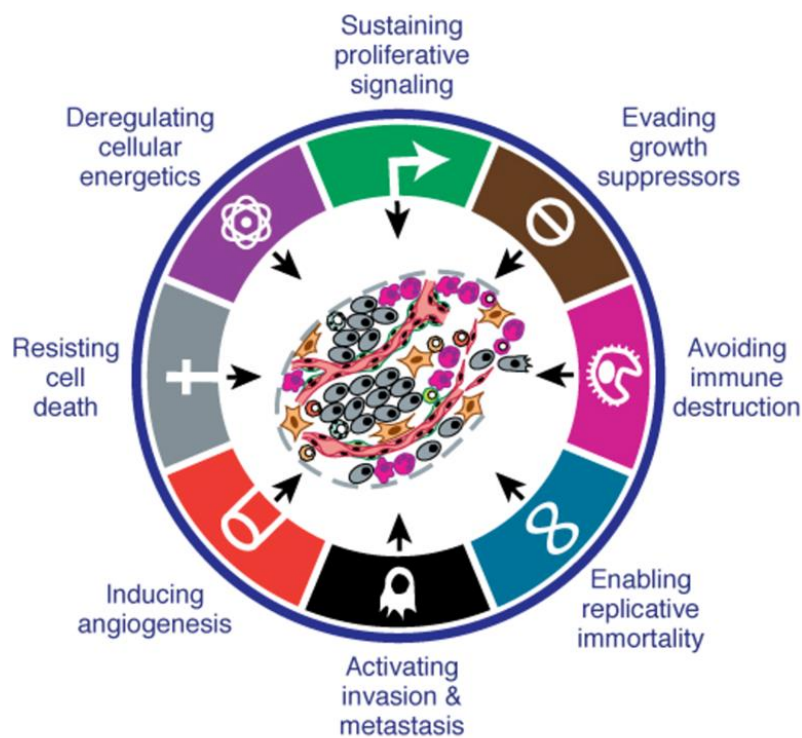
Για την παραγωγή των παραγόντων πήξης II, VII, IX και X από το ένζυμο γαμμα-γλουταμυλ-καρβοξυλάση είναι απαραίτητη η βιταμίνη K και συγκεκριμένα η ανηγμένη μορφή της Vit K_{H2}, η οποία μετατρέπεται από τη δράση του ενζύμου σε Vit K epoxide [29]. Η οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης K στη συνέχεια ανακυκλώνεται από το ένζυμο VKOR (Vitamin K epoxide reductase). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η βαρφαρίνη, ένα παράγωγο της κουμαρίνης, λειτουργεί σαν αντιπηκτικό. Ο μηχανισμός δράσης της είναι αναστολή του ενζύμου VKOR, αποτρέποντας την ανακύκλωση της βιταμίνης K και συνεπώς αναστέλλοντας τη δράση της [12]. Με παρόμοιο τρόπο λειτουργεί και η δικουμαρόλη, μία ακόμη κουμαρινική ένωση που χρησιμοποιείται σαν αντιπηκτικό [30].



Σχήμα 8: Χημική δομή δικουμαρόλης

1.1.2.3 Αντικαρκινική δράση

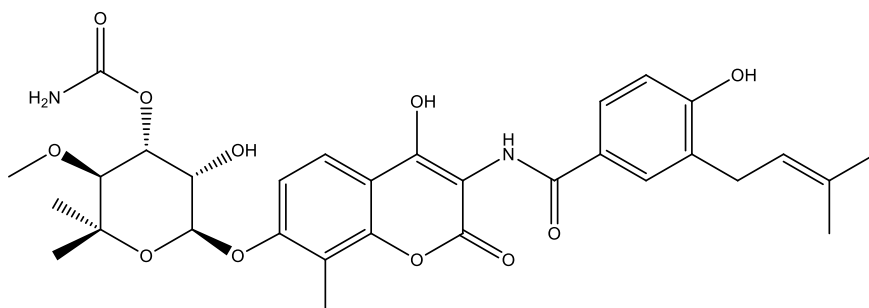
Ο καρκίνος είναι μία από τις πιο πολυμορφικές μορφές ασθένειας, με κάθε περίπτωση να παρουσιάζει ένα μοναδικό σύνολο μεταλλάξεων. Παρ' όλα αυτά, όλες οι περιπτώσεις καρκίνου επιδεικνύουν κάποια σημάδια (hallmarks) τα οποία επιτρέπουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Τέτοια σημάδια είναι για παράδειγμα η καταστολή των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, η αποφυγή της καταστροφής τους από το ανοσοποιητικό σύστημα και η επαγωγή αγγειογένεσης.



Εικόνα 3: Χαρακτηριστικά σημάδια του καρκίνου [31]

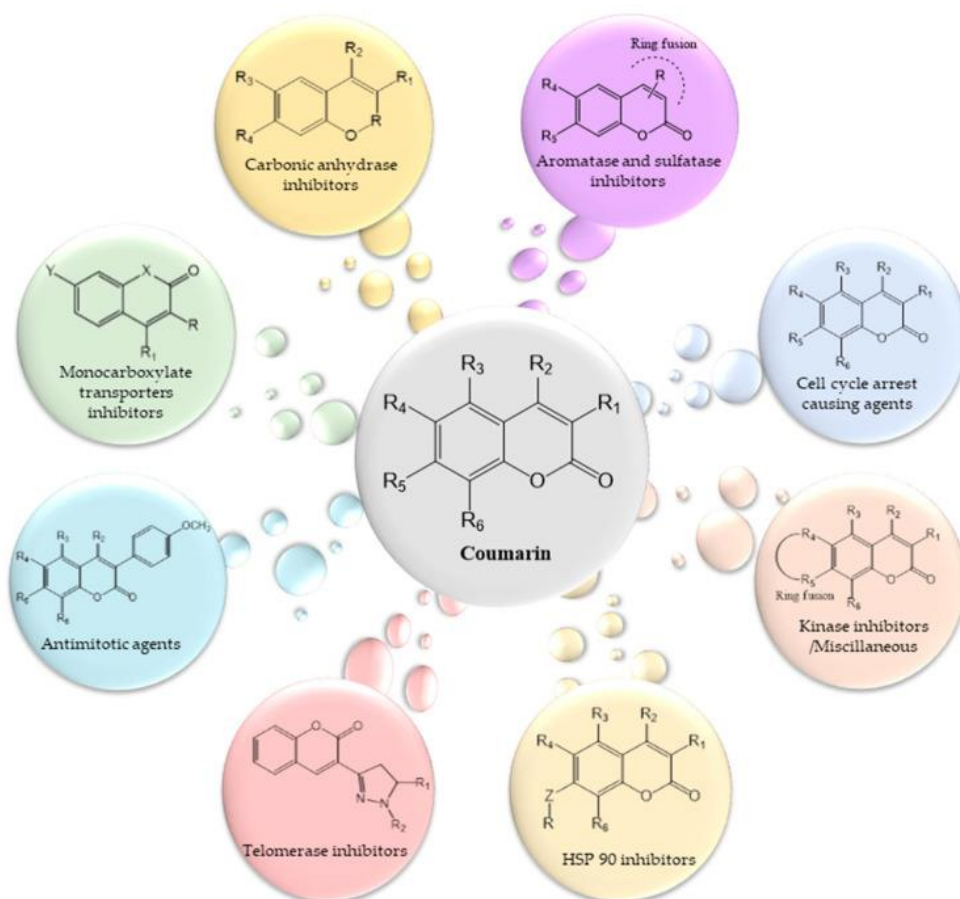
Οι κουμαρίνες φαίνεται να εκδηλώνουν αντικαρκινική δράση διαταράσσοντας τις λειτουργίες αυτές, ιδιαίτερα όσον αφορά την επιβολή κυτταρικού θανάτου και την αποτροπή του πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, η κουμαρίνη και τα παράγωγά της φαίνεται να λειτουργούν σαν αλλοστερικοί αναστολείς των ενζύμων MEK1/2, τα οποία συμμετέχουν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου [32]. Μία άλλη κουμαρίνη, η νοβοβιοκίνη φαίνεται να αναστέλλει το ένζυμο Hsp90, το οποίο

συμβάλλει στη σωστή πτύχωση των πρωτεϊνών, επάγοντας έτσι τον κυτταρικό θάνατο [3].



Σχήμα 9: Χημική δομή νοβοθοκίνης

Λόγω της πολυμορφίας του καρκίνου σαν νόσος, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι κουμαρίνες και τα ανάλογά τους εμφανίζουν αντικαρκινική δράση είναι εξίσου πολύμορφοι. Στην Εικόνα 6 συνοψίζονται οι κυριότεροι από τους μηχανισμούς αυτούς, καθώς και οι χημικές δομές των κουμαρινών που επιδεικνύουν την ανάλογη δράση.

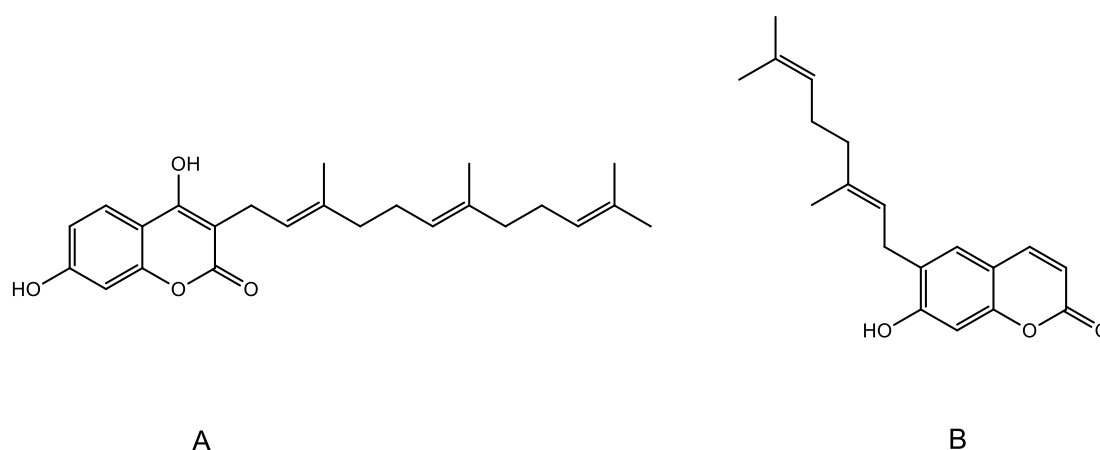


Εικόνα 4: Αντικαρκινικοί μηχανισμοί των κουμαρινών με σχέση δομής-δράσης [3]

1.1.2.4 Αντιβακτηριδιακή δράση

Λόγω της αύξησης της μικροβιακής ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, καθίσταται αναγκαία η εύρεση νέων αντιβιοτικών ενώσεων. Μία νέα τέτοια προσέγγιση, η οποία έχει επιδείξει καλές δυνατότητες είναι ο συνδυασμός φυτοχημικών με αντιβακτηριδιακή δράση και συμβατικών αντιβιοτικών [33].

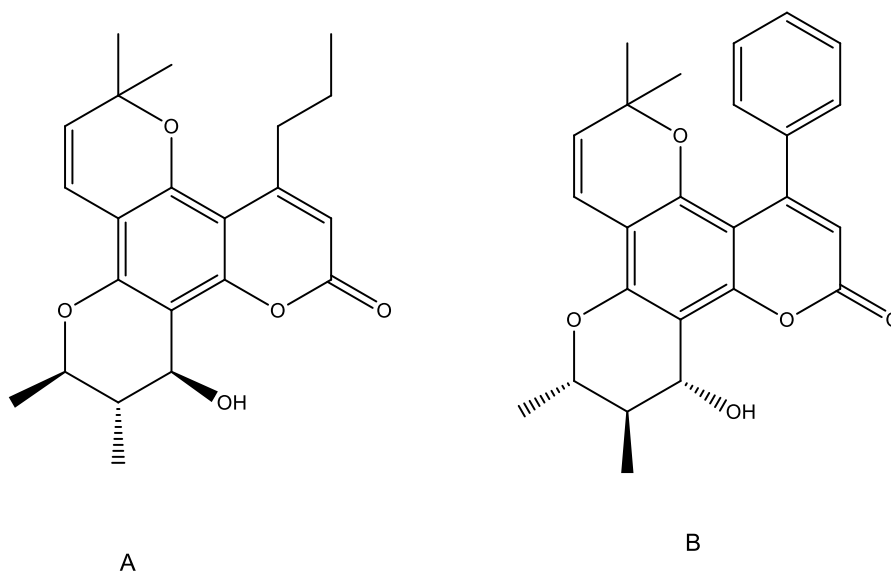
Οι κουμαρίνες έχουν αναφερθεί να έχουν αντιβακτηριδιακή δράση, τόσο έναντι Gram+ και Gram- βακτηριδίων. Το πιο σημαντικό κουμαρινικό αντιβιοτικό είναι η νοβοβοκίνη, η οποία χρησιμοποιείται έναντι Gram+ βακτηρίων όπως ο *Staphylococcus epidermidis*, ενώ έχει δείξει και δράση έναντι βακτηρίων με ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, όπως ο *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) [34]. Ο μηχανισμός αντιβακτηριδιακής δράσης της νοβοβοκίνης είναι η αναστολή της DNA γυράσης, μέσω πρόσδεσης στην B υποομάδα της [35]. Άλλες κουμαρίνες με αντιβακτηριδιακή δράση έναντι Gram+ βακτηρίων είναι κουμαρίνες με μεγάλες πλευρικές αλυσίδες, όπως η αμμορεσινόλη και η οστρουθίνη, οι οποίες είναι αποτελεσματικές έναντι των *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysodeikticus*, και *Staphylococcus aureus* [36]. Τέλος, η ιμπερατορίνη φαίνεται να αναστέλλει την ανάπτυξη του Gram- βακτηρίου *Shigella dysenteriae* [37]



Σχήμα 10: Χημική δομή αμμορεσινόλης (A) και οστρουθίνης (B)

1.1.2.5 Αντική δράση

Οι κουμαρίνη και ιδιαίτερα παράγωγά της όπως τα ινοφύλλα και τα καλανολίδια, παρουσιάζουν δράση έναντι του HIV και συγκεκριμένα του HIV-1. Ο μηχανισμός δράσης τους είναι η αναστολή της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV-1, αποτρέποντας τον πολλαπλασιασμό του ιού [38],[39]. Τόσο τα ινοφύλλα όσο και τα καλανολίδια περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό μορίων με δράση έναντι της αντίστροφης μεταγραφάσης τους HIV-1, με πιο σημαντικά τα καλανολίδιο A και ινοφύλλο B. Η ιμπερατορίνη έχει επίσης ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό του HIV-1, αλλά ο μηχανισμός δράσης της δεν περιλαμβάνει την αντίστροφη μεταγραφάση, αλλά την αναστολή του μηχανισμού του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 [40]

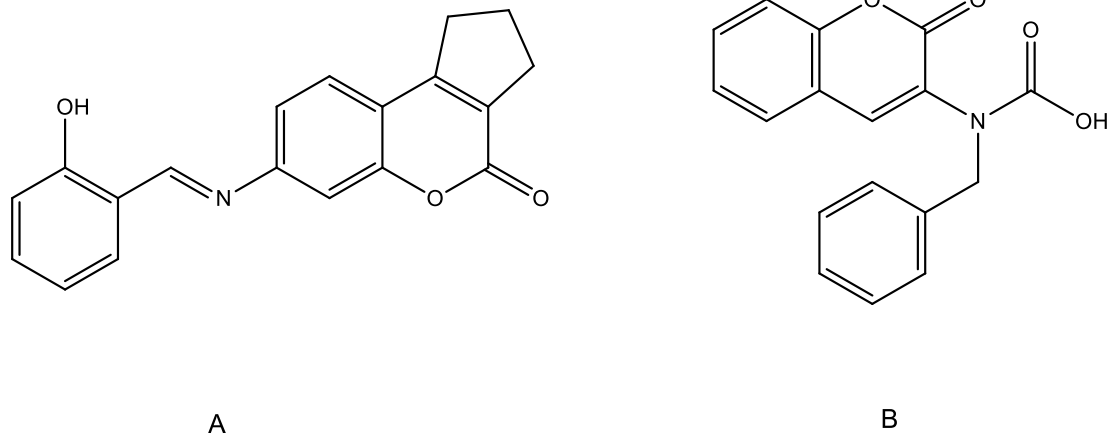


Σχήμα 11: Χημική δομή καλονολιδίου A (A) και ισοφύλλου B (B)

1.1.2.6 Νευροπροστατευτική δράση

Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι χαρακτηρίζονται από προοδευτικό νευρωνικό θάνατο ή συναπτική δυσλειτουργία και συνήθως οφείλονται σε συσσώρευση πρωτεϊνών οι οποίες είτε προκαλούν τον θάνατο νευρώνων είτε διαταράσσουν τις νευρικές συνάψεις [41]. Τα συμπτώματά τους περιλαμβάνουν δυσκολία στην κίνηση, την ομιλία, την μνήμη και άλλες εγκεφαλικές λειτουργίες, ανάλογα με την περιοχή του νευρικού συστήματος η οποία προσβάλλεται. Οι μέχρι στιγμής θεραπείες σε νευροεκφυλιστικές νόσους συνίστανται σε ενίσχυση του απολεσθέντος νευροδιαβιβαστικού σήματος, ώστε να αμβλύνουν τα συμπτώματα, χωρίς όμως να απευθύνουν το αίτιο της νόσου.

Οι κουμαρίνες έχουν δείξει δυναμική σαν υποψήφιες θεραπείες νευροεκφυλιστικών ασθενειών, επηρεάζοντας διαφορετικούς μηχανισμούς του νευρικού συστήματος. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι το βενζυλ(κουμαριν-3-υλ)καρβαμικό οξύ δρα σαν επιλεκτικός αναστολέας της μονοαμινοξειδάσης B (MAO-B), με δραστηριότητα συγκρίσιμη με τη σελεγγιλίνη, την ένωση αναφοράς [42]. Η MAO είναι σημαντικός φαρμακευτικός στόχος γιατί καταλύει την οξειδωση μονοαμινών, όπως η αδρεναλίνη, ή σεροτονίνη και η ντοπαμίνη, τερματίζοντας το διαβιβαστικό τους σήμα [43]. Δεδομένου του ότι οι μονοαμίνες αυτές είναι μερικοί από τους πιο διαδεδομένους νευροδιαβιβαστές, τόσο στο κεντρικό, όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, οι αναστολείς της MAO μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν θεραπείες σε ένα εύρος ασθενειών, όπως η κατάθλιψη, ή η νόσους του Πάρκινσον. Άλλες κουμαρίνες με νευροπροστατευτική δράση είναι η (E)-7-((2-υδροξυβενζυλιδεν)αμινο)-2,3-διυδροκυκλοπενταν-κουμαρίνη, η οποία σε *in vitro* μελέτες έδειξε αναστολή της συσσωμάτωσης β-αμυλοϊδών πεπτιδίων, που σχετίζεται με τη νόσο του Αλτσχάιμερ [44], και η εσκουλετίνη η οποία έδειξε περιορισμού του κυτταρικού θανάτου μετά από ισχαιμικό επεισόδιο σε *in vivo* μελέτες σε ποντίκια [45]



Σχήμα 12: Χημική δομή βενζυλ(κουμαριν-3-υλ)καρβαμικού οξέος (Α) και (Ε)-7-((2-υδροξυ-βενζυλιδεν)αμινο)-2,3-διυδροκυκλοπενταν-κουμαρίνης (Β).

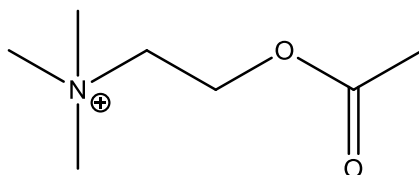
1.1.2.7 Τοξικότητα

Η κουμαρίνη έχει δείξει υπατοτοξική και καρκινογενή δράση σε *in vivo* μελέτες σε ποντίκια [46],[47] και ο FDA έχει απαγορεύσει τη χρήση της σαν πρόσθετο σε τρόφιμα [48]. Παρ' όλα αυτά, χρειάζεται προσοχή στη συσχέτιση της τοξικότητας της κουμαρίνης ανάμεσα σε ζώα και στον άνθρωπο. *In vitro* μελέτες σε ανθρώπινα υπατικά κύτταρα έχουν δείξει σχετική ανθεκτικότητα στην τοξικότητα της κουμαρίνης, η οποία σχετίζεται με την υδροξυλίωση στη θέση 7, τον κύριο μηχανισμό μεταβολισμού της κουμαρίνης [46]. Ακόμη και σε άτομα με ανεπαρκή επίπεδα 7-υδροξυλάσης, η έκθεση σε χαμηλά επίπεδα κουμαρίνης από διατροφικά ή καλλυντικά προϊόντα δεν έδειξε υπατοτοξικότητα [49].

1.2 Νευροδιαβίβαση ακετυλοχολίνης

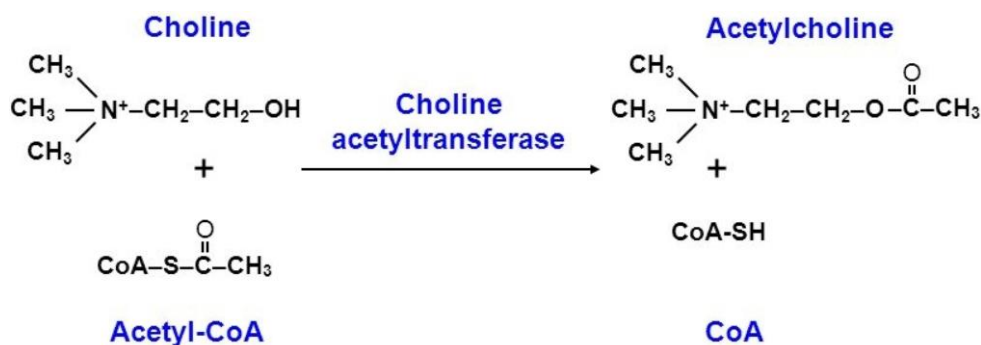
1.2.1 Ακετυλοχολίνη

Η ακετυλοχολίνη (ACh) είναι μία χημική ένωση που λειτουργεί σαν νευροδιαβιβαστής στο ανθρώπινο νευρικό σύστημα, δηλαδή λειτουργεί ως χημικό μήνυμα μεταξύ νευρώνων για τη διάδοση της νευρικής ώσης. Η χημική της δομή είναι ενός εστέρας της χολίνης με το οξικό οξύ.



Σχήμα 13: Χημική δομή ακετυλοχολίνης

Η ακετυλοχολίνη βιοσυντίθεται στους νευρώνες μέσω μίας αντίδρασης της χολίνης με το ακετυλοσυνένζυμο Α (Acetyl-CoA), καταλυόμενη από το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση χολίνης.



Σχήμα 14: Αντίδραση σύνθεσης ακετυλοχολίνης

1.2.2 Χολινεργικές συνάψεις

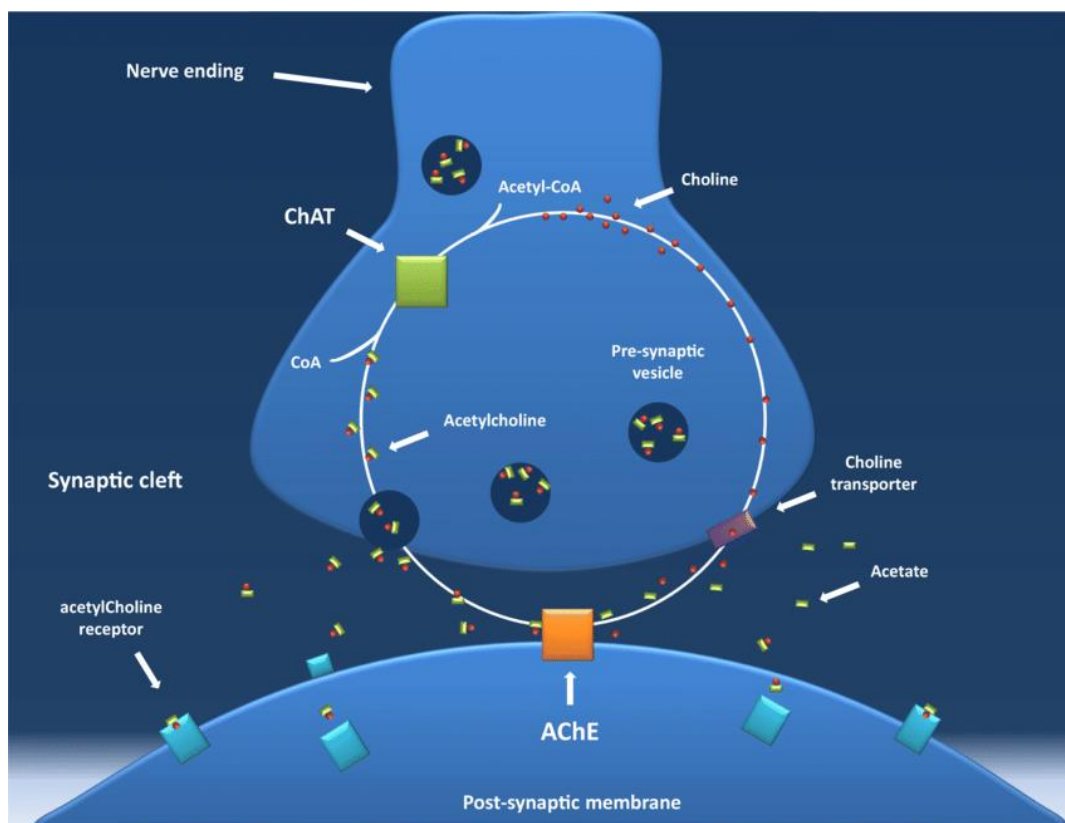
Νευρικές συνάψεις ονομάζονται οι δομές που επιτρέπουν σε έναν νευρώνα να μεταφέρει το σήμα της νευρικής ώσης σε ένα άλλο κύτταρο, είτε ηλεκτρικά, είτε συνηθέστερα χημικά μέσω νευροδιαβιβαστών. Χολινεργικές συνάψεις ονομάζονται οι νευρικές συνάψεις στις οποίες η ακετυλοχολίνη δρα ως νευροδιαβιβαστής. Απαντώνται τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου [50], όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, στα γάγγλια και στους νευρομυϊκούς κόμβους.

Η ανατομία των χολινεργικών συνάψεων περιλαμβάνει τον προσυναπτικό νευρώνα και το μετασυναπτικό κύτταρο, το οποίο είναι είτε ένας άλλος νευρώνας, είτε ένα μυϊκό κύτταρο στην περίπτωση του νευρομυϊκού κόμβου. Ανάμεσα στην προσυναπτική και τη μετασυναπτική μεμβράνη υπάρχει ένα χάσμα περίπου 50nm, τη συναπτική σχισμή. Στον προσυναπτικό νευρώνα, η ακετυλοχολίνη συντίθεται από χολίνη και ακετυλοσυνένζυμο Α και συγκεντρώνεται σε κυστίδια, τα οποία με τη σειρά τους μεταναστεύουν στις ενεργές ζώνες της προσυναπτικής μεμβράνης. Οι ενεργές ζώνες αυτές είναι περιοχές της προσυναπτικής μεμβράνης στις οποίες εντοπίζονται μεμβρανικές πρωτεΐνες (συνταξίνη και SNAP-25), οι οποίες δημιουργούν σύμπλοκα με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του κυστιδίου (συναπτομπρεβίνη και συναπτοταγμίνη), προσδένοντας το κυστίδιο στη μεμβράνη [51]. Στις ενεργές ζώνες υπάρχει επίσης μεγάλη συγκέντρωση καναλιών ασβεστίου (Ca²⁺). Μόλις το ηλεκτρικό σήμα της νευρικής ώσης φτάσει στο τερματικό του νευρώνα, τα κανάλια αυτά ανοίγουν, επιτρέποντας σε ιόντα ασβεστίου να εισέλθουν στο κύτταρο. Τα ιόντα ασβεστίου προσδένονται στην συναπτοταγμίνη, και οι αλλαγές στη διαμόρφωση του πρωτεϊνικού συμπλόκου προκαλούν εξωκυττάρωση της ακετυλοχολίνης, η οποία διασχίζει τη συναπτική σχισμή και προσδένεται σε υποδοχείς στην μετασυναπτική μεμβράνη, μεταφέροντας το νευρικό σήμα [52].

Οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης χωρίζονται σε νικοτινικούς και μουσκαρινικούς, επειδή ανταποκρίνονται στη νικοτίνη και τη μουσκαρίνη αντίστοιχα. Οι νικοτινικοί υποδοχείς είναι ιονοτροπικοί, δηλαδή αποτελούν οι ίδιοι κανάλια ιόντων που ανοίγουν με την πρόσδεση της ακετυλοχολίνης, ενώ οι μουσκαρινικοί υποδοχείς είναι μεταβοτροπικοί, δηλαδή συνδέονται με G-πρωτεΐνες, οι οποίες ενεργοποιούν δευτερογενείς μηχανισμούς στο κύτταρο, όπως η σύνθεση cAMP. Οι νικοτινικοί υποδοχείς εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και τους νευρομυϊκούς κόμβους, ενώ οι μουσκαρινικοί υποδοχείς εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στα γάγγλια του περιφερικού νευρικού συστήματος [53].

Για τον τερματισμό του νευρικού σήματος, το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (Acetylcholinesterase - AChE), το οποίο βρίσκεται στην συναπτική σχισμή, υδρολύει

την ακετυλοχολίνη σε οξικό οξύ και χολίνη, η οποία ανακυκλώνεται στην προσυναπτική μεμβράνη από μεταφορείς χολίνης [51].



Εικόνα 5: Αναπαράσταση χολινεργικής σύναψης [54]

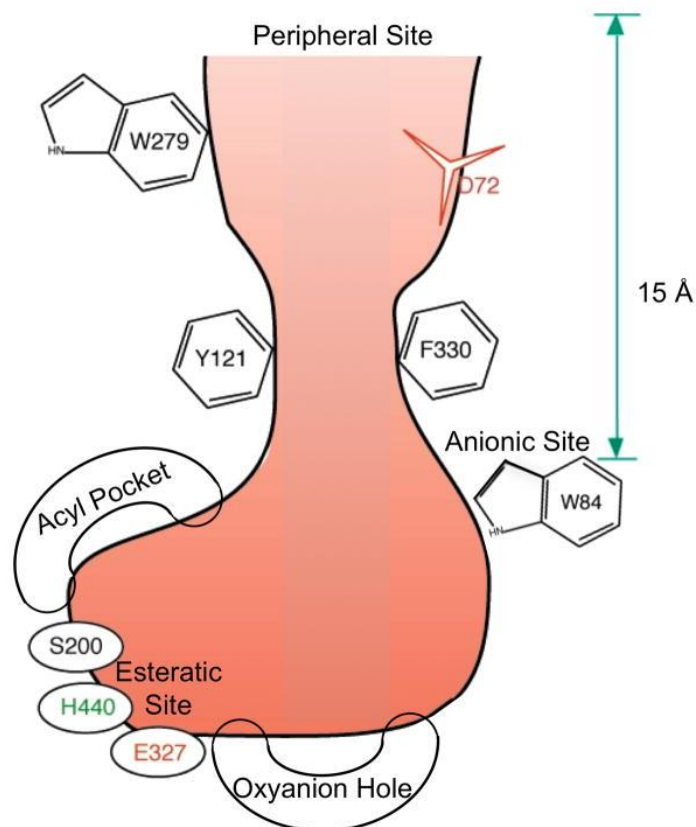
Οι χολινεργικές συνάψεις έχουν παθολογική σημασία, καθώς είναι ο στόχος τοξινών όπως η νευροτοξίνη του τετάνου (TeNT) και οι αλλαντικές νευροτοξίνες (BoNT ή BOTOX), οι οποίες δρουν στο σύμπλοκο των κυστιδικών και προσυναπτικών πρωτεϊνών, προκαλώντας τονική ή χαλαρή παράλυση αντίστοιχα.

1.2.3 Ακετυλοχολινεστεράση

Η AChE είναι μία εστεράση σερίνης, δηλαδή καταλύει την υδρόλυση εστέρων μέσω ενός υπολειμματος σερίνης στο ενεργό κέντρο. Στον άνθρωπο κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο στο χρωμόσωμα 7 (7q22), και εντοπίζεται σε πληθώρα δομικών μορφών, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο συναντάται [55]. Οι διαφορές μεταξύ των μορφών αυτών αφορούν κυρίως την τεταρτοταγή δομή του ενζύμου και καθορίζουν εάν είναι διαλυτό ή δεσμευμένο σε μεμβράνη, καθώς και την κατάσταση πολυμερισμού του, με μονομερείς, διμερείς και τετραμερείς μορφές να είναι γνωστές [56]. Σε όλες τις μορφές του ενζύμου όμως, ο πυρήνας του ενζύμου που περιλαμβάνει το ενεργό κέντρο διατηρείται.

1.2.3.1 Δομή AChE

Το μονομερές του ενζύμου έχει ελλειψοειδές σχήμα διαστάσεων 45*60*65Å και περιέχει 12 κεντρικά β' πτυχωτά φύλλα περιβαλλόμενα από 14α' έλικες. Χαρακτηριστικό του ενζύμου είναι ένα κυρίως υδρόφοβο φαράγγι βάθους 20Å και πλάτους 5Å [57]. Το ενεργό κέντρο του μορίου βρίσκεται 4Å από τη βάση του μορίου και αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες.



Εικόνα 6: Δομή του φαραγγιού της AChE του είδους *Torpedo californica* [58]

Η καταλυτική υπομονάδα αποτελείται από την τριάδα αμινοξέων που συμμετέχουν στην υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Στον άνθρωπο, τα αμινοξέα αυτά είναι η σερίνη 203, η ιστιδίνη 447 και το γλουταμινικό οξύ 334.

Η ανιονική υπομονάδα αποτελείται στον άνθρωπο από τα αμινοξέα τρυπτοφάνη 86, τυροσίνη 133, τυροσίνη 330 και φαινυλαλανίνη 338. Ο ρόλος της είναι η πρόσδεση της κατιονικής τεταρτοταγούς αμινομάδας της ακετυλοχολίνης, αλλά προσδένει και άλλα κατιονικά υποστρώματα και αναστολείς. Τα κατιονικά υποστρώματα όμως δεν προσδένονται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στα ανιονικά υπολείμματα, αλλά σε 14 αρωματικά υπολείμματα που καλύπτουν το λαιμό του φαραγγιού και διατηρούνται μεταξύ ειδών της ακετυλοχολινεστεράσης [59][60].

Η ακυλική υπομονάδα αποτελείται στον άνθρωπο από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη 295 και φαινυλαλανίνη 297 και είναι υπεύθυνη για την εκλεκτικότητα του ενζύμου ως προς διάφορα υποστρώματα, καθώς εμποδίζει στερεοχημικά την είσοδο σε μεγαλύτερους εστέρες της χολίνης

Τέλος, η οξυανιονική υπομονάδα απαρτίζεται στον άνθρωπο από τα αμινοξέα γλυκίνη 121, γλυκίνη 122 και αλανίνη 204 και ο ρόλος της είναι να σταθεροποιεί την ενδιάμεση κατάσταση του υποστρώματος κατά την αντίδραση υδρόλυσης.

Πέραν από τις υπομονάδες του ενεργού κέντρου, η ακετυλοχολινεστεράση περιλαμβάνει περισσότερα περιφερειακά ανιονικά κέντρα, έξω από το φαράγγι, τα οποία συμβάλλουν στην πρόσδεση της ακετυλοχολίνης σε πρώτο στάδιο. Επίσης, φαίνεται ότι προσδίδουν και άλλες λειτουργίες στο ένζυμο, όπως η πρόσδεση μη

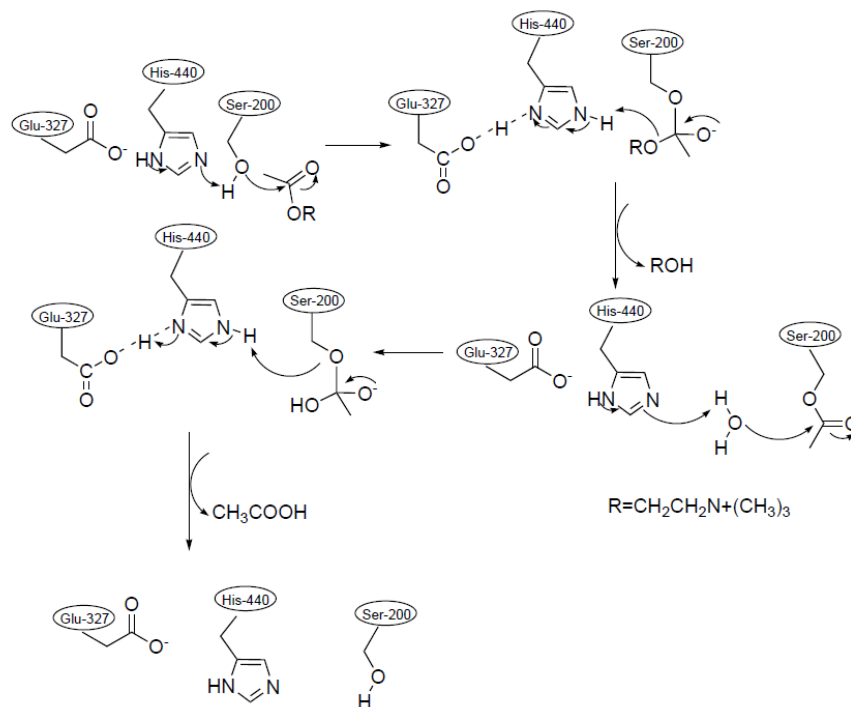
συναγωνιστικών αναστολέων και η διευκόλυνση της συσσωμάτωσης β-αμυλοειδών πεπτιδίων, φαινόμενο το οποίο σχετίζεται με τη νόσο του Αλτσχάιμερ [61].



Εικόνα 7: Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της δομής διμερούς ανθρώπινης AChE σε σύμπλοκο με donepezil [62]

1.2.4.2 Υδρόλυση ACh

Η υδρόλυση της ακετυλοχολίνης από την ακετυλοχολινεστεράση αποτελείται από δύο στάδια. Στο πρώτο (ταχύ) στάδιο, η υδροξυλομάδα της σερίνης ενεργοποιείται από το γειτονικό ιμιδαζόλιο ιστιδίνης και προσβάλλει ως πυρηνόφιλο την καρβονυλομάδα της ACh. Αυτό οδηγεί σε μία αντίδραση μετεστεροποίησης, όπου απελευθερώνεται η χολίνη και σχηματίζεται μία ακετυλιωμένη μορφή του ενζύμου. Στο δεύτερο (βραδύ) στάδιο, το ακετυλιωμένο υπόλειμμα σερίνης υδρολύεται, απελευθερώνοντας οξικό οξύ και αναγεννώντας το ένζυμο.



Εικόνα 8: Μηχανισμός υδρόλυσης ACh από την AChE [63]

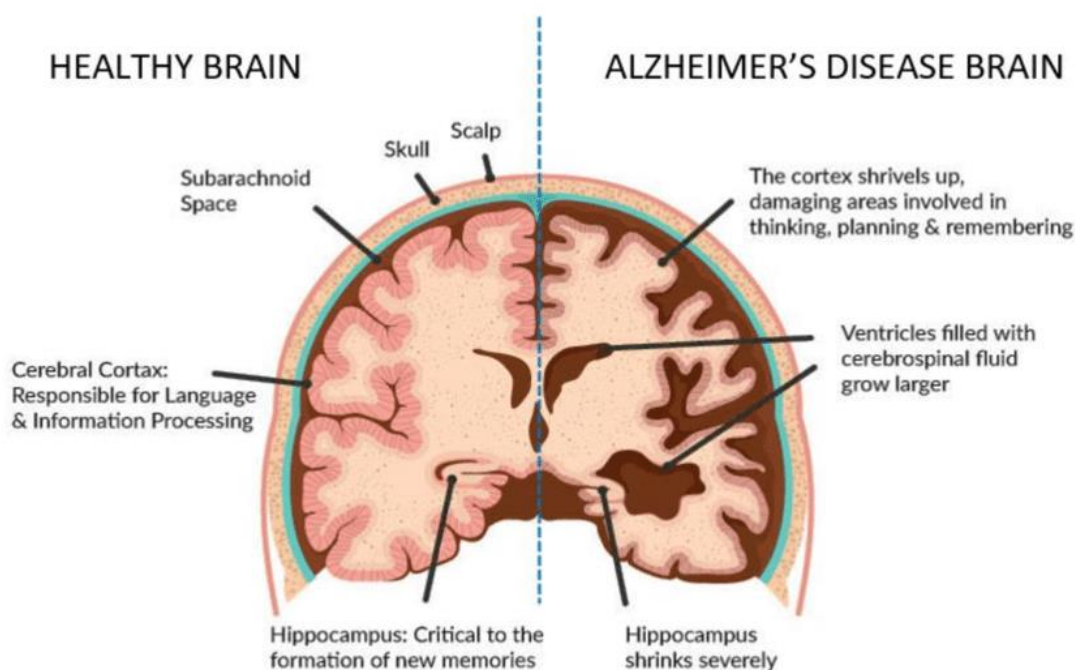
Η αντίδραση αυτή είναι ιδιαίτερα ταχεία, με ρυθμό ανανέωσης 10^4s^{-1} , ρυθμό που πλησιάζει τον ρυθμό διάχυσης [64]. Η AChE είναι εξαιρετικά εκλεκτική για την ACh, ειδικά για μια υδρόλυση σερίνης, και εμφανίζει μεγαλύτερη δράση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, με αποτέλεσμα να εμφανίζει αναστολή από το υπόστρωμα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Στο φαινόμενο αυτό μεσολαβεί το περιφερειακό ανιονικό κέντρο στην είσοδο του φαραγγιού του ενζύμου [56].

1.2.3.3 Σχετικά νοσήματα

Λόγω του ρόλου της στον τερματισμό του χολινεργικού σήματος, η AChE έχει προσεγγιστεί σαν φαρμακευτικός στόχος για αναστολείς, με στόχο την θεραπεία νοσημάτων που οφείλονται σε ανεπάρκεια χολινεργικής νευροδιαβίβασης.

Μία νόσος που σχετίζεται με τη χολινεργική νευροδιαβίβαση είναι η νόσος του Αλτσχάιμερ. Πρόκειται για μία προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσο, η οποία προκαλεί συμπτώματα άνοιας και εκδηλώνεται κυρίως σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών. Η άνοια εξελίσσεται βαθμιαία και χωρίζεται σε τρία στάδια. Στο ασυμπτωματικό ή προκλινικό στάδιο, που μπορεί να είναι πολυετές, συσσωρεύονται νευρικές βλάβες στον εγκέφαλο, χωρίς όμως να είναι επαρκείς για την εκδήλωση συμπτωμάτων. Στο στάδιο ήπιας γνωστικής διαταραχής, παρατηρούνται τα πρώτα συμπτώματα, που συνήθως σχετίζονται με τη μνήμη, για παράδειγμα η αδυναμία μετατροπής της βραχυπρόθεσμης μνήμης σε μακροπρόθεσμη. Στο κλινικό στάδιο τα συμπτώματα της νόσου εντείνονται σε σημείο που οι ασθενείς έχουν ανάγκη συνεχούς επιτήρησης και φροντίδας. Εμφανίζεται σωρεία συμπτωμάτων, όπως η λήθη ακόμη και παλαιών αναμνήσεων, η έλλειψη αντίληψης του χώρου και του χρόνου, η κατάθλιψη και η απραξία. Στα τελευταία στάδια της νόσου οι ασθενείς είναι τελείως εξαρτημένοι από το περιβάλλον τους ακόμη και για τις πιο απλές λειτουργίες [65].

Από βιολογικής απόψεως, η νόσος του Αλτσχάιμερ χαρακτηρίζεται από εκφυλισμό ή ατροφία των χολινεργικών νευρώνων του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με την εξωκυτταρική συσσώρευση πλακών του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, καθώς και την εμφάνιση κυτταροσκελετικών ινιδίων της υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης “ τ ”. Οι συσσωρεύσεις των προτεΐνων αυτών προκαλούν μία σειρά βιοχημικών διεργασιών, όπως η δημιουργία ελευθέρων ριζών, η φλεγμονή και βλάβη της νευρωνικής κυτταρικής μεμβράνης και τελικά ο κυτταρικός θάνατος. Το αποτέλεσμα είναι σημαντική μείωση των επιπέδων ACh στον εγκέφαλο και κατά συνέπεια νοητική βλάβη. Οι λειτουργία του εγκεφάλου που δυσχεραίνεται περισσότερο αρχικά είναι η μνήμη, γιατί οι περιοχές του εγκεφάλου που αρχικά πλήττονται σχετίζονται με αυτήν. Με την πρόοδο όμως της νόσου ο νευροεκφυλισμός επεκτείνεται σε περισσότερες περιοχές του εγκεφάλου με μακροσκοπικές αλλαγές στην εγκεφαλική δομή, όπως συστολή του εγκεφαλικού φλοιού, η διόγκωση των εγκεφαλικών κοιλιών και η σημαντική συρρίκνωση του ιππόκαμπου, του κέντρου της μνήμης [56].



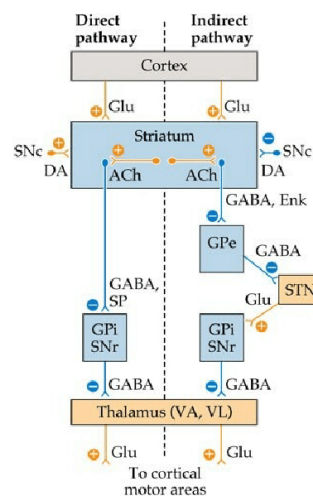
Εικόνα 9: Μακροσκοπικές αλλαγές στον εγκέφαλο σε προχωρημένη νόσο Αλτσχάιμερ [66].

Η πιο διαδεδομένη θεραπεία για την νόσο Αλτσχάιμερ συνίσταται σε αναστολές της AChE, λόγω του διπλού ρόλου που έχει το ένζυμο στην νόσο. Αφενός η αναστολή της AChE αυξάνει την χολινεργική νευροδιαβίβαση, υποκαθιστώντας την απώλεια χολινεργικών νευρώνων λόγω της νόσου. Αφετέρου, η AChE έχει φανεί ότι συνεισφέρει στην συσσωμάτωση β-αμυλοειδών λόγω αλληλεπιδράσεων των πεπτιδίων με περιφερειακά ανιονικά κέντρα του ενζύμου. Συνεπώς, η αναστολή της AChE συμβάλλει τόσο στην άμβλυνση των συμπτωμάτων, αλλά και στην επιβράδυνση της προόδου της νόσου [56]. Ένας νέος φαρμακευτικός στόχος είναι η βουτυρυλοχολινεστεράση, ένα συγγενές ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης που επίσης καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Έχει παρατηρηθεί ότι σε ασθενείς με Αλτσχάιμερ, η δράση της βουτυρυλοχολινεστεράσης αυξάνεται κατά 40-90%, συνεπώς η αναστολή της είναι μία αρκετά υποσχόμενη θεραπεία [67]. Παρ' όλα αυτά, καμία από αυτές τις θεραπείες δεν δύναται να αναστρέψει ή να παύσει την πρόοδο της νόσου. Πολύ πρόσφατα όμως, ο FDA ενέκρινε τα πρώτα αντι-αμυλοειδή

μονοκλωνικά αντισώματα, δηλαδή αντισώματα έναντι των β-αμυλοειδών πεπτιδίων, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αποτρέψουν αποφασιστικά τη συσσωμάτωσή τους [68]. Αυτό αποτελεί μία ριζοσπαστική προσέγγιση έναντι της νόσου του Αλτσχάιμερ, καθώς υπόσχεται την αποφασιστική αναστολή της προόδου της νόσου, αν και τα μακροχρόνια αποτελέσματα της θεραπείας δεν έχουν φανεί ακόμη.

Ένα άλλο νόσημα που σχετίζεται με την ακετυλοχολίνη είναι η μυασθένεια Gravis, ένα αυτοάνοσο νόσημα που οφείλεται στον σχηματισμό αυτό-αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων της ACh στους νευρομυϊκούς κόμβους. Τα αντισώματα αυτά μειώνουν τους διαθέσιμους υποδοχείς για την ενδογενή ACh, αποτρέποντας έτσι το σήμα να φτάσει σε επίπεδα ικανά να προκαλέσουν μυϊκή συστολή. Αποτέλεσμα είναι οι ασθενείς να νιώθουν αδυναμία και να δυσκολεύονται σε δραστηριότητες όπως η μάσηση. Ιδιαίτερα έντονη είναι η αδυναμία στους εξωτερικούς οφθαλμικούς μύες, οι οποίοι έχουν μικρότερη πυκνότητα υποδοχέων ACh, με χαρακτηριστικό σύμπτωμα τη βλεφαρόπτωση. Φαρμακευτική αντιμετώπιση της νόσου με αναστολείς της AChE χρησιμοποιείται, αλλά είναι απαραίτητη η χρήση μορίων με μεγάλη διάρκεια δράσης [69].

Τέλος, ένα νόσημα που συνδέεται έμμεσα με τη χολινεργική νευροδιαβίβαση είναι η νόσος του Πάρκινσον. Πρόκειται για μία νευροεκφυλιστική ασθένεια, η οποία προσβάλλει κυρίως άτομα άνω των 60 ετών και προκαλεί ακούσιο τρέμουλο, μυϊκή ακαμψία και αστάθεια. Η περιοχή του εγκεφάλου που προσβάλλει είναι τα βασικά γάγγλια, μία ομάδα από πυρήνες στον εγκέφαλο που ελέγχουν και διαβιβάζουν κινητικά ερεθίσματα προς τις κινητικές περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού μέσω του θαλάμου. Ο άμεσος μηχανισμός με τον οποίον γίνεται η διεργασία αυτή ξεκινάει από τον φλοιό του εγκεφάλου με διέγερση του ραβδωτού σώματος. Το σήμα αυτό ενισχύεται από ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας και μεταφράζεται σαν ανασταλτικό σήμα προς της ώχρα σφαίρα, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει τον θάλαμο. Το τελικό αποτέλεσμα είναι διέγερση του θαλάμου, που με τη σειρά του διεγείρει τα κινητικά κέντρα του φλοιού. Στη νόσο Πάρκινσον προκαλείται κυτταρικός θάνατος στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας, με αποτέλεσμα την μείωση του ντοπαμινεργικού σήματος στο ραβδωτό σώμα και την εξασθένηση των κινητικών σημάτων προς τον εγκεφαλικό φλοιό [50].

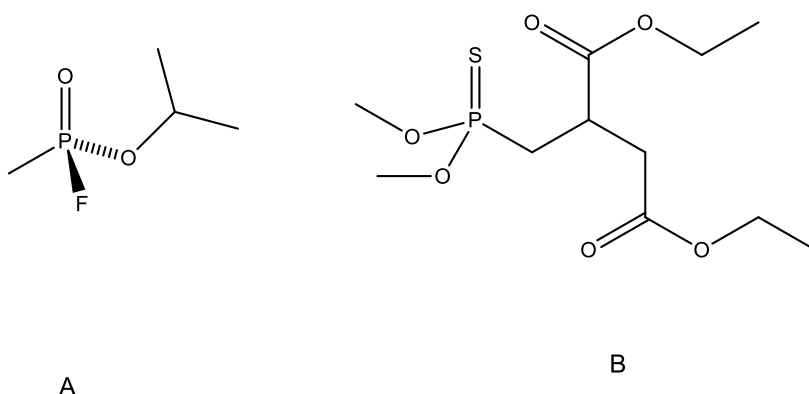


Εικόνα 10: Διάγραμμα ανατομίας των βασικών γαγγλίων [70]

Οι μέχρι στιγμής θεραπείες για τη νόσο του Πάρκινσον συνίστανται στην υποκατάσταση του ντοπαμινεργικού σήματος μέσω προδρόμων της ντοπαμίνης, όπως η L-Dopa. Παρ' όλα αυτά, νέες ενδείξεις υποδεικνύουν τη σημασία που μπορεί να έχει και η ακετυλοχολίνη σαν θεραπεία, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης χολινεργικών νευρώνων στο ραβδωτό σώμα. Η νικοτίνη έχει ήδη δείξει δυναμική στη βελτίωση των συμπτωμάτων της νόσου του Πάρκινσον, μέσω ενεργοποίησης των νικοτινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης [50]. Είναι πιθανό ότι περαιτέρω επέμβαση στο χολινεργικό σύστημα στα βασικά γάγγλια, για παράδειγμα μέσω αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, θα μπορούσε επίσης να αποδειχθεί αποτελεσματική θεραπεία.

1.2.3.4 Αναστολείς AChE

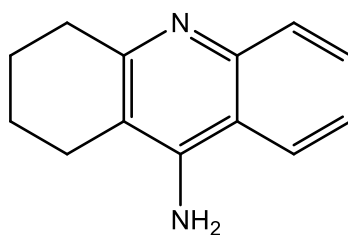
Λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος για αναστολή της AChE, έχει ανακαλυφθεί πληθώρα αναστολέων, με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Μη αναστρέψιμοι αναστολείς της AChE, όπως οι οργανοφωσφορικοί εστέρες, παράγουν κατά την υδρόλυσή τους ομάδες που προσδένονται ομοιοπολικά στο ένζυμο. Αυτό έχει σαν συνέπεια την μόνιμη και σημαντική αύξηση του σήματος της ακετυλοχολίνης, προκαλώντας τονική παράλυση, σπασμούς, βρογχική στένωση και θάνατο. Για αυτήν τους την ιδιότητα έχουν χρησιμοποιηθεί σαν χημικά όπλα (sarin) αλλά και σαν εντομοκτόνα (μαλαθείο).



Σχήμα 15: Χημική δομή sarin (A) και μαλαθείου (B)

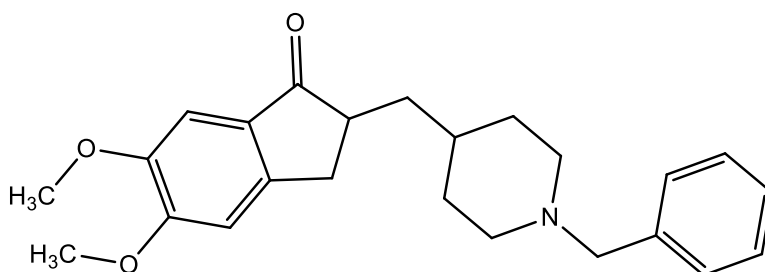
Αντίθετα με τους μη αναστρέψιμους αναστολείς, οι αναστρέψιμοι αναστολείς της AChE καταλαμβάνουν το ενεργό κέντρο για μικρά χρονικά διαστήματα (δευτερόλεπτα έως λεπτά). Αυτό επιτρέπει τον πιο ακριβή έλεγχο του χολινεργικού σήματος και έχει επιτρέψει την φαρμακευτική χρήση τους για την θεραπεία νόσων όπως η νόσος του Αλτσχάιμερ και η μυασθένεια Gravis.

Η τακρίνη ήταν το πρώτο φάρμακο που εγκρίθηκε από τον FDA για την θεραπεία της νόσου του Αλτσχάιμερ το 1989. Είναι ένας αναστρέψιμος αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης, και ήταν αποτελεσματική στην συσσώρευση ακετυλοχολίνης στις χολινεργικές συνάψεις. Παρ' όλα αυτά η χρήση της ως φάρμακο διακόπηκε το 2013, λόγω ανησυχιών για παρενέργειες όπως η υπατοτοξικότητα [71].



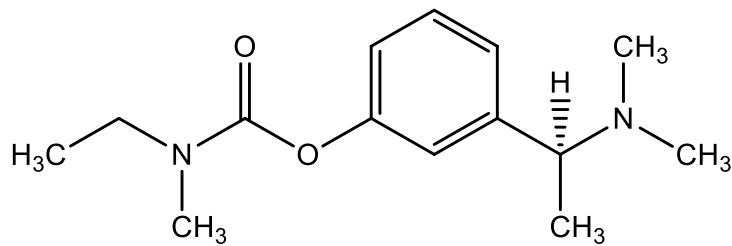
Σχήμα 16: Χημική δομή της τακρίνης

Ένας νεότερος αναστολέας της AChE είναι η δονεπεζίλη, ένα παράγωγο της πιπεριδίνης που εγκρίθηκε ως θεραπεία για τη νόσο Αλτσχάιμερ το 1996. Έχει σχετική επιλεκτικότητα έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης στον εγκέφαλο και λόγω της μεγάλης λιποφιλίας της διασχίζει εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [72]. Επιπλέον, in vivo μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι προκαλεί και εμφανή μείωση της βιοσυσσώρευσης β-αμυλοειδών πεπτιδίων [73]



Σχήμα 17: Χημική δομή δονεπεζίλης

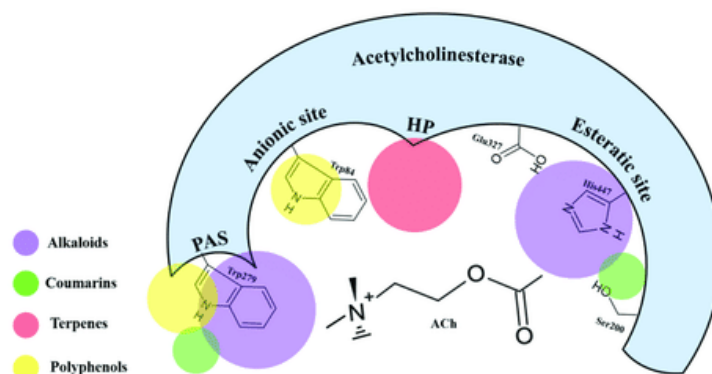
Ένας ακόμα αναστρέψιμος αναστολέας της AChE είναι η ριβαστιγμίνη, η οποία είναι ένα καρβαμιδικό παράγωγο. Σε αντίθεση με άλλους αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, η ριβαστιγμίνη έχει δραστηριότητα και έναντι της βουτυρυλοχολινεστεράσης, αυξάνοντας την φαρμακευτική δυναμική της, ειδικά έναντι της νόσου του Αλτσχάιμερ [71]. Επίσης, η ριβαστιγμίνη έχει δείξει μερική επιλεκτικότητα έναντι της μονομερούς μορφής της AChE έναντι της τετραμερούς. Κατά τη γήρανση, τα επίπεδα της τετραμερούς μορφής της AChE στον εγκέφαλο μειώνονται, ενώ αυτά της μονομερούς αυξάνονται, συνεπώς η επιλεκτικότητα της ριβαστιγμίνης έναντι της μονομερούς μορφής πιθανώς αυξάνει τη δραστηριότητά της σε γηραιότερους ασθενείς, οι οποίοι είναι πιο πιθανόν να υποφέρουν από νευροεκφυλιστικές ασθένειες [74].



Σχήμα 18: Χημική δομή ριβαστιγμίνης

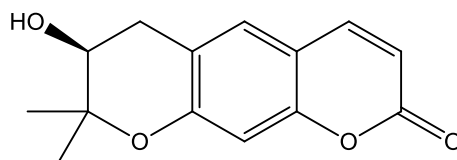
Η γαλανταμίνη είναι ένας ακόμη αναστρέψιμος αναστολέας της AChE, ο οποίος δεν σχετίζεται δομικά με τους άλλους αναστολείς, καθώς είναι ένα αλκαλοειδές. Έχει επιλεκτική δράση έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης σε σχέση με τη βουτυρυλοχολινεστεράση, ενώ φαίνεται να λειτουργεί και σαν αλλοστερικός ρυθμιστής του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης [71].

Τέλος, οι κουμαρίνες έχουν επίσης δείξει δράση σαν αναστολείς της AChE, καθώς προσδένονται τόσο στο εστερατικό, όσο και στο περιφερειακό ανιονικό κέντρο του ενζύμου [75].



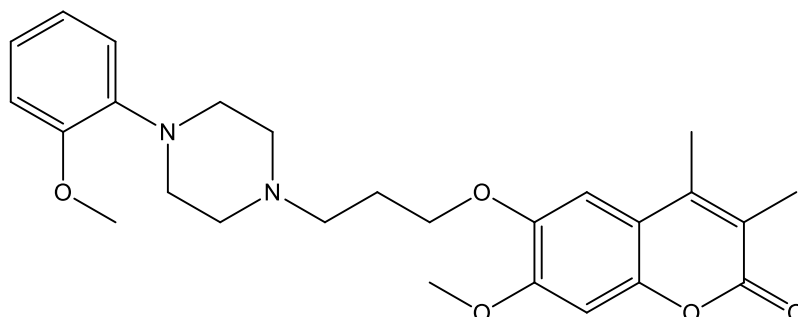
Εικόνα 11: Σημεία πρόσδεσης φυσικών ενώσεων στο ενεργό κέντρο της AChE [75]

Δύο κουμαρίνες συγκεκριμένα έχουν δείξει αξιοσημείωτη δραστηριότητα ως αναστολείς της AChE. Η διδροπυρανοκουμαρίνη, η οποία απομονώνεται από το φυτό *Angelica gigas Nakai*, έχει δείξει υψηλότερη δραστηριότητα, σε επίπεδα υψηλότερα από της γαλανταμίνης [75].



Σχήμα 19: Χημική δομή διδροπυρανοκουμαρίνης

Αντίστοιχα, η ενσακουλίνη έχει επίσης δείξει ισχυρή ανασταλτική δράση στην AChE και αποτελεί αντικείμενο κλινικών μελετών κατά της νόσου του Αλτσχάιμερ, καθώς ταυτόχρονα λειτουργεί και σαν αναστολέας του υποδοχέα NMDA [76].



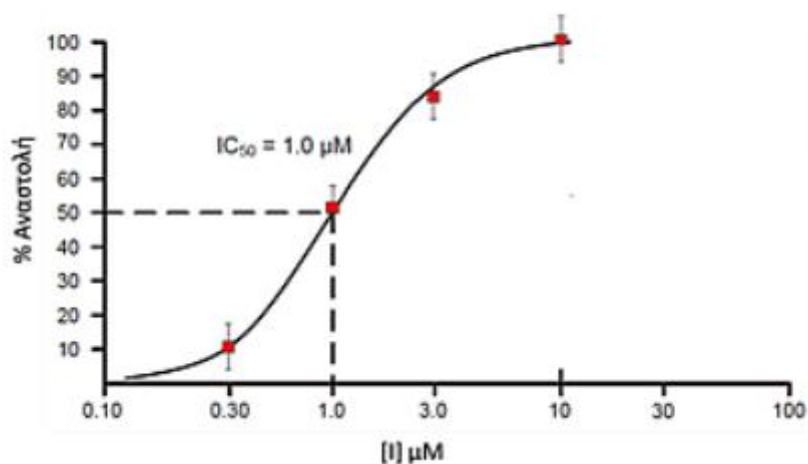
Σχήμα 20: Χημική δομή ενσακουλίνης

1.3 Στοιχεία φαρμακευτικής

1.3.1 Βασικές έννοιες φαρμακευτικής

1.3.1.1 Φαρμακοδυναμική

Φαρμακοδυναμική είναι η μελέτη των βιοχημικών επιπτώσεων των φαρμάκων σε έναν οργανισμό. Αφορά τους τρόπους με τους οποίους ένα φάρμακο επηρεάζει έναν οργανισμό, δηλαδή με ποια βιολογικά μόρια αλληλοεπιδρά και με ποιον τρόπο, είτε αυτά είναι επιθυμητοί στόχοι είτε όχι. Επίσης, η φαρμακοδυναμική επιδιώκει την ποσοτικοποίηση της δραστηριότητας των φαρμάκων, μέσω της εδραίωσης μίας σχέσης δόσης-απόκρισης. Η σχέση αυτή συνήθως εκφράζεται ως η συγκέντρωση του φαρμάκου που έχει το ήμισυ του επιθυμητού αποτελέσματος. Για παράδειγμα, αν ένα φάρμακο ενεργοποιεί έναν υποδοχέα, η δραστηριότητά του εκφράζεται σαν EC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία οι μισοί υποδοχείς που εκτέθηκαν στο φάρμακο ενεργοποιούνται. Αντίστοιχα, αν ένα φάρμακο αναστέλλει έναν υποδοχέα, η δραστηριότητά του εκφράζεται σαν IC_{50} , η συγκέντρωση όπου οι μισοί υποδοχείς που ήταν ενεργοποιημένοι απουσία του φαρμάκου απενεργοποιούνται. Εξυπακούεται ότι όσο μικρότερα τα EC_{50} και IC_{50} , τόσο μεγαλύτερη η δραστηριότητα του φαρμάκου.



Σχήμα 21: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για έναν αναστολέα και προσδιορισμός του IC_{50}

Ένα άλλο μέγεθος που υπολογίζεται στην φαρμακοδυναμική είναι η τοξικότητα. Όλες οι ουσίες έχουν μία ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία εμφανίζουν αρνητικές συνέπειες, όσο μεγαλύτερη, τόσο ασφαλέστερες είναι. Ταυτόχρονα, τα φάρμακα έχουν μία ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία εμφανίζουν δραστηριότητα. Συνεπώς, υπάρχει ένα παράθυρο μεταξύ αυτών των συγκεντρώσεων στο οποίο ένα φάρμακο είναι ασφαλές αλλά αποτελεσματικό. Αυτό το παράθυρο εκφράζεται ως ο θεραπευτικός δείκτης του φαρμάκου και υπολογίζεται ως:

$$T.I. = \frac{\text{minimum toxic concentration}}{\text{minimum effective concentration}}$$

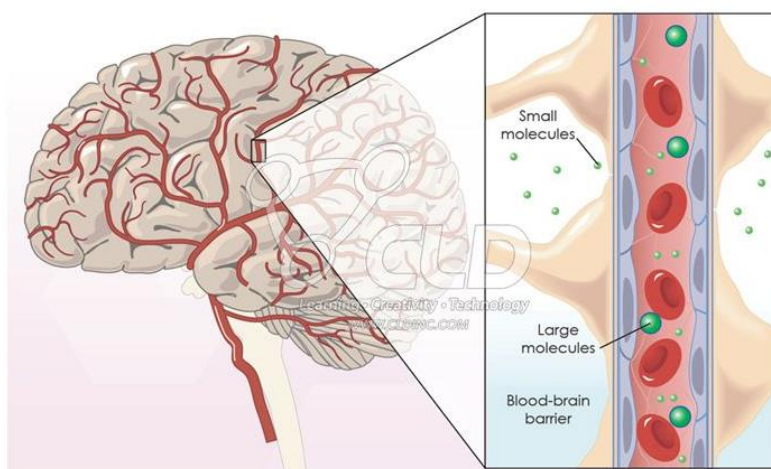
Όσο μεγαλύτερος ο φαρμακευτικός δείκτης του φαρμάκου, τόσο μεγαλύτερο περιθώριο ασφάλειας υπάρχει κατά την χορήγησή του. Ταυτόχρονα όμως, αυτό να συμψηφίζεται και με τη σοβαρότητα της νόσου, όσο πιο επικίνδυνη είναι η νόσος, τόσο μεγαλύτερη ανοχή υπάρχει για χαμηλούς θεραπευτικούς δείκτες.

1.3.1.2 Φαρμακοκινητική

Φαρμακοκινητική είναι η μελέτη των τρόπων τον ρυθμό με τον οποίο ένας οργανισμός επηρεάζει ένα φάρμακο. Συνίσταται σε τέσσερις βασικούς άξονες:

- Απορρόφηση: η διαδικασία με την οποία το φάρμακο περνάει στην κυκλοφορία του αίματος
- Κατανομή: η διαδικασία διαμοιρασμού του φαρμάκου στους διαφορετικούς ιστούς και υγρά του σώματος
- Μεταβολισμός: η διαδικασία τροποποίησης του φαρμάκου από τον οργανισμό σε θυγατρικά μόρια (μεταβολίτες)
- Απέκκριση: η διαδικασία αποβολής του φαρμάκου ή των μεταβολιτών του από τον οργανισμό

Ένα παράδειγμα φαρμακοκινητικής μελέτης της κατανομής είναι η περατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός συνίσταται από κύτταρα που περικλείουν τα αιμοφόρα αγγεία στον εγκέφαλο και εμποδίζουν μόρια με συγκεκριμένες ιδιότητες να περάσουν στον εγκέφαλο.



Εικόνα 12: Αναπαράσταση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [77]

Φάρμακα τα οποία είναι σχεδιασμένα να δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα πρέπει να μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η ικανότητά τους αυτή εκφράζεται από τη σχέση:

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

Ένα άλλο σημαντικό μέγεθος στην φαρμακοκινητική είναι η βιοδιαθεσιμότητα, ένα μέγεθος το οποίο αναφέρεται στο ποσοστό του χορηγούμενου φαρμάκου που φτάνει στο αίμα. Διαφορετικές μέθοδοι χορήγησης του ίδιου φαρμάκου έχουν διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα, με την ενδοφλέβια χορήγηση να είναι στο 100%.

1.3.2 Ανακάλυψη νέων φαρμάκων

1.3.2.1 Εύρεση Lead Compounds

Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων είναι μία περίπλοκη και μακροχρόνια διαδικασία που περιλαμβάνει τη συνεργασία ενός ευρέος φάσματος επιστημονικών κλάδων, όπως η βιολογία, η χημεία και η φαρμακολογία. Το πρώτο στάδιο στο σχεδιασμό ενός νέου φαρμάκου είναι η επιλογή του φαρμακευτικού στόχου, της βιολογικής ένωσης δηλαδή στην οποία το φάρμακο πρέπει να έχει δράση και βασίζεται στην διαθέσιμη γνώση για τον μηχανισμό της νόσου. Οι συνηθέστεροι φαρμακευτικοί στόχοι είναι πρωτεΐνες, όπως ένζυμα, υποδοχείς ή μεταφορείς. Αφού αποφασιστεί ο φαρμακευτικός στόχος, επιδιώκεται η ανακάλυψη μίας ένωσης-οδηγού (lead), μίας ένωσης δηλαδή η οποία φέρει έναν σκελετό που προσδίδει δραστηριότητα στον φαρμακευτικό στόχο. Ο σκελετός αυτός ονομάζεται φαρμακοφόρος δομή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βάση για την εύρεση νέων δραστικών μορίων. Η εύρεση μίας ένωσης-οδηγού μπορεί να προέρχεται από διαφορετικές πηγές:

- Από ήδη γνωστά φάρμακα που κυκλοφορούν ή βρίσκονται σε φάση κλινικής δοκιμής
- Από γνωστά βιολογικά μόρια που σχετίζονται με το στόχο (π.χ. υποστρώματα ενζύμων)
- Μέσω στοχευμένου σχεδιασμού με υπολογιστικά μοντέλα
- Από φυσικά προϊόντα με δράση έναντι της νόσου

1.3.2.2 Έλεγχος Hit-to-Lead

Σε περίπτωση που δεν είναι γνωστή κάποια ένωση-οδηγός, προηγείται η ανακάλυψη δομών-οδηγών (hits) που εμφανίζουν κάποια δραστηριότητα στον στόχο. Μία συνήθης μέθοδος με την οποία επιτυγχάνεται αυτό είναι ο ταχύς βιολογικός έλεγχος υψηλής απόδοσης (High Throughput Screening – HTS), κατά τον οποίον χιλιάδες έως εκατομμύρια μόρια ελέγχονται με αυτοματοποιημένο εξοπλισμό για δραστηριότητα στον φαρμακευτικό στόχο. Αφού προκύψει ένα σύνολο από hits, διενεργείται ένας έλεγχος hit to lead, μέσα από τον οποίο επιχειρείται να ανακαλυφθεί μία νέα ένωση-οδηγός. Κατά τον έλεγχο hit to lead, εδραιώνεται μία σχέση δομής-δράσης (Structure-Activity Relationship) ώστε να προκύψει η φαρμακοφόρος δομή που προσδίδει δραστηριότητα στον φαρμακευτικό στόχο

1.3.2.3 Lead optimization

Έχοντας μία ένωση-οδηγό, το επόμενο βήμα είναι η βελτιστοποίηση της (lead optimization). Στόχος αυτής της φάσης είναι η εύρεση νέων αναλόγων της ένωσης-οδηγού, που φέρουν τη φαρμακοφόρο δομή, αλλά έχουν βελτιωμένες φαρμακευτικές

ιδιότητες. Τέτοιες ιδιότητες μπορεί να είναι μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα, καλύτερη εκλεκτικότητα για τον φαρμακευτικό στόχο ή υψηλότερος θεραπευτικός δείκτης.

1.3.2.4 Υβριδικά μόρια

Μία ιδιαίτερη μορφή lead optimization είναι ο σχεδιασμός υβριδικών μορίων, δηλαδή μορίων που φέρουν περισσότερες από μία φαρμακοφόρες δομές. Το όφελος από το συνδυασμό δύο φαρμακοφόρων δομών στο ίδιο μόριο μπορεί να είναι ισχυρότερη δράση στον φαρμακευτικό στόχο, η δράση σε πάνω από ένα σημείο στον φαρμακευτικό στόχο ή η δράση σε δύο διαφορετικούς στόχους. Ανάλογα με τον τρόπο σύνδεσης των δύο δομών, τα υβριδικά μόρια ταξινομούνται σε [78]:

- Συγχωνευμένα: περιέχουν και τις δύο φαρμακοφόρες δομές
- Συντηγμένα: οι δύο δομές υπάρχουν ως μοναδικά μέρη χωρίς υπέρθεση
- Συζευγμένα: οι δύο δομές συνδέονται με μία διακριτή ομάδα, η οποία δεν αποτελεί οποιασδήποτε από τις δύο.



1.3.2.5 Κλινικές μελέτες και έγκριση

Αφού εδραιωθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια ενός υποψηφίου φαρμάκου σε προκλινικές μελέτες, το τελευταίο βήμα πριν την έγκριση είναι οι κλινικές μελέτες. Στην Φάση I, το φάρμακο χορηγείται σε μικρό αριθμό υγιών εθελοντών για να εδραιωθεί η ασφάλειά του στον άνθρωπο. Στην Φάση II, το φάρμακο χορηγείται σε έναν μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών εθελοντών, ώστε να μελετηθεί και η αποτελεσματικότητά του στον άνθρωπο. Στη Φάση III, το φάρμακο χορηγείται σε έναν ακόμα μεγαλύτερο αριθμό ασθενών εθελοντών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ώστε να εδραιωθεί η μακροχρόνια ασφάλεια και αποτελεσματικότητά του και να συγκριθεί με υπάρχουσες θεραπείες. Επίσης, σε αυτό το στάδιο χορηγείται σε ειδικές ομάδες ασθενών, όπως π.χ. σε εγκύους. Έχοντας επιτύχει και σε αυτή τη φάση, το φάρμακο περνάει από έγκριση από τον αρμόδιο οργανισμό φαρμάκων και μπαίνει στην αγορά. Μετά την είσοδο στην αγορά, το φάρμακο παραμένει σε Φάση IV κλινική μελέτη, που ουσιαστικά περιλαμβάνει τις επιπτώσεις του στον γενικό πληθυσμό στον οποίο χορηγείται.

1.4 Φασματοσκοπία NMR

1.4.1 Αρχή της φασματοσκοπίας NMR

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι μία φασματοσκοπική τεχνική που βασίζεται στην αλληλεπίδραση των ατομικών πυρήνων με εξωτερικά μαγνητικά πεδία και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δομής χημικών ενώσεων. Η αρχή της μεθόδου έγκειται στο ότι ορισμένοι πυρήνες διαθέτουν αυτοπεριστροφή (spin), δημιουργώντας ένα ασθενές δίπολο μαγνητικής ροπής (μ). Το spin ενός πυρήνα καθορίζεται από τον κβαντικό αριθμό πυρηνικής αυτοπεριστροφής (I), ο οποίος παίρνει τιμές 0, 1/2, 1, 3/2, κ.ο.κ., ανάλογα με το είδος του πυρήνα. Ισχύει ότι:

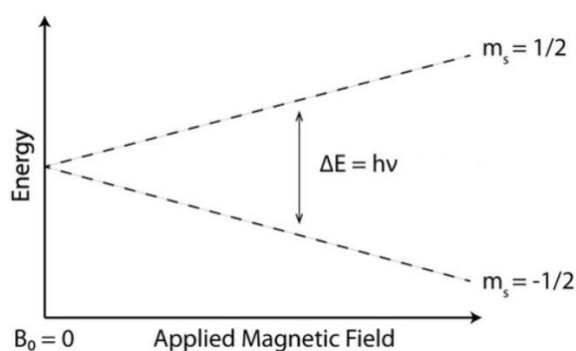
- Πυρήνες με περιττό μαζικό αριθμό έχουν ημιακέραιο spin, π.χ. ^{11}B : $I=3/2$

- Πυρήνες με άρτιο μαζικό αριθμό και περιττό ατομικό αριθμό έχουν ακέραιο spin, π.χ. $^{14}_7\text{N}$: $I = 1$.
- Πυρήνες με άρτιο μαζικό και ατομικό αριθμό έχουν μηδενικό spin, π.χ. $^{12}_6\text{C}$: $I=0$.

Όταν πυρήνες με $I > 0$ βρεθούν εντός ενός ισχυρού εξωτερικά επιβεβλημένου μαγνητικού πεδίου, η αλληλεπίδραση του spin τους με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο δημιουργεί έναν διαχωρισμό ενεργειακών καταστάσεων, ανάλογα με τον προσανατολισμό των πυρήνων σε αυτό. Το πλήθος των ενεργειακών επιπέδων για έναν πυρήνα με spin I είναι $2I + 1$ και ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας (4-900 MHz) είναι ικανή να διεγείρει τους πυρήνες σε ενεργειακά επίπεδα υψηλότερου επιπέδου, δίνοντας το φάσμα NMR. Η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου B_0 και από τον γυρομαγνητικό λόγο του πυρήνα γ , μέσω της εξίσωσης Larmor:

$$\nu = \left(\frac{\gamma}{2\pi}\right) B_0$$

Όπως φαίνεται από της εξίσωση Larmor, η ενέργεια και άρα η συχνότητα συντονισμού αυξάνεται όσο ισχυρότερο είναι το μαγνητικό πεδίο που βιώνει ο πυρήνας



Σχήμα 22: Σχέση ενέργειας συντονισμού και ισχύος μαγνητικού πεδίου για έναν πυρήνα με $I=1/2$.

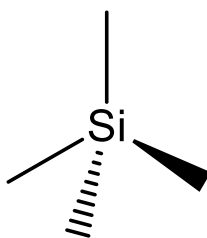
Ο λόγος που η φασματοσκοπία NMR είναι ικανή να διαχωρίσει ανάμεσα σε πυρήνες του ίδιου στοιχείου είναι ότι οι διαφορετικοί πυρήνες βιώνουν διαφορετικό τοπικό μαγνητικό πεδίο ανάλογα με το περιβάλλον τους. Ο βασικός λόγος για τον οποίο αλλάζει το τοπικό μαγνητικό πεδίο που βιώνει ένας πυρήνας είναι το μαγνητικό πεδίο των ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια διαθέτουν και αυτά spin και όταν επιβληθεί σε αυτά εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, προσανατολίζονται ώστε το δικό τους μαγνητικό πεδίο να αντιτίθεται στο επιβεβλημένο. Αυτό έχει σαν συνέπεια ότι ο πυρήνας τους βιώνει ασθενέστερο μαγνητικό πεδίο από το επιβεβλημένο και άρα συντονίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα. Ταυτόχρονα αυτό σημαίνει ότι αν ένα γειτονικό άτομο προσφέρει ή αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον εν λόγω πυρήνα, αυτό θα έχει σαν συνέπεια την μείωση ή την αύξηση της συχνότητας συντονισμού. Το φαινόμενο αυτό λέγεται προστασία ή αποπροστασία αντίστοιχα και είναι ο λόγος που πυρήνες του ίδιου στοιχείου δίνουν διαφορετικό σήμα στο φάσμα NMR. Πυρήνες του ίδιου

στοιχείου που βιώνουν το ίδιο τοπικό μαγνητικό πεδίο, π.χ. λόγω συμμετρίας του μορίου, δεν διαχωρίζονται στο φάσμα NMR.

Η μετατοπίσεις λόγω προστασίας και αποπροστασίας είναι της τάξης των μερικών Hz, ενώ οι συχνότητες συντονισμού μετριοούνται σε εκατομμύρια Hz. Αυτό θα έκανε την ανάγνωση ενός φάσματος βάσει συχνότητας αδύνατον. Επιπλέον, η συχνότητα συντονισμού εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου, συνεπώς διαφορετικά όργανα θα έδιναν διαφορετικές συχνότητες για την ίδια ένωση. Προς αποφυγή αυτών των προβλημάτων, οι μετατοπίσεις στα φάσματα NMR δίνονται ως ppm σε σχέση με μία ένωση αναφοράς, βάσει της σχέσης:

$$\delta \text{ (ppm)} = \frac{f \text{ συντονισμού} - f \text{ αναφοράς}}{f \text{ αναφοράς}} * 10^6$$

Η πιο συνήθης ένωση αναφοράς που χρησιμοποιείται είναι το τετραμεθυλοσιλάνιο (Tetramethylsilane – TMS). Ο λόγος είναι ότι είναι χημικά αδρανές, έχει μόνο μία κορυφή στο φάσμα του και η κορυφή αυτή δεν παρεμβάλλεται στις κορυφές των αναλυτών.

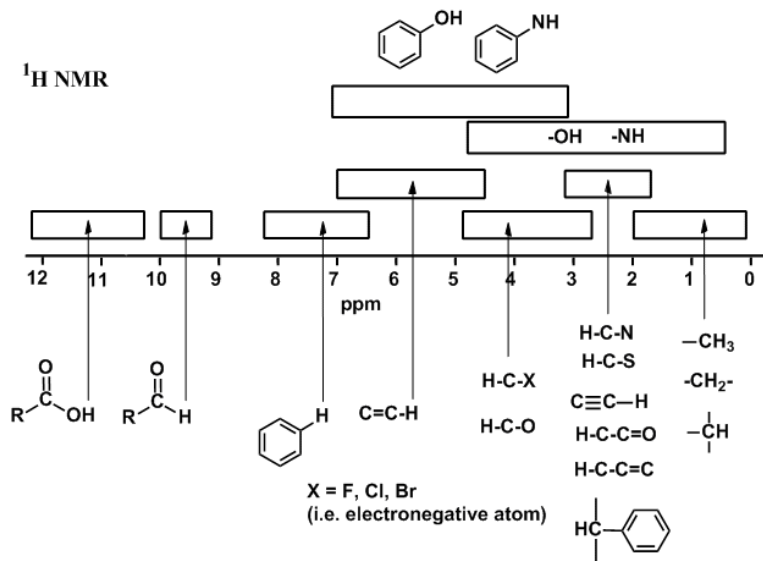


Σχήμα 23: Χημική δομή τετραμεθυλοσιλάνιου

Ένα τελευταίο φαινόμενο που επηρεάζει τα φάσματα NMR είναι η πυρηνική σύζευξη. Όπως το τοπικό μαγνητικό πεδίο για έναν πυρήνα, επηρεάζεται από το ηλεκτρονικό spin, με τον ίδιο τρόπο επηρεάζεται και από το spin των γειτονικών πυρήνων. Η διαφορά είναι ότι σε αντίθεση με τα ηλεκτρόνια, οι πυρήνες δεν προσανατολίζονται ομοιόμορφα, αλλά καταλαμβάνουν μία από τις διαθέσιμες ενεργειακές καταστάσεις, ανάλογα με τον αριθμό I τους και ανάλογα με την ενεργειακή κατάσταση στην οποία βρίσκονται, ενδέχεται να ελαττώνουν ή να ενισχύουν το μαγνητικό πεδίο που βιώνει ο γειτονικός τους πυρήνας. Αποτέλεσμα είναι ότι η κορυφή του εν λόγω πυρήνα σπάει σε υποκορυφές, με κάθε μία να αντιστοιχεί στις διαφορετικές ενεργειακές καταστάσεις που μπορεί να λάβει ο πυρήνας με τον οποίον γίνεται σύζευξη. Η διαφορά ανάμεσα σε αυτές τις δύο υποκορυφές μετρείται σε Hz και συμβολίζεται ως J. Σε περίπτωση που ένας πυρήνας αλληλοεπιδρά με πάνω από έναν πυρήνες με μη μηδενικό spin, τότε οι υποκορυφές σπάνε και αυτές σε υποκορυφές και προκύπτει ένα χαρακτηριστικό μοτίβο σύζευξης. Σημειώνεται ότι δεν παρατηρείται σύζευξη μεταξύ ισοδυνάμων πυρήνων.

1.4.2 Ερμηνεία φασμάτων ^1H NMR

Μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές NMR στην οργανική χημεία είναι αυτή του ^1H NMR, λόγω της σχετικής ευκολίας απόκτησης του φάσματος και της ευθείας ερμηνείας των φασμάτων. Αρχικά, ανάλογα με το ηλεκτρονικό περιβάλλον που βιώνει κάθε πρωτόνιο αναμένεται να βρίσκεται σε συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13:



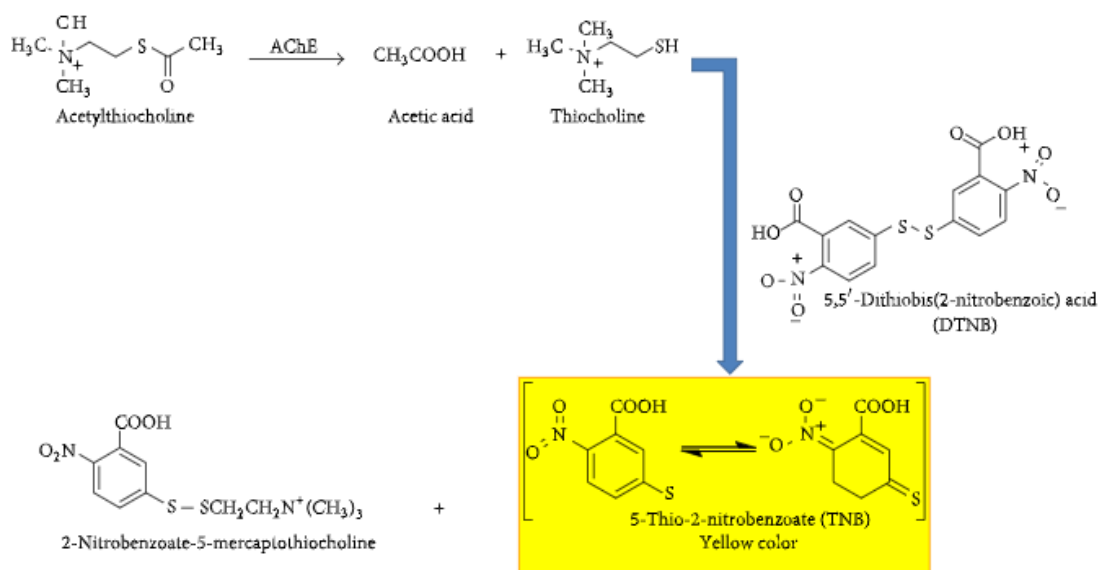
Εικόνα 13: Τυπικές μετατοπίσεις πρωτονίων στο φάσμα ¹H NMR

Δεύτερον, το ολοκλήρωμα της κάθε κορυφής σε ένα φάσμα ¹H NMR είναι ανάλογο του αριθμού των ισοδύναμων πρωτονίων. Συνεπώς, είναι εφικτή η ταυτοποίηση κορυφών βάσει του αριθμού των πρωτονίων τους, αν είναι γνωστός ο αριθμός των πρωτονίων μίας γνωστής κορυφής.

Τέλος, το ¹H έχει αριθμό spin 1/2, συνεπώς όταν κάνει σύζευξη με άλλο πρωτόνιο, η κορυφή του θα χωρίζεται σε μία διπλέτα. Αν κάνει σύζευξη και με δεύτερο μη ισοδύναμο πρωτόνιο θα χωρίζεται σε μία διπλέτα διπλετών κ.ο.κ. Η μόνη ιδιαιτερότητα είναι ότι άμα κάνει σύζευξη με δύο ή περισσότερα μεταξύ τους ισοδύναμα πρωτόνια, η σταθερές *J* θα αλληλεπικαλύπτονται, συνεπώς δεν θα προκύψει π.χ. διπλέτα διπλετών, αλλά τριπλέτα με λόγους 1:2:1.

1.5 Προσδιορισμός ικανότητας αναστολής των ενζύμων AChE και BuChE

Η μέθοδος Ellman είναι μία τεχνική για την *in vitro* μελέτη της ικανότητας ενώσεων να αναστείλουν την δράση της ακετυλοχολινεστεράσης και βουτυρυλοχολινεστεράσης. Πρόκειται για μία φωτομετρική μέθοδο, η οποία βασίζεται στην παραγωγή κίτρινου χρώματος από 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). Η αρχή της μεθόδου έγκειται στη συσχέτιση της δράσης του ενζύμου με την παραγωγή θειοχολίνης και κατά συνέπεια με την παραγωγή κίτρινου χρώματος. Στην περίπτωση της ακετυλοχολινεστεράσης, χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα η ακετυλοθειοχολίνη (acetylthiocholine – ATCl), η οποία υδρολύεται από το ένζυμο προς θειοχολίνη και οξικό οξύ. Στην περίπτωση της βουτυρυλοχολινεστεράσης, χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα η βουτυρυλοθειοχολίνη. Η παραγόμενη θειοχολίνη στη συνέχεια αντιδρά με το DTNB προς παραγωγή του κίτρινου ανιόντος 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB) και ο ρυθμός της παραγωγής του κίτρινου χρώματος μετρείται με φωτόμετρο στα 412nm. Η μέθοδος συνοψίζεται στο Σχήμα 24:

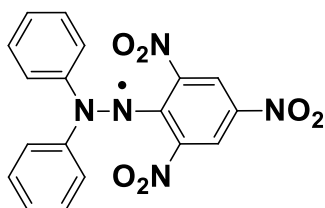


Σχήμα 24: Χημική αναπαράσταση της μεθόδου Ellman [79]

Η ποσοτικοποίηση της ενζυμικής αναστολής γίνεται μέσω της τροποποίησης της μεθόδου Ellman από τους Rahman και Choudary. Βάσει αυτής, η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται σε χρόνους 0 και 10min, με την διαφορά να θεωρείται ανάλογη της δράσης του ενζύμου. Η αναστολή του ενζύμου από μία ένωση γίνεται με σύγκριση της διαφοράς αυτής με αυτήν για ένα δείγμα αναφοράς [79].

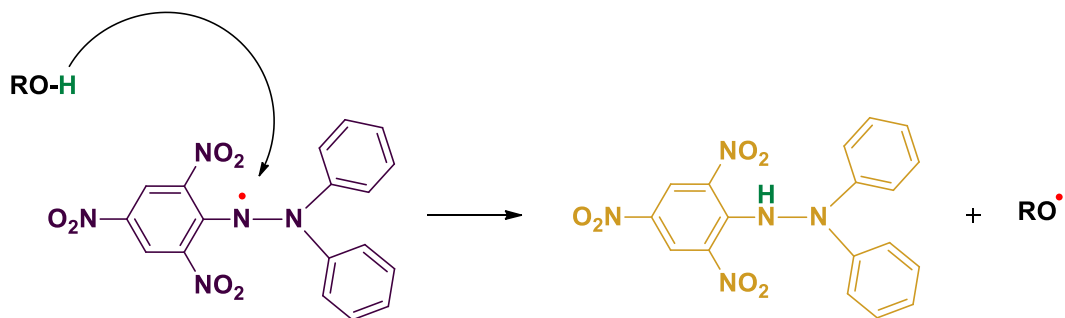
1.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης

Η μέθοδος DPPH είναι μία τεχνική για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης ενώσεων, όπως αναπτύχθηκε από τους Brand-Williams et al [80]. Η μέθοδος βασίζεται στη ρίζα 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλη (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil – DPPH).



Σχήμα 25: Χημική δομή της ρίζας DPPH

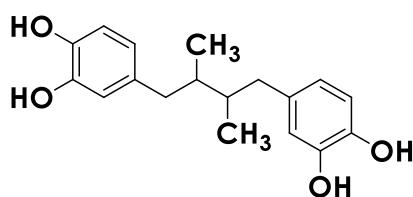
Η ρίζα DPPH έχει το πλεονέκτημα ότι δεν αποσυντίθεται και δεν αντιδρά με το οξυγόνο, συνεπώς χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης συνθετικών μορίων [81]. Σε διάλυμα, εμφανίζει ένα πορφυρό χρώμα, το οποίο μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά στα 517nm. Η ρίζα DPPH αντιδρά με ενώσεις που μπορούν να δεσμεύσουν το μονήρες ηλεκτρόνιο και να προσφέρουν ένα άτομο υδρογόνου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 26.



Σχήμα 26: Μηχανισμός δέσμευσης της ρίζας DPPH

Κατά την αντίδραση αυτή η ρίζα DPPH αποχρωματίζεται, δίνοντας ένα υποκίτρινο χρώμα. Μετρώντας την μεταβολή της απορρόφησης στα 517nm είναι εφικτός ο προσδιορισμός της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών DPPH[82].

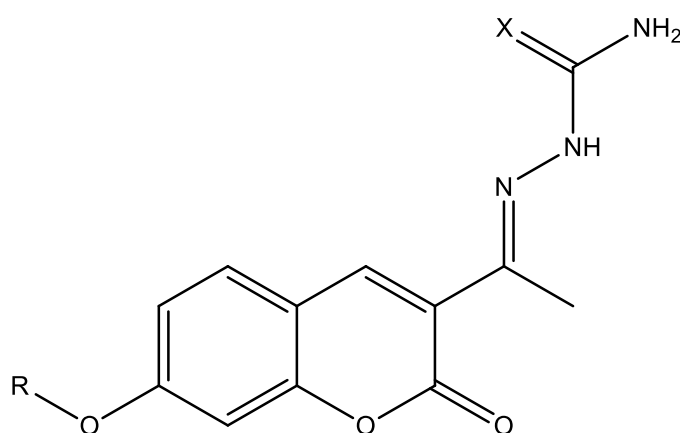
Προϋπόθεση για να μπορέσει μία ένωση να δεσμεύσει τη ρίζα DPPH είναι να μπορεί να προσφέρει ένα άτομο υδρογόνου και να μπορεί να σταθεροποιήσει το μονήρες ηλεκτρόνιο. Επιπλέον, μεγάλα μόρια ενδέχεται να μην μπορούν να προσεγγίσουν το μονήρες ηλεκτρόνιο, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Οι ενώσεις που πληρούν βέλτιστα αυτά τα κριτήρια είναι οι φαινόλες, όπως το νορ-διυδρογουαϊαρετικό οξύ (Nordihydroguaiaretic acid - NDGA).



Σχήμα 27: Χημική δομή NDGA

2. Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε με σκοπό το σχεδιασμό, τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό νέων κουμαρινικών παραγώγων και αξιολόγησή τους ως προς την νευροπροστατευτική τους δράση. Ο σχεδιασμός των νέων κουμαρινικών παραγώγων βασίστηκε σε σειρά κουμαρινικών αναλόγων που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής των Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. και έχουν δείξει δυναμική για νευροπροστατευτική δράση, λόγω της ικανότητας αναστολής του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης

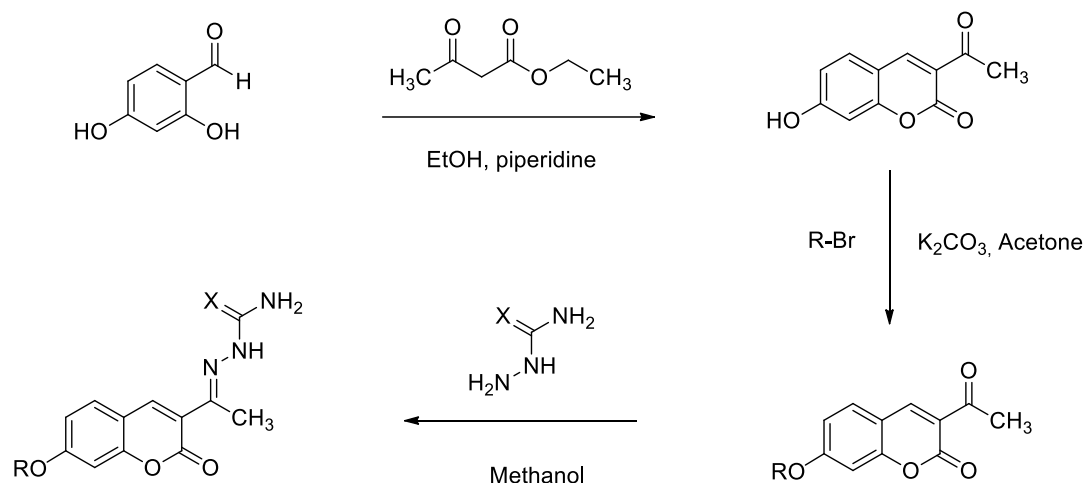


Σχήμα 28: Γενική δομή προς εξέταση κουμαρινικών παραγώγων

Τα μόρια που συντέθηκαν αξιολογήθηκαν ως προς τη δομή τους με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H NMR). Στη συνέχεια έγινε εκτίμηση της νευροπροστατευτικής τους δράσης μέσω *in vitro* μελέτης για την ικανότητα αναστολής των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση και βουτυρυλοχολινεστεράση, μέσω της τροποποιημένης μεθόδου Ellman από τους Rahman και Choudhary. Έγινε επίσης μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των μορίων, μέσω μελέτη αναστολής του οξειδωτικού DPPH.

3. Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας συντέθηκε μία σειρά κουμαρινικών υδραζονών, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:

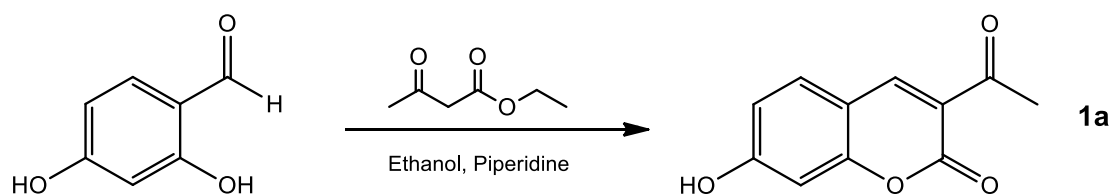


Σχήμα 29: Γραφική απεικόνιση της συνθετικής πορείας

Με αρχικό αντιδρόν την 2,4-διυδροξυβενζαλδεΐδη, συντέθηκε 3-ακετυλο-7-υδροξυ-2*H*-χρωμεν-2-όνη μέσω συμπύκνωσης Knoevenagel. Στη συνέχεια, μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστασης Williamson, έγινε σύνθεση κουμαρινικών παραγώγων αλκυλιωμένων στη θέση 7. Τέλος, με πυρηνόφιλη προσθήκη αμίνης στο καρβονύλιο στη θέση 3 έγινε σύνθεση κουμαρινικών υδραζονών.

3.1 Σύνθεση 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης

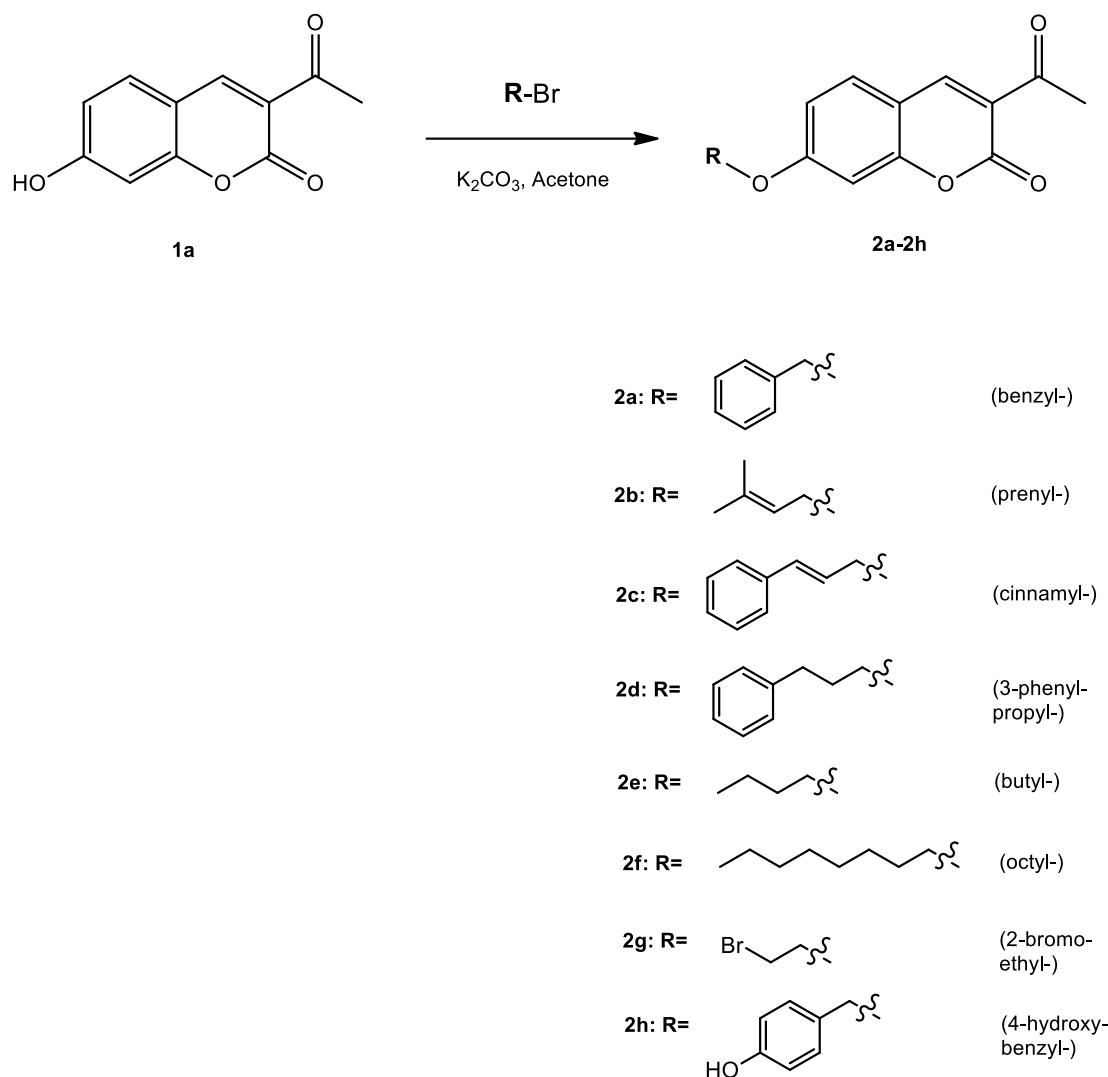
Η σύνθεση της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης έγινε με αντίδραση συμπύκνωσης Knoevenagel μεταξύ της 2,4-διυδροξυβενζαλδεΐδης και του ακετοξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1:1, σε διαλύτη αιθανόλη παρουσία καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης, [83]:



Σχήμα 30: Σύνθεση 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (1a)

3.2 Σύνθεση 3-ακετυλο-7-αλκοξυ-κουμαρινικών παραγώγων

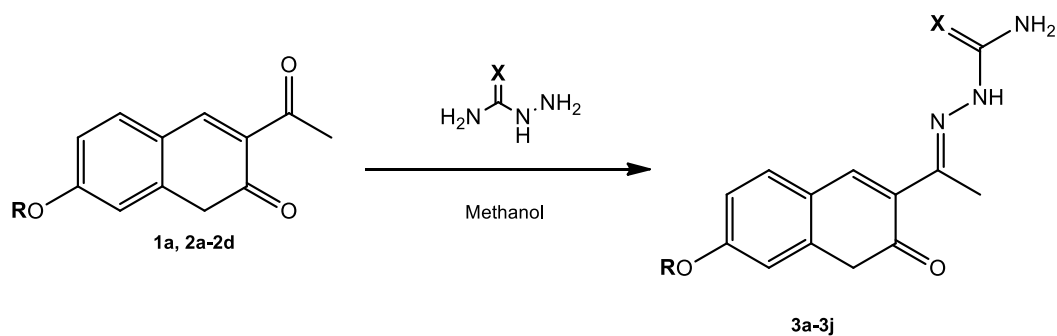
Στο δεύτερο στάδιο της σύνθεσης, η αλκυλίωση στη θέση 7 έγινε με αντίδραση Williamson μεταξύ της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και του κατάλληλου βρωμιδίου σε αναλογία 1:1.2, σε διαλύτη ακετόνη και βασικό περιβάλλον, παρουσία ανθρακικού καλίου [84].



Σχήμα 31: Σύνθεση 3-ακετυλο-7-αλκοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (2a-2h)

3.3 Σύνθεση κουμαρινικών υδραζονών

Στο τελικό στάδιο της σύνθεσης, η προσθήκη αμίνης στο καρβονύλιο στη θέση 3 έγινε με αντίδραση της κουμαρίνης με αμινογουανιδίνη ή σεμικαρβαζίδιο σε αναλογία 1.1:1 σε διαλύτη μεθανόλη[85].



3a: X= NH, R= H

3b: X= O, R= H

3c: X= NH, R= (benzyl-)

3d: X= O, R= (benzyl-)

3e: X= NH, R= (prenyl-)

3f: X= O, R= (prenyl-)

3g: X= NH, R= (cinnamyl-)

3h: X= O, R= (cinnamyl-)

3i: X= NH, R= (3-phenyl-propyl-)

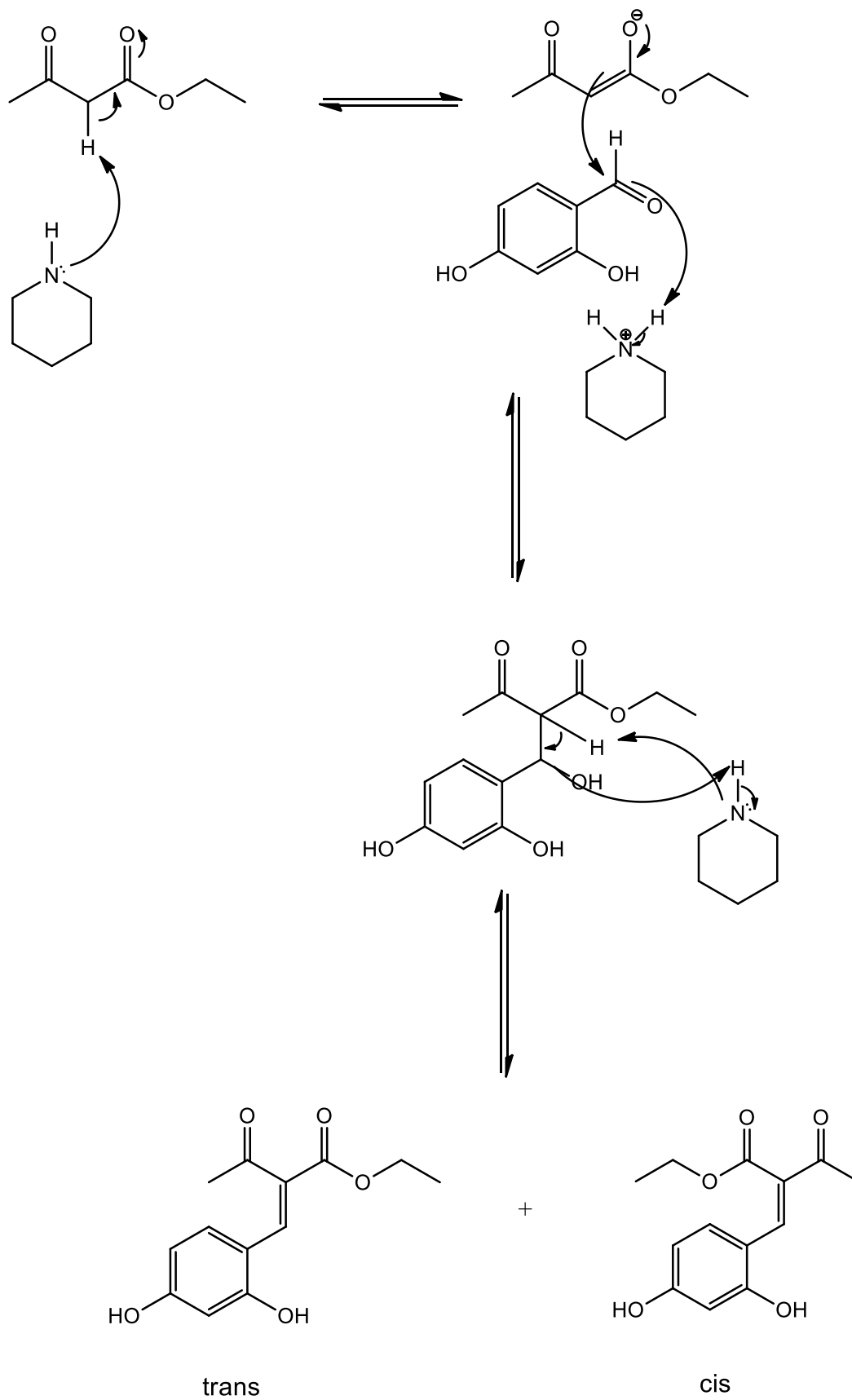
3j: X= O, R= (3-phenyl-propyl-)

Σχήμα 32: Σύνθεση κουμαρινικών υδραζονών (3a-3j)

3.4 Μηχανισμοί αντιδράσεων

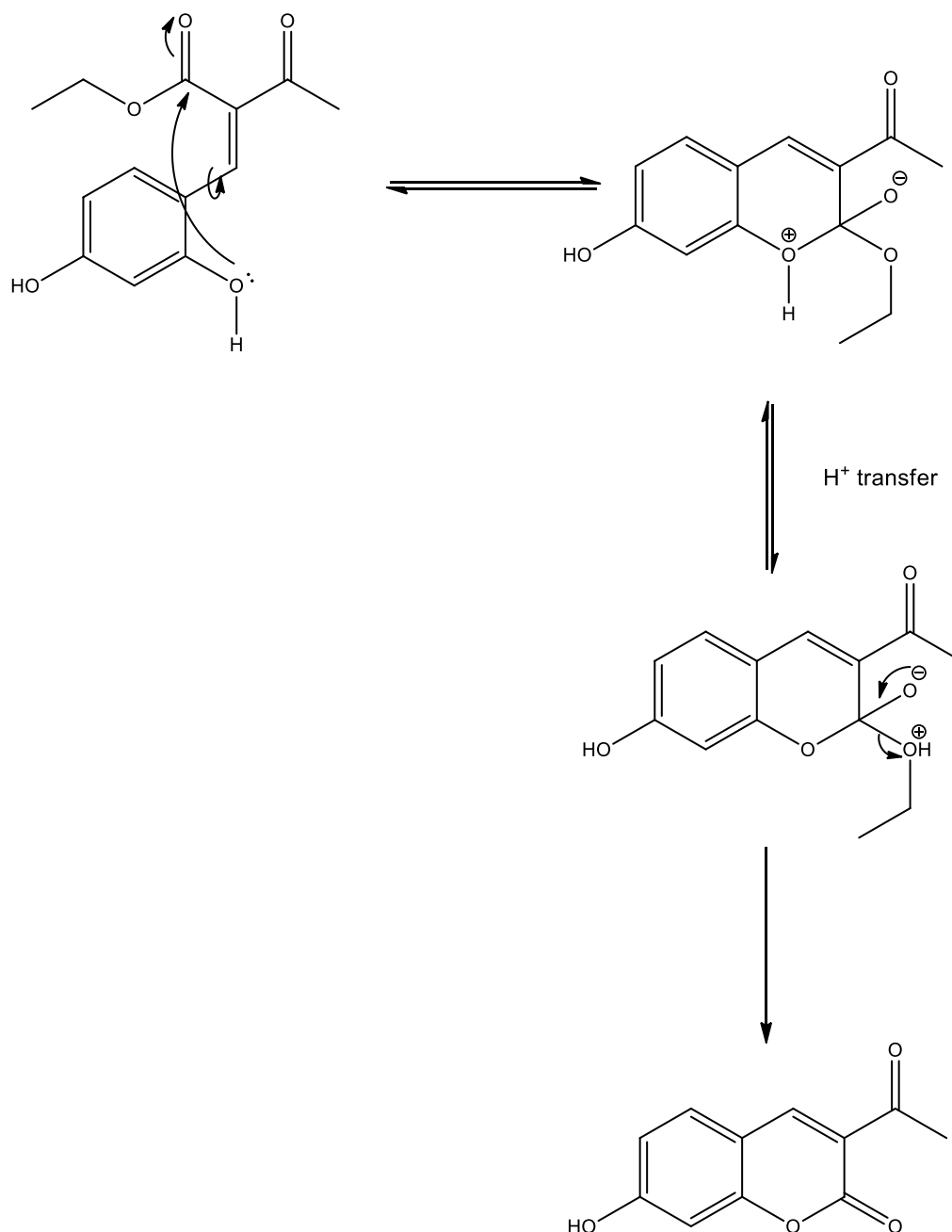
3.4.1 Μηχανισμός αντίδρασης Knoevenagel

Η συμπύκνωση Knoevenagel είναι μία αντίδραση σχηματισμού α,β ακόρεστων ενώσεων από παράγωγα καρβοξυλικών οξέων και αλδεΐδες σε βασικό περιβάλλον. Αρχικά, η βάση αποσπά ένα α-πρωτόνιο από το παράγωγο καρβοξυλικού οξέος, δημιουργώντας μία ενόλη. Στη συνέχεια η ενόλη προσβάλλει ως πυρηνόφιλο το ηλεκτρονιόφιλο που είναι ο καρβονυλικός άνθρακας της αλδεΐδας, σχηματίζοντας έναν δεσμό άνθρακα-άνθρακα. Στη συνέχεια, η βάση μπορεί να αποσπάσει και το δεύτερο α-πρωτόνιο, οδηγώντας το υδροξύλιο να λειτουργήσει σαν αποχωρούσα ομάδα αφού πρωτονιωθεί, σχηματίζοντας τον α,β διπλό δεσμό [86]



Σχήμα 33: Μηχανισμός αντίδρασης Knoevenagel

Στην προκειμένη περίπτωση, το cis προϊόν υφίσταται και μία ενδομοριακή μετεστεροποίηση, δημιουργώντας εξαμελή δακτύλιο. Παρ' ότι το cis ισομερές στην αντίδραση Knoevenagel δεν ευνοείται κινητικά, η σταθερότητα της δομής του τελικού προϊόντος το ευνοεί θερμοδυναμικά.

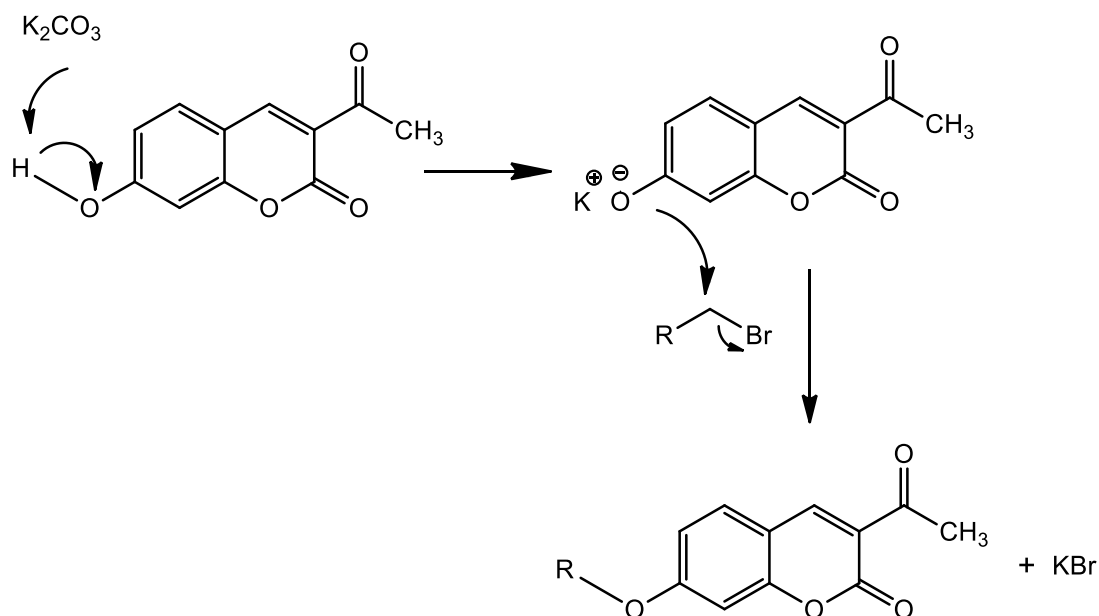


Σχήμα 34: Μηχανισμός ενδομοριακής μετεστεροποίησης προς 3-ακέτυλο-7-υδροξύ-κουμαρίνη

3.4.2 Μηχανισμός σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson

Η αντίδραση Williamson είναι μία αντίδραση σύνθεσης αιθέρων και γίνεται μεταξύ μίας αλκοόλης και ενός αλκυλαλογονιδίου σε βασικό περιβάλλον. Ανήκει στις αντιδράσεις πυρηνόφιλης υποκατάστασης και γίνεται μέσω μηχανισμού SN₂ (substitution nucleophilic 2). Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα βάση αποπρωτονιώνει την υδροξυλομάδα της αλκοόλης, κάνοντας την καλύτερο πυρηνόφιλο. Στη συνέχεια,

το πυρηνόφιλο προσβάλλει το ηλεκτρονιόφιλο, που είναι το άτομο άνθρακα στο αλκυλαλογονίδιο που είναι συνδεδεμένο με το αλογόνο. Αυτό οδηγεί σε μία μεταβατική κατάσταση, στην οποία το άτομο άνθρακα είναι μερικώς συνδεδεμένο και με το αλογόνο και με το πυρηνόφιλο. Το αλογόνο στη συνέχεια λειτουργεί σαν αποχωρούσα ομάδα και σχηματίζεται ο δεσμός άνθρακα-οξυγόνου του τελικού προϊόντος [87].

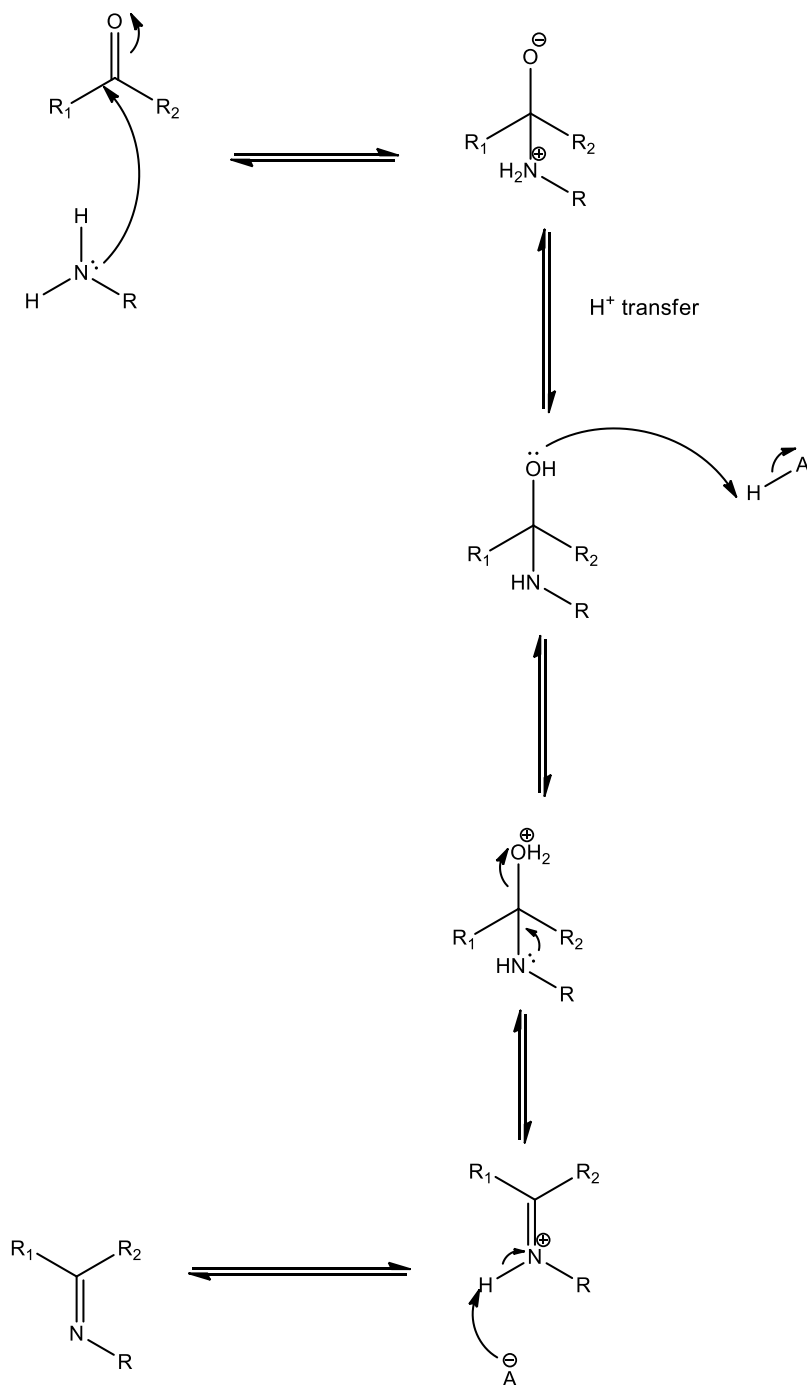


Σχήμα 35: Μηχανισμός σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson

Η αποδοτικότητα της αντίδρασης Williamson επηρεάζεται από τη φύση του πυρηνόφιλου και του ηλεκτρονιόφιλου, καθώς και από το διαλύτη. Όσον αφορά το ηλεκτρονιόφιλο, πρωτοταγή αλκυλαλογονίδια με μικρότερες ανθρακικές αλυσίδες ευνοούν την αντίδραση, λόγω μικρότερης στερεοχημικής παρεμπόδισης. Επίσης, η ύπαρξη συζυγών διπλών δεσμών ευνοεί την αντίδραση λόγω σταθεροποίησης της ενδιάμεσης κατάστασης από τα τροχιακά του π-συστήματος. Ακόμη, σημασία έχει και η αποχωρούσα ομάδα ($I > Br > Cl > F$). Όσον αφορά το πυρηνόφιλο, η δραστηριότητα αυξάνεται με αύξηση της βασικότητας. Τέλος, η αντίδραση ευνοείται σε απρωτικούς πολικούς διαλύτες, γιατί οι πρωτικοί διαλύτες τείνουν να σταθεροποιούν το πυρηνόφιλο, κάνοντας το ασθενέστερο.

3.4.3 Μηχανισμός πυρηνόφιλης προσθήκης αμινών στο καρβονύλιο

Η αντίδραση σχηματισμού ιμίνης είναι μία πυρηνόφιλη προσθήκη πρωτοταγούς αμίνης στο καρβονύλιο και καταλύεται από βάση ή οξύ. Αρχικά, η αμίνη, λειτουργώντας σαν πυρηνόφιλο, προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα και μετά από μεταφορά πρωτονίου σχηματίζεται μια καρβινολαμίνη. Οι καρβινολαμίνες είναι ασταθείς και μετά από πρωτονίωση του οξυγόνου, υφίστανται αφυδάτωση. Τέλος, αποπρωτονιώνεται το άζωτο, σχηματίζοντας την ιμίνη



Σχήμα 36: Μηχανισμός πυρηνόφιλης προσθήκης αμίνης στο καρβονύλιο

Η αντίδραση καταλύεται από βάση ή οξύ, αλλά μεγάλες συγκεντρώσεις του καταλύτη μπορούν να δράσουν ανασταλτικά για την αντίδραση. Μεγάλη συγκέντρωση οξέος οδηγεί σε πρωτονίωση της πρωτοταγούς αμίνης, εμποδίζοντας την από το να δράσει σαν πυρηνόφιλο. Αντίστοιχα, μεγάλη συγκέντρωση βάσης δεν επιτρέπει την πρωτονίωση της καρβινολαμίνης[85].

4. Μέθοδοι

4.1. Όργανα και συσκευές οργανικής σύνθεσης

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων, καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητας των προϊόντων έγινε με την τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography – TLC). Για την τεχνική του TLC χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου της εταιρείας Merck, επιστρωμένες με Silica Gel με φοροζόντα δείκτη F254. Η ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων έγινε σε σύστημα διαλυτών με κατάλληλες αναλογίες πετρελαϊκού αιθέρα / οξικού αιθυλεστέρα ή διχλωρομεθανίου / Μεθανόλης. Οι κηλίδες εμφανίστηκαν υπό λάμπα υπεριώδους (Ultraviolet - UV) ακτινοβολίας στα 254nm μετά από εμφάπτιση των πλακών σε 7% αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (Phosphomolybdic acid – PMA) και θέρμανση τους.

Για τον καθαρισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές ανακρυστάλλωσης, χρωματογραφίας στήλης και παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Preparatory TLC). Η ανακρυστάλλωση έγινε σε δυαδικά συστήματα διαλυτών, ανάλογα με την διαλυτότητα του επιθυμητού προϊόντος και των παραπροϊόντων της αντίδρασης. Η χρωματογραφία στήλης ταχείας ανάπτυξης (Flash Column Chromatography – FCC) έγινε με χρήση Silica Gel 60 (40-63 Microns) της εταιρείας Merck. Η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας έγινε σε γυάλινες πλάκες της εταιρείας Merck, επιστρωμένες με Silica Gel πάχους 250μm με φοροζόντα δείκτη F254.

Η εξάτμιση των οργανικών διαλυτών έγινε σε περιστροφικό εξατμιστήρα BüchiRotavapor® R-210 (Εικόνα 14) υπό ελαττωμένη πίεση και υπό θέρμανση σε θερμοκρασίες 40-50°C. Η τελική ξήρανση των στερεών ενώσεων έγινε σε αντλία υψηλού κενού Edwards (RV-5).



Εικόνα 14: Περιστροφικός εξατμιστήρας BüchiRotavapor® R-210

Η ταυτοποίηση και ο έλεγχος καθαρότητας των συνθετιμένων ενώσεων με τεχνική Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance – NMR) πρωτονίου (^1H). Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν σε όργανο Varian 300MHz του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Ε.Ι.Ε.) (Εικόνα 15). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6) και οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων προσδιορίστηκαν σε ppm ως προς τη συχνότητα

συντονισμού της ένωσης αναφοράς τετραμεθυλοσιλάνιο (tetramethylsilane -TMS). Η πολλαπλότητα κορυφών στα φάσματα NMR αναφέρεται ως: s (singlet – απλή), d (doublet – διπλή), t (triplet – τριπλή), q (quadruplet – τετραπλή), m (multiplet – πολλαπλή), dd (doublet of doublets – διπλή διπλών), dt (doublet of triplets – διπλή τριπλών) και br (broad – ευρεία).



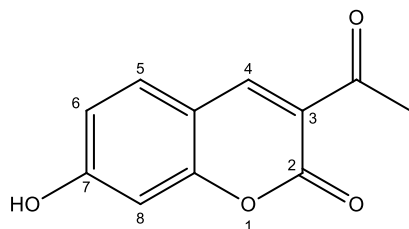
Εικόνα 15: Όργανο NMR Varian

Ο προσδιορισμός του σημείου τήξεως των ενώσεων έγινε σε συσκευή Gallenkamp (Εικόνα 16) μέσα σε ανοιχτούς τριχοειδείς σωλήνες.



Εικόνα 16: Συσκευή Gallenkamp για μέτρηση σημείου τήξεως

4.2 Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων



4.2.1 Σύνθεση 3-ακετυλο-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (1a)

Σε σφαιρική φιάλη διαλύθηκαν 10.86mmol (1500mg) 2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης και 10.86mmol (1,37mL) αιθυλεστέρα του ακετοξικού οξέος σε 30mL αιθανόλη και προστέθηκαν 161μL πιπεριδίνης. Το μείγμα αφέθηκε να αντιδράσει υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες στους 90°C υπό αναρροή και σε αδρανή ατμόσφαιρα N₂. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% PE: 30% EtOAc. Μετά το πέρας της αντίδρασης έγινε εξάτμιση του διαλύτη σε περιστροφικό εξάτμιστήρα και στη συνέχεια μέχρι ξηρού σε αντλία υψηλού κενού. Τέλος, το προϊόν ανακρυσταλλώθηκε σε σύστημα διαλυτών μεθανόλης : διχλωρομεθανίου και η καθαρότητα ελέγχθηκε με φασματοσκοπία ¹H NMR. Το προϊόν παρελήφθη ως πράσινο στερεό.

Απόδοση: 51.0%

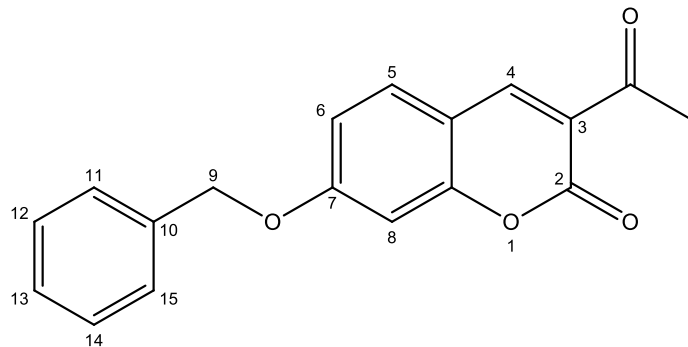
Σημείο τήξεως: 230-232 °C

¹HNMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.37 (s, 1H, H-4), 7.38 (d, *J* = 3 Hz, 1H, H-5), 6.75 (dd, *J* = 3 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-6), 6.72 (s, 1H, H-8), 2.57 (s, 3H, 3-OCH₃)

4.2.2 Σύνθεση 7-αλκοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (Γενική μέθοδος A)

Σε σφαιρική φιάλη διαλύθηκε ποσότητα 3-ακετυλο-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (1ea) με κατάλληλη ποσότητα αλκυλο-βρωμιδίου (1.2ea) σε ακετόνη παρουσία ξηρού K₂CO₃ (1ea). Το μείγμα αφέθηκε να αντιδράσει υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες στους 56°C υπό αναρροή και σε αδρανή ατμόσφαιρα N₂. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών. Ακολούθησε ανακρυστάλλωση του προϊόντος σε σύστημα διαλυτών μεθανόλης : διχλωρομεθανίου και η καθαρότητα ελέγχθηκε με φασματοσκοπία ¹H NMR.

4.2.2 3-ακετυλο-7-βενζυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (2a)



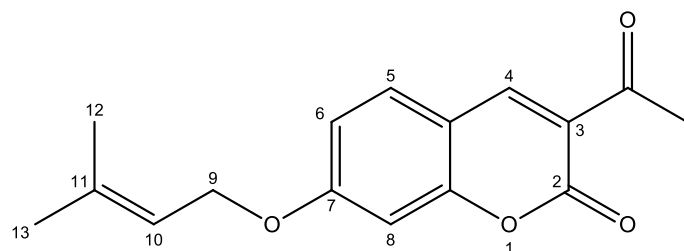
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **A**, 1.27mmol (260mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ κουμαρίνης, 1.53mmol (128μL) βενζυλο-βρωμιδίου και 1.27mmol (176mg) K₂CO₃ προστέθηκαν σε 18mL ακετόνης. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό κίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 85.7%

Σημείο τήξεως: 182-183 °C (αποσυντέθηκε)

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.49 (s, 1H, H-4), 7.55 (d, *J* = 9.0Hz, 1H, H-5), 7.46-7.31 (m, 5H, H-11 & H-12 & H-13 & H-14 & H-15) 6.97 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 5.16 (s, 2H, H-9), 2.70 (s, 3H, 3-OCH₃)

4.2.4 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (2b)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **A**, 1.76mmol (360mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ κουμαρίνης, 2.12 mmol (246μL) πρενυλο-βρωμιδίου και 1.76mmol (243mg) K₂CO₃ προστέθηκαν σε 25mL

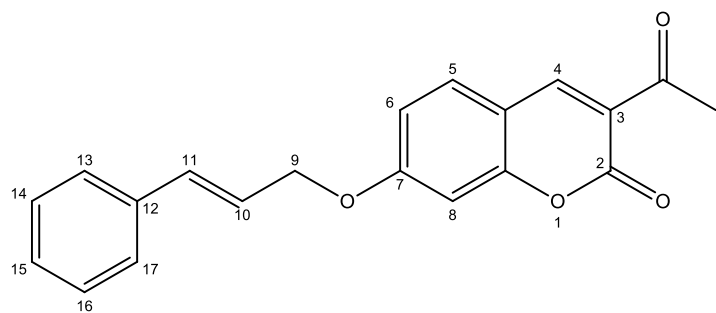
ακετόνης. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό πορτοκαλί χρώματος.

Απόδοση: 66.5%

Σημείο τήξεως: 148 °C

¹HNMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.48 (s, 1H, H-4), 7.52 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H-5), 6.89 (dd, *J* = 4.5 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-8), 5.46 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-10), 4.61 (d, *J* = 3.3Hz, 2H, H-9), 2.70 (s, 3H, 3-OCH₃), 1.81 (s, 3H, H-12), 1.77 (s, 3H, H-13)

4.2.5 3-ακετυλο-7-κινναμυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (2c)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **A**, 1.46mmol (300mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ κουμαρίνης, 1.76 mmol (347mg) κινναμυλο-βρωμιδίου και 1.46mmol (202mg) K₂CO₃ προστέθηκαν σε 20mL ακετόνης. Το προϊόν

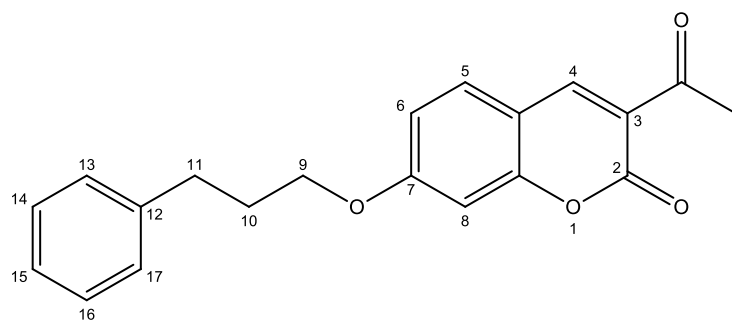
παρελήφθη σαν στερεό καφέ χρώματος.

Απόδοση: 39.6%

Σημείο τήξεως: 175-177 °C

¹HNMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.50 (s, 1H, H-4), 7.56 (d, *J* = 8.7Hz, 1H, H-5), 7.44-7.28 (m, 5H, H-13 & H-14 & H-15 & H-16 & H-17) 6.95 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.89 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-8), 6.77 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, H-11), 6.40 (dt, *J* = 11.7 Hz, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-10), 4.80 (dd, *J* = 6.0 Hz, *J* = 0.9 Hz, 2H, H-9), 2.71 (s, 3H, 3-OCH₃)

4.2.6 3-ακετυλο-7-(3-φαινυλ-προπαν)οξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (2d)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **A**, 2.17mmol (443mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ κουμαρίνης, 2.60 mmol (396μL) 3-φαινυλ-προπανο-βρωμιδίου και 2.17mmol (299mg) K_2CO_3 προστέθηκαν σε 30mL ακετόνης. Το προϊόν

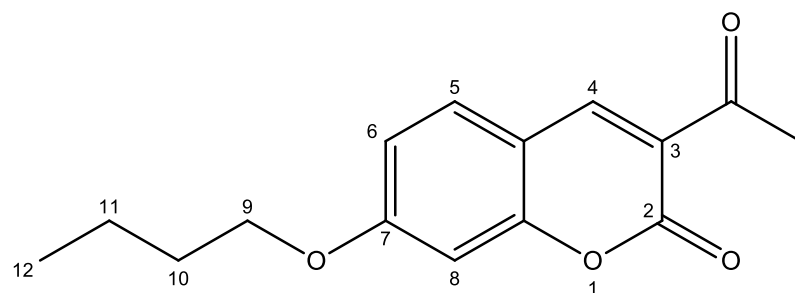
παρελήφθη σαν στερεό κίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 6.6%

Σημείο τήξεως: 155 °C

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.50 (s, 1H, H-4), 7.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-5), 7.32-7.18 (m, 5H, H-13 & H-14 & H-15 & H-16 & H-17) 6.89 (dd, $J = 9.0$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.79 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 4.05 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-9), 2.83 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-11), 2.71 (s, 3H, 3-OCH₃), 2.21-2.12 (m, 2H, H-10)

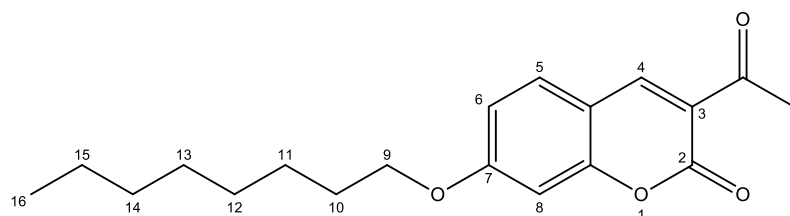
4.2.7 3-ακετυλο-7-βουτυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (2e)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **A**, 1.46mmol (300mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ κουμαρίνης, 1.76 mmol (189μL) βουτυλο-βρωμιδίου και 1.46mmol (202mg) K_2CO_3

προστέθηκαν σε 20mL ακετόνης. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό καφέ χρώματος. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, δεν πραγματοποιήθηκε η σύνθεση.

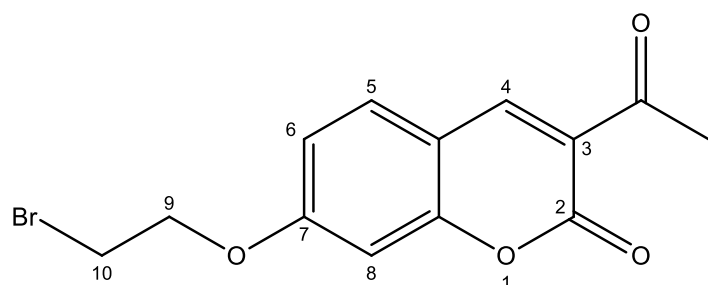
4.2.8 3-ακετυλο-7-οκτυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (2f)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **A**, 1.46mmol (300mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ κουμαρίνης, 1.76 mmol (304μL) οκτυλο-βρωμιδίου και 1.46mmol (202mg)

K_2CO_3 προστέθηκαν σε 20mL ακετόνης. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό καφέ χρώματος. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, δεν πραγματοποιήθηκε η σύνθεση.

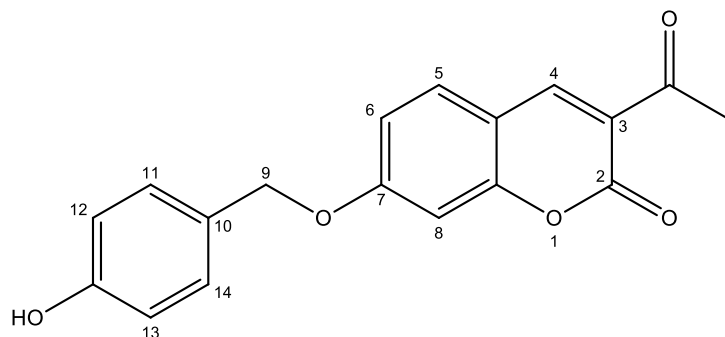
4.2.9 3-ακετυλο-7-(2-βρωμο-αιθυλ)οξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (2g)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **A**, 1.76mmol (360mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ κουμαρίνης, 2.11 mmol (182μL) 1,2-διβρωμοαιθανίου και 1.76mmol (243mg) K₂CO₃ προστέθηκαν σε 25mL

ακετόνης. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό καφέ χρώματος. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, δεν πραγματοποιήθηκε η σύνθεση.

4.2.10 3-ακετυλο-7-(4-υδροξυ-βενζυλ)οξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (2g)



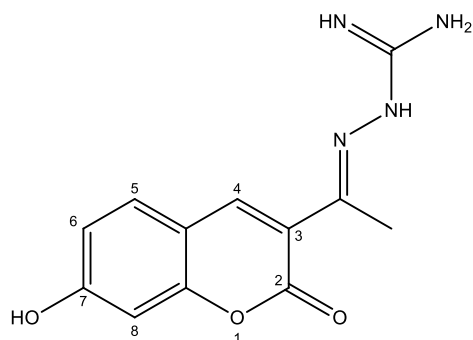
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **A**, 1.46mmol (300mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ κουμαρίνης, 1.76 mmol (354mg) 4-υδροξυ-βενζυλ-βρωμιδίου και 1.46mmol (202mg) K₂CO₃ προστέθηκαν σε 20mL ακετόνης. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό

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

4.2.11 Σύνθεση κουμαρινικών υδραζονών (Γενική μέθοδος **B**)

Σε σφαιρική φιάλη διαλύθηκε ποσότητα της εκάστοτε 3-ακετυλο-7-υποκατεστημένης κουμαρίνης (**1a**, **2a**, **2b**, **2c**, **2d**) (1.1eq) με κατάλληλη ποσότητα υδροχλωρικής αμινογουανιδίνης ή υδροχλωρικού σεμικαρβαζιδίου (1eq) σε μεθανόλη. Το μείγμα αφέθηκε να αντιδράσει υπό συνεχή ανάδευση για 3h στους 65°C και ύστερα για 24h σε θερμοκρασία δωματίου υπό αναρροή και σε αδρανή ατμόσφαιρα N₂. Στη συνέχεια, το μείγμα ψύχθηκε για 3h στους 4°C και ακολούθησε διήθηση, από την οποία το προϊόν παρελήφθη ως ίζημα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών και η καθαρότητα ελέγχθηκε με φασματοσκοπία ¹H NMR.

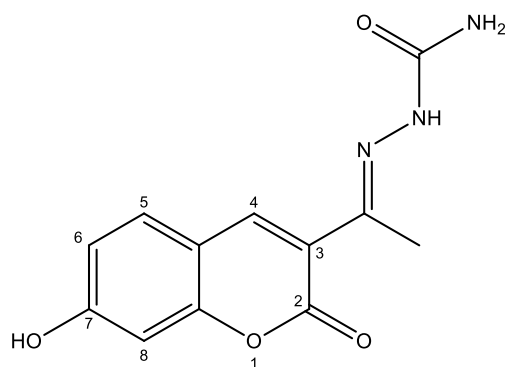
4.2.12 (E)-2(1-(7-υδροξυ-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3a)



σύνθεση.

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **B**, 0.50mmol (100mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.45mmol (49.2mg) υδροχλωρικής αμινογουανιδίνης προστέθηκαν σε 4.5mL μεθανόλη με προσθήκη καταλυτικά 1.5mg Π-τολουενοσουλφονικού οξέος (PTSA). Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό υποπράσινου χρώματος. Μέσω φασματοσκοπίας NMR διαπιστώθηκε ότι δεν πραγματοποιήθηκε η

4.2.13 (E)-2(1-(7-υδροξυ-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξαμίδιο (3b)



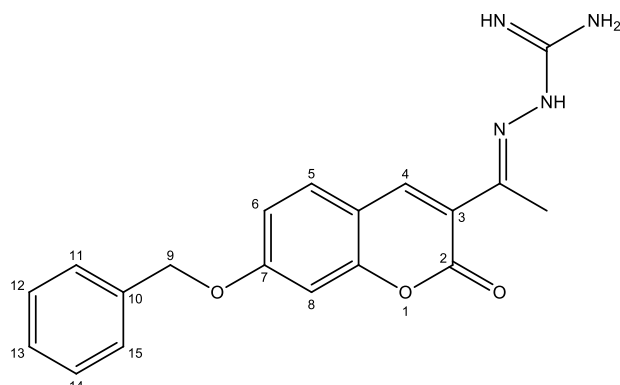
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **B**, 0.50mmol (100mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.45mmol (50.7mg) υδροχλωρικού σεμικαρβαζιδίου προστέθηκαν σε 4.5mL μεθανόλη. Έγινε καθαρισμός του προϊόντος με ανακρυστάλλωση σε σύστημα διχλωρομεθανίου : μεθανόλης. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό γκρι-πράσινου χρώματος.

Απόδοση: 76.8%

Σημείο τήξεως: 226-228 °C

¹H NMR (300MHz, DMSO): δ (ppm) 10.64 (s, 1H, -OH), 9.378 (s, 1H, 3-C-N-NH), 8.21 (s, 1H, H-4), 7.57 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.80 (dd, *J* = 11.7 Hz, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-6), 6.71 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-8), 6.45 (s, 2H, 3-C-NH₂), 2.09 (s, 3H, 3-CH₃)

4.2.14 (E)-2(1-(7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3c)



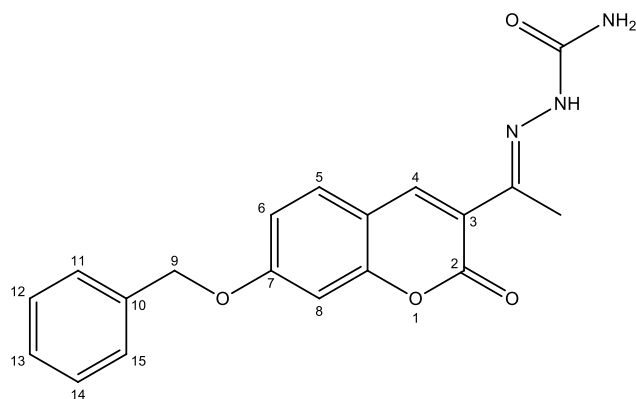
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **B**, 0.34mmol (100mg) 3-ακετυλο-7-βενζυλοξυ-κουμαρίνης και 0.31mmol (34.1mg) υδροχλωρικής αμινογουανιδίνης προστέθηκαν σε 3.5mL μεθανόλη. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό κίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 19.6%

Σημείο τήξεως: 219-220 °C

¹H NMR (300MHz, DMSO): δ (ppm) 11.14 (s, 1H, 3-C-N-NH), 8.41 (s, 1H, H-4), 7.89-7.72 (br, 3H, 3-C-NH₂ & 3-C=NH), 7.70 (d, *J* = 6.3Hz, 1H, H-5), 7.50 -7.33 (m, 5H, H-11 & H-12 & H-13 & H-14 & H-15), 7.15 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-8), 7.09 (dd, *J* = 6.6 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-6), 5.24 (s, 2H, H-9), 2.27 (s, 3H, 3-CH₃)

4.2.15 (E)-2(1-(7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξαμίδιο (3d)



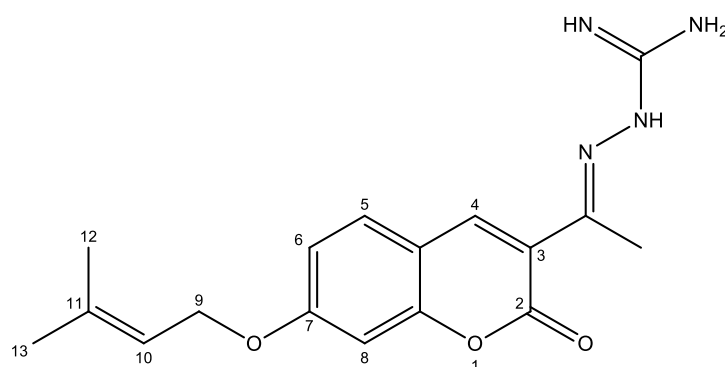
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **B**, 0.14mmol (42mg) 3-ακετυλο-7-βενζυλοξυ-κουμαρίνης και 0.13mmol (14.5mg) υδροχλωρικού σεμικαρβαζιδίου προστέθηκαν σε 2mL μεθανόλη. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό κίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 42.3%

Σημείο τήξεως: 206-208 °C

¹H NMR (300MHz, DMSO): δ (ppm) 9.44 (s, 1H, 3-C-N-NH), 8.28 (s, 1H, H-4), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.51 -7.33 (m, 5H, H-11 & H-12 & H-13 & H-14 & H-15), 7.11 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-8), 7.05 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.49 (s, 2H, 3-C-NH₂), 5.23 (s, 2H, H-9), 2.12 (s, 3H, 3-CH₃)

4.2.16 (E)-2(1-(7-(πρενυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3e)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **B**, 0.55mmol (150mg) 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.50mmol (55.3mg) υδροχλωρικής αμινογουανιδίνης προστέθηκαν σε 5mL μεθανόλη. Έγινε καθαρισμός τους προϊόντος με

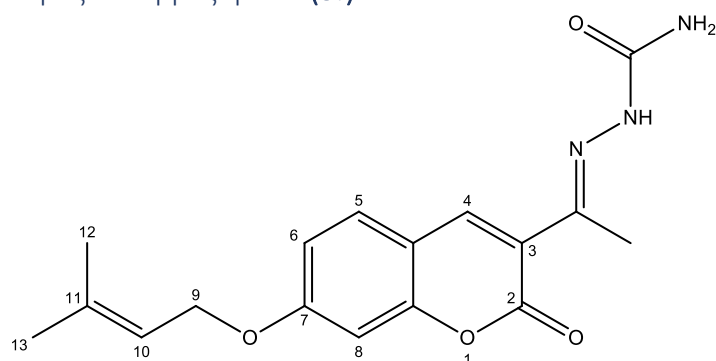
ανακρυστάλλωση σε σύστημα διχλωρομεθανίου : μεθανόλης. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό κίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 71.3%

Σημείο τήξεως: Αναμένεται μέτρηση του σημείου τήξεως

¹H NMR (300MHz, DMSO): δ (ppm) 8.41 (s, 1H, H-4), 7.87-7.76 (br, 4H, 3-C-N-NH & 3-C-NH₂ & 3-C=NH) 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-5), 7.05 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-8), 7.00 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-6), 5.46 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-2'), 4.64 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-1'), 2.28 (s, 3H, 3-CH₃), 1.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 6H, 3'-CH₃ & 4'-CH₃)

4.2.17 (E)-2(1-(7-(πρενυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξαμίδιο (3f)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **B**, 0.55mmol (150mg) 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.50mmol (55.8mg) υδροχλωρικού σεμικαρβαζιδίου προστέθηκαν σε 5mL μεθανόλη. Έγινε καθαρισμός τους προϊόντος

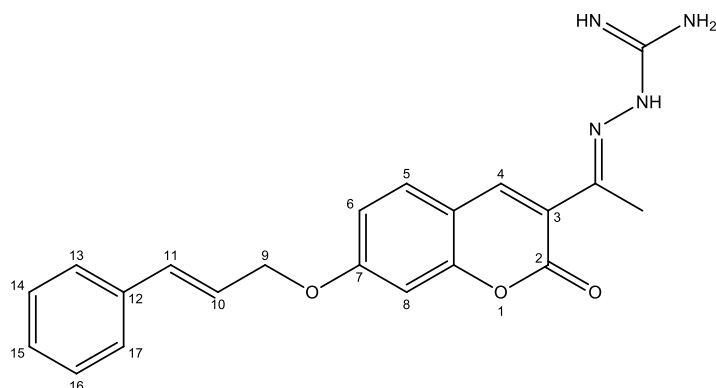
με ανακρυστάλλωση σε σύστημα διχλωρομεθανίου : μεθανόλης. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό κίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 75.9%

Σημείο τήξεως: Αναμένεται μέτρηση του σημείου τήξεως

¹H NMR (300MHz, DMSO): δ (ppm) 9.44 (s, 1H, 3-C-N-NH), 8.23 (s, 1H, H-4), 7.67 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-8), 6.97 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.63-6.35 (br, 2H, 3-C-NH₂) 5.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-10), 4.64 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, H-9), 2.11 (s, 3H, 3-CH₃), 1.74 (d, *J* = 7.8 Hz, 6H, H-12 & H-13)

4.2.18 (E)-2(1-(7-(κινναμυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3g)



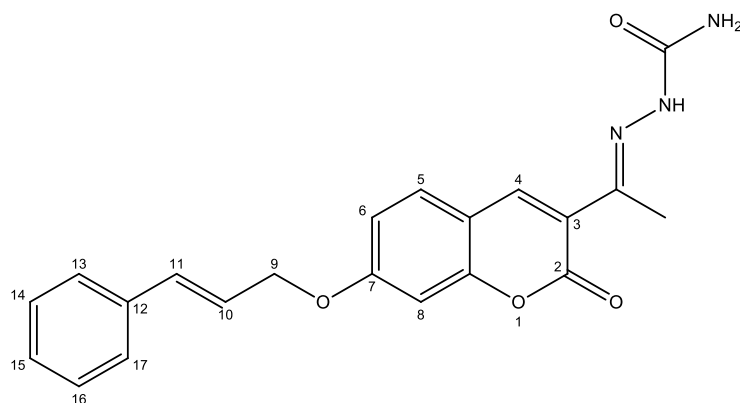
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **B**, 0.29mmol (93mg) 3-ακετυλο-7-κινναμυλοξυ-κουμαρίνης και 0.35mmol (38.5mg) υδροχλωρικής αμινογουανιδίνης προστέθηκαν σε 5mL μεθανόλη με προσθήκη καταλυτικά 1mg Π-τολουενοσουλφονικού οξέος

(PTSA). Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό καφέ χρώματος.

Απόδοση: 78.9%

Σημείο τήξεως: Αναμένεται μέτρηση του σημείου τήξεως

¹H NMR (300MHz, DMSO): δ (ppm) 11.15 (s, 1H, 3-C-N-NH), 8.41 (s, 1H, H-4), 7.85-7.73 (br, 3H, 3-C-NH₂ & 3-C=NH), 7.70 (d, *J* = 8.7Hz, 1H, H-5), 7.52-7.25 (m, 5H, H-13 & H-14 & H-15 & H-16 & H-17), 7.14 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-8), 7.07 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, H-11), 6.53 (dt, *J* = 12 Hz, *J* = 6 Hz, 1H, H-10), 4.87 (d, *J* = 6 Hz, 2H, H-9), 2.28 (s, 3H, 3-CH₃)



4.2.19 (E)-2(1-(7-(κινναμυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (3h)

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **B**, 0.31mmol (100mg) 3-ακετυλο-7-κινναμυλοξυ-κουμαρίνης και 0.28mmol (31.7mg) υδροχλωρικού σεμικαρβαζιδίου

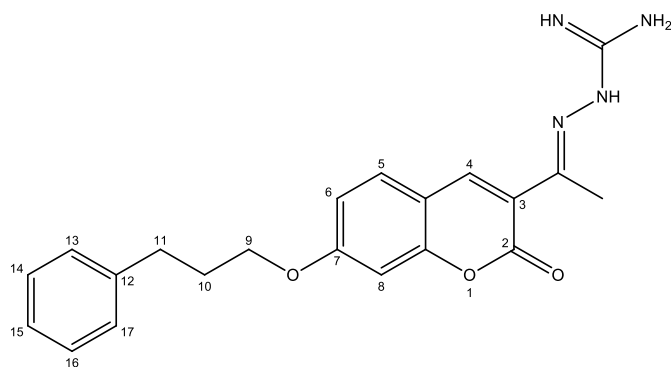
προστέθηκαν σε 3mL μεθανόλη. Έγινε καθαρισμός τους προϊόντος με ανακρυστάλλωση σε σύστημα διχλωρομεθανίου : μεθανόλης. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό καφέ χρώματος.

Απόδοση: 65.6%

Σημείο τήξεως: Αναμένεται μέτρηση του σημείου τήξεως

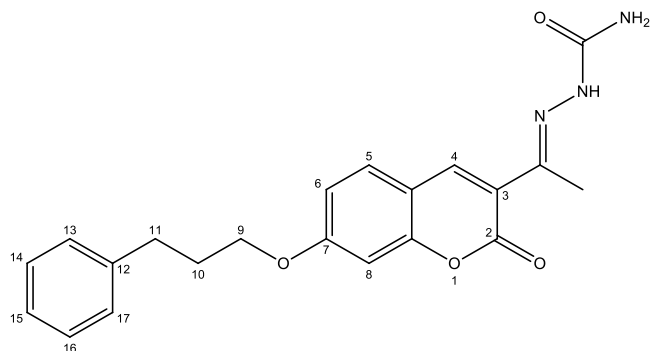
¹H NMR (300MHz, DMSO): δ (ppm) 9.44 (s, 1H, 3-C-N-NH), 8.23 (s, 1H, H-4), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.52-7.27 (m, 5H, H-13 & H-14 & H-15 & H-16 & H-17), 7.08 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-8), 7.04 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H-11), 6.58-6.44 (m, 3H, H-10 & 3-C-NH₂), 4.86 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H-9), 2.12 (s, 3H, 3-CH₃)

4.2.20 (*E*)-2(1-(7-((3-φαινυλ-προπαν)οξυ)-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (**3i**)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **B**, 0.13mmol (40.4mg) 3-ακετυλο-7-(3-φαινυλ-προπαν)οξυ-κουμαρίνης και 0.11mmol (12.6mg) υδροχλωρικής αμινογουανιδίνης προστέθηκαν σε 3mL μεθανόλη. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό κίτρινου χρώματος. Μέσω φασματοσκοπίας NMR διαπιστώθηκε ότι δεν πραγματοποιήθηκε η σύνθεση.

4.2.21 (*E*)-2(1-(7-((3-φαινυλ-προπαν)οξυ)-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξαμίδιο (**3j**)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο **B**, 0.14mmol (46mg) 3-ακετυλο-7-(3-φενυλ-προπαν)οξυ-κουμαρίνης και 0.13mmol (14.5mg) υδροχλωρικού σεμικαρβαζιδίου προστέθηκαν σε 3mL μεθανόλη. Έγινε καθαρισμός του προϊόντος με Prep TLC. Το προϊόν παρελήφθη σαν στερεό κίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 49.7%

Σημείο τήξεως: 184-185 °C

¹H NMR (300MHz, DMSO): δ (ppm) 9.43 (s, 1H, 3-C-N-NH), 8.28 (s, 1H, H-4), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.32 -7.15 (m, 5H, H-13 & H-14 & H-15 & H-16 & H-17), 7.02-6.95 (m, 2H, H-8 & H-6), 6.49 (s, 2H, 3-C-NH₂), 4.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-9), 2.75 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-11), 2.12 (s, 3H, 3-CH₃), 2.08-1.99 (m, 2H, H-10)

4.3 Αναστολή AChE

4.3.1 Υλικά και Όργανα

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης *in vitro* παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια για *in vitro* προσδιορισμό αναστολής AChE

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

Το ένζυμο που επιλέχθηκε για την παρούσα μέθοδο προέρχεται από το είδος *Electrophorus electricus*. Η επιλογή έγινε λόγω της υψηλής ομοιότητας με την ανθρώπινη ακετυλοχολινεστεράση (60% ομοιότητα στο ενεργό κέντρο).

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε vortex ZX3 Advanced Vortex Mixer της εταιρείας Velp Scientifica. Η μέτρηση των αποτελεσμάτων έγινε σε πλάκα 96 θέσεων και για την μέτρηση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή plate reader Epoch 2 Microplate Reader της εταιρείας Bio Tek Instruments (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Συσκευή Epoch 2 Microplate Reader

4.3.2 Πειραματική Διαδικασία

Χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) Tris-HCl 50mM (pH=8.0), παρασκευάστηκαν διαλύματα ακετυλοχολινεστεράσης *Electrophorus electricus* 0.1units/mL, DTNB 3mM και ATCI 14mM.

Σε κάθε πηγάδι πλάκας 96 θέσεων προστέθηκαν 158μL buffer, 20μL διαλύματος ακετυλοχολινεστεράσης και 2μL διαλύματος της εκάστοτε ένωσης σε DMSO. Οι τελικές προς εξέταση συγκεντρώσεις στο πηγάδι για την κάθε ένωση ήταν 100μM, 80μM, 60μM, 40μM και 20μM, με περαιτέρω αραιώσεις για ενώσεις που παρουσίαζαν υψηλή αναστολή του ενζύμου. Για control δείγματα χρησιμοποιήθηκε DMSO αντί για διάλυμα ένωσης. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 15min, προσθήκη από 10μL διαλυμάτων DTNB και ATCI και μέτρηση των απορροφήσεων στα 412nm σε χρόνους t=0min και t=10min.

Στην τροποποιημένη μέθοδο Ellman, η δράση του ενζύμου προσδίδει στα δείγματα έντονο κίτρινο χρώμα, ενώ δείγματα με ικανούς αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης αποκτούν ωχρό κίτρινο ή καθόλου χρώμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 18:



Εικόνα 18: Πλακίδιο 96 θέσεων μετά το πέρας της μεθόδου. Φαίνεται η διαφορά χρώματος ανάμεσα σε ασθενή (πάνω) και ισχυρό (κάτω) αναστολέα της AChE.

Η ποσοστιαία αναστολή της AChE υπολογίστηκε ως εξής:

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

Όπου:

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

Κάθε μέτρηση έγινε εις τριπλούν. Από τα δεδομένα αυτά υπολογίστηκε το IC₅₀ για την κάθε ένωση. Σαν ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η γαλανταμίνη (IC₅₀=0.92 μM).

4.4 Αναστολή BuChE

4.4.1 Υλικά και όργανα:

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αναστολής της βουτυρυλοχολινεστεράσης *in vitro* παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια για *in vitro* προσδιορισμό αναστολής BuChE

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	Fluorochem
Βουτυρυλοθειοχολίνη (Butyrylthiocholine - BTCl)	Alfa Aesar
Βουτυρυλοχολινεστεράση ορού αλόγου (equine serum) (BuChE)	Sigma-Aldrich
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide - DMSO)	Fischer Scientific
Tris Base	Fischer Scientific

Χρησιμοποιήθηκε βουτυρυλοχολινεστεράση ορού αλόγου, λόγω 90.1% ομολογίας με την ανθρώπινη βουτυρυλοχολινεστεράση.

Χρησιμοποιήθηκε η ίδια οργανολογία με τη μέθοδο προσδιορισμού αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης.

4.4.2 Πειραματική διαδικασία

Ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία με τη μέθοδο προσδιορισμού αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, χρησιμοποιώντας βουτυρυλοχολινεστεράση έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης και BTCl έναντι του ATCl.

4.5 Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης

4.5.1 Υλικά και όργανα

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια για *in vitro* προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλη (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – DPPH)	Sigma-Aldrich
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide - DMSO)	Fischer Scientific

Χρησιμοποιήθηκε η ίδια οργανολογία με τη μέθοδο προσδιορισμού αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης.

4.5.2 Πειραματική διαδικασία

Παρασκευάστηκε αλκοολικό διάλυμα DPPH 0.1mM. Σε κάθε πηγάδι πλάκας 96 θέσεων προστέθηκαν 195μL διαλύματος DPPH και 5μL διαλύματος της προς εξέταση ένωσης σε DMSO, ώστε η τελική συγκέντρωση της ένωσης στο πηγάδι να είναι 100μM. Για control δείγματα χρησιμοποιήθηκε DMSO αντί για διάλυμα ένωσης. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm σε χρόνους 30 και 60min. Η ποσοστιαία αναστολή του DPPH υπολογίστηκε ως εξής:

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

Σαν ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το νορ-διυδρογουαϊαρετικό οξύ (Nordihydroguaiaretic acid – NDGA) [88].

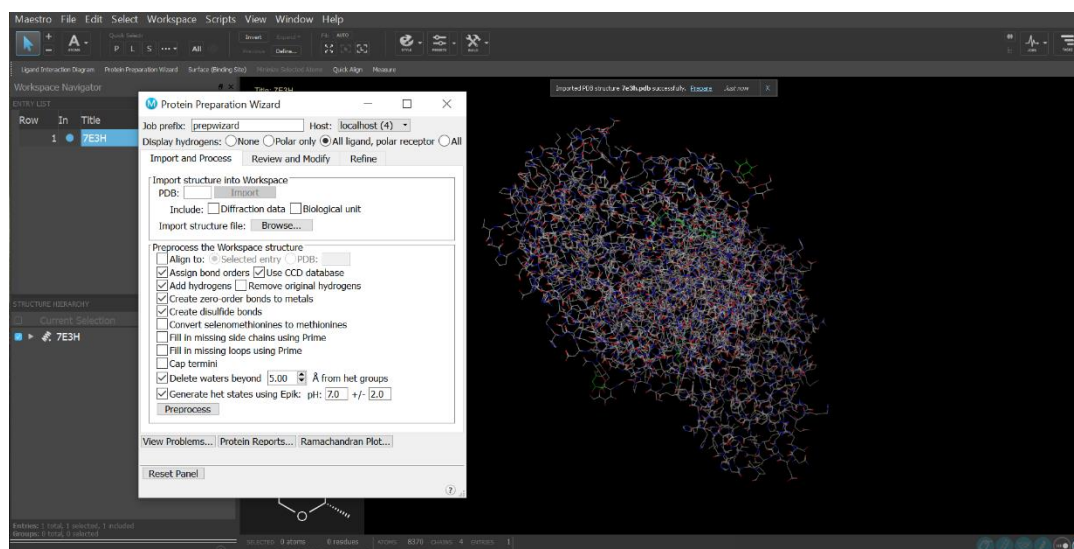
4.6 In silico ligand binding

4.6.1 Λογισμικό

Η διαδικασία του in silico ligand binding έγινε με τη χρήση του αλγορίθμου Glide, ο οποίος προσομοιώνει την πρόσδεση μικρών μορίων στο ενεργό κέντρο ενός υποδοχέα [89]. Ο αλγόριθμος αυτός φιλοξενείται στο Maestro, ένα από τα προγράμματα της σουίτας Schrödinger® και επιδιώκει να προσεγγίσει την βέλτιστη θέση και προσανατολισμό του μορίου στον διαμορφωτικό χώρο που είναι διαθέσιμος για την πρόσδεση του. Αρχικά, πραγματοποιεί μία αναζήτηση όλων των δυνατών περιοχών που μπορεί να προσλάβει το μόριο στο ενεργό κέντρο και στη συνέχεια με μία σειρά ιεραρχικών φίλτρων ελάχιστης ενέργειας αξιολογεί τις βέλτιστες πύξες.

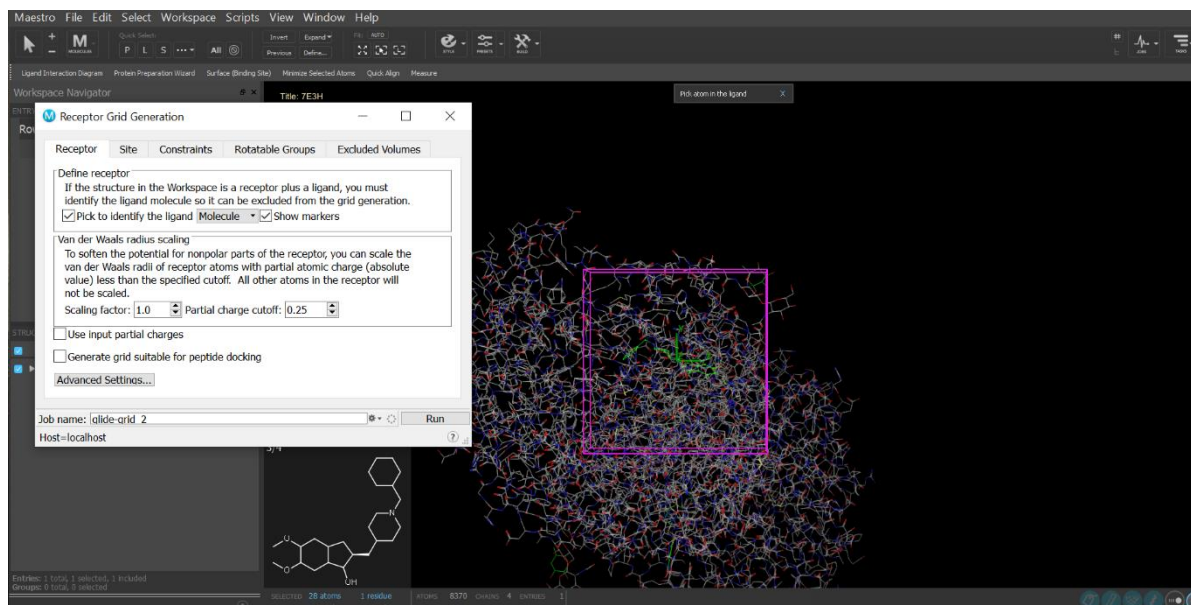
4.6.2 Μεθοδολογία

Αρχικά έγινε εισαγωγή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων της AChE από την PDB [62] και ακολούθησε προετοιμασία της μέσω του Protein Preparation Wizard, με και χωρίς αφαίρεση των νερών επιδιалύτωσης (Εικόνα 19). Η κρυσταλλική δομή εισόδου ήταν σύμπλοκο του ενζύμου με την δονεπεξίλη, ώστε να μπορεί να γίνει αξιολόγηση της ποιότητας του μοντέλου.



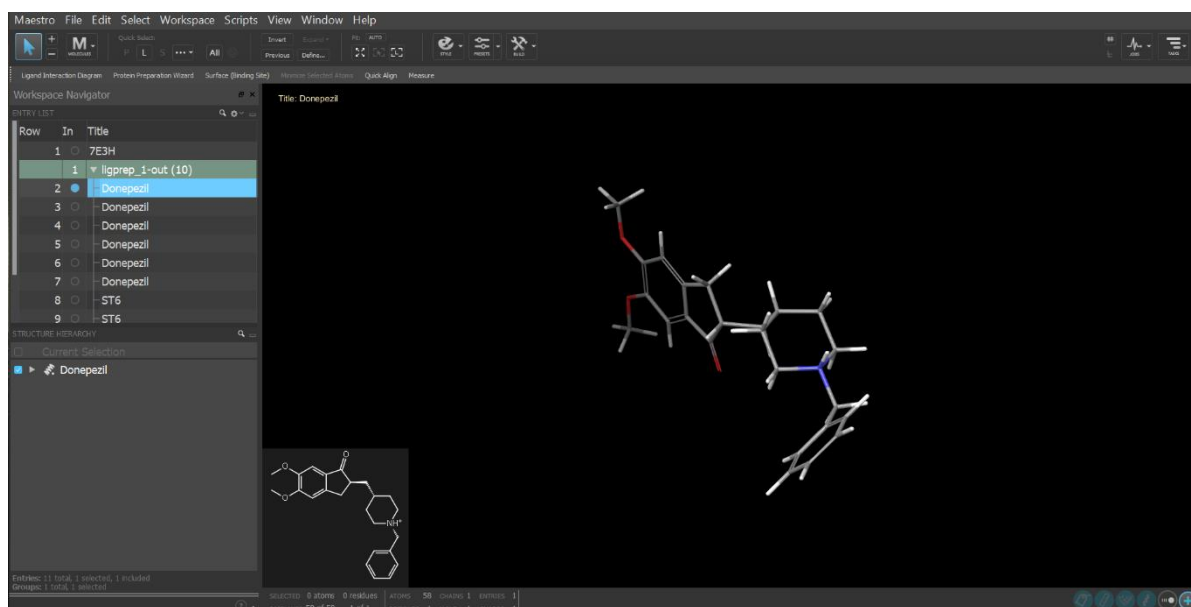
Εικόνα 19: Εισαγωγή και προετοιμασία κρυσταλλογραφικής δομής AChE στο Maestro μέσω του Protein Preparation Wizard

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε το πλέγμα (Grid) του ενεργού κέντρου, μέσω της εντολής Receptor Grid Generation, χρησιμοποιώντας σαν πρότυπο την κρυσταλλογραφική θέση πρόσδεσης της δονεπεζίλης (Εικόνα 20). Το Grid κατασκευάστηκε δύο φορές για κάθε πρωτεϊνική δομή, για κλίμακες 1 και 0,8 της ακτίνας Van der Waals των ατόμων του ενεργού κέντρου.



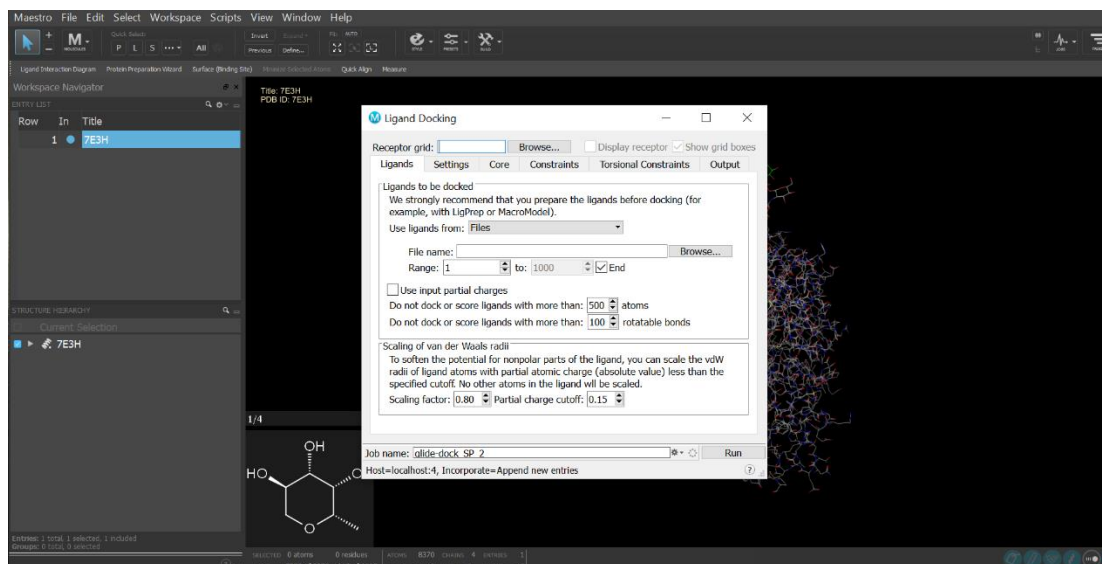
Εικόνα 20: Κατασκευή πλέγματος (Grid) του ενεργού κέντρου γύρω από την κρυσταλλογραφική θέση πρόσδεσης της δονεπεζίλης στην AChE

Τα μικρά μόρια που επρόκειτο να προσδεθούν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου σχεδιάστηκαν με την επιλογή 2D Sketcher και στην συνέχεια πέρασαν την διαδικασία του LigPrep, ώστε να δημιουργηθούν όλες οι πιθανές τρισδιάστατες ταυτομερείς και πρωτονιομένες δομές (Εικόνα 21). Η διαδικασία έγινε και για την δονεπεζίλη, ώστε να λειτουργήσει σαν control της ποιότητας του μοντέλου.



Εικόνα 21: Αποτελέσματα επεξεργασίας της δομής της δονεπεζίλης με το εργαλείο LigPrep

Ο υπολογισμός της πρόσδεσης των μικρών μορίων στο ενεργό κέντρο έγινε μέσω του εργαλείου Ligand Docking. Η διαδικασία του Docking έγινε και για τα τέσσερα Grids που είχαν κατασκευαστεί, χρησιμοποιώντας σαν Ligands τα αποτελέσματα του LigPrep (Εικόνα 22). Για κάθε Grid, το Docking έγινε εις διπλούν για κλίμακες 1 και 0,8 της ακτίνας Van der Waals των Ligands.

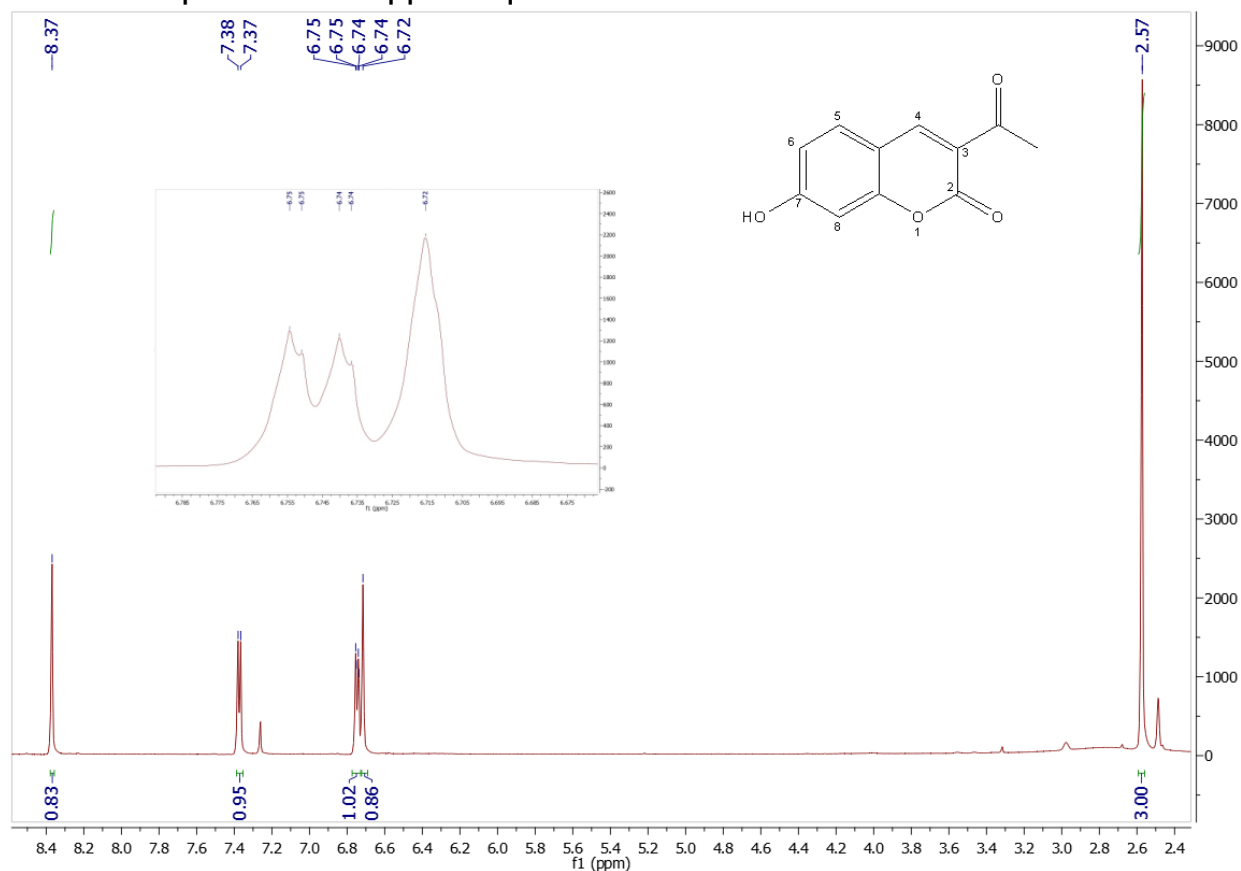


Εικόνα 22: Εργαλείο Ligand Docking μέσω του αλγορίθμου Glide

Τέλος, η αξιολόγηση του μοντέλου έγινε συγκρίνοντας τη θεωρητική πρόσδεση της δονεπεζίλης με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Η σύγκριση αυτή έγινε υπολογίζοντας την απόκλιση των δύο μορφών με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (Root Mean Square Deviation – RMSD). Η παραμετροποίηση του μοντέλου που έδινε την πιο ακριβή πρόσδεση της δονεπεζίλης χρησιμοποιήθηκε στην συνέχεια για τον προσδιορισμό της πρόσδεσης των υπόλοιπων μορίων.

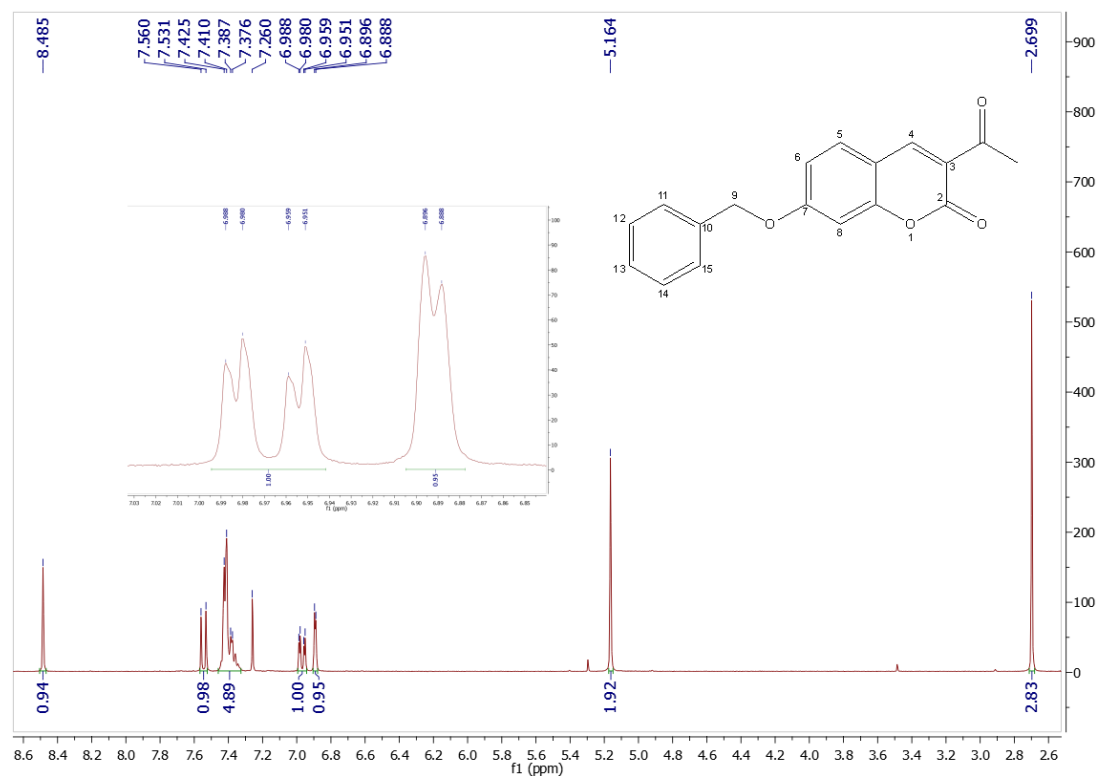
5. Αποτελέσματα-Συζήτηση

5.1 Φασματοσκοπική μελέτη



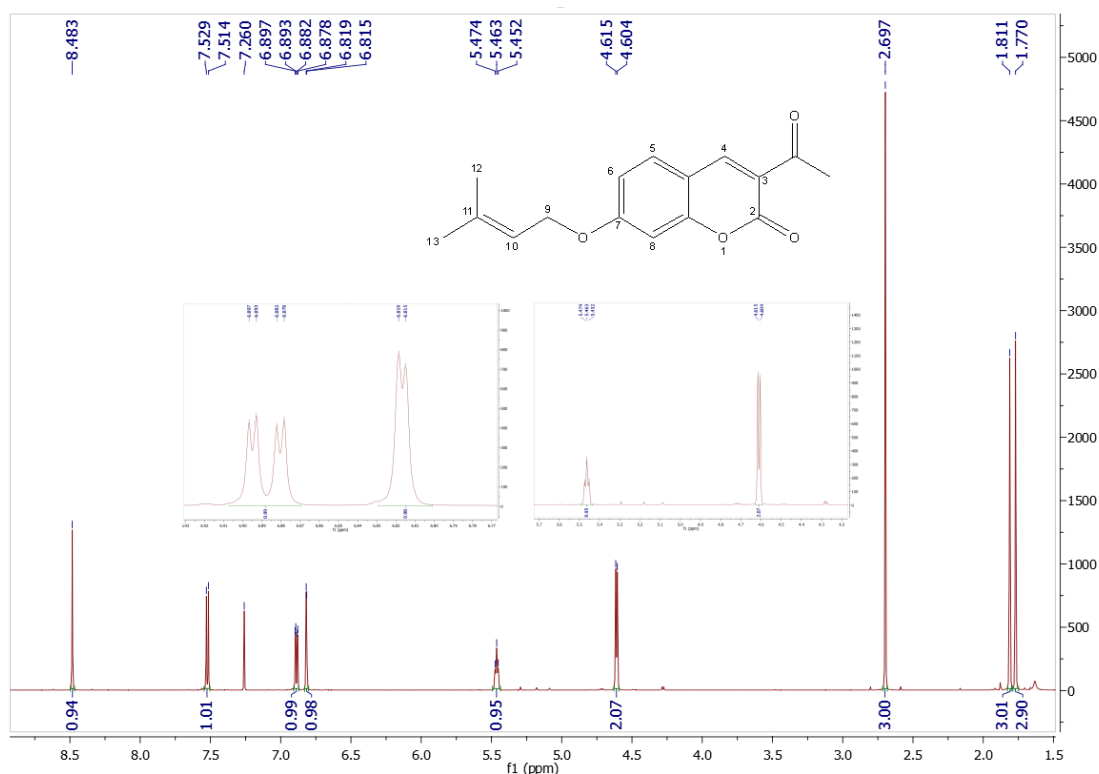
Φάσμα ^1H NMR της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (1a)

Το φάσμα χαρακτηρίζεται από μία απλή κορυφή στα 2.57ppm, η οποία αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της αλκυλομάδας στη θέση 3. Η απλή κορυφή στα 6.72ppm αποδίδεται στο H-8 και ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο. Ακολουθεί μια διπλή διπλών κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο στη θέση 6, το οποίο αλληλεπιδρά με τα μη ισοδύναμα πρωτόνια H-5 και H-8. Από το σχήμα της κορυφής αυτής φαίνεται μικρός δευτερεύων διαχωρισμός στη διπλή διπλών κορυφή, που αποδίδεται σε ασθενή αλληλεπίδραση με το πρωτόνιο στη θέση 8 και εξηγεί το ότι η κορυφή που αποδίδεται στο H-8 δεν εμφανίζει διαχωρισμό. Στη συνέχεια παρατηρείται μία διπλή κορυφή ενός πρωτονίου στα 7.38ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο στη θέση 5, το οποίο αλληλεπιδρά με ένα μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-6). Τέλος, η απλή κορυφή στα 8.37ppm αποδίδεται στο H-4.



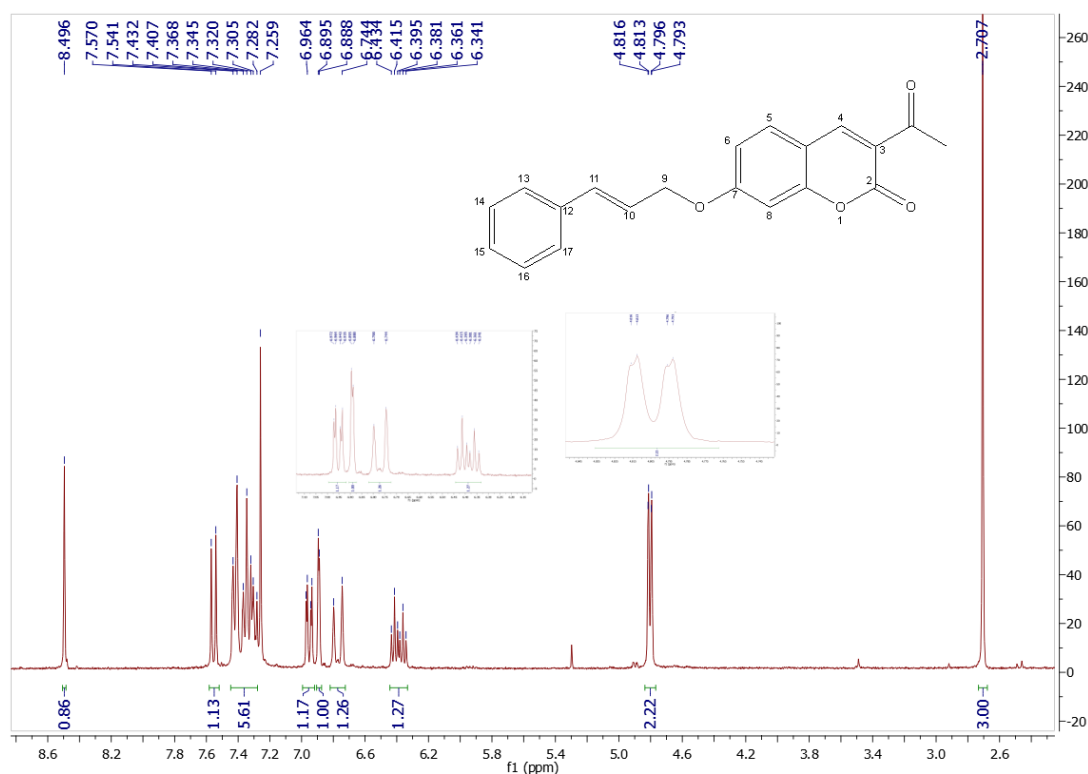
Φάσμα ^1H NMR της 3-ακετύλο-7-βενζυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (**2a**)

Το φάσμα χαρακτηρίζεται από μία απλή κορυφή στα 2.70ppm, η οποία αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της αλκυλομάδας στη θέση 3. Ακολουθεί μία απλή κορυφή στα 5.16ppm, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 9. Στη συνέχεια παρατηρείται μία διπλή κορυφή στα 6.89ppm, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-8, το οποίο αλληλεπιδρά με ένα μη ισοδύναμο πρωτόνιο στη θέση 6. Η διπλή διπλών κορυφή στα 6.97ppm αποδίδεται στο H-6, το οποίο αλληλεπιδρά με δύο μη ισοδύναμα πρωτόνια, τα H-8 και H-5. Ακολουθεί μια πολλαπλή κορυφή μεταξύ 7.89-7.72ppm, η οποία ολοκληρώνεται για πέντε πρωτόνια και αποδίδεται στα πέντε πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου στις θέσεις 11, 12, 13, 14 και 15. Η διπλή κορυφή στα 7.55ppm αποδίδεται στο H-5, το οποίο αλληλεπιδρά με το H-6. Τέλος, η απλή κορυφή στα 8.49ppm αποδίδεται στο H-4.



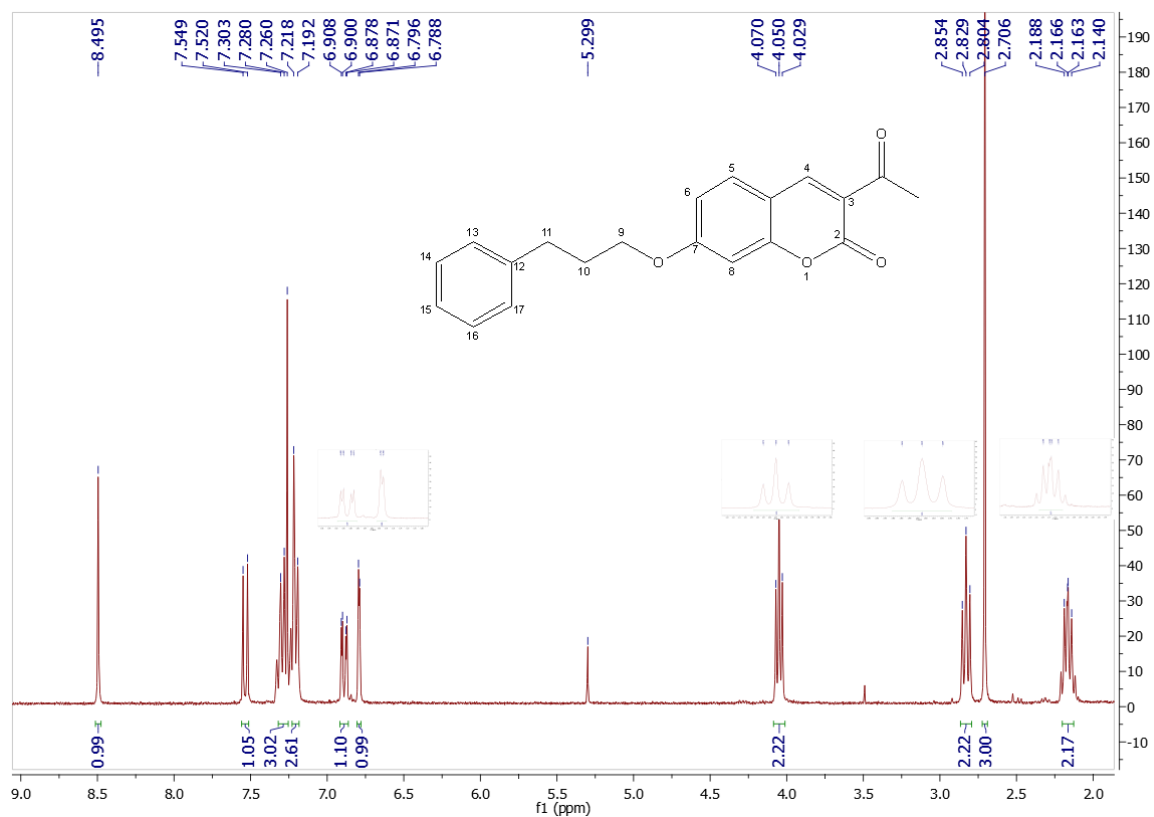
Φάσμα ¹H NMR της 3-ακέτυλο-7-πρενυλοξυ-2-Η-χρωμεν-2-όνης (**2b**)

Το φάσμα χαρακτηρίζεται από δύο απλές κορυφές στα 1.77 και 1.81ppm, οι οποίες ολοκληρώνονται για τρία πρωτόνια οι κάθε μία και αποδίδονται στα έξι αλειφατικά πρωτόνια στις θέσεις 12 και 13. Η απλή κορυφή στα 2.70ppm αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της αλκυλομάδας στη θέση 3. Ακολουθεί μια διπλή κορυφή στα 4.61ppm, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 9, τα οποία αλληλεπιδρούν με το H-10. Η τριπλή κορυφή στα 5.46ppm ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-10, το οποίο αλληλεπιδρά με τα δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 9. Στη συνέχεια, η διπλή κορυφή στα 6.82ppm αποδίδεται στο H-8, το οποίο αλληλεπιδρά με το H-6. Η διπλή διπλών κορυφή στα 6.89ppm αποδίδεται στο H-6, το οποίο αλληλεπιδρά με δύο μη ισοδύναμα πρωτόνια στις θέσεις 5 και 8. Ακολουθεί μια διπλή κορυφή στα 7.52ppm, η οποία αποδίδεται στο H-5, το οποίο αλληλεπιδρά με το πρωτόνιο στη θέση 6. Τέλος, η απλή κορυφή στα 8.48ppm αποδίδεται στο H-4.



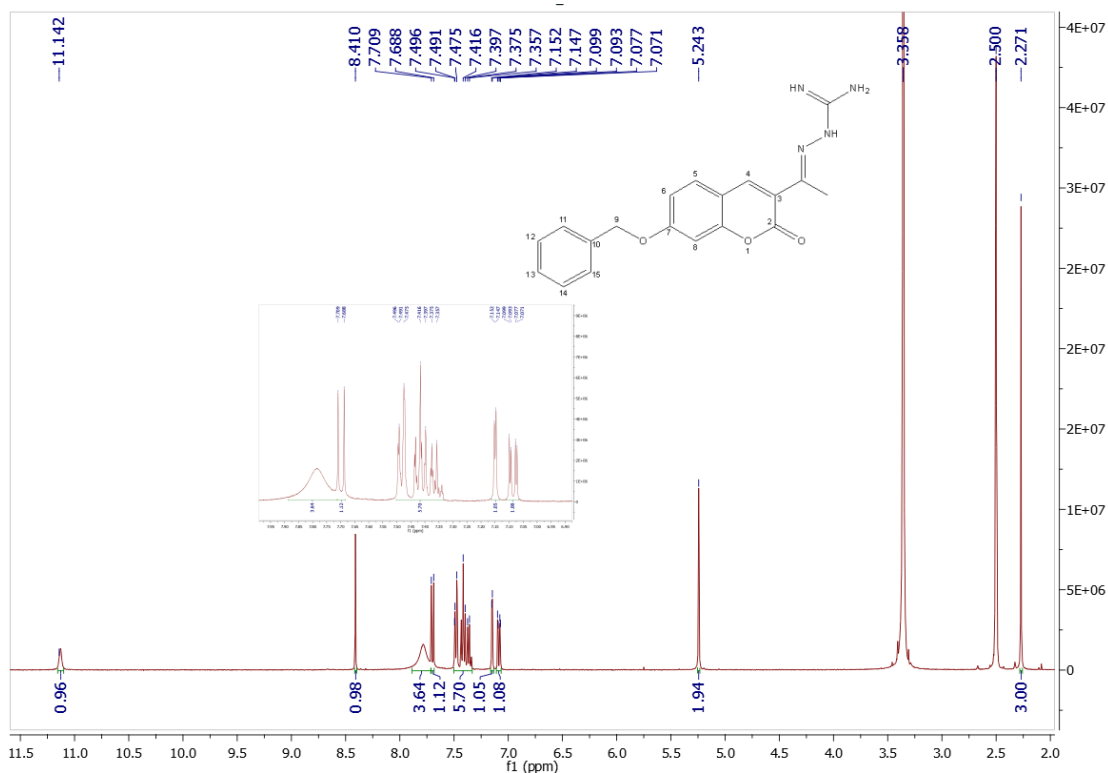
Φάσμα ^1H NMR της 3-ακέτυλο-7-σινναμυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (**2c**)

Το φάσμα χαρακτηρίζεται από μία απλή κορυφή στα 2.71ppm, η οποία ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της αλκυλομάδας στη θέση 3. Ακολουθεί μία διπλή διπλών κορυφή στα 4.80, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 9. Τα δύο H-9 πρωτόνια αλληλεπιδρούν με το H-10 και ασθενώς με το H-11 πρωτόνιο, η ασθενής αλληλεπίδραση με το οποίο προκαλεί πολύ μικρό δευτερεύοντα διαχωρισμό στην κορυφή. Ακολουθεί μία διπλή τριπλών κορυφή στα 6.40ppm, η οποία αποδίδεται στο H-10 πρωτόνιο, το οποίο αλληλεπιδρά με τα δύο ισοδύναμα H-9 πρωτόνια και με το H-11 πρωτόνιο. Η διπλή κορυφή στα 6.77ppm ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-11 πρωτόνιο, το οποίο αλληλεπιδρά με το πρωτόνιο στη θέση 10. Στη συνέχεια, παρατηρείται μία διπλή κορυφή στα 6.89ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο στη θέση 8, το οποίο αλληλεπιδρά με το πρωτόνιο στη θέση 6. Η διπλή διπλών κορυφή στα 6.95ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο στη θέση 6, το οποίο αλληλοεπιδρά με τα μη ισοδύναμα πρωτόνια στις θέσεις 5 και 8. Ακολουθεί μία πολλαπλή κορυφή μεταξύ 7.44 και 7.28ppm, η οποία ολοκληρώνεται για πέντε πρωτόνια και αποδίδεται στα πέντε πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου στις θέσεις 13, 14, 15, 16 και 17. Η διπλή κορυφή στα 7.56ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο στη θέση 5, το οποίο αλληλεπιδρά με το H-6. Τέλος, η απλή κορυφή στα 8.50ppm αποδίδεται στο H-4.



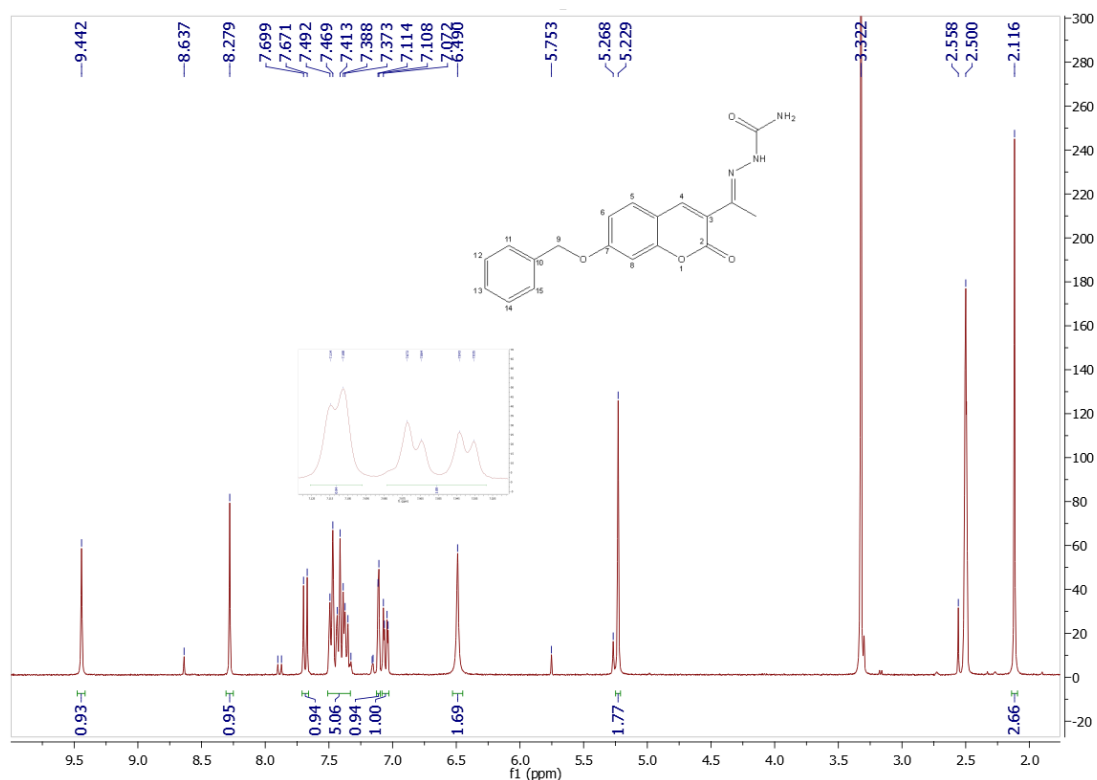
Φάσμα ^1H NMR της 3-ακετύλο-7-(3-φαινυλπροπαν)οξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (**2d**)

Το φάσμα χαρακτηρίζεται από μία πολλαπλή κορυφή μεταξύ 2.21-2.12ppm, η οποία ολοκληρώνεται σε δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 10. Τα δύο H-9 πρωτόνια αλληλεπιδρούν με δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 9 και δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 11. Παρ' όλ' αυτά δεν είναι εμφανής η αναμενόμενη μορφή τριπλής τριπλών, καθώς υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των κορυφών. Ακολουθεί μία απλή κορυφή στα 2.71ppm, η οποία αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της αλκυλομάδας στη θέση 3. Στη συνέχεια παρατηρείται μία τριπλή κορυφή στα 2.83ppm, η οποία ολοκληρώνεται στα δύο πρωτόνια αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 11, τα οποία αλληλεπιδρούν με τα δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 10. Η τριπλή κορυφή στα 4.05ppm οφείλεται στα δύο ισοδύναμα H-9 πρωτόνια, τα οποία αλληλεπιδρούν με τα δύο ισοδύναμα H-10 πρωτόνια. Στα 6.79ppm παρατηρείται μία διπλή κορυφή που οφείλεται στο H-8 πρωτόνιο, που αλληλοεπιδρά με το H-6 πρωτόνιο. Το H-6 πρωτόνιο με τη σειρά του εμφανίζει κορυφή διπλής διπλών στα 6.89, και αλληλεπιδρά με τα H-5 και H-8. Ακολουθεί πολλαπλή κορυφή μεταξύ 7.32-7.18ppm, η οποία ολοκληρώνεται στα πέντε πρωτόνια και αποδίδεται στα πέντε πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου στις θέσεις 13, 14, 15, 16 και 17. Η διπλή κορυφή στα 7.53ppm αποδίδεται στο H-5, το οποίο αλληλεπιδρά με το γειτονικό H-6. Τέλος, η απλή κορυφή στα 8.50ppm αποδίδεται στο H-4.



Φάσμα ^1H NMR της (E)-2(1-(7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (**3c**)

Το φάσμα χαρακτηρίζεται από μία απλή κορυφή στα 2.27ppm, η οποία ολοκληρώνεται σε τρία πρωτόνια και αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της αλκυλομάδας στη θέση 3. Η μετατόπισή της κορυφής αυτής σε σχέση με την ένωση **2a**, λόγω καλύτερου shielding από το N σε σχέση με το O, είναι ένδειξη της επιτυχίας της σύνθεσης. Ακολουθεί μία απλή κορυφή στα 5.24ppm, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 9. Στη συνέχεια παρατηρείται μία διπλή διπλών κορυφή στα 7.09ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο στη θέση 6, το οποίο αλληλοεπιδρά με τα μη ισοδύναμα πρωτόνια H-5 και H-8. Η διπλή κορυφή στα 7.15ppm αποδίδεται στο H-8 πρωτόνιο, το οποίο αλληλοεπιδρά με το H-6. Ακολουθεί μία πολλαπλή κορυφή μεταξύ 7.50-7.33ppm, η οποία ολοκληρώνεται για πέντε πρωτόνια και αποδίδεται στα πέντε πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου στις θέσεις 11, 12, 13, 14 και 15. Η διπλή κορυφή στα 7.70ppm αποδίδεται στο H-5, το οποίο αλληλεπιδρά με το H-6. Η ευρεία κορυφή μεταξύ 7.89-7.72ppm ολοκληρώνεται σε 3 πρωτόνια και αποδίδεται στα 2 πρωτόνια της πρωτοταγούς αμινομάδας και στα πρωτόνιο της ιμινομάδας. Ακολουθεί η απλή κορυφή στα 8.41ppm, η οποία αποδίδεται στο H-4. Τέλος, η απλή κορυφή στα 11.14ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο της δευτεροταγούς αμινομάδας.



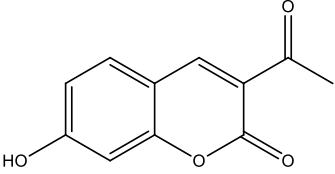
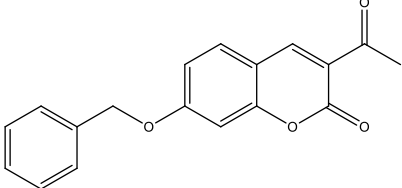
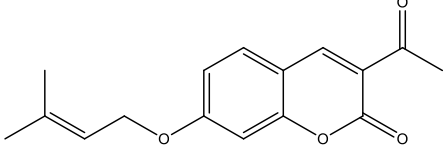
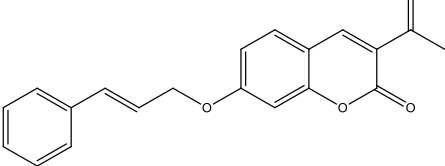
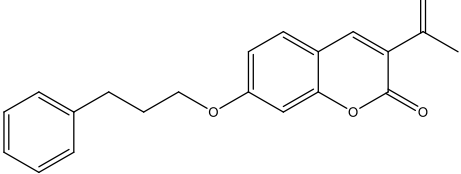
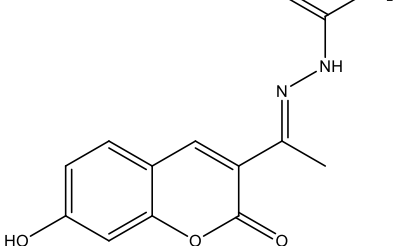
Φάσμα ^1H NMR της (*E*)-2(1-(7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)υδραζινοκαρβοξαμίδιο (**3d**)

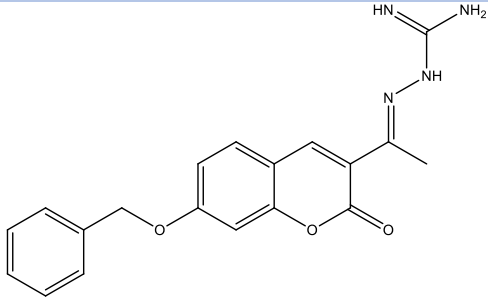
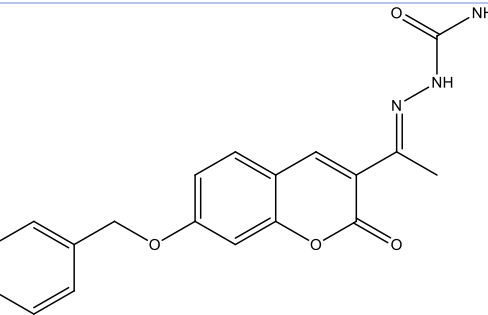
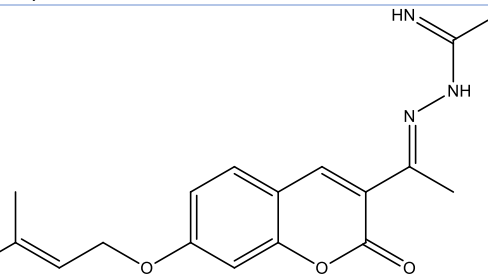
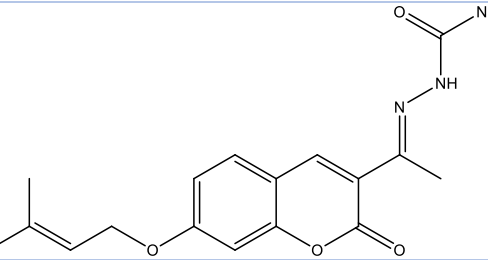
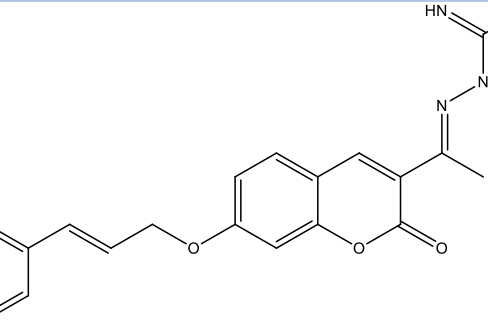
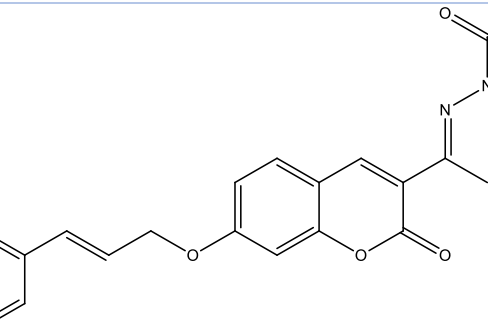
Το φάσμα χαρακτηρίζεται από μία απλή κορυφή στα 2.11ppm, η οποία ολοκληρώνεται σε τρία πρωτόνια και αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της αλκυλομάδας στη θέση 3. Η μετατόπισή της κορυφής αυτής σε σχέση με την ένωση **2a**, λόγω καλύτερου shielding από το N σε σχέση με το O, είναι ένδειξη της επιτυχίας της σύνθεσης. Ακολουθεί μία απλή κορυφή στα 5.23ppm, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια στη θέση 9. Η απλή κορυφή στα 6.49ppm ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα δύο πρωτόνια της πρωτοταγούς αμινομάδας. Στη συνέχεια παρατηρείται μία κορυφή διπλής διπλών στα 7.05ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο στη θέση 6, το οποίο αλληλεπιδρά με τα μη ισοδύναμα πρωτόνια H-5 και H-8. Η διπλή κορυφή στα 7.11ppm αποδίδεται στο H-8 πρωτόνιο, το οποίο αλληλοεπιδρά με το H-6. Ακολουθεί μία πολλαπλή κορυφή μεταξύ 7.51-7.33ppm, η οποία ολοκληρώνεται για πέντε πρωτόνια και αποδίδεται στα πέντε πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου στις θέσεις 11, 12, 13, 14 και 15. Η διπλή κορυφή στα 7.69ppm αποδίδεται στο H-5, το οποίο αλληλεπιδρά με το H-6. Ακολουθεί η απλή κορυφή στα 8.28ppm, η οποία αποδίδεται στο H-4. Τέλος, η απλή κορυφή στα 9.44ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο της δευτεροταγούς αμινομάδας.

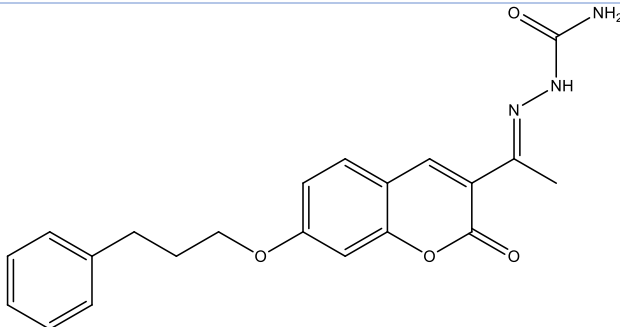
5.2 Αξιολόγηση δράσης αναστολής AChE

Τα αποτελέσματα της δράσης των συντεθειμένων κουμαρινικών παραγώγων ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης παρατίθενται στον Πίνακα 4:

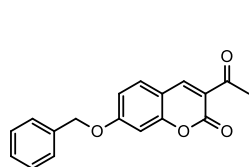
Πίνακας 4: Ικανότητα %αναστολής της AChE σε συγκέντρωση 100μM και IC₅₀ ενώσεων

A/A	Χημική δομή	%Αναστολή AChE [100μM]	IC ₅₀ (μM)
1a		67.1±0.5	77.7±4.9
2a		27.2±4.2	-
2b		40.1±5.1	-
2c		29.2±5.1	-
2d		16.4±3.5	-
3b		33.4±6.8	-

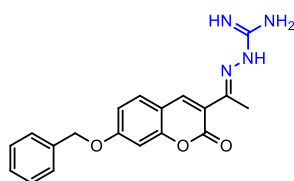
3c		100.0±0.1	9.7±3.5
3d		77.5±1.1	58.3±6.7
3e		100.0±0.1	9.6±2.9
3f		25.2±8.0	-
3g		84.3±1.0	17.9±5.8
3h		70.1±1.3	47.1±7.1

3j		35.3±2.7	-
-	Galantamine		0.92±0.1

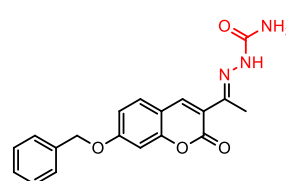
Αρχικά παρατηρείται ότι η αμινόλυση των κουμαρινών από την αμινογουανιδίνη και το σεμικαρβαζίδιο αυξάνει γενικά την ικανότητα αναστολής του ενζύμου, όπως φαίνεται από τη σύγκριση των ενώσεων **2a**, **2b**, **2c**, **2d** με τα αντίστοιχα παράγωγά τους. Δεδομένου του ότι οι κουμαρίνες προσδέονται στο ανιονικό κέντρο του ενζύμου, η προσθήκη ομάδων-δοτών δεσμού υδρογόνου συνάδει με αύξηση της ικανότητας πρόσδεσης. Στην περίπτωση της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρινής **1a**, δεν παρατηρήθηκε αύξηση της ικανότητας αναστολής μετά την αμινόλυσή της. Ενδεχομένως ο λόγος για αυτήν την απόκλιση είναι ότι η μη υποκατεστημένη υδροξυλομάδα στην **1a** μπορεί να λειτουργήσει σαν δότης δεσμού υδρογόνου.



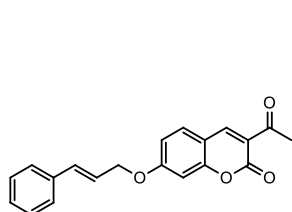
27.2% AChE Inhibition



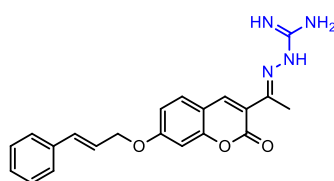
100.0% AChE Inhibition



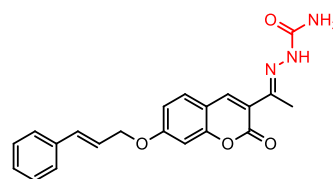
77.5% AChE Inhibition



29.2% AChE Inhibition

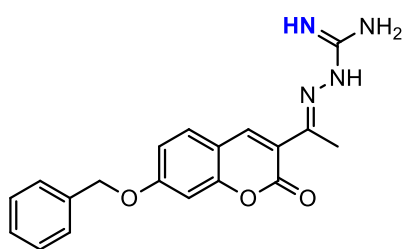


84.3% AChE Inhibition

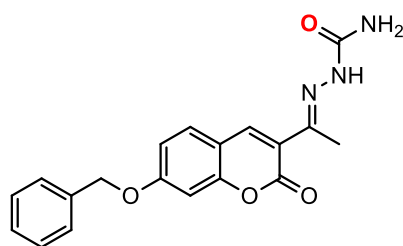


70.1% AChE Inhibition

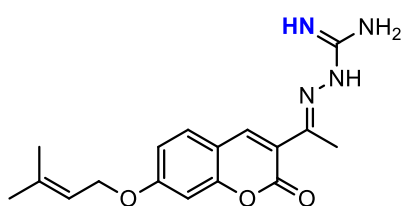
Επίσης παρατηρείται ότι τα καρβοξυμιδαμίδια παρουσιάζουν ισχυρότερη ικανότητα αναστολής της AChE από τα αντίστοιχα καρβοξαμίδια, όπως φαίνεται από τη σύγκριση των ενώσεων **3c**, **3e**, **3g** με τις **3b**, **3d**, **3f**, **3h**. Το γεγονός ότι η αντικατάσταση μίας καρβονυλομάδας από μία ιμινομάδα φαίνεται να αυξάνει την ικανότητα αναστολής του ενζύμου φαίνεται επίσης να υποστηρίζει την υπόθεση ότι ομάδες-δότες δεσμών υδρογόνου βελτιώνουν την πρόσδεση της ένωσης στο ανιονικό κέντρο.



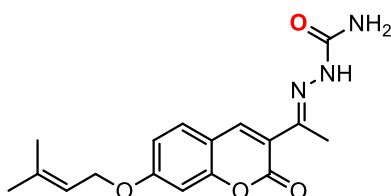
100.0% AChE Inhibition



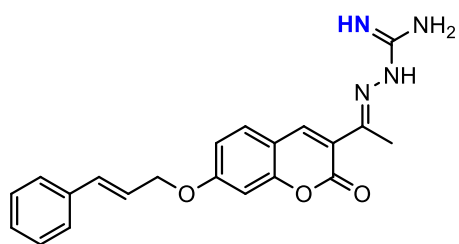
75.2% AChE Inhibition



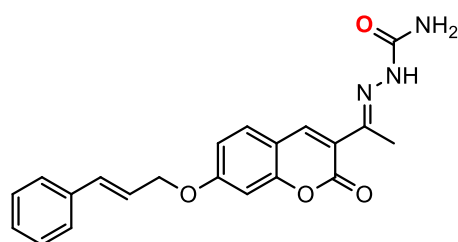
100.0% AChE Inhibition



25.2% AChE Inhibition

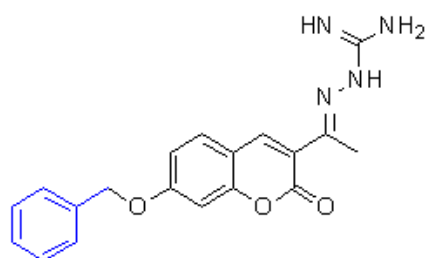


84.3% AChE Inhibition

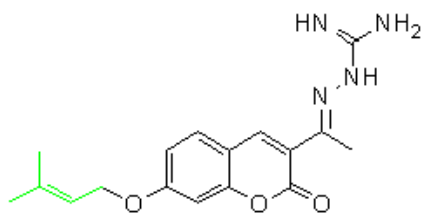


70.1% AChE Inhibition

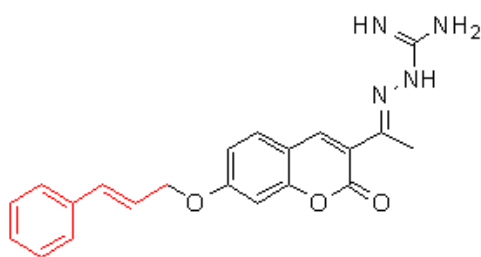
Μεταξύ των καρβοξιμιδαμιδίων, η επιμήκυνση των πλευρικών ομάδων φαίνεται να μειώνει την ανασταλτική δράση της ένωσης, όπως φαίνεται από τη σύγκριση των ενώσεων **3c**, **3e** με την **3g**. Αυτό μπορεί ενδεχομένως να εξηγηθεί από αύξηση των στερεοχημικών παρεμποδίσεων που αναιρούν την περεταίρω υδροφοβική αλληλεπίδραση.



IC₅₀ = 9.7 μM

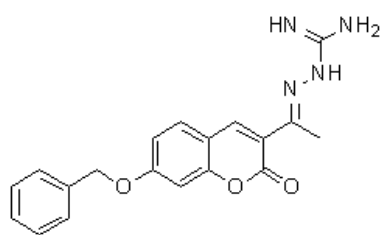


IC₅₀ = 9.6 μM

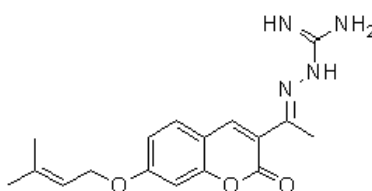


IC₅₀ = 41.1 μM

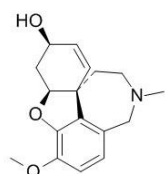
Συνολικά, οι ενώσεις **3c** και **3e**, που περιλαμβάνουν όλα τα προαναφερθέντα στοιχεία στο μόριο τους φαίνεται να έχουν σημαντικά ισχυρότερη δράση από όλες τις υπόλοιπες. Επιπλέον, τα IC₅₀ τους προσεγγίζουν αυτό της ένωσης αναφοράς εντός μιας τάξης μεγέθους.



IC₅₀ = 9.7 μM



IC₅₀ = 9.6 μM



Galantamine

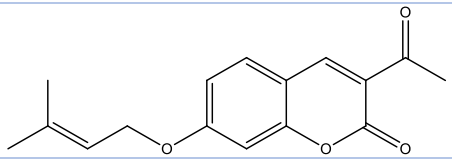
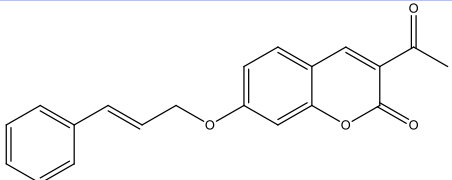
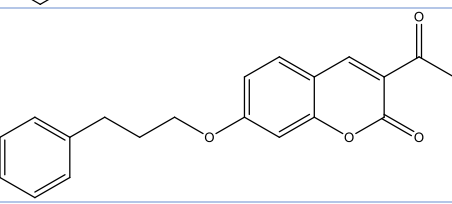
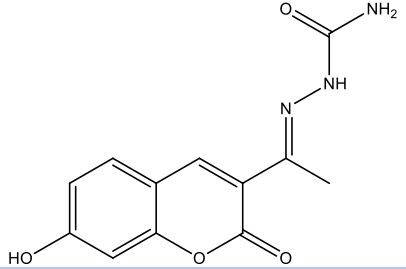
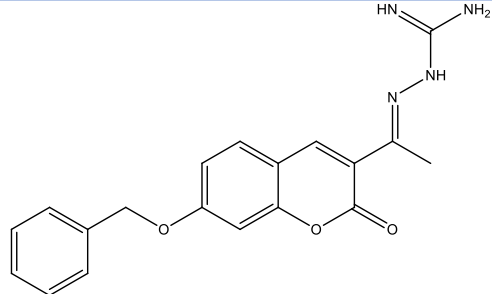
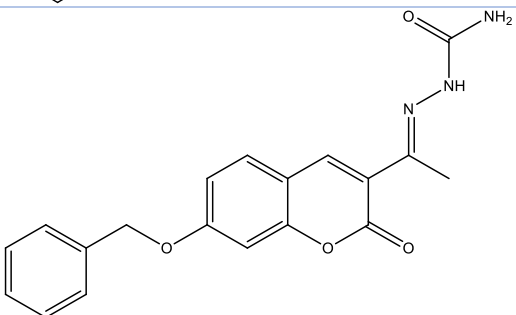
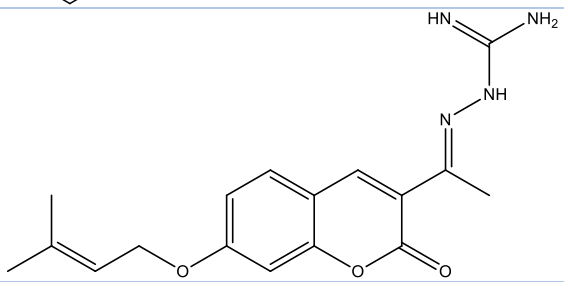
IC₅₀ = 0.92 μM

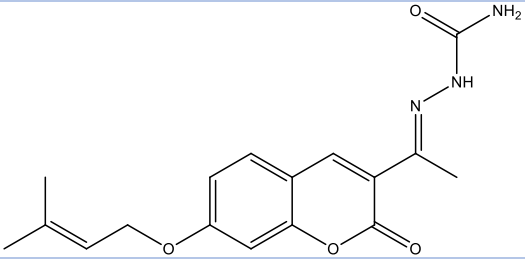
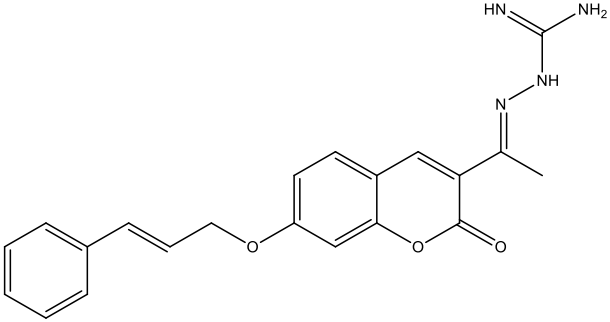
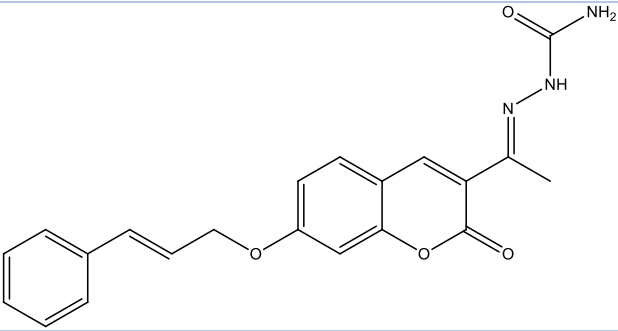
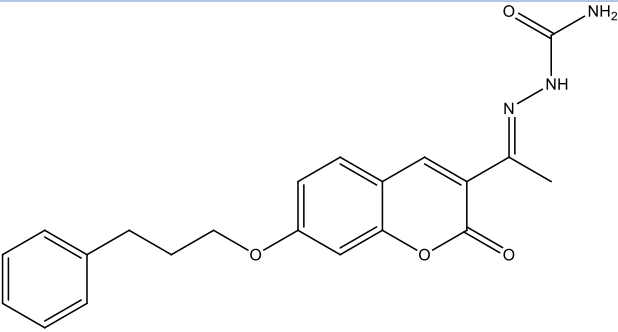
5.3 Αξιολόγηση δράσης ως αναστολείς BuChE

Τα αποτελέσματα της δράσης των συνθεθειμένων κουμαρινικών παραγώγων ως αναστολείς της βουτυρυλοχολινεστεράσης παρατίθενται στον Πίνακα 5:

Πίνακας 5: Ικανότητα %αναστολής της BuChE σε συγκέντρωση 100μM και IC-50 ενώσεων

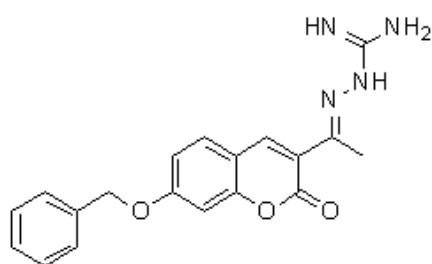
A/A	Χημική δομή	%Αναστολή BuChE [100μM]	IC ₅₀ (μM)
1a		64.3±2.4	92.9±6.7
2a		22.1±5.3	-

2b		9.1±3.1	-
2c		46.6±7.5	-
2d		46.5±7.2	-
3b		9.0±0.9	-
3c		100.0±0.1	6.6±0.6
3d		100.0±0.1	8.5±6.8
3e		100.0±0.1	5.6±3.7

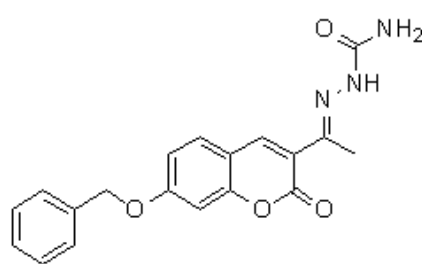
3f		35.6±0.8	-
3g		92.5±2.9	8.2±2.8
3h		71.3±6.1	46.8±4.0
3j		88.6±1.2	49.0±2.6
-	Galantamine		8.2±0.5

Γενικά, τα φαινόμενα που παρατηρήθηκαν για τη σχέση δομής-δράσης στην ακετυλοχολινεστεράση, επαναλαμβάνονται στην βουτυρυλοχολινεστεράση, όπως αναμενόταν. Τα καρβοξυμιδαμίδια έχουν πάλι ισχυρότερη δράση από τα αντίστοιχα καρβοξαμίδια και κουμαρίνες, ενώ μεταξύ αυτών η υποκατάσταση στην 7-υδροξυλομάδα φαίνεται πάλι να αυξάνει την δράση τους.

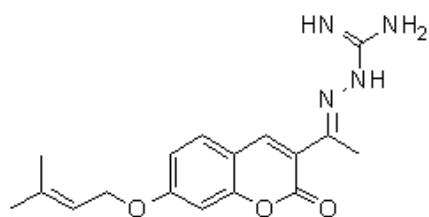
Μία σημαντική διαφορά με την ακετυλοχολινεστεράση είναι ότι η επιμήκυνση της πλευρικής ομάδας φαίνεται να μην μειώνει σημαντικά την ανασταλτική δράση της ένωσης, με αποτέλεσμα τα περισσότερα μόρια να εμφανίζουν ισχυρότερη δράση. Ενδεχομένως αυτό να οφείλεται σε μικρότερη στερεοχημική παρεμπόδιση λόγω διαφορετικής δομής του ενζύμου. Οι ενώσεις με την ισχυρότερη ανασταλτική δράση ήταν οι **3c**, **3d**, **3e** και **3g**, οι οποίες είχαν παρόμοια δραστηριότητα με την ένωση αναφοράς.



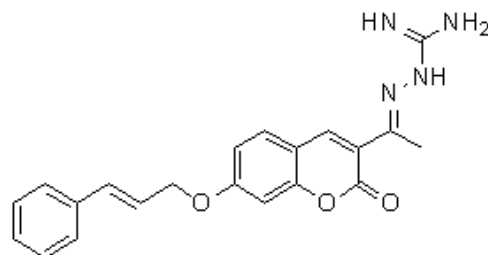
IC₅₀ = 6.6 μM



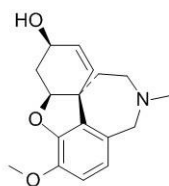
IC₅₀ = 8.5 μM



IC₅₀ = 5.6 μM



IC₅₀ = 8.7 μM



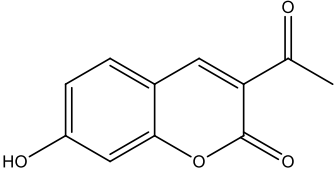
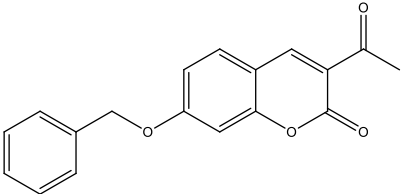
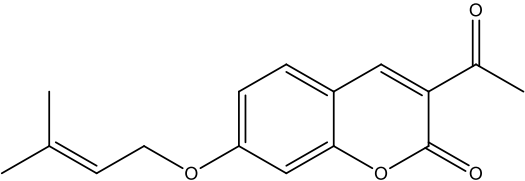
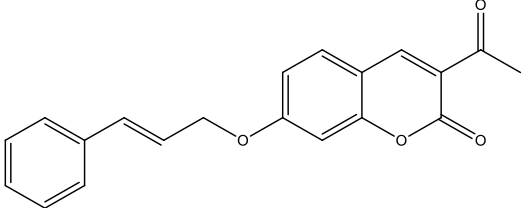
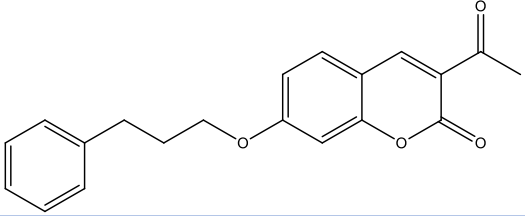
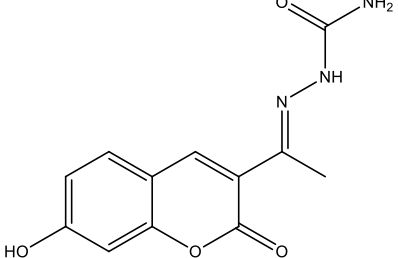
Galantamine

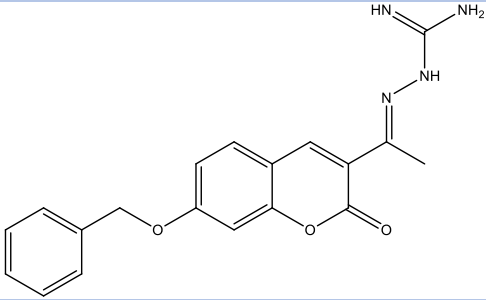
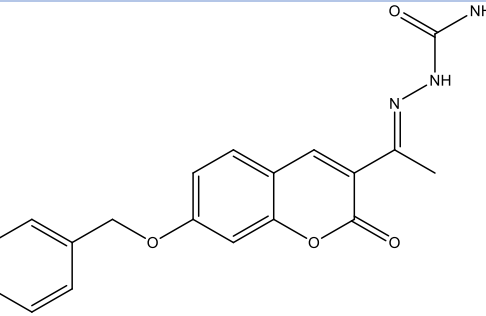
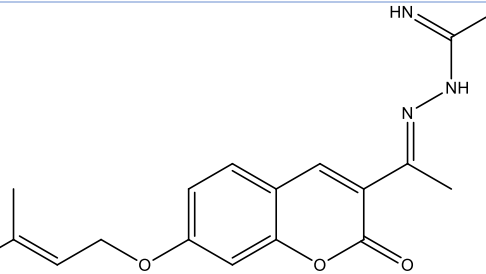
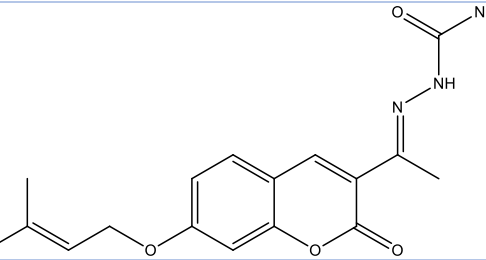
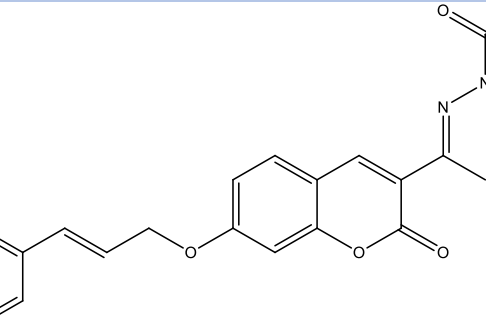
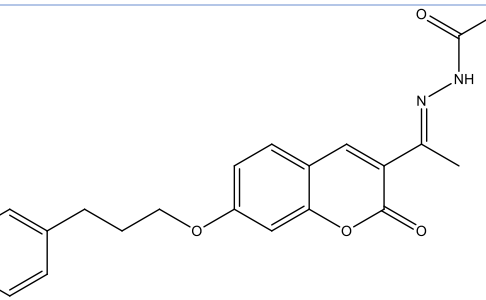
IC₅₀ = 8.2 μM

5.4 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης

Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης των συνθετιμένων κουμαρινικών παραγώγων παρατίθενται στον Πίνακα 6:

Πίνακας 6: Αντιοξειδωτική δράση ως %αναστολή DPPH σε χρόνους 30min και 60min

A/A	Χημική δομή	%Αναστολή DPPH [30min]	%Αναστολή DPPH [60min]
1a		1.30	2.34
2a		3.53	3.58
2b		-	-
2c		1.48	1.99
2d		1.73	2.60
3b		8.66	14.59

3c		-	-
3d		-	-
3e		-	-
3f		-	-
3h		-	-
3j		-	-
-	NDGA	84.0	96.0

Οι προς εξέταση ενώσεις δεν παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, συγκρινόμενες με την ένωση αναφοράς. Δεδομένου ότι η αναστολή του DPPH προϋποθέτει αφενός έναν δότη υδρογόνου και αφετέρου ικανότητα σταθεροποίησης της ελεύθερης ρίζας, η χαμηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα των μορίων μπορεί να εξηγηθεί από την απουσία φαινολικών υδρογόνων. Την υπόθεση αυτή υποστηρίζει και το γεγονός ότι η ένωση **3b** με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (14.6%) δεν είναι υποκατεστημένη στην 7-υδροξυ θέση του κουμαρινικού σκελετού.

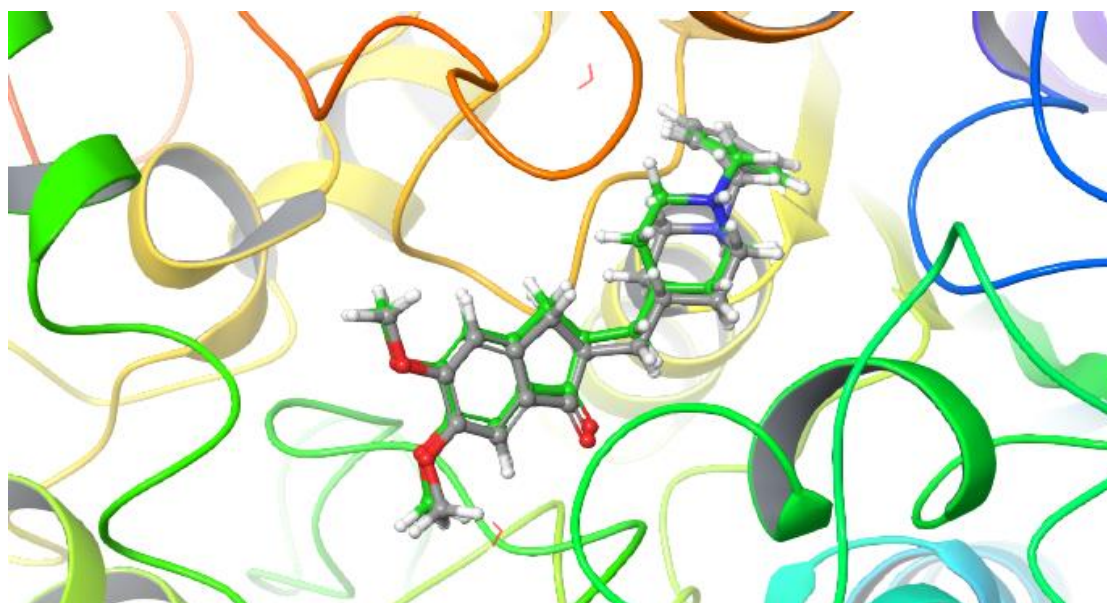
5.5 Ligand Docking

Τα αποτελέσματα της απόκλισης των διαφορετικών παραμετροποιήσεων του μοντέλου από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα πρόσδεσης της δονεπεζίλης παρατίθεται στον Πίνακα 7:

Πίνακας 7: Απόκλιση παραμετροποιήσεων μοντέλου docking από κρυσταλλογραφικά δεδομένα

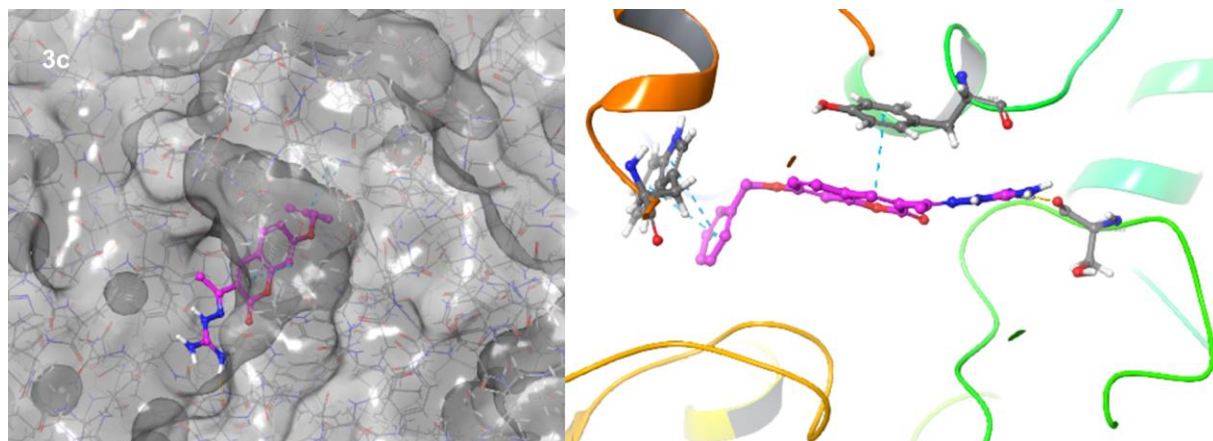
Νερά επιδιалύτωσης	Κλίμακα Van der Waals Grid	Κλίμακα Van der Waals Docking	RMSD (Å)
√	0.8	0.8	0,8697
√	0.8	1	0,6497
√	1	0.8	0,6003
√	1	1	0,2531
	0.8	0.8	0,8410
	0.8	1	0,7801
	1	0.8	0,3400
	1	1	0,2654

Βάσει των αποτελεσμάτων του Πίνακα 7, επιλέχθηκε σαν βέλτιστο μοντέλο αυτό με την παρουσία των νερών επιδιалύτωσης και με κλίμακες ακτίνας Van der Waals για το Grid και το Docking 1 και 1 αντίστοιχα. Η σύγκριση με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα φαίνεται στην Εικόνα 23:

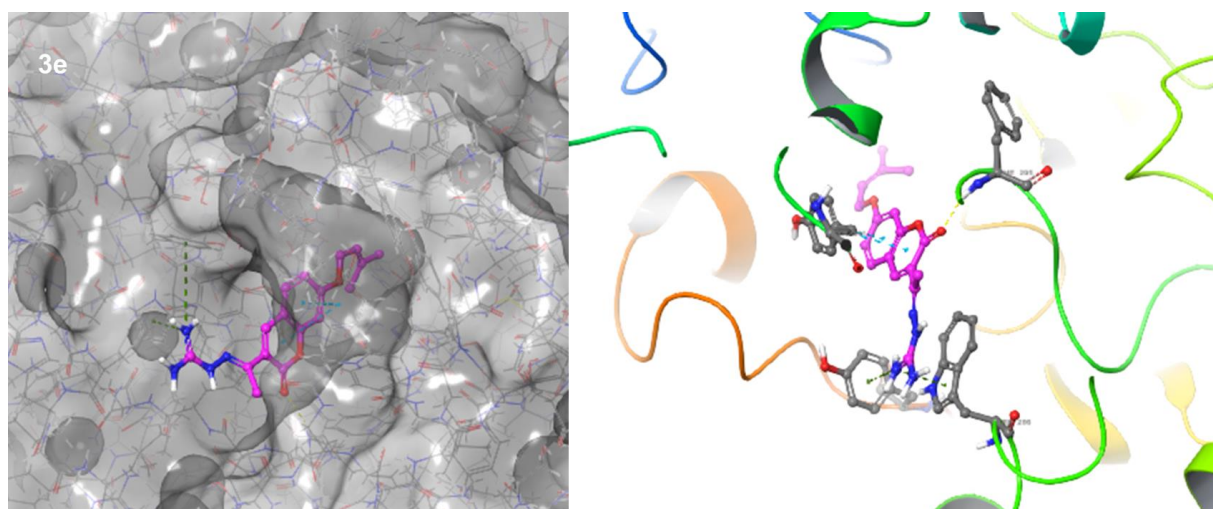


Εικόνα 23: Γραφική αναπαράσταση της κρυσταλλογραφικής θέσης πρόσδεσης της δονεπεζίλης στην AChE (πράσινο) έναντι της πρόβλεψης του βέλτιστου μοντέλου (γκρι)

Στη συνέχεια έγινε πρόσδεση βάσει του μοντέλου των ενώσεων **3c** και **3e**. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις Εικόνες 24 και 25:



Εικόνα 24: Αποτελέσματα *docking* της ένωσης **3c** στο ενεργό κέντρο της AChE (δεξιά) και οι αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου (αριστερά)



Εικόνα 25: Αποτελέσματα *docking* της ένωσης **3e** στο ενεργό κέντρο της AChE (δεξιά) και οι αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου (αριστερά)

Η ένωση **3c** φάνηκε να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο S293, και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (π-stacking) με τα κατάλοιπα Y341 και W86.

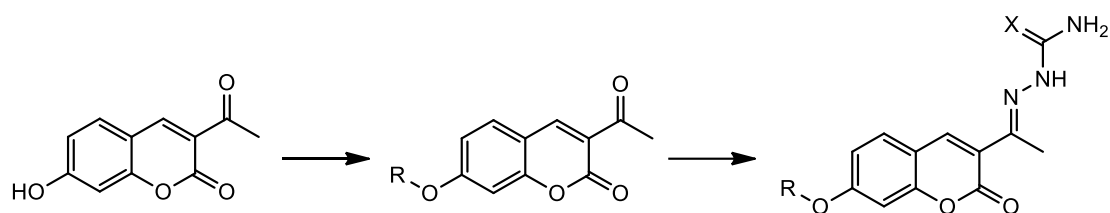
Αντίστοιχα, η ένωση **3e** φάνηκε να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα F295, Y72 και W286. Επίσης, σχημάτιζε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (π-stacking) με το κατάλοιπο Y341.

Αμφότερες οι ενώσεις φάνηκαν να προσδένονται σε κατάλοιπα γνωστών υπομονάδων πρόσδεσης κουμαρινών στο ένζυμο, με την **3c** να προσδένεται στο κατάλοιπο W86 της ανιονικής υπομονάδας και την **3e** να προσδένεται στο κατάλοιπο W286 του περιφερικού ανιονικού κέντρου. Η ένωση **3e** φάνηκε να διεισδύει λιγότερο βαθιά στο φαράγγι του ενεργού κέντρου, λόγω της απουσίας βενζολικού δακτυλίου ικανού να προσδεθεί στην ανιονική υπομονάδα, με αποτέλεσμα να προσδένεται στο περιφερικό ανιονικό κέντρο. Οι αλληλεπιδράσεις των μορίων με το ενεργό κέντρο δικαιολογούν τη σημασία τόσο των αζωτούχων ομάδων, όσο και των 7-υποκαταστάσεων στη σχέση δομής-δράσης στο ένζυμο.

6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν 19 κουμαρινικά παράγωγα και μελετήθηκε η σχέση δομής-δράσης. Οι δομές των νέων ενώσεων ταυτοποιήθηκαν μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού $^1\text{H NMR}$.

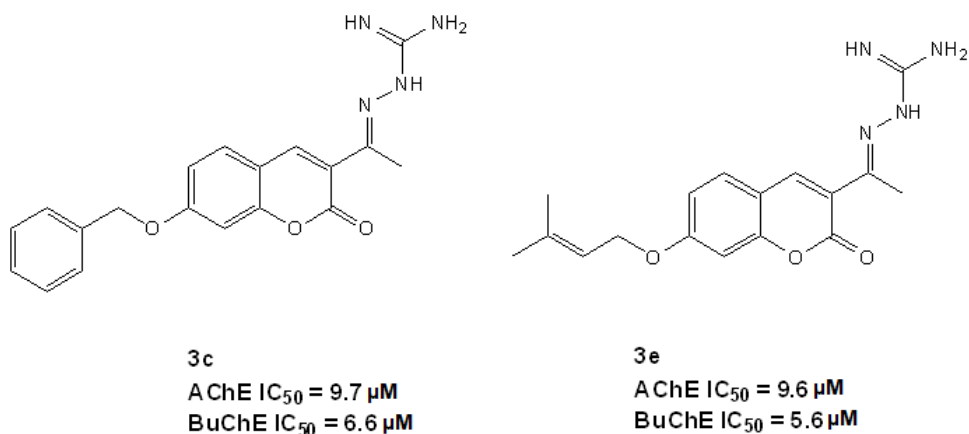
Αρχικά συντέθηκε η 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη, μέσω συμπύκνωσης Knoevenagel με απόδοση 51%. Εν συνεχεία, έγινε αντίδραση σύνθεσης αιθέρων Williamson, από την οποία προέκυψαν 8 νέα αλκυλιωμένα παράγωγα της αρχικής ένωσης. Η απόδοση της αντίδρασης διέφερε σημαντικά μεταξύ συντονισμένων και μη συντονισμένων αλκυλίων, με τα συντονισμένα αλκύλια να δίνουν ικανοποιητικές αποδόσεις (40-86%), σε αντίθεση με τα μη συντονισμένα αλκύλια που έδωσαν μη ικανοποιητικές αποδόσεις (<10%). Επιπλέον συντέθηκαν 10 νέα υβριδικά μόρια με προσθήκη χαρακτηριστικών ομάδων υδραζονών στον φαρμακοφόρο σκελετό.



Σχήμα 37: Συνθετική πορεία κουμαρινικών υδραζονών

Οι ενώσεις που συντέθηκαν αξιολογήθηκαν για την νευροπροστατευτική τους δράση *in vitro*. Συγκεκριμένα έγινε αξιολόγηση της ικανότητας τους να αναστείλουν τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) και της βουτυρυλοχολινεστεράσης (BuChE), με τη χρήση της τροποποιημένης μεθόδου Ellman. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πολλά από τα μόρια που συντέθηκαν εμφάνισαν αλληλεπίδραση και με τα δύο ένζυμα (>60% αναστολή στα 100 μM), καταδεικνύοντας τη δυναμική του φαρμακοφόρου της κουμαρίνης στους συγκεκριμένους φαρμακευτικούς στόχους.

Από την ανάλυση της σχέσης δομής-δράσης προέκυψε ότι η προσθήκη της χαρακτηριστικής ομάδας των υδραζονών και ιδιαίτερα της αμινογουανιδίνης βελτιώνει σημαντικά την αναστολή των δύο ενζύμων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αλκυλίωση επίσης ενισχύει την ανασταλτική δράση, όμως το φαινόμενο αυτό είναι ασθενέστερο για μεγαλύτερες πλευρικές ομάδες. Συνολικά, δύο ενώσεις, οι **3c** και **3e**, έδειξαν την ισχυρότερη δράση και αποτελούν υποσχόμενες ενώσεις-οδηγούς για μελλοντική βελτιστοποίηση.



Σχήμα 38: Χημική δομή των ισχυρότερων αναστολέων **3c** και **3e**

Αξιολογήθηκε επίσης η αντιοξειδωτική δράση των συνθεθειμένων ενώσεων μέσω της μεθόδου DPPH και δεν παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση

Τέλος, έγινε *in silico* docking των ενώσεων **3c** και **3e** στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αμφότερες οι ενώσεις προσδέθηκαν σε γνωστές υπομονάδες πρόσδεσης κουμαρινών, επιβεβαιώνοντας τα συμπεράσματα για τη σχέση δομής-δράσης.

7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Από την έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, προέκυψαν αποτελέσματα που μπορούν να αποτελέσουν εφαλτήριο για περαιτέρω έρευνα στον τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας, καθώς και να συμβάλλουν στην ανάπτυξη της «Χημικής Βιβλιοθήκης» για την μελέτη της σχέσης δομής δράσης.

Αρχικά, προτείνεται ο πιο ενδεδειγμένος χαρακτηρισμός των νέων μορίων και ιδιαίτερα των πιο δραστικών, με φασματοσκοπικές και φασματομετρικές μεθόδους (^{13}C NMR, HR-MS αντίστοιχα). Επίσης προτείνεται η διερεύνηση της δράσης τους και σε άλλους φαρμακευτικούς στόχους, π.χ. η κυτταροτοξικότητά τους ή η αντιφλεγμονώδης δράση τους.

Ακόμα, προτείνεται η περαιτέρω διερεύνηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των νέων μορίων, και συγκεκριμένα:

- της βιοδιαθεσιμότητας
- των κινητικών απορρόφησης-κατανομής-μεταβολισμού-αποβολής
- της ικανότητας διέλευσης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ)

Για την βελτίωση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, μπορεί να μελετηθεί και η δυνατότητα εγκλεισμού σε νανοφορείς. Η τεχνική αυτή έχει τη δυναμική να βελτιώσει τόσο το χρονικό προφίλ της απορρόφησης μιας ένωσης, όσο και τη δυνατότητα διέλευσης του ΑΕΦ.

Επιπροσθέτως, συνιστάται η διερεύνηση των δυνατοτήτων βελτιστοποίησης της συνθετικής διαδικασίας. Τεχνικές που δεν χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, αλλά έχουν τη δυνατότητα να βελτιώσουν τη σύνθεση είναι μέθοδοι υψηλής ενέργειας, όπως η χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων. Οι τεχνικές αυτές ενδεχομένως κρίνονται απαραίτητες για την επίτευξη της σύνθεσης ορισμένων από τις ενώσεις, οι οποίες έδειξαν μη ικανοποιητικές αποδόσεις στις συμβατικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Επίσης, χρήσιμη θα ήταν και η διερεύνηση της χρήσης εναλλακτικών διαλυτών, όπως τα ιοντικά υγρά (ΙΥ) και οι βαθέως εύτηκτοι διαλύτες (DES).

Τέλος, προτείνεται η διερεύνηση περαιτέρω μορίων από την σειρά που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, καθώς και από παρεμφερείς σειρές. Με βάση τις ενώσεις που έδειξαν ισχυρότερη δραστηριότητα μπορεί να γίνει διερεύνηση διαφορετικών αλκυλικών πλευρικών αλυσίδων, ή διαφορετικών αζωτούχων ομάδων. Μπορεί επίσης να γίνει μελέτη κουμαρινών υποκατεστημένων σε διαφορετικές θέσεις για περαιτέρω βελτιστοποίηση της πρόσδεσης στους φαρμακευτικούς στόχους.

Βιβλιογραφία

- [1] Sharifi-Rad J, Cruz-Martins N, López-Jornet P, Lopez EP, Harun N, Yeskaliyeva B, Beyatli A, Sytar O, Shaheen S, Sharopov F, Taheri Y, Docea AO, Calina D, Cho WC. Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Aug 23;2021: 6492346. doi: 10.1155/2021/6492346. PMID: 34531939; PMCID: PMC8440074.
- [2] Ojala T. Ph.D. Thesis. Biological Screening of Plant Coumarins. University of Helsinki; Helsinki, Finland: 2001.
- [3] Küpeli Akkol E, Genç Y, Karpuz B, Sobarzo-Sánchez E, Capasso R. Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 19;12(7):1959. doi: 10.3390/cancers12071959. PMID: 32707666; PMCID: PMC7409047.
- [4] Murray R.D.H., Mendez J., Brown S.A. *The Natural Coumarins Occurrence, Chemistry and Biochemistry*, Chichester. John Wiley and Sons Ltd.; New York, NY, USA: 1982.
- [5] Du L, Li M, Zheng S, Wang B. Rational Design of a Fluorescent Hydrogen Peroxide Probe Based on the Umbelliferone Fluorophore. *Tetrahedron Lett*. 2008 May 5;49(19):3045-3048. doi: 10.1016/j.tetlet.2008.03.063. PMID: 19081820; PMCID: PMC2490821.
- [6] Ohta T, Watanabe K, Moriya M, Shirasu Y, Kada T. Anti-mutagenic effects of coumarin and umbelliferone on mutagenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide or UV irradiation in *E. coli*. *Mutat Res*. 1983 Apr;117(1-2):135-8. doi: 10.1016/0165-1218(83)90160-x. PMID: 6403855.
- [7] Sim MO, Lee HI, Ham JR, Seo KI, Kim MJ, Lee MK. Anti-inflammatory and antioxidant effects of umbelliferone in chronic alcohol-fed rats. *Nutr Res Pract*. 2015 Aug;9(4):364-9. doi: 10.4162/nrp.2015.9.4.364. Epub 2015 May 18. PMID: 26244074; PMCID: PMC4523479.
- [8] Keating G., O’Kennedy R. In: *The Chemistry and Occurrence of Coumarins. Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*. 1997; 23–66.
- [9] Wu A, Lu J, Zhong G, Lu L, Qu Y, Zhang C. Xanthotoxin (8-methoxypsoralen): A review of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity. *Phytother Res*. 2022 Oct;36(10):3805-3832. doi: 10.1002/ptr.7577. Epub 2022 Aug 1. PMID: 35913174.
- [10] Young AR. Photocarcinogenicity of psoralens used in PUVA treatment: present status in mouse and man. *J Photochem Photobiol B*. 1990 Jun;6(1-2):237-47. doi: 10.1016/1011-1344(90)85093-c. PMID: 2121937.
- [11] Ahmad J., Shamsuddin K.M., Zaiman A. A Pyranocoumarin from *Atalantia ceylanica*. *Phytochemistry*. 1984;23: 2098–2099. doi: 10.1016/S0031-9422(00)84993-6.
- [12] Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists. *American College of Chest*

Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. 2008 June;8(6): 160S–198S.

[13] Sharma R., Arya V. Review on fruits having anti-diabetic potential. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2011;3: 204–212.

[14] Bubols G. B., Vianna Dda R., Medina-Remon A., et al. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2013;13(3):318–334. doi: 10.2174/138955713804999775.

[15] Torres R., Faini F., Modak B., Urbina F., Labbé C., Guerrero J. Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry*. 2006;67(10):984–987. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.03.016.

[16] Al-Amiery A. A., Kadhum A. A. H., Mohamad A. A. Antifungal activities of new coumarins. *Molecules*. 2012;17(5):5713–5723. doi: 10.3390/molecules17055713.

[17] Kirsch G., Abdelwahab A. B., Chaimbault P. Natural and synthetic coumarins with effects on inflammation. *Molecules*. 2016;21(10):1322. doi: 10.3390/molecules21101322.

[18] Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2005;5(1):29–46. doi: 10.2174/1568011053352550.

[19] Sharifi-Rad J, Cruz-Martins N, López-Jornet P, Lopez EP, Harun N, Yeskaliyeva B, Beyatli A, Sytar O, Shaheen S, Sharopov F, Taheri Y, Docea AO, Calina D, Cho WC. Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Aug 23;2021: 6492346. doi: 10.1155/2021/6492346. PMID: 34531939; PMCID: PMC8440074.

[20] Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140: 771–776.

[21] Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140: 805–820.

[22] Ferrero-Miliani L, Nielsen O, Andersen P, Girardin S. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol*.

[23] Docea A. O., Calina D., Buga A. M., et al. The effect of silver nanoparticles on antioxidant/pro-oxidant balance in a murine model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(4):p. 17.

[24] Huang G. J., Deng J. S., Liao J. C., et al. Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory activity of imperatorin from *Glehnia littoralis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(7):1673–1681. doi: 10.1021/jf204297e.

[25] Witaicenis A., Seito L. N., Di Stasi L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chemico-Biological Interactions*. 2010;186(2):211–218. doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.045.

- [26] Kwon O. S., Choi J. S., Islam M. N., Kim Y. S., Kim H. P. Inhibition of 5-lipoxygenase and skin inflammation by the aerial parts of *Artemisia capillaris* and its constituents. *Archives of Pharmacal Research*. 2011;34(9):1561–1569. doi: 10.1007/s12272-011-0919-0.
- [27] Borman P. Lymphedema diagnosis, treatment, and follow-up from the view point of physical medicine and rehabilitation specialists. *Turkish journal of physical medicine and rehabilitation*. 2018;64(3):179–197.
- [28] Halliday, Matthew. Characterisation of Direct Acting Oral Anticoagulants and Their Pharmacodynamics on Thrombin Generation and Coagulation Parameters. 2017. doi: 10.13140/RG.2.2.13417.01126.
- [29] Presnell SR, Stafford DW. The vitamin K-dependent carboxylase. *Thromb. Haemost.* 2002;87(6):937–46.
- [30] Kresge N., Simoni R.D., Hill R.L. Hemorrhagic Sweet Clover Disease, Dicumarol, and Warfarin: The Work of Karl Paul Link. *J. Biol. Chem.* 2005;280:e5.
- [31] Lhomond S, Pallares N, Barroso K, Schmit K, Dejeans N, Fazli H, Taouji S, Patterson JB, Chevet E. Adaptation of the secretory pathway in cancer through IRE1 signaling. *Methods Mol Biol.* 2015;1292: 177-94. doi: 10.1007/978-1-4939-2522-3_13. PMID: 25804756.
- [32] Ohren J.F., Chen H., Pavlovsky A., Whitehead C., Zhang E., Kuffa P., Yan C., McConnell P., Spessard C., Banotai C., et al. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel non-competitive kinase inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004;11: 1192–1197. doi: 10.1038/nsmb859.
- [33] Salehi B., Prakash Mishra A., Nigam M., et al. *Ficus* plants: state of the art from a phytochemical, pharmacological, and toxicological perspective. *Phytotherapy Research*. 2021;35(3):1187–1217. doi: 10.1002/ptr.6884.
- [34] Walsh TJ, Standiford HC, Reboli AC, John JF, Mulligan ME, Ribner BS, Montgomerie JZ, Goetz MB, Mayhall CG, Rimland D, et al. Randomized double-blinded trial of rifampin with either novobiocin or trimethoprim-sulfamethoxazole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: prevention of antimicrobial resistance and effect of host factors on outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Jun;37(6):1334-42. doi: 10.1128/AAC.37.6.1334. PMID: 8328783; PMCID: PMC187962.
- [35] Maxwell A. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol Microbiol.* 1993 Aug;9(4):681-6. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01728.x. PMID: 8231802.
- [36] Evans W. C. *Trease and Evans Pharmacognosy*. 16th. Elsevier Ltd; 2009.
- [37] Raja S. B., Murali M. R., Roopa K., Devaraj S. N. Imperatorin a furocoumarin inhibits periplasmic Cu-Zn SOD of *Shigella dysenteriae* their by modulates its resistance towards phagocytosis during host pathogen interaction. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2011;65(8):560–568. doi: 10.1016/j.biopha.2010.10.010.
- [38] Kashman Y., Gustafson K. R., Fuller R. W., et al. HIV inhibitory natural products. Part 7. The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1992;35(15):2735–2743. doi: 10.1021/jm00093a004.

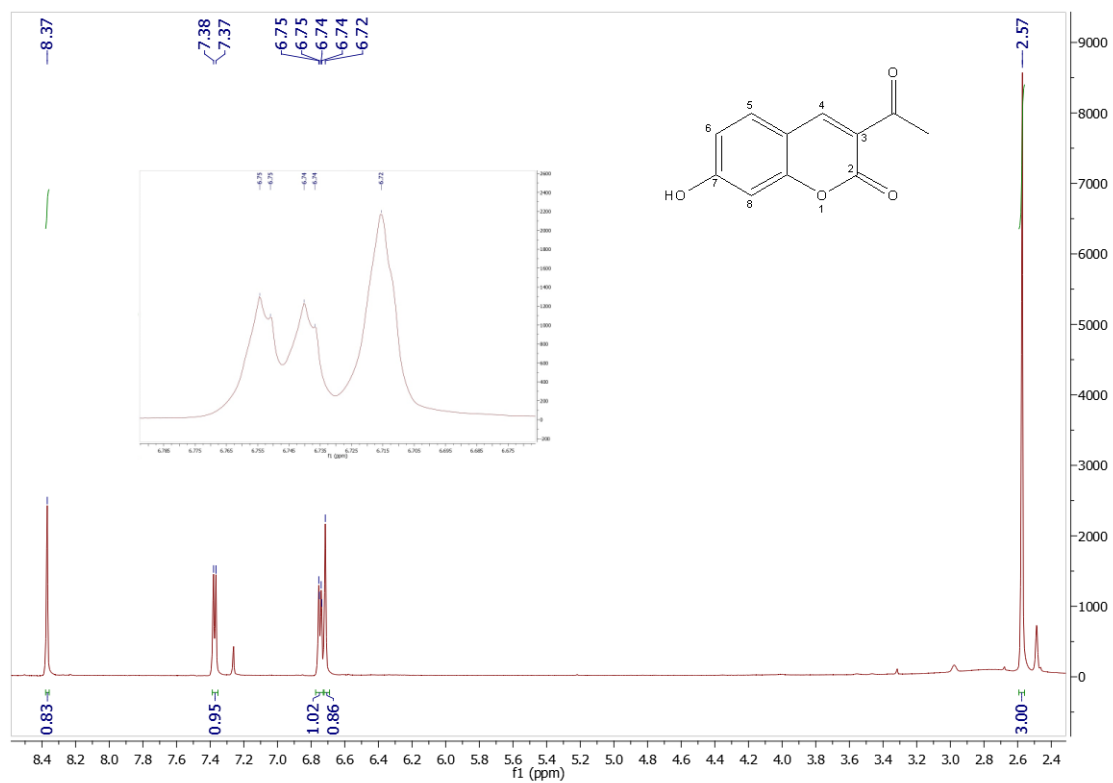
- [39] Spino C., Dodier M., Sotheeswaran S. Anti-HIV coumarins from calophyllum seed oil. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 1998;8: 3475–3478.
- [40] Sancho R, Márquez N, Gómez-Gonzalo M, Calzado MA, Bettoni G, Coiras MT, Alcamí J, López-Cabrera M, Appendino G, Muñoz E. Imperatorin inhibits HIV-1 replication through an Sp1-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2004 Sep 3;279(36):37349-59. doi: 10.1074/jbc.M401993200. Epub 2004 Jun 24. PMID: 15218031.
- [41] Islam M. S., Quispe C., Hossain R., et al. Neuropharmacological effects of quercetin: a literature-based review. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12: 1533.
- [42] Matos MJ, Vilar S, Gonzalez-Franco RM, Uriarte E, Santana L, Friedman C, Tatonetti NP, Viña D, Fontenla JA. Novel (coumarin-3-yl)carbamates as selective MAO-B inhibitors: synthesis, in vitro and in vivo assays, theoretical evaluation of ADME properties and docking study. *Eur J Med Chem*. 2013 May;63: 151-61. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.02.009. Epub 2013 Feb 16. PMID: 23474901.
- [43] Yeung AWK, Georgieva MG, Atanasov AG, Tzvetkov NT. Monoamine Oxidases (MAOs) as Privileged Molecular Targets in Neuroscience: Research Literature Analysis. *Front Mol Neurosci*. 2019 May 29;12:143. doi: 10.3389/fnmol.2019.00143. PMID: 31191248; PMCID: PMC6549493.
- [44] Huang M, Xie SS, Jiang N, Lan JS, Kong LY, Wang XB. Multifunctional coumarin derivatives: monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition, anti- β -amyloid (A β) aggregation and metal chelation properties against Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015 Feb 1;25(3):508-13. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.12.034. Epub 2014 Dec 19. PMID: 25542589.
- [45] Wang C, Pei A, Chen J, Yu H, Sun ML, Liu CF, Xu X. A natural coumarin derivative esculetin offers neuroprotection on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *J Neurochem*. 2012 Jun;121(6):1007-13. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07744.x. PMID: 22458555.
- [46] Lake B. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food Chem. Tox.* 1999;37: 423–453. doi: 10.1016/S0278-6915(99)00010-1.
- [47] Byrden T. Master's Thesis. Dublin City University; Dublin, Ireland: 1995. The Elucidation of the Mode of Action of Coumarin and Some Specified Derivatives.
- [48] Iwata N., Kainuma M., Kobayashi D., et al. The relation between hepatotoxicity and the total coumarin intake from traditional Japanese medicines containing cinnamon bark. *Frontiers in Pharmacology*. 2016;7: 174–174.
- [49] Pelkonen O., Raunio H., Rautio A., Pasanen M., Lang M.A. The Metabolism of Coumarin. *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*. 1997; 67–92.
- [50] Liu, C. Targeting the cholinergic system in Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin* 41. 2020; 453–463 doi:10.1038/s41401-020-0380-z
- [51] Ratliff WA, Saykally JN, Kane MJ, Citron BA. Neuromuscular Junction Morphology and Gene Dysregulation in the Wobbler Model of Spinal Neurodegeneration. *J Mol Neurosci*. 2018 Sep;66(1):114-120.

- [52] Hirsch NP. Neuromuscular junction in health and disease. *Br J Anaesth*. 2007 Jul;99(1):132-8.
- [53] Tiwari, P.; Dwivedi, S.; Singh, M.; Mishra, R.; Chandy, A. Basic And Modern Concepts On Cholinergic Receptor: A Review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2013;3(5):413-420.
- [54] Assis, C.R.D., Linhares, A.G., Cabrera, M.P. et al. Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure: new and forgotten insights. *Environ Sci Pollut Res* 25, 2018;18364–18376 doi:10.1007/s11356-018-2303-9
- [55] Silman I., Sussman J.L. Acetylcholinesterase: “Classical” and “non-classical” functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005;5(3 SPEC. ISS.):293–302.
- [56] Lane, Roger M.; Kivipelto, Miia.; Greig, Nigel H.. Acetylcholinesterase and Its Inhibition in Alzheimer Disease. *Clinical Neuropharmacology*. 2004 May-June;27(3):141-149
- [57] Cheng, S., Song, W., Yuan, X. et al. Gorge Motions of Acetylcholinesterase Revealed by Microsecond Molecular Dynamics Simulations. *Sci Rep* 7. 2017; 3219. doi:10.1038/s41598-017-03088-y
- [58] Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*. 2010 Sep 6;187(1-3):10-22. doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.042. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20138030; PMCID: PMC2894301.
- [59] Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Ariel N, Segall Y, Velan B, Shafferman A. Contribution of aromatic moieties of tyrosine 133 and of the anionic subsite tryptophan 86 to catalytic efficiency and allosteric modulation of acetylcholinesterase. *J Biol Chem*. 1995 Feb 3;270(5):2082-91. doi: 10.1074/jbc.270.5.2082. PMID: 7836436.
- [60] Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Segall Y, Ariel N, Cohen S, Velan B, Shafferman A. Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *J Biol Chem*. 1993 Aug 15;268(23):17083-95. PMID: 8349597.
- [61] Johnson G., Moore S. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design *Current Pharmaceutical Design*. 2005;12(2): 217–225.
- [62] Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, Cassidy MS, Gary EN, Love J, Franklin MC, Height JJ. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J Med Chem*. 2012 Nov 26;55(22):10282-6. doi: 10.1021/jm300871x. Epub 2012 Nov 12. PMID: 23035744.
- [63] Colovic M.B., Krstic D.Z., Lazarevic-Pasti T.D. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*. 2013;11(3):315–335.

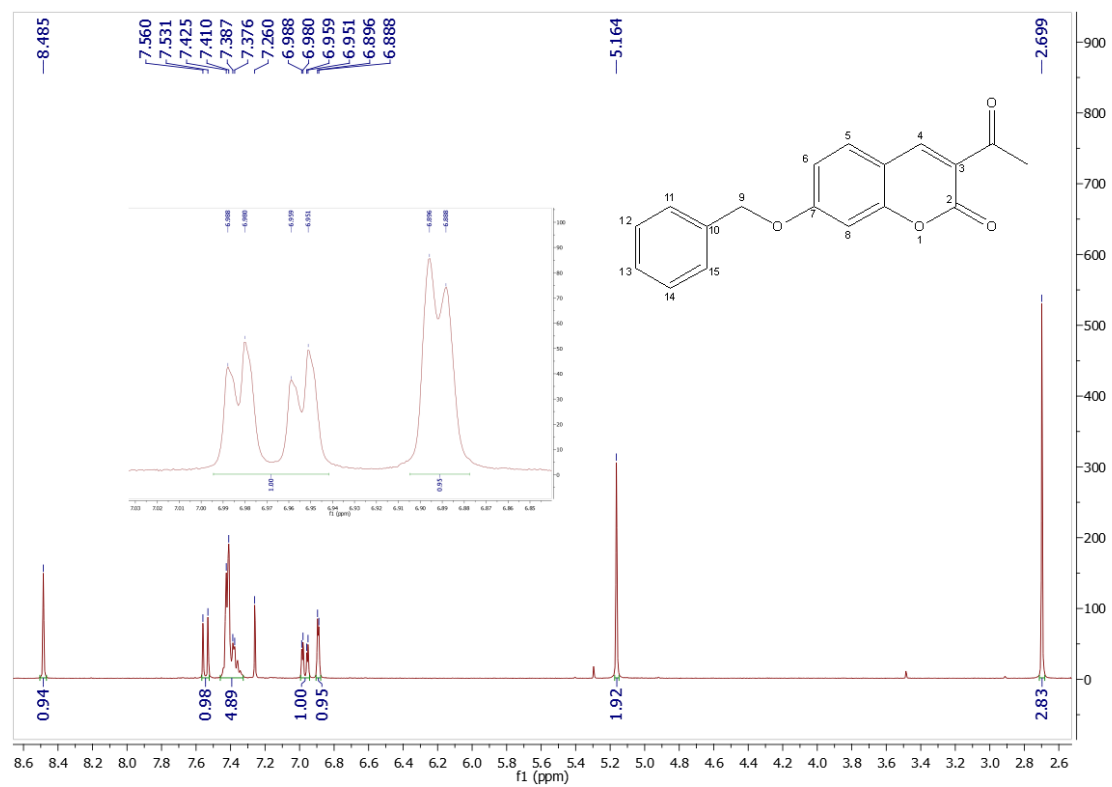
- [64] Silman I., Sussman J.L. Acetylcholinesterase: "Classical" and "non-classical" functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(3 SPEC. ISS.).2005; 293–302.
- [65] Long J.M., Holtzman D.M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019;179(2):312–339.
- [66] Dan, Siddhartha & Sharma, Deeksha & Rastogi, Kartikey & Ojha, Himanshu & Pathak, Mallika & Singhal, Rahul & Shaloo. Therapeutic and Diagnostic Applications of Nanocomposites in the Treatment Alzheimer's Disease Studies. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 12.2021; 940-960. 10.33263/BRIAC121.940960.
- [67] Dos Santos T.C., Gomes T.M., Pinto B.A.S. et al. Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy. *Frontiers in Pharmacology* 2021 Oct 9; 1–14.
- [68] Cummings J. Anti-Amyloid Monoclonal Antibodies are Transformative Treatments that Redefine Alzheimer's Disease Therapeutics. *Drugs*. 2023 May;83(7):569-576. doi: 10.1007/s40265-023-01858-9. Epub 2023 Apr 15. PMID: 37060386; PMCID: PMC10195708.
- [69] Behin A, Le Panse R. New Pathways and Therapeutic Targets in Autoimmune Myasthenia Gravis. *J Neuromuscul Dis*. 2018;5(3):265-277.
- [70] Leisman, Gerry, et al. 'Clinical Motor and Cognitive Neurobehavioral Relationships in the Basal Ganglia'. *Basal Ganglia - An Integrative View*, InTech, 2 2013 Jan. doi:10.5772/55227.
- [71] Patil, D.; Singh, A.; Kanase, V. A REVIEW ON CAUSES, STAGES AND TREATMENTS USED IN ALZHEIMER'S DISEASE. *World Journal of Pharmaceutical Research* 2017, 6 (12), 251-267.
- [72] Asiri, Y.; Mostafa, G. Donepezil. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* 2010, 117-150.
- [73] Akasofu, S.; Kimura, M.; Kosasa, T.; Sawada, K.; Ogura, H. Study Of Neuroprotection Of Donepezil, A Therapy For Alzheimer's Disease. *Chemico-Biological Interactions* 2008, 175 (1-3), 222-226.
- [74] Kennedy, John S.; Polinsky, Ronald J. Johnson, Benjamin; Loosen, P.; Enz, Albert; Laplanche, Robert; Schmidt, Dennis; Mancione, Linda C.; Parris, Winston C. V.; Ebert, Michael H.. Preferential Cerebrospinal Fluid Acetylcholinesterase Inhibition by Rivastigmine in Humans. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 1999 December; 19(6):513-521
- [75] Dos Santos T.C., Gomes T.M., Pinto B.A.S. et al. "Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy", *Frontiers in Pharmacology*, 2018 October 9;1–14.
- [76] 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.
- [77] Carpenter T.S., Kirshner D.A., Lau E.Y. et al. "A Method to Predict Blood-Brain Barrier Permeability of Drug-Like Compounds Using Molecular Dynamics Simulations", *Biophysical Journal*, 2014;107(3):630–641.

- [78] L. K. Luna Parada, L. Y. Vargas Mendez, V. V. Kouznetsov, "Quinoline-Substituted 1,2,3-Triazole-Based Molecules, As Promising Conjugated Hybrids in Biomedical Research" *Org Med Chem*. 2018,7(2): 1-10.
- [79] Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr V., Featherstone R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961;7: 88-95.
- [80] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*. 1995;28(1):25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- [81] R. W. Holtz. In Vitro Methods to Screen Materials for Anti-Aging Effects. *Personal Care & Cosmetic Technology, Skin Aging Handbook*, William Andrew Publishing 2009; 329-362. doi:/10.1016/B978-0-8155-1584-5.50017-X
- [82] M. Karamac, R. Amarowicz, S. Weidner, S. Abe, F. Shahidi. Antioxidant Activity of Rye Caryopses and Embryos Extracts. *Czech J Food Sci*. 2000;20(6):209-214.
- [83] Draoui, N.; Schicke, O.; Fernandes, A.; Drozak, X.; Nahra, F.; Dumont, A.; Douxfils, J.; Hermans, E.; Dogné, J.; Corbau, R.; Marchand, A.; Chaltin, P.; Sonveaux, P.; Feron, O.; Riant, O. Synthesis And Pharmacological Evaluation Of Carboxycoumarins As A New Antitumor Treatment Targeting Lactate Transport In Cancer Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013;21(22):7107-7117.
- [84] Gkionis, L.; Kavetsou, E.; Kalospyros, A.; Manousakis, D.; Garzon Sanz, M.; Butterworth, S.; Detsi, A.; Tirella, A. Investigation Of The Cytotoxicity Of Bioinspired Coumarin Analogues Towards Human Breast Cancer Cells. *Molecular Diversity* 2020;25(1):307-321.
- [85] Loudon, M.; Parise, J. *Organic Chemistry*; W.H. Freeman & Company: New York, 2021;926-931.
- [86] Synthesis of Acrylamides via the Doebner-Knoevenagel Condensation M. J. Zacuto, *J. Org. Chem.*, 2019;84:6465-6474.
- [87] Μ. Ώξενκιουν – Πετροπούλου, "Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης. Φασματομετρικές Μέθοδοι", Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα, 2006;17-18.
- [88] D. Hadjipavlou-Litina, T. Garnelis, C. M. Athanassopoulos, D. Papaioannou, "Kukoamine A analogs with lipoxygenase inhibitory activity" *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2009;24(5):1188-1193. doi:10.1080/14756360902779193

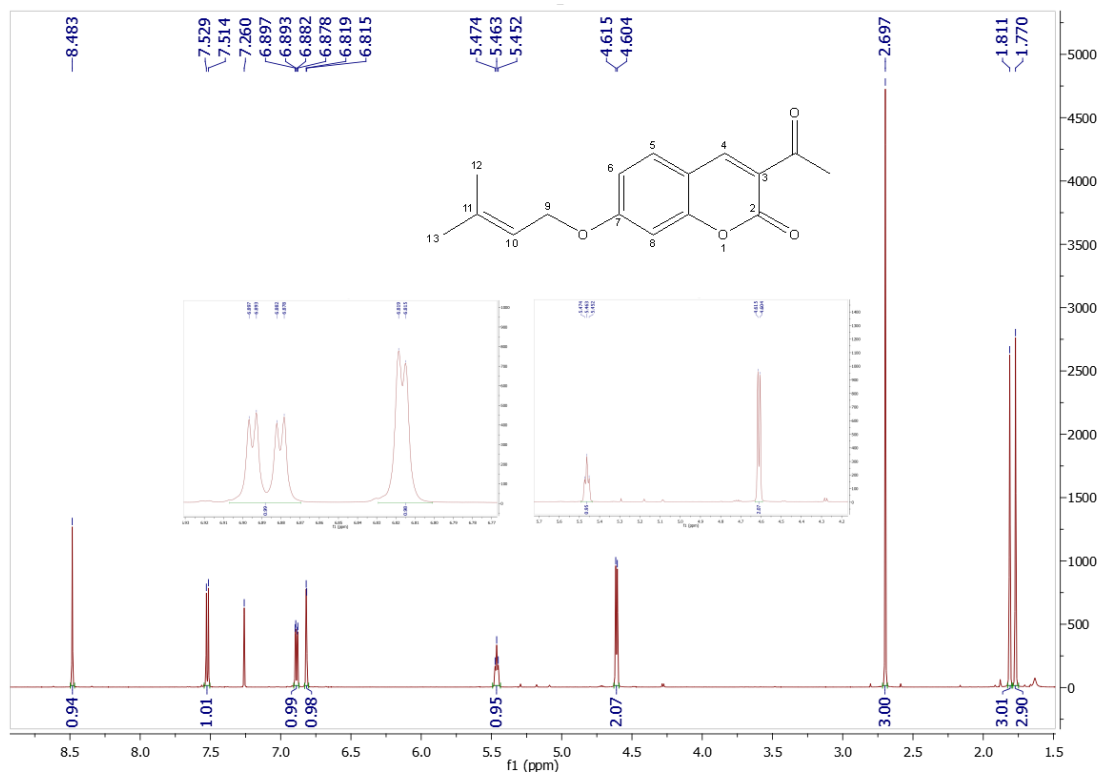
Παράρτημα Φασμάτων ^1H NMR



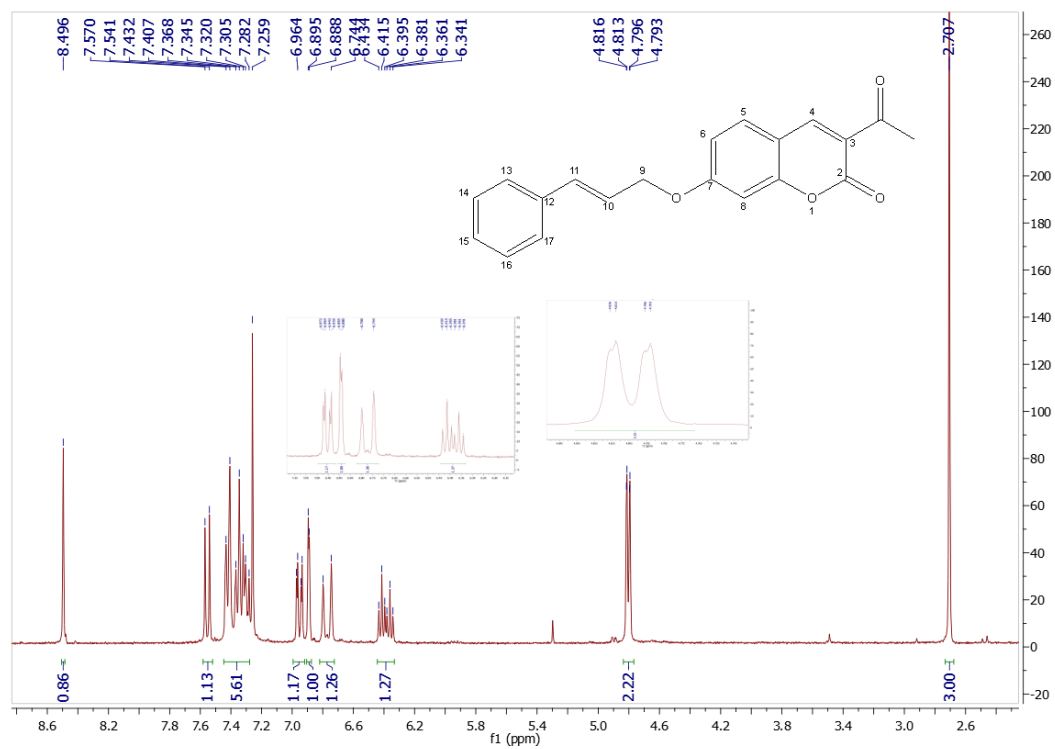
Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **1a**



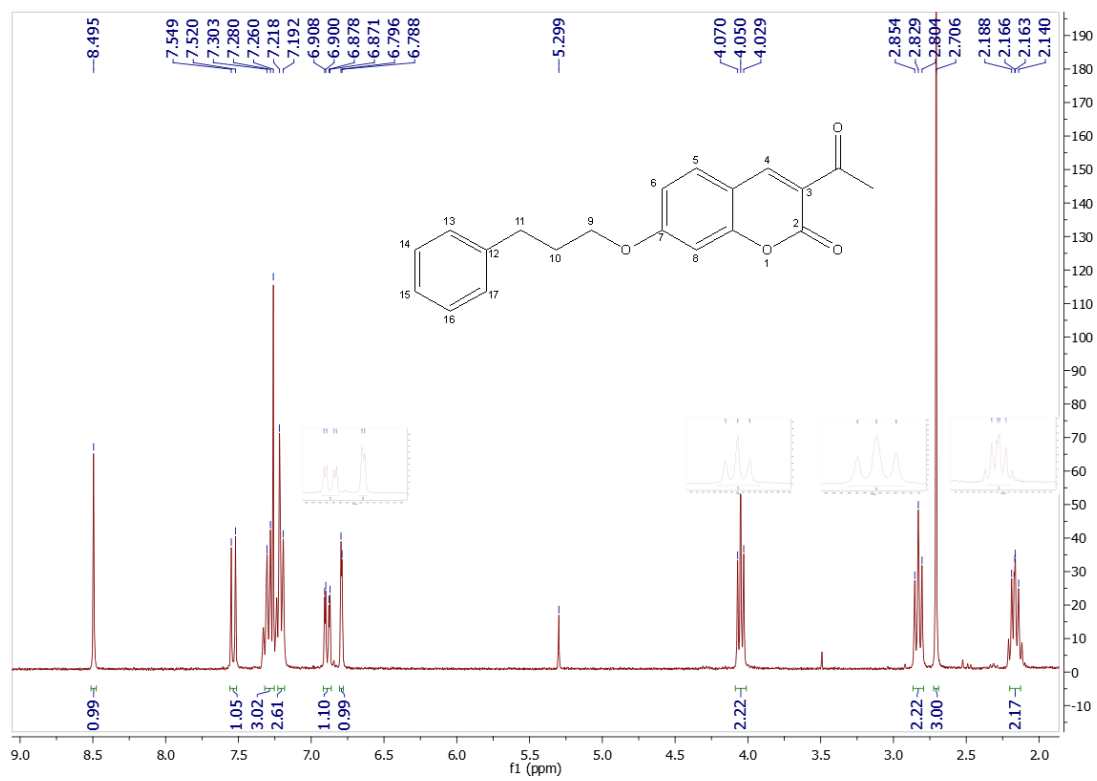
Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **2a**



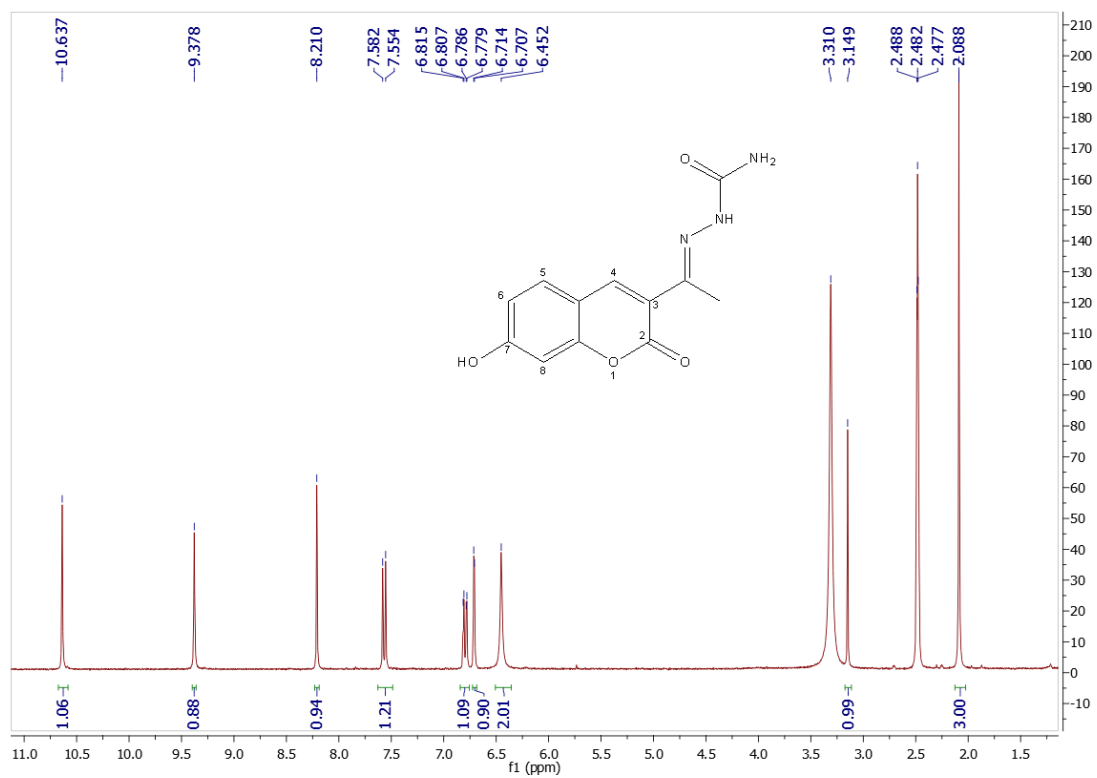
Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της ένωσης **2b**



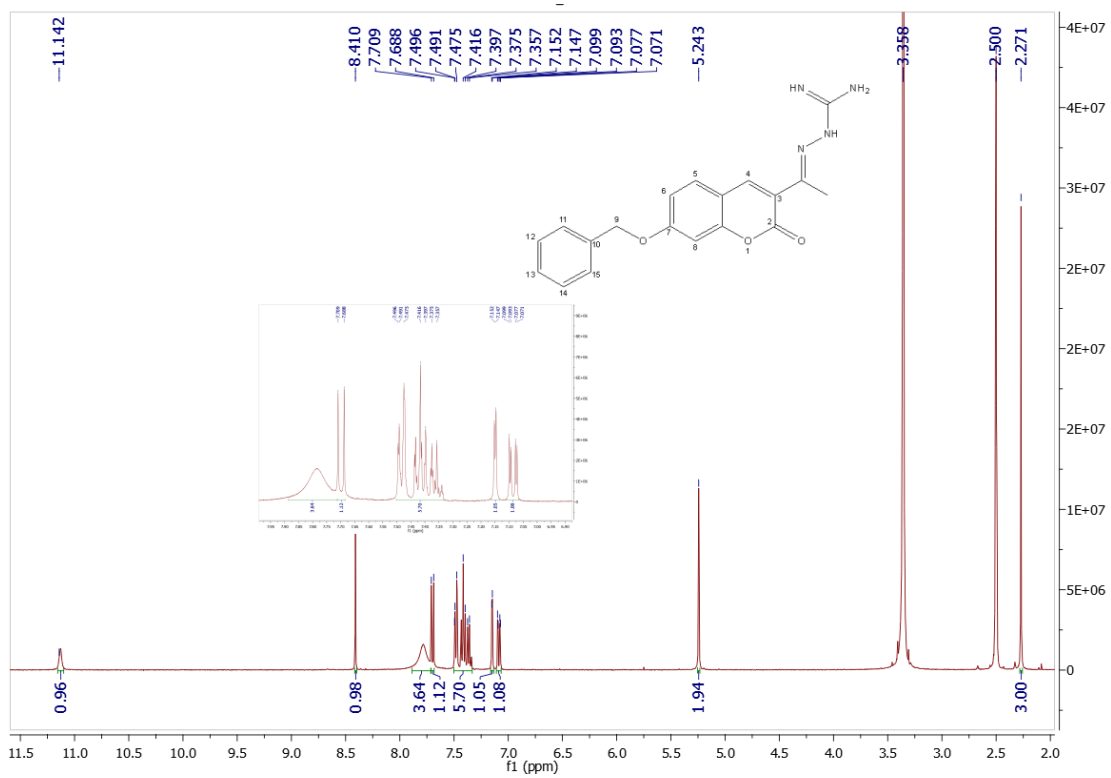
Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 2c



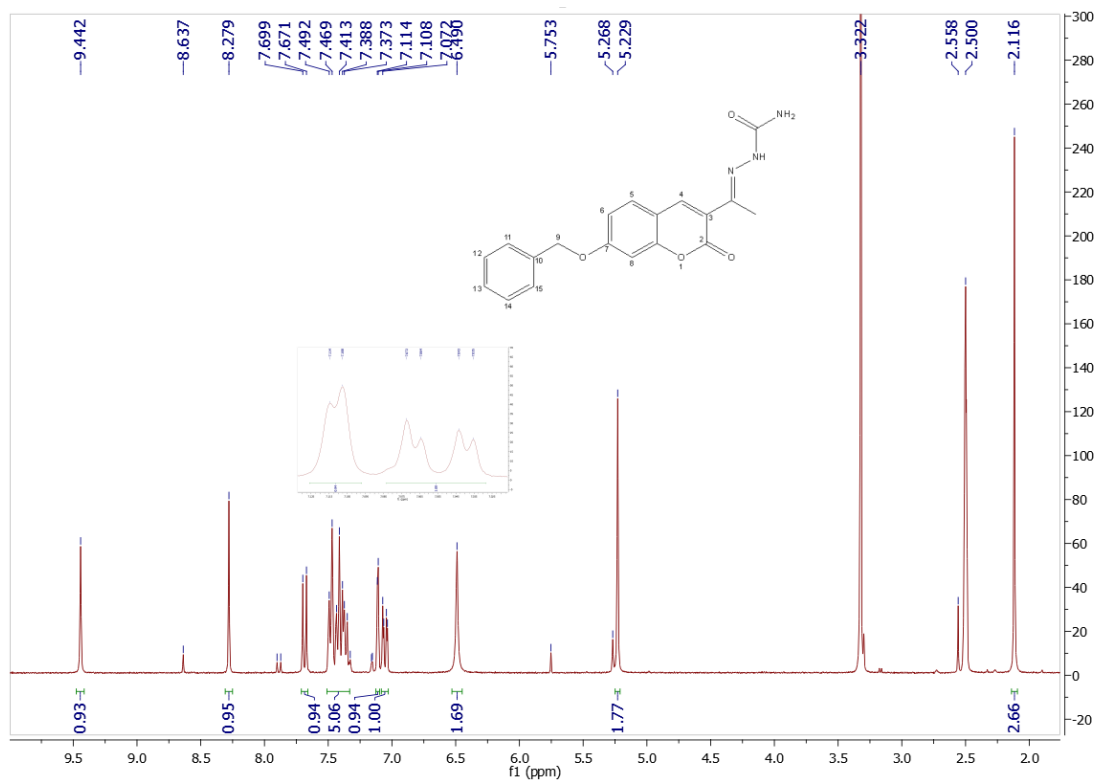
Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **2d**



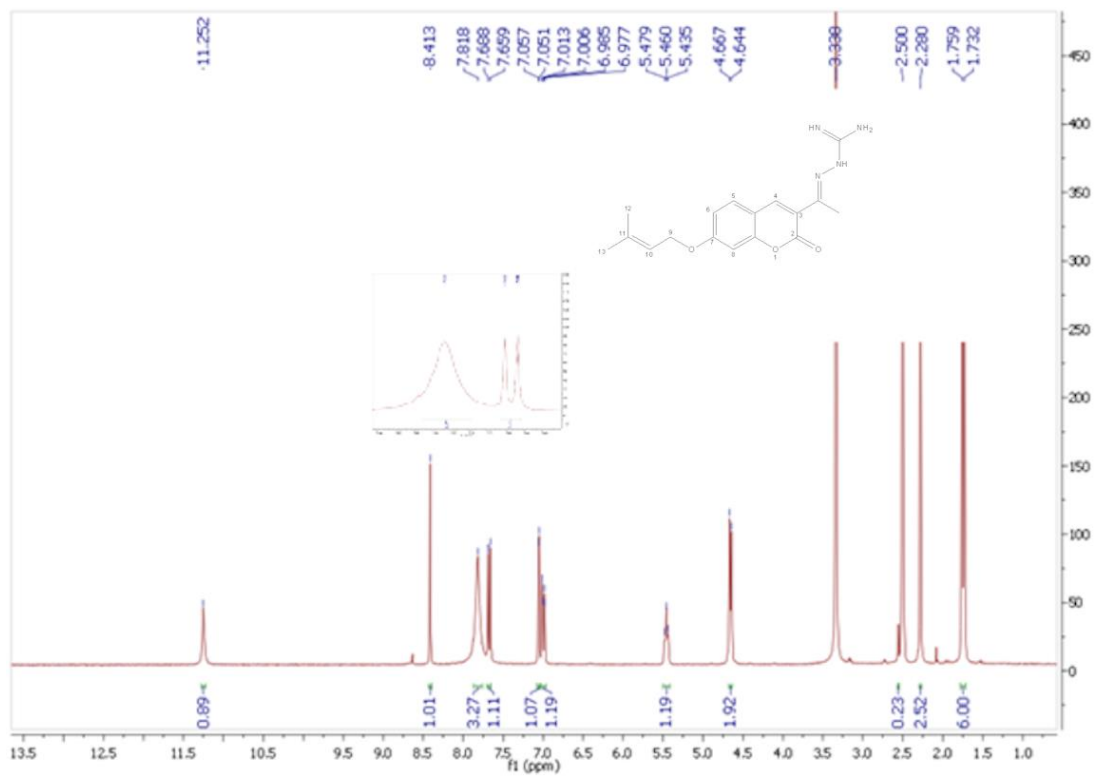
Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **3b**



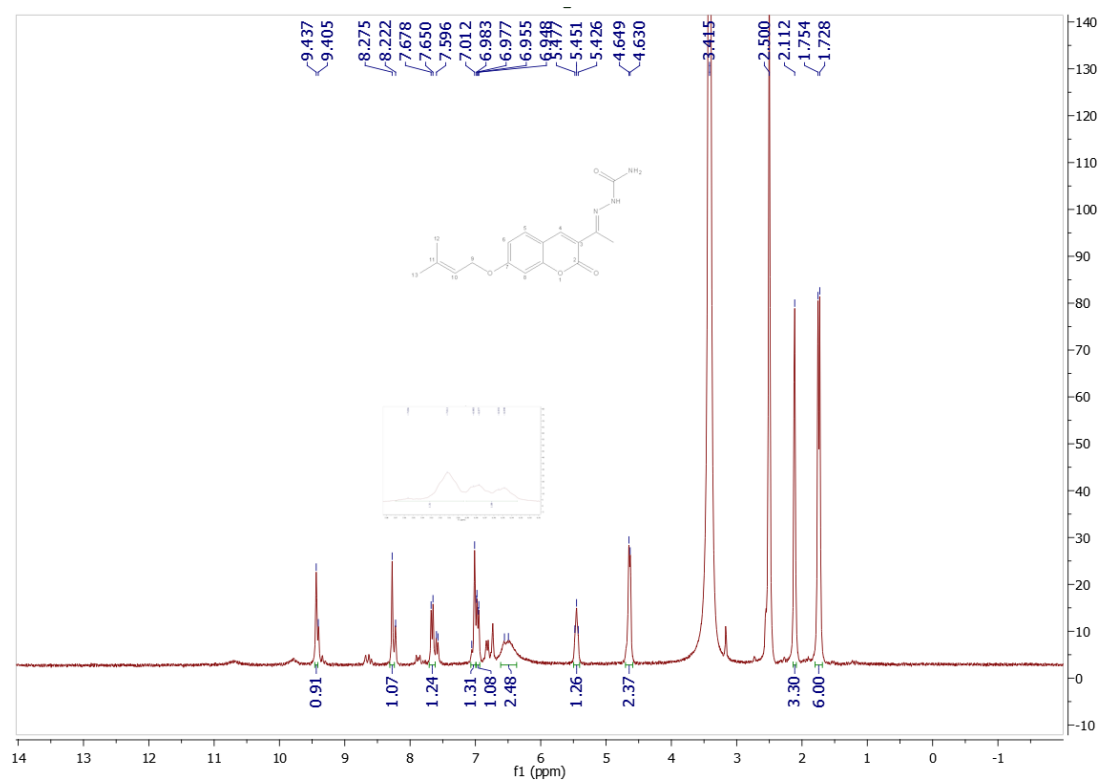
Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **3c**



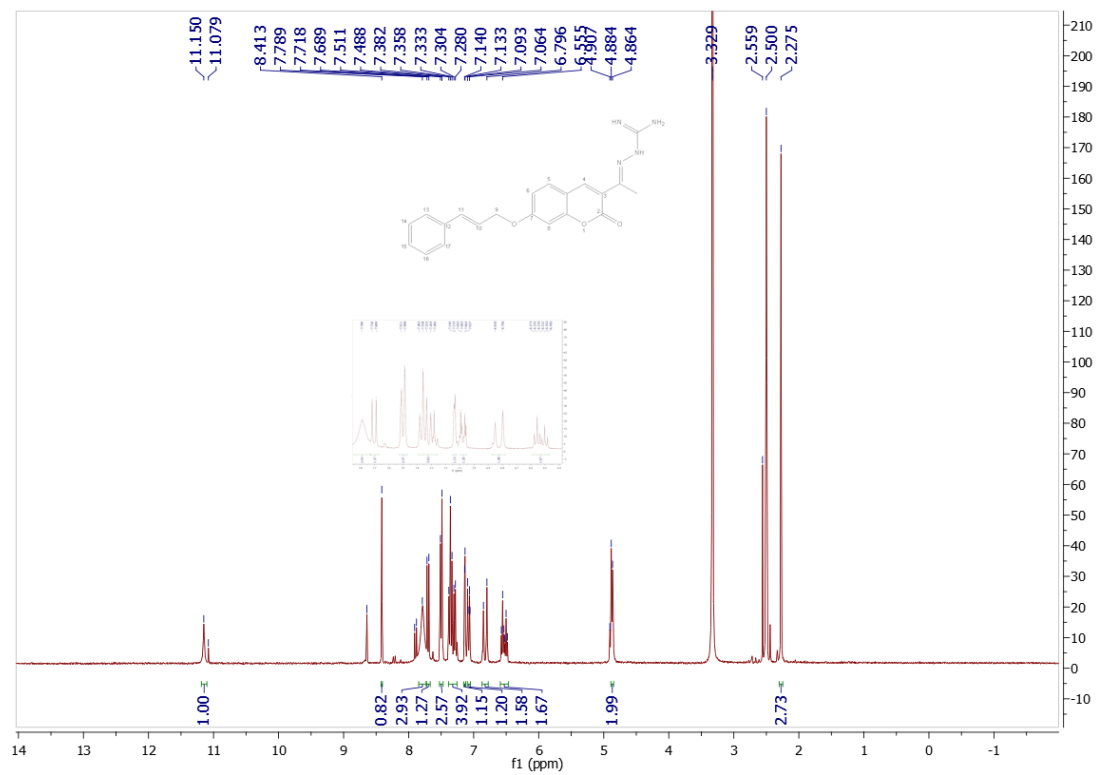
Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **3d**



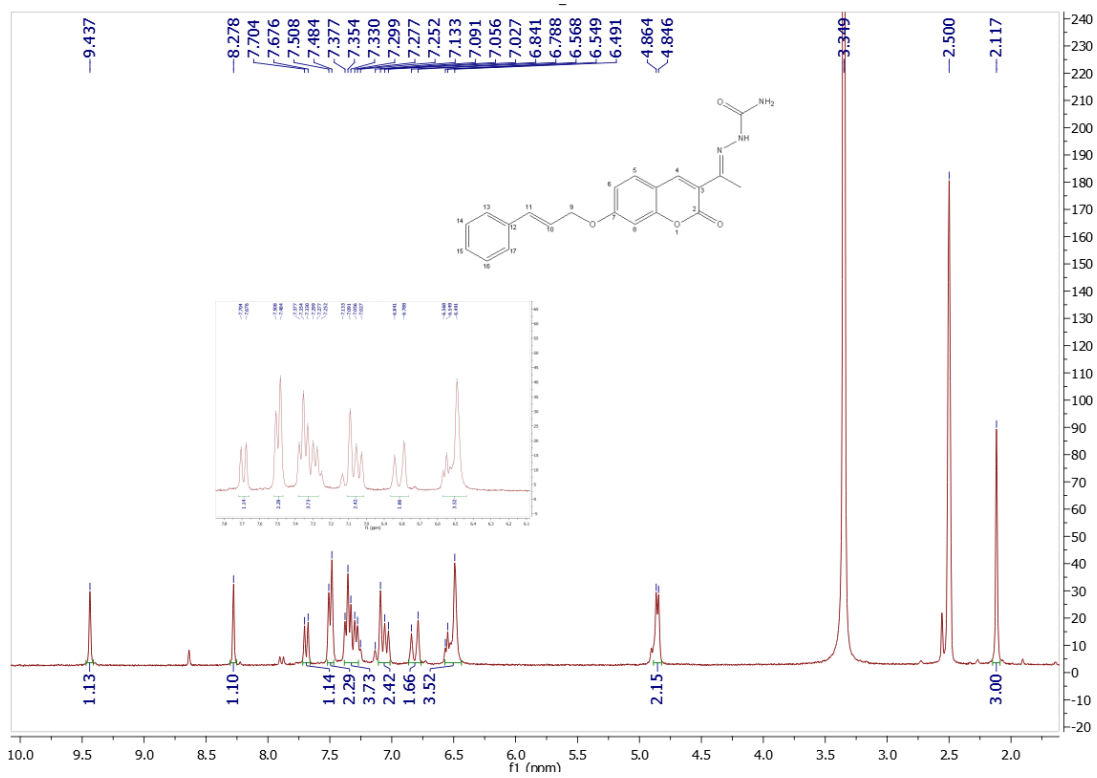
Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 3e



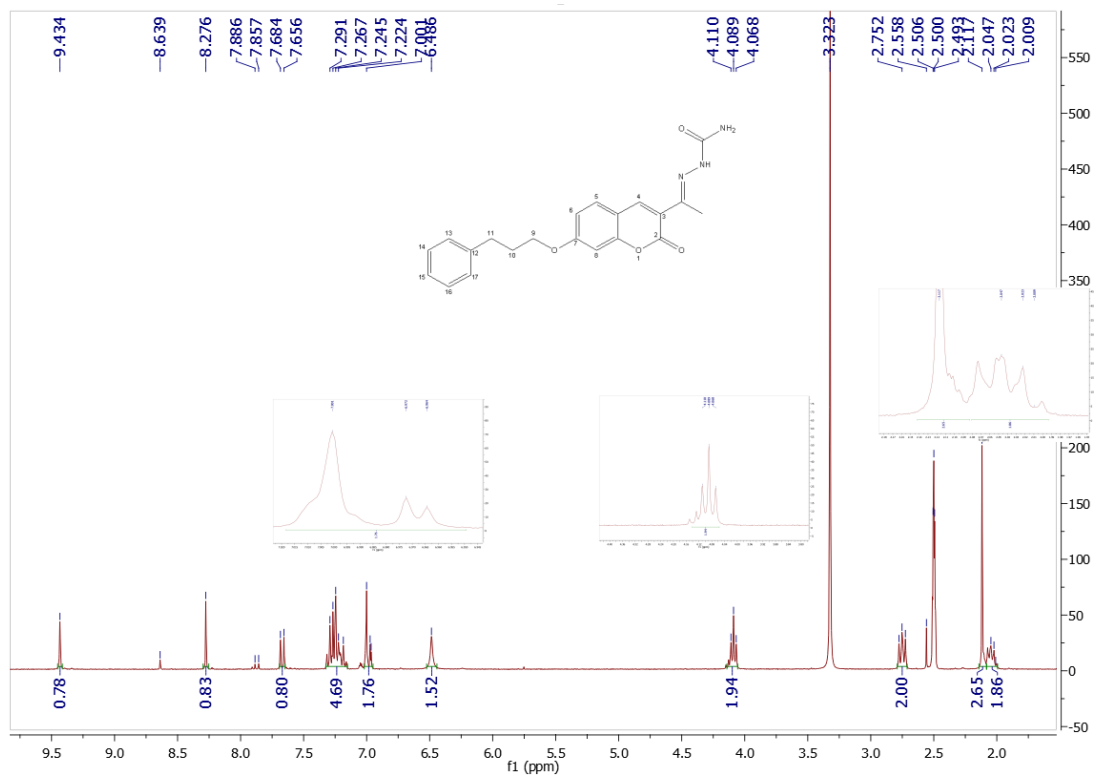
Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **3f**



Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **3g**



Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **3h**



Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 3j

Ευρετήρια

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Σύνοψη φαρμακολογικής δράσης κουμαρινών [19].....	13
Εικόνα 2: Καταρράκτης πήξης [28]. Οι λατινικοί αριθμοί αναφέρονται σε διαφορετικούς παράγοντες πήξης, ενώ η κατάληξη a αναφέρεται σε ενεργοποιημένη μορφή τους.....	15
Εικόνα 3: Χαρακτηριστικά σημάδια του καρκίνου [31]	16
Εικόνα 4: Αντικαρκινικοί μηχανισμοί των κουμαρινών με σχέση δομής-δράσης [3]	17
Εικόνα 5: Αναπαράσταση χολινεργικής σύναψης [54]	22
Εικόνα 6: Δομή του φαραγγιού της AChE του είδους <i>Torpedo californica</i> [58].....	23
Εικόνα 7: Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της δομής διμερούς ανθρώπινης AChE σε σύμπλοκο με δονεπεζίλη [62]	24
Εικόνα 8: Μηχανισμός υδρόλυσης ACh από την AChE [63].....	25
Εικόνα 9: Μακροσκοπικές αλλαγές στον εγκέφαλο σε προχωρημένη νόσο Αλτσχάιμερ [66].	26
Εικόνα 10: Διάγραμμα ανατομίας των βασικών γαγγλίων [70]	27
Εικόνα 11: Σημεία πρόσδεσης φυσικών ενώσεων στο ενεργό κέντρο της AChE [75]	30
Εικόνα 12: Αναπαράσταση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [77].....	32
Εικόνα 13: Τυπικές μετατοπίσεις πρωτονίων στο φάσμα ¹ H NMR.....	37
Εικόνα 14: Περιστροφικός εξαμιστήρας BüchiRotavapor® R-210.....	48
Εικόνα 15: Όργανο NMR Varian	49
Εικόνα 16: Συσκευή Gallenkamp για μέτρηση σημείου τήξεως	49
Εικόνα 17: Συσκευή Epoch 2 Microplate Reader.....	59
Εικόνα 18: Πλακίδιο 96 θέσεων μετά το πέρας της μεθόδου. Φαίνεται η διαφορά χρώματος ανάμεσα σε ασθενή (πάνω) και ισχυρό (κάτω) αναστολέα της AChE.	60
Εικόνα 19: Εισαγωγή και προετοιμασία κρυσταλλογραφικής δομής AChE στο Maestro μέσω του Protein Preparation Wizard	62
Εικόνα 20: Κατασκευή πλέγματος (Grid) του ενεργού κέντρου γύρω από την κρυσταλλογραφική θέση πρόσδεσης της δονεπεζίλης στην AChE.....	63
Εικόνα 21: Αποτελέσματα επεξεργασίας της δομής της δονεπεζίλης με το εργαλείο LigPrep	63
Εικόνα 22: Εργαλείο Ligand Docking μέσω του αλγορίθμου Glide.....	64
Εικόνα 23: Γραφική αναπαράσταση της κρυσταλλογραφικής θέσης πρόσδεσης της δονεπεζίλης στην AChE (πράσινο) έναντι της πρόβλεψης του βέλτιστου μοντέλου (γκρι) ...	83
Εικόνα 24: Αποτελέσματα docking της ένωσης 3c στο ενεργό κέντρο της AChE (δεξιά) και οι αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου (αριστερά).....	84
Εικόνα 25: Αποτελέσματα docking της ένωσης 3e στο ενεργό κέντρο της AChE (δεξιά) και οι αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου (αριστερά).....	84

Ευρετήριο Σχημάτων

Σχήμα 1: Χημική δομή κουμαρίνης (A) και χρωμόνης (B).....	11
Σχήμα 2: Χημική δομή ουμπελιφερόνης (7-υδροξυ-κουμαρίνης)	12
Σχήμα 3: Χημική δομή ξανθοτοξίνης (A) και αγγελικίνης (B)	12
Σχήμα 4: Χημική δομή ξανθιλετίνης (A) και σεσελίνης (B)	12
Σχήμα 5: Χημική δομή βαρφαρίνης	13
Σχήμα 6: Χημική δομή ιμπερατορίνης	14
Σχήμα 7: Χημική δομή εσκουλετίνης.....	14

Σχήμα 8: Χημική δομή δικουμαρόλης.....	16
Σχήμα 9: Χημική δομή νοβοβοκίνης	17
Σχήμα 10: Χημική δομή αμμορεσινόλης (A) και οστρουθίνης (B)	18
Σχήμα 11: Χημική δομή καλονολιδίου A (A) και ινοφύλλου B (B)	19
Σχήμα 12: Χημική δομή βενζυλ(κουμαριν-3-υλ)καρβαμικού οξέος (A) και (E)-7-((2-υδροξυ-βενζυλιδεν)αμινο)-2,3-διυδροκυκλοπενταν-κουμαρίνης (B).....	20
Σχήμα 13: Χημική δομή ακέτυλοχολίνης	20
Σχήμα 14: Αντίδραση σύνθεσης ακετυλοχολίνης	21
Σχήμα 15: Χημική δομή sarin (A) και μαλαθείου (B).....	28
Σχήμα 16: Χημική δομή της τακρίνης.....	29
Σχήμα 17: Χημική δομή δονεπεζίλης	29
Σχήμα 18: Χημική δομή ριβαστιγμίνης	30
Σχήμα 19: Χημική δομή διυδροπυρανοκουμαρίνης	30
Σχήμα 20: Χημική δομή ενσακουλίνης	31
Σχήμα 21: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για έναν αναστολέα και προσδιορισμός του IC ₅₀	31
Σχήμα 22: Σχέση ενέργειας συντονισμού και ισχύος μαγνητικού πεδίου για έναν πυρήνα με I=1/2.	35
Σχήμα 23: Χημική δομή τετραμεθυλοσιλάνιου.....	36
Σχήμα 24: Χημική αναπαράσταση της μεθόδου Ellman [79]	38
Σχήμα 25: Χημική δομή της ρίζας DPPH.....	38
Σχήμα 26: Μηχανισμός δέσμευσης της ρίζας DPPH	39
Σχήμα 27: Χημική δομή NDGA	39
Σχήμα 28: Γενική δομή προς εξέταση κουμαρινικών παραγώγων	40
Σχήμα 29: Γραφική απεικόνιση της συνθετικής πορείας.....	41
Σχήμα 30: Σύνθεση 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (1a)	41
Σχήμα 31: Σύνθεση 3-ακετυλο-7-αλκοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (2a-2h).....	42
Σχήμα 32: Σύνθεση κουμαρινικών υδραζονών (3a-3j).....	43
Σχήμα 33: Μηχανισμός αντίδρασης Knoevenagel	44
Σχήμα 34: Μηχανισμός ενδομοριακής μετεστεροποίησης προς 3-ακέτυλο-7-υδρόξυ-κουμαρίνη.....	45
Σχήμα 35: Μηχανισμός σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson.....	46
Σχήμα 36: Μηχανισμός πυρηνόφιλης προσθήκης αμίνης στο καρβονύλιο	47
Σχήμα 37: Συνθετική πορεία κουμαρινικών υδραζονών	85
Σχήμα 38: Χημική δομή των ισχυρότερων αναστολέων 3c και 3e	86

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια για in vitro προσδιορισμό αναστολής AChE	59
Πίνακας 2: Αντιδραστήρια για in vitro προσδιορισμό αναστολής BuChE	61
Πίνακας 3: Αντιδραστήρια για in vitro προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης.....	61
Πίνακας 4: Ικανότητα %αναστολής της AChE σε συγκέντρωση 100μM και IC-50 ενώσεων..	72
Πίνακας 5: Ικανότητα %αναστολής της BuChE σε συγκέντρωση 100μM και IC-50 ενώσεων	77
Πίνακας 6: Αντιοξειδωτική δράση ως %αναστολή DPPH σε χρόνους 30min και 60min	81
Πίνακας 7: Απόκλιση παραμετροποιήσεων μοντέλου docking από κρυσταλλογραφικά δεδομένα.....	83