



UNIwersytet
MEDYCZNY
W ŁODZI

UNIwersytet MEDYCZNY W ŁODZI
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

KIERUNEK: FARMACJA

mgr farm. KAMIL ZAWADA

**INNOWACYJNE HYBRYDY
TETRAHYDROAKRYDINY Z KOMPONENTEM
PRZECIWZAPALNYM**

**THE INNOVATIVE TETRAHYDROACRIDINE'S HYBRIDS
WITH ANTI-INFLAMMATORY COMPONENT**

Promotor pracy:

prof. dr hab. n. farm.

Paweł Szymański

Katedra Chemii Farmaceutycznej

Zakład Chemii Farmaceutycznej,

Analizy Leków i Radiofarmacji

Łódź 2020

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu promotorowi Panu prof. dr hab. n. farm. Pawłowi Szymańskiemu za cierpliwość i wyrozumiałość oraz nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie pracy doktorskiej i przygotowaniu publikacji naukowej.

Chciałbym podziękować dr n. farm. Kamili Czarneckiej za wszelką pomoc w redagowaniu pracy doktorskiej, jak i publikacji naukowej, wszelkie wskazówki i merytoryczną recenzję.

Dziękuję wszystkim pracownikom naukowym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Wydział Farmaceutyczny), Uniwersytetu Karola w Pradze (Wydział Farmaceutyczny w Hradec Králové), Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny), Grupy Adamed (Dział Rozwoju Technologii w Pabianicach), Uniwersytetu Gdańskiego (International Centre for Cancer Vaccine Science) Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (Wydział Farmaceutyczny), bez których współpracy w badaniach moja praca nie mogła by powstać, za ich poświęcony czas.

Szczególnie pragnę podziękować mojej narzeczonej mgr. farm. Karolinie Szporak, Rodzicom, Dziadkom, przyszłym Teściom, pozostałym członkom rodziny, przyjaciołom i współpracownikom za nieustanne wsparcie, olbrzymie pokłady cierpliwości, motywację i wiarę w ukończenie niniejszej pracy, nawet w chwilach mojego zwątpienia.

Spis treści

Wykaz skrótów	5
<u>CZEŚĆ TEORETYCZNA</u>	10
1 CHARAKTERYSTYKA CHOROBY ALZHEIMERA.....	10
2 HIPOTEZY ROZWOJU CHOROBY ALZHEIMERA	17
2.1 Hipoteza cholinergiczna – zaburzenia neurotransmisji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego.....	17
2.2 Hipoteza amyloidowa – tworzenie neurotoksycznego amyloidu- β	27
2.3 Hipoteza białka Tau – tworzenie neurofibryli białka Tau.....	32
3 PRZEWLEKŁY STAN ZAPALNY W OBRĘBIE OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO TOWARZYSZĄCY CHOROBI ALZHEIMERA	34
3.1 Inicjacja stanu zapalnego	35
3.2 Układ dopełniacza i jego rola w procesie choroby Alzheimera	36
3.3 Powstawanie czynników stanu zapalnego na szlaku cyklooksygenazy.....	37
3.4 Jądrowy czynnik NF- κ B i jego rola w procesie stanu zapalnego.....	40
3.5 Udział cytokin w patofizjologii choroby Alzheimera	40
3.6 Udział chemokin w patofizjologii choroby Alzheimera	42
4 LEKI STOSOWANE W TERAPII CHOROBY ALZHEIMERA.....	43
5 NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWPALNE JAKO UZUPEŁNIENIE TERAPII CHOROBY ALZHEIMERA.....	49
6 NOWE STRATEGIE LECZENIA CHOROBY ALZHEIMERA – TWORZENIE LEKÓW WIELOFUNKCYJNYCH.....	53
<u>CZEŚĆ PRAKTYCZNA</u>	60
7 CEL PRACY	60
8 METODOLOGIA BADAŃ	63
8.1 Odczynniki	63
8.2 Aparatura.....	64
8.3 Synteza	65
8.4 Badanie <i>in vitro</i> aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków (3a-3h) wobec cholinesteraz AChE i BuChE	75
8.5 Badanie kinetyki reakcji inhibicji AChE przez wybrany związek o najwyższej aktywności wobec enzymu	76

8.6	<i>Badanie wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek, prowadzone na linii komórkowej HepG2</i>	77
8.7	<i>Badanie wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek, prowadzone na linii komórkowej EA.hy926</i>	78
8.8	<i>Wyznaczanie punktu pKa dla wybranego, najbardziej aktywnego związku</i>	79
8.9	<i>Badanie aktywności antyoksydacyjnej otrzymanych związków (3a-3h) metodą ABTS i DPPH</i>	80
8.10	<i>Modelowanie molekularne.....</i>	81
9	WYNIKI I DISKUSJA	83
9.1	<i>Badanie in vitro aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków (3a-3h) wobec cholinesteraz AChE i BuChE</i>	85
9.2	<i>Kinetyka reakcji inhibicji AChE i BuChE przez wybrany związek.....</i>	86
9.3	<i>Badanie wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek, prowadzone na linii komórkowej HepG2</i>	89
9.4	<i>Badanie wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek, prowadzone na linii komórkowej EA.hy926</i>	89
9.5	<i>Wyznaczanie punktu pKa dla wybranego, najbardziej aktywnego związku</i>	90
9.6	<i>Badanie aktywności antyoksydacyjnej otrzymanych związków 3a-3h metodą ABTS i DPPH.....</i>	91
9.7	<i>Modelowanie molekularne.....</i>	93
9.8	<i>Tabele zbiorcze właściwości oraz wyników badań zsyntezowanych związków (2a-2h, 3a-3h)</i>	96
10	WNIOSKI	101
11	STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	103
12	STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	104
13	BIBLIOGRAFIA.....	105

Wykaz skrótów

Aβ	- ang. amyloid-beta; amyloid-beta
ABP	- ang. acyl-binding pocket; kieszeń wiążąca grupy acylowe
ABTS	- ang. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy kwas)
ACh	- ang. acetylcholine; acetylocholina
AChE	- ang. acetylcholinesterase; acetylocholinoesteraza
AChRs	- ang. acetylcholine receptors; receptory acetylocholinowe
AICD	- ang. APP intracellular domain; wewnątrzkomórkowy odcinek APP
Ala	- ang. alanine; alanina
ALAT	- aminotransferaza alaninowa
APH-1	- ang. anterior pharynx-defective 1
ApoE	- ang. apolipoprotein E; apolipoproteina E
APP	- ang. amyloid precursor protein; proteinowy prekursor amyloidu
AS	- ang. anionic site; miejsce anionowe
Asn	- ang. asparagine; asparagina
BACE	- ang. beta-amyloid cleaving enzyme; enzym rozcinający amyloid-beta
βAPP	- ang. amyloid precursor protein beta; proteinowy prekursor amyloidu
BuChE	- ang. butyrylcholinesterase; butyrylocholinoesteraza
cAMP	- ang. cyclic adenosine monophosphate; cykliczny adenozynomonofosforan
CAS	- ang. catalytic active site; miejsce aktywne katalitycznie
CDK5	- ang. cyclin-dependent kinase 5; kinaza cyklinozależna 5
CDMT	- ang. 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine; 2-chloro-4,6-dimetoksy- 1,3,5-triazyna
COX-1	- ang. cyclooxygenase 1; cyklooksyzgenaza 1
COX-3	- ang. cyclooxygenase 3; cyklooksyzgenaza 3

COX-2	- ang. cyclooxygenase 2; cyklooksyzgenaza 2
ChAT	- ang. choline aminotransferase; aminotransferaza cholinowa
CR1	- ang. complement receptor type 1; receptor dopełniacza typu 1
CTF-β	- ang. beta-carboxyl-terminal fragment; C-terminalny fragment beta
CTF-γ	- ang. C-terminal fragment γ; C-terminalny fragment γ
DAM	- ang. disease-associated microglia; mikroglej chorobowy
DAMPs	- ang. damage-associated molecular patterns; cząsteczki wzorcowe towarzyszące uszkodzeniu
DMSO	- ang. dimethyl sulfoxide; dimetylosulfotlenek
DNA	- ang. deoxyribonucleic acid; kwas deoksyrybonukleinowy
DPPH	- ang. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowy
DTNB	- ang. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy
DYRK1A	- ang. dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1a; podwójnie specyficzna regulowana fosforylacją tyrozyny kinaza 1a
EDTA	- ang. ethylenediaminetetraacetic acid; etylenodiaminotetraoctowy kwas
EeAChE	- łac. Electrophorus electricus acetylcholinesterase; acetylocholino-esteraza ze Strętwy
Gln	- ang. glutamine; glutamine
Glu	- ang. glutamic acid; kwas glutaminowy
GM-CSF	- ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
GPCR	- ang. G protein-coupled receptor; receptory sprzężone z białkami G
GSK-3β	- ang. glycogen synthase kinase 3β; syntaza glikogenu kinaza 3β
hAChE	- ang. human acetylcholinesterase; ludzka acetylocholinoesteraza
His	- ang. histidine; histydyna
HIV	- ang. human immunodeficiency virus; ludzki wirus niedoboru odporności

HSV-1	- łac. human simplex virus-1; wirus opryszczki typu 1
IDE	- ang. insulin-degrading enzyme, insulysin; enzym degradujący insulinę, insulizyna
IFN-α	- ang. interferon-alpha; interferon alfa
IgE	- immunoglobulina E
IκB	- ang. inhibitor κ B; inhibitor κ B
IL	- ang. interleukin; interleukina
Leu	- ang. leucine; leucuna
MAC	- ang. membrane attacking complex; błonowy kompleks atakujący
mAChRs	- ang. muscarinic acetylcholine receptors; acetylocholinowe receptory muskarynowe
MAO	- ang. monoamine oxidase; monoaminooksydaza
MCP-1	- ang. monocyte chemoattractant protein-1; monocytarne białko chemotaktyczne typu 1
MHC	- ang. major histocompatibility complex; główny kompleks zgodności tkankowej
MIP	- ang. macrophage inflammatory proteins; białko zapalne makrofagów
mRNA	- ang. messenger RNA; matrycowy RNA
MTDL's	- ang. multitarget-directed ligands; ligandy o działaniu wielokierunkowym
MTT	- ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu bromek
nAChRs	- ang. nicotinic acetylcholine receptors; acetylocholinowe receptory nikotynowe
NEP	- ang. neprilysin, neutral endopeptidase neprylizyna, neutralna endopeptydaza
NFκB	- ang. nuclear factor κ B; czynnik jądrowy κ B
NFTs	- ang. neurofibrillary tangles; splątki neurofibrylarne
Ngb	- ang. neuroglobin; neuroglobina

NLPZ	- niesteroidowe leki przeciwzapalne
NMDA	- ang. <i>N</i> -methyl-D-aspartate; <i>N</i> -metylo-D-asparaginowy
OH	- ang. oxyanion hole; otwór oksyanionowy
OUN	- ośrodkowy układ nerwowy
PAMPs	- ang. pathogen-associated molecular patterns; cząsteczki wzorcowe na powierzchni patogenu
PAS	- ang. peripheral anionic site; peryferyjne miejsce anionowe
PBS	- ang. phosphate-buffered saline; sól fizjologiczna buforowana fosforanem
PEN-2	- ang. presenilin enhancer protein 2; enzym wzmacniający presenilinę 2
PET	- ang. positron emission tomography; pozytronowa tomografia emisyjna
PGG2	- ang. prostaglandin G2; prostaglandyna G2
PGH2	- ang. prostaglandin H2; prostaglandyna H2
PGD2	- ang. prostaglandin D2; prostaglandyna D2
PGE2	- ang. prostaglandin E2; prostaglandyna E2
PGF2	- ang. prostaglandin F2; prostaglandyna F2
PGI2	- ang. prostacyclin I2; prostacyklina I2
PGT	- ang. prostaglandine transporter; transporter prostaglandynowy
Phe	- ang. phenylalanine; fenyloalanina
PIP₂	- ang. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan
PLA₂	- ang. phospholipase A2; fosfolipaza A2
PPAR_γ	- ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma; receptory typu gamma aktywowane przez proliferatory peroksysomów
PRRs	- ang. pattern recognition receptors; wzorcowe receptory poznawcze
PS-1	- ang. presenilin 1; presenilina 1
PS-2	- ang. presenilin 2; presenilina 2

RAA	- renina-angiotensyna-aldosteron
RAGE	- ang. receptor for advanced glycation endproducts; receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji
RNS	- ang. reactive nitrogen species; reaktywne formy azotu
ROS	- ang. reactive oxygen species; reaktywne formy tlenu
RZS	- reumatoidalne zapalenie stawów
sαAPP	- ang. alpha-secretase-released APP ectodomain; ektodomena APP uwolniona przez sekretazę alfa
sβAPP	- ang. soluble amyloid precursor protein beta; rozpuszczalna forma proteinowego prekursora amyloidu-beta
Ser	- ang. serine; seryna
Sig-R	- ang. sigma receptor; receptor sigma
TcAChE	- łac. Tetronarce californica acetylcholinesterase; acetylocholinoesteraza z Drętwy kalifornijskiej
TGFβ	- ang. transforming growth factor β; transformujący czynnik wzrostu beta
THA	- ang. tetrahydroacridine; tetrahydroakrydyna
THF	- tetrahydrofuran
TLC	- ang. thin layer-chromatography; cienkowarstwowa chromatografia cieczowa
TNB	- ang. 5-thio-2-nitrobenzoic acid anion; anion kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego
TNF-α	- ang. tumor necrosis factor α; czynnik martwicy nowotworu α
Trp	- ang. tryptophan; tryptofan
TXA2	- ang. thromboxane A2; tromboksan A2
Tyr	- ang. tyrosine; tyrozyna
Val	- ang. valine; walina

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1 CHARAKTERYSTYKA CHOROBY ALZHEIMERA

Choroba Alzheimera jest najczęściej występującą na świecie chorobą neurodegeneracyjną, po raz pierwszy scharakteryzowaną w 1906 roku przez niemieckiego lekarza Aloisa Alzheimera. Choroba ma charakter postępujący, a na jej skomplikowaną patogenezę składa się wiele czynników i mechanizmów biologicznych. Pomimo ponad stu lat badań, do tej pory dokładna jej etiologia nie została określona, a stosowane metody leczenia pozwalają jedynie spowolnić jej przebieg, nie dając szans na całkowite wyleczenie [1-3].

Choroba Alzheimera jest główną przyczyną demencji i zaburzenia zdolności poznawczych u osób starszych. Oficjalne dane wskazują, że w 2016 roku liczba osób cierpiących na chorobę Alzheimera na świecie wynosiła ok. 47 milionów, a liczba ta może wzrosnąć do ponad 75 milionów w roku 2030. Odsetek zdiagnozowanych przypadków znacząco wzrasta wraz z wiekiem. Choroba występuje u ok. 1% osób w wieku 60 lat, 5% w wieku 65-75 lat, do 50% w wieku powyżej 85 lat. Wzrastająca wraz z wiekiem liczba chorych wskazuje, że jest to jeden z czynników ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera. Chorobę charakteryzuje postępująca utrata pamięci, zaburzenia mowy, upośledzenie orientacji oraz zdolności nauki. Towarzyszy temu osłabienie odporności (a co za tym idzie podatność na infekcje) oraz spadek masy ciała. Powyższe cechy choroby Alzheimera, które wraz z jej rozwojem ulegają nasileniu powodują z czasem całkowite uzależnienie chorego od opiekunów co stanowi duży problem w wymiarze społecznym. Fakt, iż częstość występowania choroby wzrasta wraz wiekiem i ostatecznie uniemożliwia udział w życiu społecznym chorego, ale także może poważnie ograniczyć funkcjonowanie osób z najbliższego otoczenia stanowi szczególnie problem w starzejącym się społeczeństwie. Szacuje się, że choroba Alzheimera jest czwartą w kolejności najczęstszą przyczyną śmierci osób po 65 roku życia [1, 2, 4-8].

Pomimo, że patofizjologia choroby Alzheimera nie została dotychczas w całości poznana, udało się określić kilka istotnych czynników, które znacząco przyczyniają się do jej rozwoju. Charakterystyczne dla tej choroby są zaburzenia w funkcjonowaniu układu cholinergicznego i glutaminergicznego, utrata komórek

nerwowych w mózgu, odkładanie się w ośrodkowym układzie nerwowym zewnątrzkomórkowych depozytów amyloidu- β ($A\beta$) w postaci złogów (blaszek), występowanie przewlekłych stanów zapalnych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, zaburzenia homeostazy biometali i wzrost stężenia metali ciężkich (np. miedzi, cynku, żelaza, glinu i rtęci), tworzenie się wewnątrzkomórkowych splotów neurofibryli zbudowanych z „błędnego” białka Tau (białko τ) zaburzających funkcjonowanie komórek nerwowych, zmniejszenie krążenia mózgowego. W mózgu chorych zaobserwowano spadek połączeń nerwowych (synaps) oraz obumieranie komórek nerwowych, a w ich miejsce powstawanie „blizn”. Nasileniu ulega proces gliozy – wzrost komórek gleju, tj. astrocytów i astrogleju, oraz zwiększenie ich aktywności [1, 2, 4, 8-11]. Złogi amyloidu- β i neurofibryle obecne są również w mózgu osób starszych nie cierpiących na demencję, jednak ilość ich jest znacznie większa u osób z chorobą Alzheimera [12]. Wspomniane powyżej zaburzenie homeostazy metali odgrywa ważną rolę w agregacji amyloidu- β , neurotoksyczności oraz powstawaniu reaktywnych form tlenu. Badania *in vitro* wykazały, że żelazo, miedź i cynk mogą wiązać się z $A\beta$ wzmagając jego agregację. Jony metali Cu oraz Fe posiadają silne właściwości „redox” i przyczyniają się do powstawania reaktywnych form tlenu, powodujących uszkodzenia komórek [13].

Choroba Alzheimera może występować w formie rodzinnej oraz sporadycznej. Pierwsza z nich ma charakter dziedziczny, występuje rzadko (5-10% przypadków zachorowań) i pierwsze objawy choroby zauważalne są już w młodym wieku. Przyczyn formy rodzinnej choroby Alzheimera należy doszukiwać się w dziedziczonych mutacjach genowych. Znaczna część przypadków zachorowań na chorobę Alzheimera ma charakter sporadyczny i pierwsze objawy zauważalne są po 65 roku życia. Sporadyczne przypadki występowania choroby Alzheimera dotyczą 90-95% pacjentów [14-16]. Kliniczne objawy choroby Alzheimera obejmują nie tylko utratę pamięci i zaburzenia funkcji poznawczych. U pacjentów na różnych etapach postępu choroby obserwuje się apatię, depresję, psychozy, agresję, niepokój i zaburzenia snu. Apatia w przebiegu choroby Alzheimera występuje w 49% przypadków i jest ściśle powiązana z dysfunkcją układu cholinergicznego. Stan psychiczny chorego ulega poprawie po włączeniu do terapii leków z grupy inhibitorów cholinoesteraz np. donepezilu [17, 18].

Ze względu na zauważalne u pacjentów zmiany w mózgu oraz objawy choroby Alzheimera, wyróżniono następujące fazy jej rozwoju:

- faza przedobjawowa (przedkliniczna) – zmiany patologiczne w mózgu obecne, objawy choroby nie występują,
- faza przeddemencyjna – występują łagodne zaburzenia zdolności poznawczych, jednakże pacjent nadal jest zdolny do samodzielnej egzystencji,
- demencja – występuje zaburzenie zdolności poznawczych i funkcjonowania, w znacznym stopniu, codzienne funkcjonowanie ulega znacznemu upośledzeniu, pacjent staje się w pełni zależny od opiekunów [19].

Identyfikacja pacjenta w fazie przedobjawowej jest kluczowa do wdrożenia jak najwcześniejszego leczenia, przy czym niektóre zmiany patofizjologiczne w mózgu mogą pojawić się na wiele lat przed wystąpieniem pierwszych objawów klinicznych, np. u osób z predyspozycjami genetycznymi do choroby Alzheimera złogi amyloidowe mogą być obecne przez 20 lat, zanim wystąpią objawy chorobowe [19].

Astrocyty i astrogliję są najliczniejszymi komórkami gleju. W mózgu osoby zdrowej funkcja tych komórek polega na wspieraniu metabolizmu, funkcjonalności komórek nerwowych i utrzymują mózg w prawidłowej kondycji. Oddziałując z neuronami biorą udział w procesie neurotransmisji, utrzymują homeostazę jonową, regulują metabolizm energetyczny, biorą udział w procesie remodelowania połączeń synaptycznych oraz ochronie komórek nerwowych przed stresem oksydacyjnym. Astrocyty pełnią fundamentalną rolę w tworzeniu i funkcjonowaniu bariery krew-mózg [13, 15, 20, 21]. Aktywacja astrocytów jest ważnym elementem odpowiedzi układu immunologicznego na uszkodzenie tkanki mózgowej. Astrocyty ulegają przestawieniu z formy „uśpionej” w aktywną w przypadku rozwoju stanu zapalnego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, a za aktywację tego procesu odpowiadają czynnik martwicy nowotworu (TNF- α) oraz interleukiny IL-1 i IL-6. Aktywowane astrocyty wydzielają chemoatraktanty indukujące zmiany w barierze krew-mózg, zwiększając przepuszczalność dla komórek układu immunologicznego oraz uczestniczą w regulacji procesów usuwania amyloidu- β za pośrednictwem apolipoproteiny E. Rekrutacji i przenikaniu do wnętrza ośrodkowego

układu nerwowego ulegają leukocyty (limfocyty i fagocyty) [14, 15, 21-23]. Astrocyty wydzielają cytokiny, interleukiny i tlenek azotu. W przypadku osób z chorobą Alzheimera astrocyty skupiają się wokół złogów amyloidu- β i stając się nadreaktywne, tracą swoje właściwości neuroprotekcyjne. Efektem tego jest m.in. zaburzenie homeostazy wapniowej w komórkach nerwowych, nieprawidłowe funkcjonowanie połączeń synaptycznych, nadmierna wrażliwość na neurotoksyny. Aktywacja astrocytów we wczesnej fazie rozwoju choroby Alzheimera dotyczy głównie takich regionów mózgu jak kora czołowa i warstwa piramidowa [15, 20].

Poza astrocytami aktywacji ulega również mikroglej wchodzący w skład układu immunologicznego. Komórki mikrogleju pochodzą od monocytów, które są ich prekursorami i powstają z nich w trakcie embriogenezy. Stale rezydują w mózgu w postaci nieaktywnej i stanowią około 10% ogółu komórek wchodzących w skład OUN. Mikroglej to najważniejsze komórki układu immunologicznego w mózgu pełniące ważną rolę w utrzymaniu homeostazy ośrodkowego układu nerwowego. Komórki te kontrolują swoje najbliższe środowisko i aktywność synaptyczną (ochrona i remodelowania połączeń synaptycznych), usuwają martwe komórki i wspomagają funkcjonowanie komórek nerwowych. Komórki mikrogleju, podobnie jak makrofagi, są komórkami prezentującymi antygeny poprzez główny układ zgodności tkankowej klasy II (MHC class II – ang. major histocompatibility complex), uczestniczą w syntezie czynników zapalnych tj. cytokin, chemokin, tlenku azotu i prostaglandyn. W przypadku uszkodzeń tkanki nerwowej w OUN, agregacji protein lub pod wpływem patogenów ulegają aktywacji i inicjują odpowiedź immunologiczną, stanowiąc pierwszą linię obrony immunologicznej. Proces aktywacji mikrogleju jest złożony i jest następstwem wielu zdarzeń, w wyniku których ulega on „przebudzeniu” i inicjacji ulega wrodzona odpowiedź immunologiczna. Aktywowane komórki mikrogleju ulegają zmianom morfologicznym – przyjmują formę amebocytową a rozgałęzienia cytoplazmy zmniejszają się. Na powierzchni błony komórkowej aktywowanego mikrogleju pojawia się duża różnorodność markerów powierzchniowych, a same komórki mają możliwość fagocytozy [2, 3, 14, 15, 24]. W wyniku aktywacji makrofagi, a do nich zaliczają się komórki mikrogleju, powstają komórki o różnych fenotypach różniące się rolą w odpowiedzi na rozwijający się stan zapalny. Komórki mikrogleju obecne w stanie homeostazy, w przypadku rozwijającej się neurodegeneracji przekształcają się w unikalny fagocytujący mikroglej stanu chorobowego (DAM – disease-associated

microglia). Fenotyp DAM występuje w zwiększonej ilości również w mózgu osób w podeszłym wieku. Komórki te charakteryzują się zwiększoną fagocytozą, oksydacyjną fosforylacją i możliwością prezentacji antygenów. Gromadzi się wokół blaszek amyloidowych i poprzez fagocytozę usuwa patologiczne złoże białkowe [25]. Wyróżniamy dwa główne fenotypy – M1 (fenotyp prozapalny, powstający pod wpływem ekspresji cytotoksycznych genów) oraz M2 (przeciwzapalny). Powstawaniu fenotypu M1 towarzyszy wzrost poziomu, wytwarzanych przez te komórki, cytokin prozapalnych i nasilenie procesu fagocytozy, zaś fenotyp M2 charakteryzuje się wytwarzaniem cytokin przeciwzapalnych, fagocytozą i obniżeniem produkcji tlenu azotu. Komórki mikrogleju i astrocyty są prawdopodobnie jednym z głównych źródeł powstawania cytokin w procesie stanu zapalnego towarzyszącego chorobie Alzheimera. Różne fenotypy komórek mikrogleju mogą równocześnie występować w różnych obszarach mózgu objętych stanem zapalnym. Komórki mikrogleju ulegają koncentracji wokół depozytów amyloidu- β , gdzie aktywują mediatory prozapalne tj. MHC, COX-2, MCP-1, TNF- α , IL - 1 β , IL-6. Czynniki te regulują migrację innych komórek układu immunologicznego (np. MCP-1) oraz uczestniczą w mechanizmie procesu zapalnego (np. COX-2, IL). Mikroglej łączy się z oligomerami i fibrylami A β , poprzez szereg receptorów, których zaliczyć możemy: A1, CD36, CD14, α 6 β 1 integrynę, CD47, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9. Receptory te biorą udział w mechanizmie powstawania stanu zapalnego [2, 14, 22, 26].

Podczas aktywacji astrocytów, astrogleju i komórek mikrogleju uwolnieniu ulegają cytokiny i chemokiny, które stymulują peryferyjne makrofagi do przekraczania bariery krew-mózg. Zarówno mikroglej jak i makrofagi poza fagocytozą mają dodatkowo możliwość rozpoznawania patogenów przy pomocy wzorcowych receptorów poznawczych (PRRs – ang. pattern recognition receptors), które regulują m.in. aktywację powyższych komórek. Receptory te wiążą się z cząsteczkami wzorcowymi na powierzchni patogenów (PAMPs – ang. pathogen-associated molecular patterns) lub z cząsteczkami wzorcowymi towarzyszącymi uszkodzeniom (DAMPs – ang. damage-associated molecular patterns). Pod wpływem tego dochodzi do zainicjowania mechanizmów obronnych [14, 15, 27]. Przewlekła aktywacja mikrogleju prowadzi do szkodliwego oddziaływania przez te komórki na neurony poprzez długotrwałe działanie cytotoksycznych mediatorów zapalnych, wydzielanych przez komórki mikrogleju. Skutkiem tego jest dysfunkcja neuronów i ich śmierć [28].

Aktywowane komórki mikrogleju wytwarzają wolne rodniki tlenowe, co przyczynia się do pogłębienia stresu oksydacyjnego oraz rozwoju stanu zapalnego, które są kluczowym czynnikiem w procesie neurodegeneracji. Wolne rodniki zmniejszają integralność bariery krew - mózg, czyniąc ją bardziej przepuszczalną [2, 21]. Stresem oksydacyjnym nazywamy brak równowagi między powstawaniem reaktywnych form, zwanych wolnymi rodnikami, tlenu (ROS) oraz azotu (RNS), a wewnątrzkomórkową zdolnością do ich usuwania tj. obniżeniem poziomu przeciwutleniaczy lub zaburzeniami w mechanizmach wyłapywania wolnych rodników. Wolne rodniki to molekuły lub fragmenty molekuł zawierające jeden lub więcej niesparowanych elektronów na orbitach. Najważniejszą klasą wolnych rodników powstających w środowisku żywych organizmów są te zawierające nadtlenny anion $O_2^{\cdot-}$, grupę hydroksylową ($OH^{\cdot}$) lub nadtlenek wodoru (H_2O_2). Stres oksydacyjny prowadzi do uszkodzeń DNA, lipidów, węglowodanów i protein w komórkach. Komórki nerwowe są znacznie bardziej podatne na uszkodzenia niż inne komórki organizmu [21, 29-31]. W stanie balansu oksydacyjno-redukcyjnego wzrost poziomu wolnych rodników wzmacnia transkrypcję i syntezę endogennych związków o właściwościach antyoksydacyjnych. Mechanizm ten utrzymuje równowagę oksydacyjno-redukcyjną w organizmie i pełni funkcję cytoprotekcyjną. W takim stanie fizjologicznego balansu wolne rodniki i reaktywne formy tlenu uczestniczą w różnych szlakach wewnątrzkomórkowego metabolizmu i utrzymaniu homeostazy. W przypadku długotrwałego zaburzenia balansu „redox” szlaki metaboliczne komórki ulegają deregulacji. Nasilają się procesy fosforylacji, przy jednoczesnym spadku aktywności enzymów defosforylujących. Komórki organizmu w takim stanie mogą przestawić się na cykl „złośliwy”, nasila się synteza czynników prozapalnych i rozwój stanu zapalnego [21]. Poziom rodników tlenowych w układzie nerwowym regulowany jest m.in. przez neuroglobinę. Neuroglobina (Ngb) jest białkiem ulegającym ekspresji w obrębie układu nerwowego, biorącym udział w utrzymaniu homeostazy „redox”, wykazując przy tym działanie neuroprotektoryjne. Nadekspresja Ngb przekłada się na zwiększoną ochronę komórek przed apoptozą, indukowaną stresem oksydacyjnym, zmniejszeniu ulega również poziom powstającego $A\beta(1-40)$ i $A\beta(1-42)$. Poziom Ngb spada wraz z wiekiem w mózgu co może mieć wpływ na postępującą z wiekiem neurodegenerację [31].

W wyniku uszkodzenia mitochondriów komórek nerwowych i spadku aktywności mitochondrialnych kompleksów enzymatycznych obniżeniu ulega poziom metabolizmu w ośrodkowym układzie nerwowym. Uszkodzenia mitochondrialne powodują dysfunkcje w łańcuchu oddechowym. Skutkiem spadku wydajności produkcji energii w łańcuchu oddechowym jest wzrost uwalniania reaktywnych form tlenu, zaburzeniu ulega transport aksonalny zależny od energii i homeostaza gospodarki wapniowej [10, 32].

Wykazano również, że na zwiększone ryzyko rozwoju choroby Alzheimera mają wpływ m.in. niska aktywność fizyczna i umysłowa, nadciśnienie, hipercholesterolemia, cukrzyca, narażenie na neurotoksyny (np. nitrozoaminy), przebyte infekcje (wirus HSV-1, wirus HIV, chlamydia), urazy głowy, depresja, menopauza, stres oksydacyjny, mutacje genowe. Przypuszcza się, że znaczne zanieczyszczenie powietrza prowadzi do przewlekłego uszkodzenia nabłonka i śródbłonka układu oddechowego. Skutkuje to rozwojem przewlekłego systemowego stanu zapalnego, również w obrębie ośrodkowego układu nerwowego co może mieć znaczenie w rozwoju choroby Alzheimera. Powyższe czynniki określa się mianem czynników modyfikowalnych, których ograniczenie lub wyeliminowanie może mieć wpływ na potencjalne wystąpienie choroby (w odróżnieniu do czynników niemodyfikowalnych, np. mutacji genowych). Ocenia się, że czynniki modyfikowalne odpowiadają za około 35% przypadków podwyższonego ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera, a prewencyjne ich ograniczenie może skutkować redukcją o 1/3 przypadków zachorowań [1,2,5,6,9,32,33].

Nie stwierdzono dotychczas, który z tych czynników i procesów patofizjologicznych jest najważniejszy oraz ma inicjujący wpływ na rozwój choroby [6]. u chorych występują one równocześnie i dopełniają się w procesie chorobowym. Powodem 90-95% przypadków wystąpienia choroby Alzheimera jest nałożenie się wielu czynników ryzyka jednocześnie [15]. Badania z wykorzystaniem autopsji mózgu osób, u których stwierdzono kliniczne objawy choroby Alzheimera, wykazały, że nawet w ok. 30% przypadków brak jest charakterystycznych dla tej choroby zmian patologicznych w obrębie mózgu. Obserwacje te mogą wskazywać, że inne schorzenia mogą dawać objawy podobne do choroby Alzheimera [19].

2 HIPOTEZY ROZWOJU CHOROBY ALZHEIMERA

Na podstawie dotychczas poznanych czynników ryzyka choroby Alzheimera oraz procesów, składających się na jej patofizjologię, powstały trzy hipotezy rozwoju tej choroby. Oparto na nich aktualnie przyjęte metody leczenia choroby. Leki stosowane obecnie oraz poszukiwane nowe związki o działaniu leczniczym wykazują mechanizmy działania w dużej mierze dostosowane do ogólnie przyjętych hipotez rozwoju choroby [1, 2, 4, 5, 8, 15, 20].

2.1 Hipoteza cholinergiczna - zaburzenia neurotransmisji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego

Wśród hipotez dotyczących rozwoju choroby Alzheimera hipoteza cholinergiczna jest najstarsza, szeroko akceptowana oraz klinicznie potwierdzona. Nasilające się upośledzenie pamięci, mowy oraz nauki, nazywane upośledzeniem zdolności poznawczych, towarzyszące rozwijającej się chorobie Alzheimera jest konsekwencją znacznego spadku poziomu neurotransmiterów w mózgu oraz postępującej neurodegeneracji [1, 2, 4, 8].

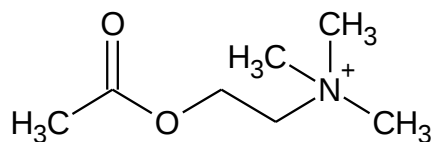
Neurodegeneracją określa się postępujący i nieuleczalny proces polegający na utracie komórek nerwowych (neuronów), dysregulacji metabolizmu i funkcji neuronów, zaburzeń dystrybucji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego oraz ogólnej dysfunkcji tego układu. W przypadku choroby Alzheimera proces neurodegeneracji dotyczy głównie takich obszarów mózgu jak jądra podstawne przodomózgowia, kora mózgowa (zwłaszcza w obrębie kory nowej), miejsce sinawe (jądro pnia mózgu), grzbietowe jądra szwu, hipokamp. Szczególne znaczenie w przypadku opisywanej choroby ma spadek poziomu i aktywności acetylocholino (**Ryc. 1 s. 20**), dysfunkcja cholinergicznych receptorów presynaptycznych, nadaktywność acetylocholinoesterazy (układ cholinergiczny) oraz zaburzenia poziomu glutaminianu (**Ryc. 2 s. 20**) (układ glutaminergiczny). Badania pośmiertne mózgów osób cierpiących na chorobę Alzheimera wykazały spadek poziomu acetylocholino (ACh) w powyższych strukturach mózgu, choliny oraz transferazy acetylocholino (ChAT) – enzymu biorącego udział w syntezie acetylocholino [8, 32, 34].

Acetylocholina (ACh) bierze udział w przewodzeniu impulsów nerwowych w połączeniach synaptycznych między neuronami (układ cholinergiczny

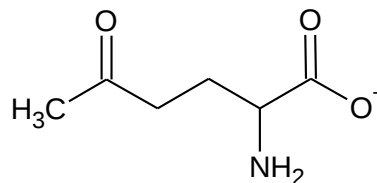
w ośrodkowym układzie nerwowym) oraz w połączeniach nerwowo-mięśniowych. Impuls elektryczny po dotarciu to zakończenia aksonu wywołuje depolaryzację błony presynaptycznej, w której umieszczone są pęcherzyki z neuroprzekaźnikiem (np. acetylocholiną). Depolaryzacja błony presynaptycznej powoduje uwolnienie acetylocholiny do szczeliny synaptycznej, a jej kontakt z błoną postsynaptyczną (acetylocholina łączy się z receptorami na błonie postsynaptycznej), powoduje jej polaryzację (napływ jonów K^+ do wnętrza komórki) i wytworzenie impulsu nerwowego, który przemieszcza się wzdłuż następnego neuronu [38, 42]. Neuroprzekaźnik ten odgrywa ważną rolę w procesie nauki, koncentracji, pamięci oraz motywacji. Acetylocholina aktywuje jonotropowe receptory nikotynowe (nAChRs) będące ligandem kontrolującym przepływ w kanale jonowym, oraz metabotropowe receptory muskarynowe (mAChRs). Receptory mAChRs należą do dużej grupy receptorów sprzężonych z białkiem-G (GPCR). Wśród receptorów muskarynowych (mAChRs) wyróżniamy 5 podtypów (M1, M2, M3, M4, M5) występujących np. w sercu, mózgu, oku, układzie trawiennym i układzie moczowym. Podtyp M1 obecny jest głównie w mózgu (hipokamp, kora czołowa) i odgrywa ważną rolę w procesach poznawczych oraz pamięci. Zaobserwowano, że w przebiegu choroby Alzheimera struktura i ilość receptorów muskarynowych w mózgu nie ulegają zmianie dlatego, też tworzenie wysoce selektywnych związków będących agonistami receptorów M1, może być obiecującą strategią poszukiwania nowych leków na tę chorobę. Dotychczas badane związki (agoniści receptorów M1) wykazywały również hamujący wpływ na tworzenie się depozytów amyloidu- β , poprzez przestawienie syntezy białka prekursora amyloidu (APP) na szlak nieamyloidogenny, w wyniku aktywacji enzymów tego szlaku tj. kinazy - C i dezintegryn. Poprzez aktywację kinazy-C oraz zwiększenie wewnątrzkomórkowej aktywności α -sekreazy, zwiększeniu ulega poziom sAPP a spada poziom amyloidu- β . Agoniści receptorów M1 wykazują również działanie inhibicyjne wobec syntazy glikogenu kinazy-3b (GSK-3b) biorącej udział w procesie hiperfosforylacji białka tau. Receptory cholinergiczne nikotynowe (nAChRs) są białkami transbłonowymi pełniącymi funkcję kanałów jonowych. Składają się z pięciu podjednostek otaczających hydrofilowy kanał. Wyróżnia się dwa rodzaje podjednostek – α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) i β ($\beta 2$ - $\beta 4$). Najczęściej występujące receptory w mózgu ssaków (w tym ludzi) składają się z podjednostek: $\alpha 4$, $\alpha 7$ i $\beta 2$ [34, 35, 36]. Receptory nikotynowe pośredniczą w przepływie jonów potasowych, sodowych oraz

wapniowych. Ze względu na kombinacje podjednostek α i β , wyróżniamy różne podtypy receptorów nikotynowych o odmiennych właściwościach i umiejscowieniu w obrębie mózgu. Receptory te odgrywają istotną rolę w ochronie komórek nerwowych poprzez oddziaływanie poszczególnych podjednostek receptora z peptydami amyloidu- β . Zastosowanie agonistów receptorów nAChRs, powoduje poprawę zdolności nauki, pamięci i koncentracji w badaniach na zwierzętach oraz u ludzi. Receptory nAChRs posiadające w swojej budowie podjednostkę $\alpha 7$ działają neuroprotekcynie, chroniąc komórki nerwowe przed toksycznym działaniem amyloidu- β [6, 8, 32]. Receptory cholinergiczne wykazują działanie neuroprotekcyjne związane z modulacją komórek układu odpornościowego, poprzez przeciwzapalny szlak cholinergiczny. Mechanizm inhibicji uwalniania cytokin jest związany z działaniem acetylocholiny (ACh) na nerw błędny. Poza tym makrofagi i inne komórki układu odpornościowego posiadają receptory acetylocholinowe (AChRs), które są zdolne do hamowania wewnątrzkomórkowej syntezy cytokin [34, 36].

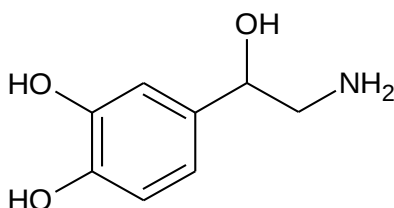
Prawidłowy poziom acetylocholiny i glutaminianu w ośrodkowym układzie nerwowym oraz dodatkowo noradrenaliny (**Ryc. 3 s. 20**) i serotoniny (**Ryc. 4 s. 20**), jest niezbędny do jego funkcjonowania bez zaburzeń procesów pamięci, nauki i mowy. Glutaminian to główny neuroprzekaźnik w ośrodkowym układzie nerwowym, odpowiedzialny za emocje, naukę i pamięć. Stymuluje szacunkowo ok. 70% wszystkich synaps biorących udział w procesach emocjonalnych, Aktywowane przez glutaminian receptory NMDA biorą udział w plastyczności neuronów oraz odgrywają ważną rolę w procesie nauki oraz pamięci. Patologiczna aktywacja powyższych receptorów prawdopodobnie odgrywa znaczącą rolę w rozwoju demencji. Zaburzenia w funkcjonowaniu układu glutaminergicznego skutkują nasileniem stresu oksydacyjnego oraz aktywacją apoptozy komórek. Glutaminian jest jednym z czynników aktywujących receptory NMDA, transportujące kationy Na^+ , K^+ , Ca^{2+} przez błonę komórkową neuronów. Utrzymanie prawidłowego stężenia glutaminianu w przestrzeni międzykomórkowej ośrodkowego układu nerwowego jest jedną z fizjologicznych funkcji astrocytów. Zaburzenie prawidłowego poziomu tego neurotransmitera prowadzi m.in. do depolaryzacji komórek nerwowych, poprzez gwałtowny napływ wapnia do ich wnętrza, uszkodzenia komórek i ich śmierci. Z obumarłych komórek dodatkowo uwalnia się glutaminian, który nasila efekt cytostatyczny i postępującą neurodegenerację [8, 34].



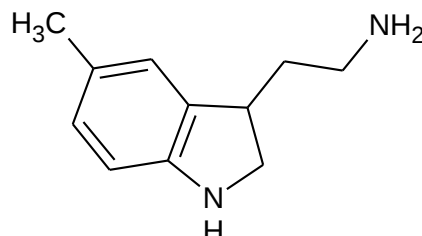
Ryc. 1. Acetylocholina



Ryc. 2. Glutaminian

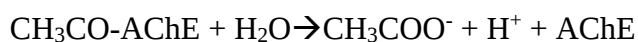
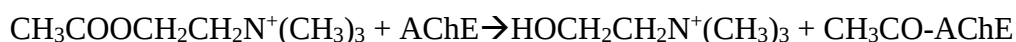


Ryc. 3. Noradrenalina



Ryc. 4. Serotonina

Acetylocholina jest neurotransmiterem odgrywającym kluczową rolę w procesach poznawczych. Poziom acetylocholino w synapsach regulowany jest przez enzymy zwane cholinoesterazami. W warunkach fizjologicznie prawidłowych największy udział w regulacji poziomu ACh ma acetylocholinoesteraza (AChE). Enzym ten jest proteazą serynową (grupa enzymów – hydrolazy serynowe, rodzina – esterazy/lipazy). Katalizuje ona hydrolizę acetylocholino do choliny i kwasu octowego. Proces ten, przedstawiony na poniższym **Schemacie 1**, zachodzi dwuetapowo. AChE pod wpływem ACh ulega acetylowaniu (przyłączeniu grupy $\text{CH}_3\text{CO}-$) w wyniku czego z acetylocholino powstaje cząsteczka choliny. W dalszej kolejności acetylowany enzym reaguje z cząsteczką wody w wyniku czego powstaje cząsteczka wolnego enzymu i cząsteczka kwasu octowego. Innym enzymem regulującym poziom ACh jest butyrylocholinoesteraza (BuChE). Oba enzymy – AChE i BuChE – są w 65% homologiczne pod względem sekwencji aminokwasów, z których są zbudowane, pomimo, że kodowane są przez dwa różne geny. Na chromosomie 7 znajduje się gen, którego wynikiem ekspresji jest powstawanie acetylocholinoesterazy, zaś na chromosomie 3 znajduje się gen kodujący butyrylocholinoesterazę [8, 37, 39].



Schemat 1. Reakcja hydrolizy acetylocholino do choliny i kwasu octowego przy udziale enzymu acetylocholinoesterazy [37-39].

Acetylocholinoesteraza (AChE) jest białkiem zbudowanym z 537 aminokwasów. Obecna jest głównie w synapsach nerwowo-mięśniowych oraz erytrocytach, w mózgu obecność jej jest największa w takich strukturach jak substancja szara, mózdzek, jądro ogoniaste oraz hipokamp. Butyrylocholinoesteraza (BuChE) znajduje się w ośrodkowym układzie nerwowym, osoczu, wątrobie i płucach. BuChE podobnie jak AChE katalizuje hydrolizę acetylocholiny do choline i kwasu octowego. Hydroliza acetylocholiny zachodzi szybciej pod wpływem acetylocholinoesterazy niż pod wpływem butyrylocholinoesterazy. U osób zdrowych aktywność AChE pokrywa około 80% aktywności cholinoesteraz, zaś BuChE przypada około 20%. U pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera, Dochodzi do zaburzenia równowagi między poziomem AChE i BuChE. Aktywność pierwszego enzymu znacznie spada (o 85%) na rzecz wzrostu aktywności drugiego. Acetylocholinoesteraza jest wysoce skutecznym katalizatorem reakcji hydrolizy acetylocholiny mogącym katalizować hydrolizę 10000 cząsteczek acetylocholiny na sekundę (niektóre źródła podają ilość 14000 cząsteczek). Szybkość przebiegu reakcji limitowana jest wyłącznie stężeniem substratu oraz szybkością wiązania acetylocholiny z enzymem [8, 40].

Dotychczas rozróżniono dwa rodzaje cząsteczek ludzkiej acetylocholinoesterazy – hAChE-R i hAChE-S. Występowanie tych dwóch form jest wynikiem alternatywnych szlaków ich powstawania. Forma enzymu powstaje w wyniku udziału w procesie translacji odpowiedniej dla hAChE-R lub hAChE-S matrycy mRNA oraz różnych promotorów z wydłużonym N-terminalnym końcem – N-AChE-R lub N - AChE-S. Forma hAChE-R jest postacią rozpuszczalną występującą w szczelinie synaptycznej. Cząsteczka ta nie posiada w swojej budowie C-terminalnego fragmentu z aminokwasem cysteiną, przez co nie łączy się z postsynaptyczną błoną komórki nerwowej i bierze udział w hydrolizie acetylocholiny w obrębie szczeliny synaptycznej. Forma synaptyczna hAChE-S posiadająca C-terminalny fragment, który nadaje jej właściwości amfifilowe, łączy się z receptorami w błonie postsynaptycznej, gdzie bierze udział w hydrolizie acetylocholiny uczestnicząc w procesie przewodzenia impulsów nerwowych [41, 42].

Hipoteza cholinergiczna rozwoju choroby Alzheimera zakłada, że niski poziom acetylocholiny przy dodatkowym zaburzeniu balansu stężenia i aktywności cholinoesteraz prowadzi do osłabienia komunikacji między komórkami nerwowymi

i pogorszenia zdolności poznawczych oraz demencji. U pacjentów z chorobą Alzheimera obserwowany jest znaczne zaburzenie przewodnictwa cholinergicznego i zanik neuronów cholinergiczych w obrębie kory mózgowej, hipokampa oraz części podstawnej kresomózgowia. Zastosowanie w terapii leków będących inhibitorami cholinoesteraz, zwłaszcza AChE, skutkuje zwiększeniem poziomu ACh w połączeniach synaptycznych i złagodzeniem objawów choroby. Do stworzenia skutecznych inhibitorów cholinoesteraz niezbędne było poznanie struktury enzymu. Po raz pierwszy krystaliczną strukturę acetylocholinoesterazy opisano w 1991r. Badania wykazały, że zarówno AChE jak i BuChE wykazują wysoką konserwatywność budowy. Oznacza to, że cholinoesterazy zarówno występujące w organizmie ludzkim jak i w organizmach innych ssaków (gryzonie, bydło) oraz kręgowców niższych (ryby) wykazują wysokie podobieństwo budowy (sekwencji aminokwasów). Fakt ten znacznie ułatwia badania aktywności poszukiwanych, nowo syntezowanych związków i określania ich potencjału do zastosowania jako leków. Wyniki badań przeprowadzonych z zastosowaniem AChE pochodzenia zwierzęcego ze względu na wysoką konserwatywność enzymu, można z bardzo wysokim prawdopodobieństwem interpretować równoważnie, jak gdyby zostały wykonane z użyciem ludzkiej AChE (hAChE). Badania struktury enzymu oraz aktywności potencjalnych inhibitorów mogą być wykonywane z wykorzystaniem AChE pochodzącej np. od Drętwy kalifornijskiej (*Tetronarce californica*) (TcAChE) lub Strętwy (*Electrophorus electricus*) (EeAChE) [8, 37, 43].

Najbardziej istotną częścią acetylocholinoesterazy jest głęboka (20Å głębokości) i wąska (5Å szerokości) szczelina rozciągająca się od powierzchni w głąb jej cząsteczki. Szczelina stanowi miejsce wiązania enzymu z ligandem, którego hydrolizę enzym katalizuje lub powodującego inhibicję enzymu. w obrębie szczeliny wyróżniamy kilka istotnych obszarów (domen):

- peryferyjne miejsce anionowe (ang. peripheral anionic site, PAS),
- miejsce aktywne katalitycznie (ang. catalytic active site, CAS),
- kieszeń (otwór) oksyanionowa (ang. oxyanion hole, OH),
- kieszeń wiążąca grupy acylowe (ang. acyl-binding pocket, ABP),
- miejsce anionowe (ang anionic site, AS) [37, 39, 43-45].

Powierzchnia szczeliny w AChE zawiera w swojej strukturze 14 reszt aromatycznych następujących aminokwasów: Tyr70, Trp84, Trp120, Tyr121, Tyr130, Trp233, Trp279, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331, Tyr334, Trp432, Tyr442. Charakterystycznym elementem szczeliny enzymu jest występujące w niej zwężenie (wąskie gardło) utworzone przez dwa aminokwasy – tyrozynę (Tyr121) oraz fenyloalaninę (Phe330). Światło szczeliny ma tak małą średnicę, że przejść przez nią mogłyby jedynie cząsteczki nie większe od pojedynczej cząsteczki wody. Szczelina w miejscu zwężenia zachowuje wysoką elastyczność, dzięki możliwym zmianom konformacyjnym – jest rozciągliwa, w przeciwnym razie substraty, z którymi enzym się wiąże nie miałyby dostępu do miejsca aktywnego. Ogólny rozkład ładunków nadaje szczelinie charakter dipola na całej jej długości. Zarówno dipol jak i grupy aromatyczne oddziałują elektrostatycznie z dodatnio naładowanymi fragmentami cząsteczkami ligandu kierując je wzdłuż szczeliny w stronę miejsca aktywnego. W cząsteczce acetylocholino dodatni ładunek znajduje się na atomie azotu w czwartorzędowej grupie amonowej. Pomiedzy grupami aromatycznymi, szczególne znaczenie mają w tym przypadku cząsteczki tryptofanu, a dodatnio naładowanym atomem azotu powstają oddziaływania kation- π , dzięki którym cząsteczka acetylocholino kierowana jest w dół szczeliny w kierunku triady katalitycznej, złożonej z trzech aminokwasów (Glu-His-Ser). Dodatkowo między grupą karbonylową w cząsteczce acetylocholino a cząsteczkami tyrozyny na powierzchni szczeliny powstają słabe wiązania wodorowe. W strukturze acetylocholinoesterazy zawarta jest duża ilość cząsteczek wody. Zawartość wody w strukturze opisywanego enzymu jest dwukrotnie większa niż w większości białek globularnych. Prawdopodobnie cząsteczki wody, obecne również w szczelinie enzymu, pełniąc rolę „smaru” ułatwiają przechodzenie substratu przez szczelinę od jej wejścia, następnie do miejsca aktywnego, na wyjściu ze szczeliny kończąc. Dodatkowo cząsteczki wody wpływają na zwiększenie elastyczności szczeliny oraz mogą tymczasowo uzupełniać ubytki w strukturze enzymu [8, 39, 45, 46].

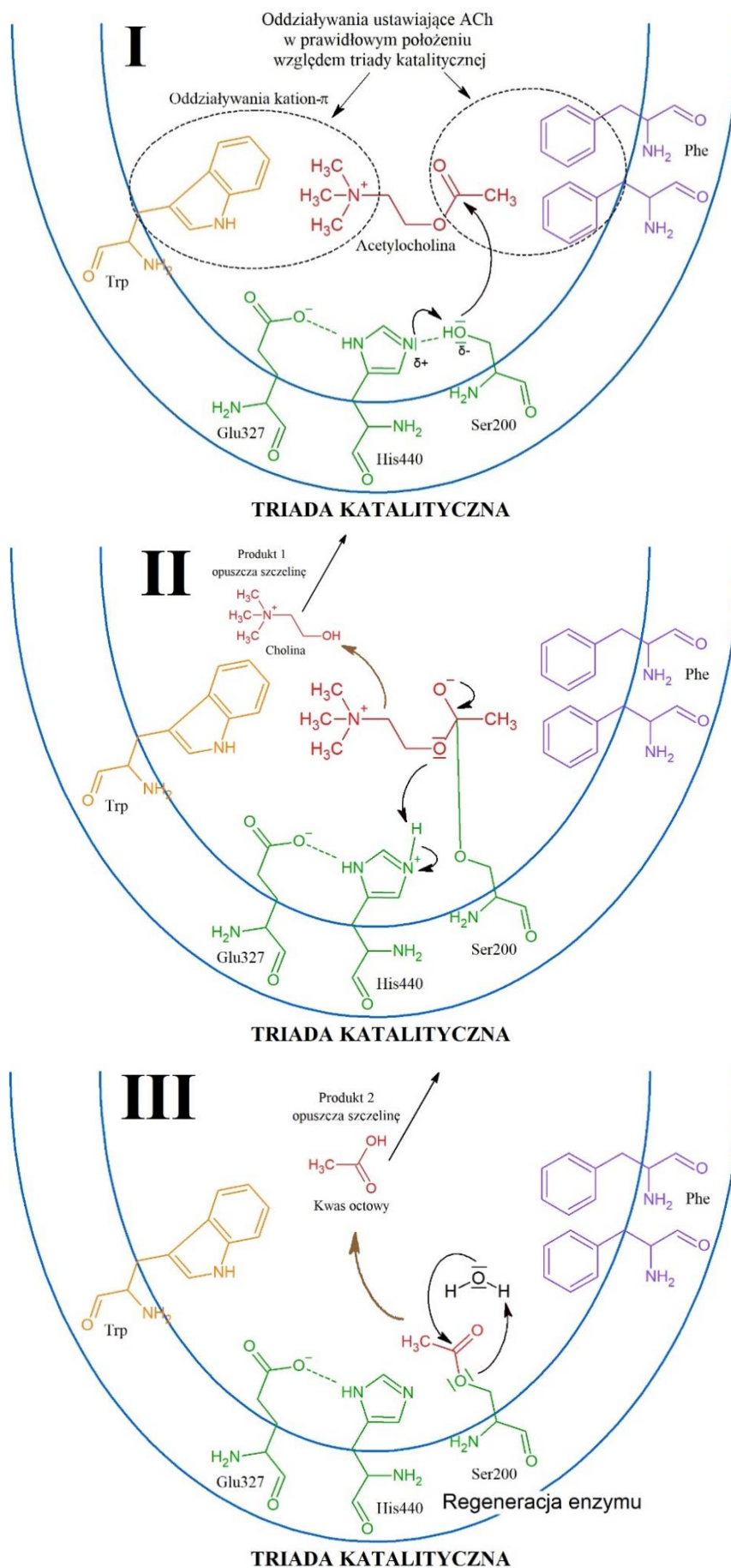
Peryferyjne miejsce anionowe (PAS) znajduje się blisko „wejścia” do szczeliny. W skład tego fragmentu szczeliny wchodzi m.in. reszty aminokwasów tyrozyny (Tyr124, Tyr337) oraz tryptofanu (Trp286), których zadaniem jest przyciąganie i wiązanie dodatnio naładowanych grup w cząsteczce substratu (w ACh IV-rzędowy atom azotu) oraz kierowanie ich w głąb szczeliny. Cząsteczka tryptofanu (Trp286) odpowiada m.in. za wiązanie z ugrupowaniami lipofilowymi w cząsteczkach

substratu. Związki wykazujące możliwość jednoczesnego wiązania zarówno z triadą katalityczną w CAS, jak i wyżej wymienionymi aminokwasami w obrębie PAS, charakteryzują się wysokim potencjałem inhibicyjnym wobec AChE. Peryferyjne miejsce anionowe w AChE bierze udział w formowaniu złogów amyloidu- β indukowanym przez enzym. Peptydy amyloidowe wiążą się z acetylocholinoesterazą w PAS, tworząc z enzymem stabilne kompleksy co znacznie ułatwia akumulację oraz formowanie toksycznych blaszek [7, 44, 46].

Miejsce aktywne katalitycznie (CAS) usytuowane jest blisko dna szczeliny enzymu. Ta część enzymu odpowiada za hydrolizę acetylocholiny. Podobnie jak w trakcie przechodzenia substratu przez szczelinę, za optymalne ułożenie hydrolizowanej cząsteczki odpowiadają jej oddziaływania z grupami aromatycznymi. Najważniejszą rolę w tym przypadku odgrywa cząsteczka tryptofanu, która tworzy wiązania kation- π z czwartorzędowym atomem azotu w acetylocholiny. Podstawa szczeliny zawiera fragment, nazwany kieszenią acylową, zawierający grupy aromatyczne z aminokwasu fenyloalaniny (Phe295, Phe297), które dodatkowo wpływają na prawidłowe ułożenie acetylocholiny, poprzez wiązanie z fragmentem acetylowym jej cząsteczki. W budowie CAS wyróżniamy trzy aminokwasy bezpośrednio zaangażowane w katalityczną hydrolizę substratu. Struktura ta nazwana triadą katalityczną składa się z seryny (Ser200), histydyny (His440) oraz kwasu glutaminowego (Glu327) [7, 39, 42, 44]. Cząsteczki histydyny i kwasu glutaminowego są dawcami elektronów dla seryny co zwiększa jej reaktywność. W grupie karbonylowej cząsteczki acetylocholiny dochodzi do rozerwania podwójnego wiązania między atomami węgla i tlenu, a cząsteczka seryny z acetylocholiny tworzą wiązanie kowalencyjne. W wyniku tej reakcji powstaje produkt pośredni z ujemnie naładowanym atomem tlenu (oksyanion). Anion tlenowy oddziałuje z grupami amidowymi, wchodzącymi w skład kieszeni (otworu) oksyanionowej, co powoduje jego stabilizację. W cząsteczce acetylocholiny ulega rozerwaniu wiązanie pomiędzy choliną a grupą acylową, w wyniku czego uwalnia się cząsteczka choliny a w cząsteczce AChE powstaje acetyloseryna – tworzy się przejściowa forma $\text{CH}_3\text{CO-AChE}$. Następnie wiązanie między grupą acylową i seryną ulega hydrolizie pod wpływem cząsteczki wody i powstaje cząsteczka kwasu octowego, a enzym ulega regeneracji. Proces katalitycznej hydrolizy acetylocholiny w AChE przedstawiono na **Schemacie 2 s. 26** [8, 38, 50, 51].

Butyrylocholinoesteraza (BuChE) jest enzymem wykazującym znaczne podobieństwo budowy oraz właściwości katalitycznych do acetylocholinoesterazy. BuChE tak jak AChE wykazuje dużą konserwatywność, a przykładem tego jest fakt, że wołowa butyrylocholinoesteraza jest w 90% homologiczna do występującej w organizmie ludzkim. Zaobserwowane różnice w budowie między AChE oraz BuChE, mają główny wpływ na różnice w możliwościach katalitycznych obu enzymów – odmienne preferencje substratowe. W cząsteczce BuChE, również obecna jest szczelina, będąca miejscem wiązania substratu, jednakże w stosunku do AChE, sześć z czternastu aminokwasów aromatycznych wchodzących w skład jej struktury zastąpione jest przez aminokwasy alifatyczne lub o charakterze polarnym. PAS w cząsteczce BuChE nie posiada fragmentu zbudowanego z ugrupowań aromatycznych – Tyr72, Tyr124 i Trp286. Występujące w AChE mają swoje odpowiedniki w postaci alifatycznych aminokwasów Asn68 (aspargina), Gln119 (glutamina) i Ala277 (alanina) w cząsteczce BuChE. W szczelinie enzymu nie występuje zwężenie („wąskie gardło”). Kieszeń wiążąca reszty acylowe jest większa niż w cząsteczce AChE, ponieważ składa się z aminokwasów o mniejszych cząsteczkach, leucyny (Leu286) i waliny (Val288). Większa wolna przestrzeń w tym fragmencie cząsteczki enzymu pozwala na wiązanie substratu z dłuższym łańcuchem acylowym. Triada katalityczna składa się z seryny (Ser198), kwasu glutaminowego (Glu325) i histydyny (His438) [47].

Badania wykazały, że w przeciwieństwie do hAChE-R, forma synaptyczna acetylocholinoesterazy może indukować powstawanie złogów i blaszek amyloidu- β . Odpowiedzialny jest za to C-terminalny fragment, który jest w pewnym stopniu homologiczny do peptydów amyloidowych. Badania wskazują, że cząsteczki A β wiążą się z enzymem w obrębie peryferyjnego miejsca anionowego (PAS). Cząsteczka hAChE-S łączy się z peptydami A β , tworzy stabilne kompleksy A β -hAChE-S, co znacznie wzmacnia fibrylizację A β , jego toksyczność oraz dalsze formowanie neurotoksycznych złogów i blaszek. Nie bez znaczenia wydaje się być struktura β -kartki lub α -helisy cząsteczki hAChE-S. Cząsteczki enzymu posiadające strukturę β -kartki wykazują znacznie wyższe powinowactwo do łączenia z peptydami A β , które również przyjmują taką strukturę, w rezultacie czego łatwiej tworzą się stabilne kompleksy enzymu z amyloidem- β . Zastosowanie inhibitorów wiążących enzym w PAS lub przeciwciał monoklonalnych może skutecznie hamować ten proces [41, 48, 49].



Schemat 2. Proces hydrolizy cząsteczki acetylocholiny z udziałem katalizatora – acetylocholinoesterazy (AChE) [38, 50, 51].

2.2 Hipoteza amyloidowa - tworzenie neurotoksycznego amyloidu- β

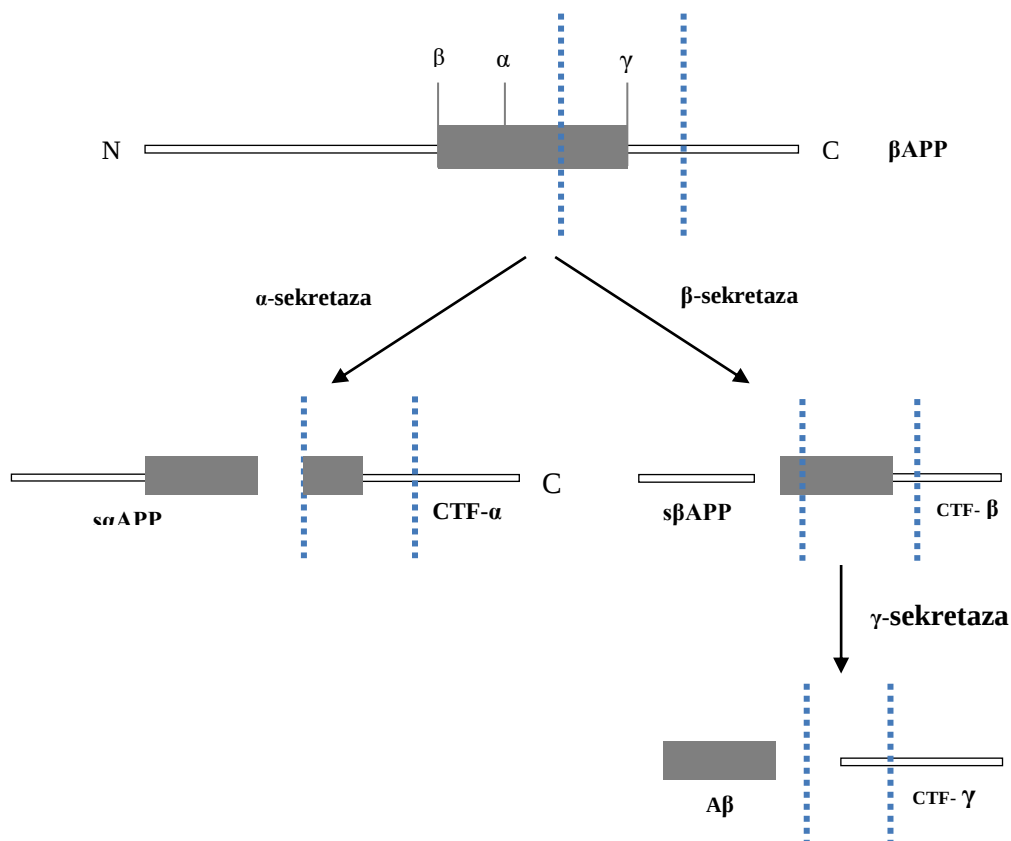
W ośrodkowym układzie nerwowym u osób cierpiących na chorobę Alzheimera zaobserwowano odkładanie się złogów (w postaci blaszek) nierozpuszczalnej formy amyloidu- β ($A\beta$). Blaszkki stanowią struktury zewnątrzkomórkowe zbudowane z centralnego rdzenia, tworzonego przez sploty (fibryle) amyloidowe o długości 5-10nm i uszkodzone neuryty. Fibryle te są tworzone przez cząsteczki amyloidu- β zbudowane z 39-42 aminokwasów. Rdzeń otoczony jest przez aktywowane komórki mikrogleju. Zewnętrzną część blaszki stanowią reaktywne astrocyty. W strukturze blaszek zaobserwowano również wiele czynników związanych z układem immunologicznym. Należą do nich immunoglobuliny, składniki układu dopełniacza (C1q, C3b, C3a), cytokiny (IL-1 β , IL-6, TNF α , TGF β), białka ostrej fazy (α 2-makroglobulina, α 1- antychymotrypsyna). Obecność tych czynników sugeruje, że formowanie się złogów amyloidu w postaci opisywanych blaszek wywołuje reakcję ze strony układu immunologicznego, ale również wykazano, że paradoksalnie powyższe czynniki utrwalają strukturę depozytów amyloidowych, gdyż pod ich wpływem rdzeń blaszki wiąże się z aktywowanymi komórkami mikrogleju i reaktywnymi astrocytami [12, 15, 20]. Wyodrębniono dwie formy zewnątrzkomórkowych blaszek amyloidu- β – neuryticzną oraz rozproszoną. Blaszkki neuryticzne mają strukturę krystaliczną i są powiązane z uszkodzonymi neuronami (dendrytami). W przypadku tej formy zaobserwowano w rdzeniu dużą ilość komórek mikrogleju, zaś na peryferiach astrocytów, co sugeruje udział tej formy w tworzeniu stanu zapalnego. Blaszkki rozproszone występują głównie u osób w wieku podeszłym i formy tej nie wiąże się z procesem neurodegeneracji [52, 53].

Amyloid- β jest peptydem o różnej długości łańcucha aminokwasowego. Szczególne znaczenie w rozwoju choroby Alzheimera mają dwie formy $A\beta$ o łańcuchu złożonym z 40 oraz 42 aminokwasów ($A\beta$ 1-40 oraz $A\beta$ 1-42), a właściwie zaburzenia proporcji ich powstawania oraz usuwania w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Amyloid- β powstaje z białkowego prekursora amyloidu (β APP), w wyniku działania na niego enzymów z grupy sekretaz. β APP powstaje w wyniku ekspresji genu zlokalizowanego na chromosomie 21, dlatego też zauważalny jest znaczny wzrost ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera u osób z zespołem Downa (trisomia chromosomu 21) oraz w przypadku mutacji samego genu [4, 5, 54].

Powstające w jądrze komórkowym cząsteczki β APP, będące proteiną błonową, transportowane są ku błonie komórkowej, którą częściowo przenikają do przestrzeni międzykomórkowej – N-terminalnym końcem - i na jej powierzchni ulegają rozcinaniu enzymatycznemu. Koniec C-terminalny cząsteczki β APP znajduje się w obrębie cytozolu komórki. Wyodrębniono dwa szlaki metaboliczne, w których β APP poddawany jest działaniu różnych sekretaz. W pierwszym etapie szlaku, nazwanego amyloidogennym, cząsteczka β APP pod wpływem β -sekreazy (BACE, odcina koniec aminowy, N- terminalny, w łańcuchu peptydowym) ulega proteolizie i powstaje z niej cząsteczka s β APP oraz C-terminalny fragment β (CTF- β). Wyróżniamy dwa rodzaje β -sekreazy będące homologami – BACE 1 oraz BACE 2. W procesie powstawania A β główną rolę odgrywa BACE 1 [4, 6, 52, 54-56]. W drugim etapie szlaku amyloidogennego główną rolę odgrywa γ -sekreaza. Nie jest to pojedyncza cząsteczka a transmembranowy kompleks enzymów złożony z czterech podjednostek takich jak: presenilina 1 lub 2 (PS - 1, PS-2), nikastryna, A β H-1 i PEN-2. Kompleks ten rozcina cząsteczkę CTF- β uwalniając cząsteczkę A β oraz peptyd sygnałowy CTF- γ . Szlaki metabolizmu cząsteczki β APP przedstawiono na **Schemacie 3 s. 29**. Enzym γ -sekreaza rozcina cząsteczkę CTF- β w różnych miejscach, w efekcie czego powstają cząsteczki A β o różnej długości, które są uwalniane z komórki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Długość łańcucha może wynosić od 38 do 42 aminokwasów, jednakże najczęściej powstaje łańcuchów peptydowych o długości 40 oraz 42 aminokwasów. Monomery A β łączą się w oligomery, które następnie tworzą większe protofibryle, a ostatecznie fibryle i blaszki. Amyloid- β 1-42 wykazuje znacznie większą tendencję do formowania agregatów i złogów niż amyloid- β 1-40, jest od niego również bardziej neurotoksyczny. Wykazano również powstawanie peptydów A β 2-42 i A β 3-42, jako produktów degradacji białka β APP. Dotychczas nie udało się określić jaką fizjologiczną funkcję pełnią zarówno cząsteczki β APP, jak i peptydy będące produktami jego degradacji tj. amyloid- β [4, 10, 57]. Odkładające się w przestrzeniach międzykomórkowych w pobliżu neuronów złogi β - amyloidu ulegają opsonizacji, nasilają stres oksydacyjny (powstają reaktywne formy tlenu oraz azotu), aktywują komórki mikrogleju, białka ostrej fazy oraz kompleks układu dopełniacza, w nadmiarze powstaje glutaminian. Komórki mikrogleju gromadzą się wokół złogów A β i przeprowadzają fagocytozę. Dochodzi do rozwoju stanu zapalnego oraz uszkodzenia komórek nerwowych i neurodegeneracji. Amyloid- β w badaniach *in vitro* wykazuje

toksyczność wobec różnych rodzajów komórek, nie tylko nerwowych. Obserwacje wykazały, że mózg osób starszych wykazuje większą odporność na A β niż u osób młodych, u których mniejsza ilość złogów A β powoduje znacznie większe uszkodzenia [11, 15, 20, 52, 54, 58].

W przypadku metabolizmu cząsteczki β APP na szlaku nieamyloidogennym, proteoliza zachodzi pod wpływem α -sekreazy. Enzym α -sekreaza należy do rodziny dezintegrzyn. Działanie tego enzymu polega na rozcinaniu cząsteczki β APP w miejscu wiązania glutaminy z lizyną. Nie powstaje przy tym cząsteczka s β APP, z której następnie powstałyby cząsteczki amyloidu- β . W wyniku rozcinania cząsteczki β APP przez enzym α -sekreazę powstaje cząsteczka s α APP. Pozostała część β APP ulega dalszemu rozcinaniu przez γ -sekreazę na powierzchni błony komórkowej zarówno od strony przestrzeni zewnątrzkomórkowej jak i cytozolu. W wyniku tego powstają fragmenty oznaczane jako AICD (uwalniany do cytoplazmy) oraz p3 (uwalniany do przestrzeni zewnątrzkomórkowej), które nie ulegają agregacji [4, 52, 54, 57, 59].



Schemat 3. Szlaki metabolizmu β APP, przy udziale α -sekreazy (nieamyloidogenny) lub β - i γ -sekreazy (amyloidogenny) z uwzględnieniem najważniejszych metabolitów [4].

U osób zdrowych zachowana jest równowaga w powstawaniu, rozkładaniu i usuwaniu amyloidu- β , przy czym koło 95% stanowią cząsteczki o długości łańcucha wynoszącej 40 aminokwasów [9]. Postać fibrylarna (nierozpuszczalna) $A\beta$ ulega enzymatycznej degradacji wewnątrzkomórkowo – cząsteczki amyloidu rozkładane są w endosomach i lizosomach komórkowych. Rozpuszczalna postać $A\beta$, ulega rozkładowi pod wpływem zewnątrzkomórkowych proteaz. Amyloid- β jest usuwany z ośrodkowego układu nerwowego poprzez m.in. aktywne wychwytywanie przez receptor RAGE (receptor produktów zaawansowanej glikacji) oraz przez komórki mikrogleju i astrocyty (fagocytoza). Nieaktywny transport amyloidu- β polega na przenikaniu do płynu mózgowo-rdzeniowego przez przestrzenie okołonaczyniowe Virchowa- Robina (w postaci lipoproteiny). Cząsteczki $A\beta$ poza aktywnym i nieaktywnym transportem ulegają również rozkładowi (proteolizy) pod wpływem neprylizyny (NEP) i enzymu degradującego insulinę (IDE) [14, 32]. Ilość powstających cząsteczek β APP w ośrodkowym układzie nerwowym wzrasta w wyniku odpowiedzi obronnej organizmu na uszkodzenia tkanki nerwowej i zaburzeniach krążenia mózgowego. Istnieje przypuszczenie, że β APP może wykazywać właściwości cytoprotekcyjne poprzez usuwanie wolnych rodników oraz tworzenie kompleksów np. z toksycznymi metalami [10].

Nadmiar nieusuniętego amyloidu- β i tworzenie przez niego depozytów prowadzi do powstania cyklicznej odpowiedzi zwrotnej. W jej wyniku aktywowane czynniki układu immunologicznego (zwłaszcza interleukiny 1β i 6 oraz $\alpha 1$ - antychymotrypsyna) stabilizują depozyty uszkadzające komórki w najbliższym otoczeniu. W odpowiedzi na to nasileniu ulega powstawanie β APP, z którego następnie tworzone są łańcuchy amyloidu- β 1-40 oraz 1-42 [20].

W wyniku procesów patofizjologicznych znacząco wzrasta ilość powstającego amyloidu- β 1-42. Istotnym czynnikiem wpływającym na nasilenie procesu powstawania bardziej toksycznego $A\beta$ 1-42 są mutacje genowe. Determinują one rodzinne predyspozycje do wystąpienia choroby Alzheimera, co jest przyczyną od 5% do 10% przypadków zachorowań. Szczególną rolę odgrywają mutacje genów kodujących enzymy biorące udział w szlaku amyloidogennym tj. homologu BACE 1 β -sekreazy oraz enzymów z kompleksu γ -sekreazy - preseniliny 1 (gen na chromosomie 14), preseniliny 2 (gen na chromosomie 1) oraz samego białkowego

prekursora amyloidu β (β APP) [10, 15, 54, 60]. Mutacje te mogą prowadzić do nadmiernej aktywności β -sekretazy i γ -sekretazy przez co metabolizm β APP przesuwana się znacznie w kierunku szlaku amyloidogennego. Występowanie rodzinnych mutacji genów kodujących PS1 i PS2, może być przyczyną zwiększonego ryzyka rozwoju choroby Alzheimera i wczesnego występowania objawów choroby wśród spokrewnionych osób [10]. Inną mutacją, która może mieć wpływ na wzrost ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera jest autosomalna dominująca mutacja budowy cząsteczki APP, zwłaszcza w jej N-terminalnym lub C-terminalnym fragmencie. Prowadzi ona do nieprawidłowego rozcinania cząsteczki APP przez enzymy [54]. Badania wykazały, że poza mutacjami istotne znaczenie ma również polimorfizm genowy tj. występowanie różnych form (alleli) genów kodujących apolipoproteinę E (ApoE). Bierze ona udział w transporcie cholesterolu w organizmie, ale pozostaje również nie bez znaczenia w usuwaniu z ośrodkowego układu nerwowego cząsteczek $A\beta$, gdyż w mózgu ApoE ulega syntezie i wydzielaniu głównie przez astrocyty i mikroglej. Komórki te usuwają i degradują amyloid- β i wykazano, że w procesie tym ApoE bierze udział, jednak dokładna jej rola w tym przypadku nie została do końca poznana. Wyróżniamy trzy izoformy apolipoproteiny E oznaczone symbolami ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3, ApoE ϵ 4. Forma ApoE ϵ 4 wykazuje najwyższe powinowactwo do lipoprotein niskiej gęstości. U osób z występującym w genotypie allelem ApoE ϵ 4, stwierdza się tendencję do wysokiego poziomu cholesterolu we krwi oraz do miażdżycy tętnic (m. in. tętnic szyjnych). Prowadzi to do zaburzeń krążenia mózgowego. Odmiana apoE ϵ 4 upośledza również proces usuwania amyloidu-beta (w postaci związanej z lipoproteiną) z mózgu do płynu mózgowo-rdzeniowego, więc nasila się tworzenie jego agregatów oraz złogów w przestrzeni międzykomórkowej. Genotyp ApoE jaki wykazują komórki mikrogleju, wpływa na ich zdolność usuwania amyloidu- β z mózgu. Najwyższą efektywność wykazują te komórki w których ekspresji ulega ApoE ϵ 2. Znacznie słabiej z usuwaniem $A\beta$ radzą sobie komórki mikrogleju wykazujące ekspresję ApoE ϵ 3, ApoE ϵ 4 lub całkowicie pozbawione tej apolipoproteiny. Wystąpienie jednego allelu ApoE ϵ 4 zwiększa ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera czterokrotnie, przy dwóch allelach ryzyko rozwoju choroby może wzrosnąć nawet dwunastokrotnie. W przeciwieństwie do ApoE ϵ 4, wystąpienie allelu ApoE ϵ 2 może zmniejszać ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera, gdyż ta forma apolipoproteiny wykazuje działanie protekcyjne [6, 19, 20, 32, 53, 54, 61]. Komórki mikrogleju są

w stanie usunąć najbardziej toksyczną rozpuszczalną postać amyloidu- β , z przestrzeni międzykomórkowej tkanki nerwowej, z wykorzystaniem mechanizmu pinocytozy. Cząsteczki A β łączone są w endolizosomalne kompartmenty (pakiety), które ulegają degradacji [20].

Zaobserwowano obecność AChE w strukturze blaszek neurytycznych A β . Wykazana została możliwość tworzenia stabilnych kompleksów enzymu AChE jak i BuChE z amyloidem- β , jak również indukowanie przez enzym zmian konformacyjnych cząsteczek A β . Ułatwia to formowanie przez amyloid- β fibryli i złogów. Kompleks ten ulega agregacji i tworzy złogi podobnie jak sam A β , jest przy tym znacznie bardziej neurotoksyczny [5, 48, 61, 62].

Badania przeprowadzone u młodych osób, posiadających uwarunkowania genetyczne predysponujące do rozwoju choroby Alzheimera, wykazały, iż złogi amyloidu- β mogą odkładać się w obrębie mózgu przez okres dwudziestu lat zanim zaobserwowane zostaną pierwsze kliniczne objawy choroby. Jednym ze wskaźników świadczących o początku rozwoju choroby jest spadek poziomu A β 1-42 w płynie mózgowo-rdzeniowym wykrywalny, 15-20 lat przed wystąpieniem pierwszych objawów, w badaniu techniką pozytonowej tomografii emisyjnej (PET – ang. positron emission tomography) [19, 53].

2.3 Hipoteza białka Tau - tworzenie neurofibryli białka Tau.

W odróżnieniu od opisanego powyżej amyloidu- β , odkładającego się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, czynnikiem uszkadzającym komórki nerwowe „od środka” jest nieprawidłowe białko Tau (białko τ). Fizjologicznie prawidłowe białko łączy mikrotubule, stabilizuje mikrotubule aksonowe, uczestniczy w transporcie wewnątrzkomórkowym (składników odżywczych, pęcherzyków, mitochondriów, chromosomów) oraz wchodzi w skład cytoszkieletu komórek [1, 3, 6, 14, 54]. Białko Tau ulega odłączeniu od mikrotubul (dysocjuje), kiedy ulega fosforylacji [14]. W przypadku niektórych chorób neurodegeneracyjnych, m. in. w chorobie Alzheimera, zaobserwowano tworzenie się błędnego (patologicznego) białka Tau. Powstaje ono w przypadku zaburzenia równowagi między enzymami z grupy kinaz i fosfataz co prowadzi do nadmiernej fosforylacji (hiperfosforylacji) opisywanego białka. Szczególne znaczenie może mieć w tym przypadku kinaza tyrozynowa, która bierze udział w fosforylacji aminokwasu – tyrozyny [2].

Znane kinazy biorące udział w hiperfosforylacji białka Tau w przebiegu choroby Alzheimera to:

- zależna od cyklin kinaza-5 (CDK5),
- syntaza glikogenu kinaza-3 β (GSK-3 β),
- proteina aktywowana Ca²⁺/kalmoduliną kinaza-2
- kinaza-1 kazeiny,
- specyficzna kinaza-1A regulująca fosforylację tyrozyny (DYRK1A) [14].

Błędne białko Tau ma tendencje do tworzenia splotów oraz neurofibryli wewnątrzkomórkowych (NFTs), składających się z wiązek sparowanych helikalnych filamentów. Ulegają one kumulacji w cytoplazmie neuronów, w wyniku czego białko traci powinowactwo do mikrotubul i dochodzi do destabilizacji cytoszkieletu i całej komórki. W przypadku komórek nerwowych skutkuje to zaburzeniem przewodnictwa nerwowego w aksonach oraz w połączeniach synaptycznych, a ostatecznie po kilku latach neuron ze splotami z błędnym białkiem Tau obumiera [1, 6, 11, 12, 14, 63].

Prawdopodobnie hiperfosforylacja białka Tau jest wynikiem mutacji genowych, jednakże zaobserwowano, że czynnikami indukującymi ten proces są również przewlekłe stany zapalne (zwiększona aktywność cyklooksygenazy 2) oraz tworzące się złogi amyloidu- β [1, 4, 32, 53, 63]. Istnieje również hipoteza, że patologie dotyczące amyloidu- β oraz hiperfosforylacji białka Tau są niezależne od siebie. Nasilone powstawanie wewnątrzkomórkowych splotów białka Tau u osób uprawiających dyscypliny sportowe z wysokim prawdopodobieństwem występowania kontuzji np. boks [14, 54].

Szczególnie ważną rolę w procesie fosforylacji odgrywa enzym syntaza glikogenu kinaza 3 β (GSK-3 β). Zwiększona aktywność tego enzymu, zwłaszcza w korze czołowej zwiększa ryzyko rozwoju choroby Alzheimera. Enzym bierze udział, jako katalizator, w reakcji fosforylacji aminokwasów – seryny i treoniny. Jedną z strategii leczenia choroby Alzheimera zakłada wykorzystanie inhibitorów GSK-3 β w celu zahamowania tworzenia neurofibryli białka Tau. Podjęte zostały próby wykorzystania Litu, który wykazuje właściwości inhibicyjne GSK-3 β , jednak pomimo obiecujących rezultatów badań na liniach komórkowych i zwierzętach, nie osiągnięto zadowalających efektów u ludzi [6, 32, 56].

3 PRZEWLEKŁY STAN ZAPALNY W OBRĘBIE OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO TOWARZYSZĄCY CHOROBIĘ ALZHEIMERA.

Stan zapalny stanowi odpowiedź organizmu mającą na celu wyeliminowanie przyczyny uszkodzenia komórek oraz usunięcia komórek, które uległy obumarciu. Jeżeli prawidłowy stan tkanki objętej stanem zapalnym nie zostanie przywrócony, stan zapalny staje się przewlekły co w rezultacie prowadzi do pogłębienia uszkodzeń tkanek w najbliższym otoczeniu. W tej sytuacji mechanizmy cytotoksyczne przeplatają się z procesami naprawczymi, jednak na ogół uszkodzenia ulegają kumulacji co może powodować nieodwracalne zmiany w tkankach [3].

Obserwacje wykazały obecność licznych przewlekłych stanów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym u pacjentów z chorobą Alzheimera. W wyniku aktywacji mikrogleju i astrocytów (komórki glejowe będące makrofagami; zlokalizowane w mózgu i rdzeniu kręgowym [2]) dochodzi do wzrostu poziomu mediatorów prozapalnych wytwarzanych przez te komórki (parakrynnych cząsteczek sygnałowych, pochodnych kwasu arachidonowego - prostanoidy), takich jak prostaglandyny, cytokiny, chemokiny, leukotrieny, proteazy, proteoglikany, tromboksany, białko C-reaktywne, czynniki układu dopełniacza, w obrębie płynu mózgowo-rdzeniowego i mózgu. Zwiększeniu ulega również powstawanie reaktywnych form tlenu i azotu, które prowadzą do uszkodzeń komórkowych. W normalnych warunkach prostanoidy syntezowane są endogennie przez wiele komórek w formie nieaktywnej, następnie ulegają aktywacji i uwolnieniu pod wpływem różnych czynników zapalnych. Mediatory te regulują różne procesy fizjologiczne np. agregację płytek krwi, napięcie ścian naczyń krwionośnych, owulację czy rozwój płodu. Wykazano zależność między stanem zapalnym i wzmożonym powstawaniem i agregacją amyloidu- β . Mediatory prozapalne oraz reaktywne formy tlenu i azotu nasilają powstawanie A β 1-42 (poprzez przestawienie produkcji APP na szlak amyloidogenny) i jego agregację. Powstające w wyniku tego złoży amyloidu- β uszkodzają komórki i dodatkowo indukują aktywność mikrogleju i astrocytów oraz stan zapalny. Dodatkowo, pod wpływem mediatorów prozapalnych zahamowaniu ulega tworzenie rozpuszczalnej formy APP, która wykazuje działanie neuroprotekcyjne [3, 4, 60, 64]. Wynika z tego, że zależność między amyloidem- β i stanem zapalnym ma

charakter cykliczny. Skutkiem tego jest uszkodzenie neuronów i połączeń synaptycznych co prowadzi do postępującej neurodegeneracji [2]. Odkrycie tej zależności pozwoliło na zaliczenie lokalnych, przewlekłych stanów zapalnych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego do głównych czynników rozwoju choroby Alzheimera [2, 3, 4, 60, 64].

3.1 Inicjacja stanu zapalnego.

W celu szczegółowego wyjaśnienia roli stanu zapalnego w procesie choroby Alzheimera niezbędne jest zapoznanie ze złożonym mechanizmem jego powstawania i odpowiedzi organizmu. Rozpoczęcie procesu następuje pod wpływem działania na receptory błonowe sprzężone z białkiem G (GPCR) takich czynników jak hormony (np. wazopresyna, adrenalina, noradrenalina, tyreotropina, lutropina i inne), neuroprzekazniki (np. acetylocholina), czynniki wzrostu (np. fibroblastów, insulinopodobny i inne). W odpowiedzi na aktywację GPCR uruchomieniu ulega cyklaza adenylowa, która uczestniczy w syntezie cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (cAMP). Pod wpływem cAMP aktywowana zostaje kinaza białkowa typu C. Z fosfolipidów błon komórkowych (fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanolaminy) pod wpływem enzymu fosfolipazy A₂ (PLA₂), aktywowanej przez kinazę białkową typu C, uwalniają się nienasycone kwasy tłuszczowe (arachidonowy, α -linoleinowy, γ -linoleinowy) oraz cząsteczki 1-acylofosfolipidu (1-AFL). Reakcja uwalniania kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych pod wpływem PLA₂ jest katalizowana przez jony wapniowe Ca²⁺. W mniejszym stopniu nienasycone kwasy tłuszczowe uwalniane są pod wpływem fosfolipazy C i D. Fosfolipaza C hydrolizuje głównie fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan (PIP₂), z którego po szeregu przemian powstaje kwas arachidonowy. Fosfolipaza D odpowiada za hydrolizę fosfatydylocholiny, z której powstaje cholina oraz kwas fosfatydowy, który następnie ulega przemianie do kwasu arachidonowego. Końcowym produktem przemian fosfolipidów błonowych w reakcjach z udziałem fosfolipaz jest kwas arachidonowy i to on odgrywa główną rolę w dalszym procesie odpowiedzi organizmu na stan zapalny. Cząsteczki tego kwasu ulegają włączeniu w dwa szlaki metaboliczne, w rezultacie których powstają mediatory zapalne. W pierwszym szlaku, pod wpływem cyklooksygenazy, z kwasu arachidonowego powstają prostaglandyny, prostacyklina i tromboksan [60, 65].

3.2 Układ dopełniacza i jego rola w procesie choroby Alzheimera.

Składniki (proteiny) oraz receptory wchodzące w skład układu dopełniacza mogą powstawać w obrębie mózgu i ulegać aktywacji w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych takich jak, choroba Alzheimera czy stwardnienie rozsiane. W przypadku choroby Alzheimera tworzące się w przestrzeni międzykomórkowej ośrodkowego układu nerwowego depozyty amyloidu- β prowadzą do aktywacji układu dopełniacza (ang. complement system). Stanowi on istotny element zarówno odpowiedzi immunologicznej nieswoistej (wrodzonej) jak i swoistej (nabytej), a jego składniki odpowiadają za takie procesy jak rozpoznanie patogenu, opsonizacja, rozwój stanu zapalnego, bezpośrednia eliminacja patogenu. W skład układu dopełniacza wchodzi proteiny oraz proteazy, które na skutek kontaktu z patogenem ulegają kaskadowej aktywacji tzn. aktywowane składniki układu aktywują kolejne. Klasyczna aktywacja układu dopełniacza rozpoczyna się przyłączeniem do przeciwciał, połączonych z powierzchnią patogenu, proteiny C1q, z której związane są dwa enzymy – proteazy C1r i C1s. W wyniku zmian konformacyjnych C1q, po połączeniu z przeciwciałem, aktywacji ulegają enzymy z nim związane. C1s prowadzi do postępującej kaskadowo aktywacji kolejnych składników układu, na drodze enzymatycznego rozkładu i uwalniania aktywnych cząstek lub łączenia się w aktywne kompleksy. Aktywacji, łączeniu i oddziaływaniu między sobą ulegają składniki C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 oraz C9. Ostatecznie kaskada aktywacji poszczególnych składników prowadzi do utworzenia błonowego kompleksu atakującego (MAC – membrane attacking complex), wbudowującego się w błonę komórkową (np. patogennych drobnoustrojów) i tworzącego w nich kanały, przez które z komórki wypływają np. jony, a do wnętrza komórki wpływa woda. Utworzenie MAC nie jest jedynym skutkiem aktywacji układu dopełniacza. Poszczególne składniki mogą pełnić dodatkowe funkcje np. aktywowany C3 powoduje migrację komórek fagocytyzujących oraz bierze udział w rozpoznawaniu patogenów, C3a aktywuje komórki mikrogleju do usuwania A β poprzez fagocytozę, zaś C3b i C4b wiążąc się z receptorami CR1 (receptor dopełniacza 1) obecnymi w komórkach fagocytyzujących ułatwiają proces fagocytozy. Aktywacja alternatywnego szlaku układu dopełniacza, którego składnikami są C3, czynniki B i D oraz properdyna, prowadzi do łączenia składnika C3 z powierzchnią komórki patogenu. Składniki układu dopełniacza biorą udział w regulacji aktywności i dyferencjacji limfocytów typu T. Zaobserwowano,

że w przebiegu choroby Alzheimera klasyczny szlak układu dopełniacza ulega deregulacji. W mózgu chorego wszystkie czynniki klasycznego szlaku dopełniacza (C1q, C3b, C3c, C3d, C4d, C5b-9, C7, C9), kompleks atakujący błonę (MAC) oraz komórki mikrogleju i astrocyty otaczające złogi amyloidu- β ulegają nadmiernej immunoreaktywności, a w obrębie ośrodkowego układu nerwowego wzrasta poziom C1q, który wykazuje możliwość wiązania z amyloidem- β poprzez N-terminalny fragment peptydu. W blaszkach zaobserwowano obecność inhibitorów końcowych składników klasycznego układu dopełniacza – witronektynę, protektynę i klusterynę [3, 12, 15, 20, 54].

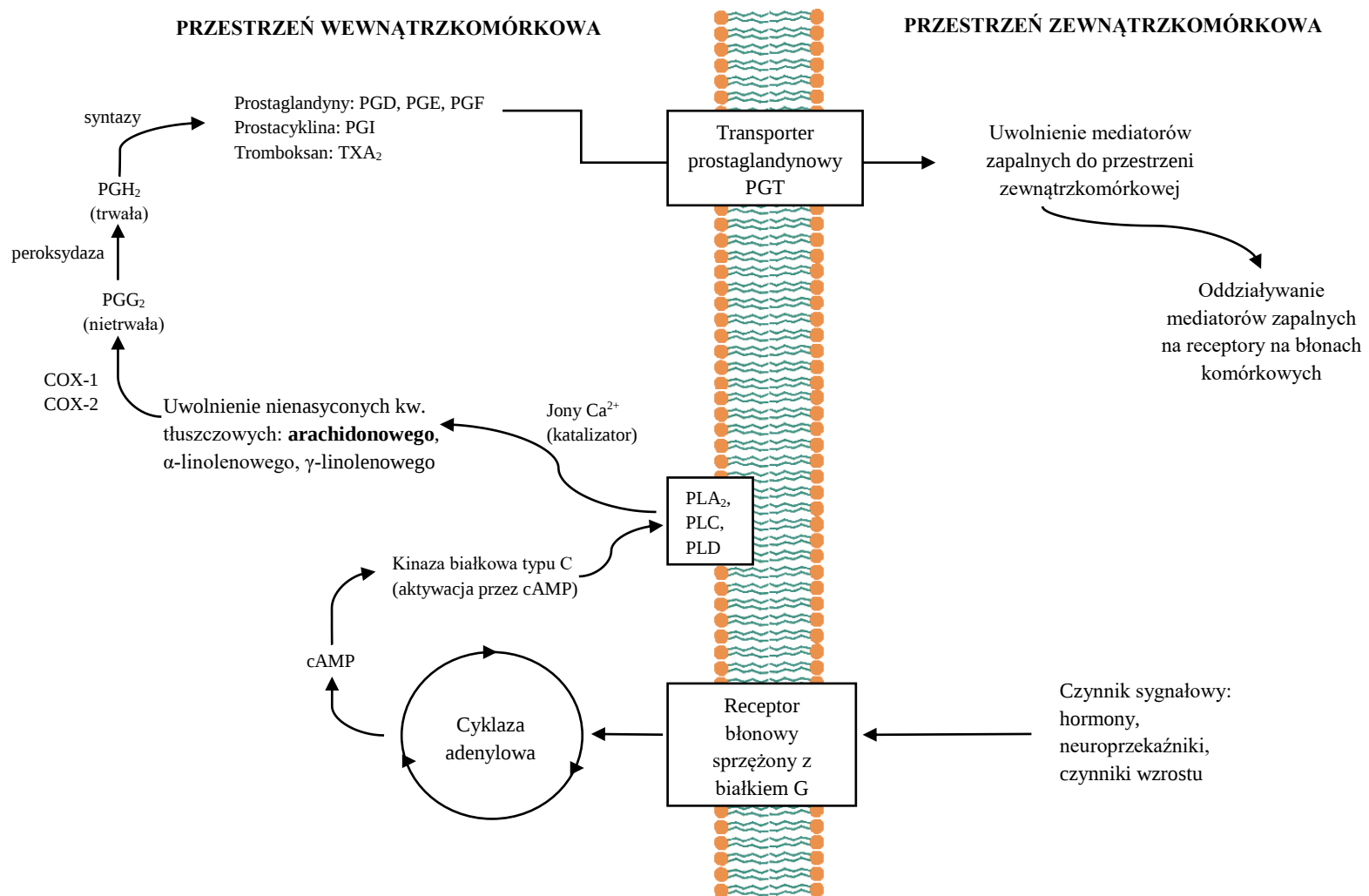
3.3 Powstawanie czynników stanu zapalnego na szlaku cyklooksygenazy.

Wyróżniamy dwa rodzaje cyklooksygenazy – 1 (konstytutywną, kodowaną przez gen na chromosomie 9) i 2 (indukowaną, kodowaną przez gen na chromosomie 1) oznaczane jako COX-1 oraz COX-2. Enzymy te katalizują te same reakcje i są homologiczne w około 60% [11]. Cyklooksygenaza 1 (COX-1) obecna jest stale w wielu różnych tkankach organizmu i bierze udział w regulacji wielu procesów fizjologicznych i utrzymaniu homeostazy, np. stale wykazuje działanie cytoprotekcyjne w obrębie śluzówki układu pokarmowego. Występowanie cyklooksygenazy 2 (COX-2) dotyczy głównie, ale nie wyłącznie, tkanek objętych procesem zapalnym lub nowotworowym, w których to ilość tego enzymu znacznie wzrasta pod wpływem mediatorów zapalnych np. interleukiny 1 (IL-1), czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α) oraz w przypadku uszkodzenia tkanek [20, 60, 66]. Innymi czynnikami zwiększającymi powstawanie COX - 2 są np. proliferacja i wzrost komórek, neoplazja, stres. Cyklooksygenaza 2 odgrywa znaczącą rolę w regulacji takich procesów jak poporodowy rozwój nerek, utrzymanie homeostazy układu krążenia oraz cykl menstruacyjny [60].

W kontekście znaczenia cyklooksygenazy w mechanizmie rozwoju choroby Alzheimera, należy zaznaczyć, że zarówno COX-1 jak i COX-2 są stale obecne w układzie nerwowym w warunkach fizjologicznych. Cyklooksygenaza 1 obecna jest w największej ilości w kresomózgowiu oraz międzymózgowiu, zaś cyklooksygenaza 2 fizjologicznie występuje w przdomózgowiu oraz rdzeniu kręgowym (korzenie grzbietowe nerwów rdzeniowych, istota szara). Oba enzymy wytwarzane są również przez astrocyty. Cyklooksygenaza 2 fizjologicznie odgrywa rolę w integracji bariery

kręgowym oraz w przewodnictwie synaptycznym [64]. Przypuszcza się, że wykazuje ona działanie cytoprotekcyjne chroniąc neurony przed działaniem toksyn i wolnych rodników [11]. Znaczne zwiększenie wytwarzania enzymu w obrębie ośrodkowego układu nerwowego ma miejsce w przypadku m.in. stanów zapalnych oraz nowotworów. Badania wykazały, że u osób z chorobą Alzheimera znacząco wzrasta ilość COX-1 i COX-2 w obrębie mikrogleju oraz komórek nerwowych, a wzrost aktywności COX-2 w obrębie hipokampu, kory nowej i układzie piramidalnym wiąże się z nasileniem zaburzeń pamięci [4, 11]. Wyodrębniono dodatkowo cyklooksygenazę 3 (COX-3) występującą głównie w korze mózgowej, podwzgórzu, rdzeniu kręgowym i mięśniu sercowym, jednak dotychczas nie poznano dokładnie jaką pełni funkcję. Prawdopodobnie COX-3 jest odmianą COX-1. Cyklooksygenazy znajdują się w komórkach na siateczce śródplazmatycznej oraz błonie jądrowej [60].

W wyniku aktywacji cyklooksygenazy następuje kaskada tworzenia związków zwanych mediatorami zapalnymi (prostacykliny, prostaglandyny, tromboksanu) (**Schemat 4 s. 39**). Pod wpływem działania COX-1 kwas arachidonowy ulega przekształceniu w nietrwały (labilny), cykliczny 15- hydroksynadtlenek - prostaglandynę G_2 (PGG_2), która następnie poprzez działanie na nią enzymu peroksydazy przekształca się w trwałą formę prostaglandyny H_2 (PGH_2). Specyficzne syntazy, aktywowane przez cyklooksygenazę lub cytochrom P450, przekształcają PGH_2 w szereg biologicznie czynnych prostaglandyn (PGD_2 , PGE_2 , PGF_2), prostacyklinę (PGI_2) oraz tromboksan (TXA_2), które ulegają uwolnieniu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej poprzez transporter prostaglandynowy (PGT). Cyklooksygenaza 1 poza kwasem arachidonowym może przekształcać również kwas γ - linoleinowy. Analogicznym szlakiem metabolicznym jest tworzenie prostanoidów przy udziale COX- 2 z tym, że w tym przypadku oprócz kwasu arachidonowego substratem mogą być kwas α - linoleinowy i kwas eikozapentanowy. Produkty końcowe uwalniane są z komórek do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Oddziałują one z receptorami błonowymi komórek docelowych wywołując specyficzne dla każdej z nich reakcje [60, 65].



Schemat 4. Mechanizm powstawania mediatorów zapalnych, przy udziale cyklooksygenazy [60].

3.4 Jądrowy czynnik NF- κ B i jego rola w procesie stanu zapalnego.

Odpowiedź organizmu na stan zapalny regulowana jest między innymi przez białkowy czynnik jądrowy NF- κ B. Jest on stale obecny w cytoplazmie komórkowej w formie nieaktywnej, połączony z proteiną I κ B o właściwościach inhibicyjnych wobec NF- κ B. Pod wpływem działania na komórkę takich czynników jak cytokiny, wolne rodniki, antygeny, amyloid- β i inne, uruchomiony zostaje proces, w którym kompleks NF- κ B-I κ B ulega fosforylacji a cząsteczka I κ B degradacji. Wolny, aktywowany NF- κ B jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z cząsteczką DNA i wywołuje odpowiedź na stan zapalny lub odpowiedź immunologiczną na antygeny. Badania wykazały znaczny wzrost aktywności czynnika NF- κ B w ośrodkowym układzie nerwowym osób z chorobą Alzheimera. Dotyczy to zarówno komórek nerwowych jak i komórek mikrogleju [4].

3.5 Udział cytokin w patofizjologii choroby Alzheimera.

Cytokiny są rozpuszczalnymi białkami o niskiej masie cząsteczkowej, wytwarzanymi przez komórki układu immunologicznego (limfocyty T, macrofagi), regulującymi ich aktywację, wzrost i różnicowanie. Wytwarzane są również przez komórki nie uczestniczące w odpowiedzi immunologicznej tj. komórki Schwanna (tworzące osłonkę mielinową wokół aksonów komórek nerwowych) i fibroblasty (wchodzące w skład tkanki łącznej). Regulują ekspresję błonowych protein powierzchniowych oraz proces apoptozy, proliferację, wzrost i dyferencjację komórek, odpowiedź zapalną. Główną funkcją cytokin jest regulacja przekształcania nieodróżnicowanych limfocytów typu T w pomocnicze limfocyty typu T. W obrębie ośrodkowego układu nerwowego cytokiny wytwarzane są przez komórki mikrogleju i astrocyty m.in. pod wpływem długotrwałej ekspozycji tych komórek na agregaty amyloidu- β . Uwolnieniu z tych komórek ulegają neurotoksyczne cytokiny prozapalne, reaktywne formy tlenu, tlenek azotu oraz grupy karbonylowe. Pod wpływem tych czynników uszkodzeniu ulegają komórki nerwowe znajdujące się w najbliższym otoczeniu, które obumierając wydzielają mediatory odpowiedzi immunologicznej i rozwija się chroniczny stan zapalny w mózgu. Cytokiny wytwarzane są również przez neurony. Część cytokin wykazuje działanie nasilające stan zapalny, dlatego też zaliczane są do grupy cytokin prozapalnych – do grupy tej zaliczamy: IL-1, IL-6, TNF- α . Do cytokin przeciwzapalnych zaliczamy: IL-1ra, IL-4, IL-10, TGF- β . Wykazują one

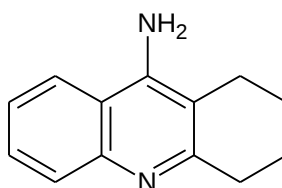
działanie hamujące wobec cytokin prozapalnych. Niektóre cytokiny wykazują działanie zarówno prozapalne (np. aktywują limfocyty typu B), jak i przeciwzapalne (np. oddziałują hamująco na ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne). Do cytokin o właściwościach zarówno pro- jak i przeciwzapalnych zaliczamy IL-4, IL-10, IL-13. Badania tkanki nerwowej i płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów z chorobą Alzheimera wykazały znaczny wzrost w ośrodkowym układzie nerwowym cytokin prozapalnych IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- α oraz czynnika stymulującego kolonie granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Obserwacje wykazały, że cytokiny wpływając na aktywację mikrogleju i astrocytów mobilizują te komórki do fagocytozy amyloidu- β i działają neuroprotekcyjnie, jednakże długotrwały wzrost poziomu cytokin przyczynia się do nasilenia neurodegeneracji. Cytokina IL-1 powoduje wzrost produkcji β APP w mRNA, co może przekładać się na wzrost powstawania A β . Dodatkowo IL-1, nasila aktywność α 1-antychymotrypsyny (która wchodzi w skład blaszek amyloidowych), indukuje powstawanie IL-6 oraz aktywność syntazy tlenu azotu, zwiększa aktywność acetylocholinoesterazy, aktywuje astrocyty i mikroglej. Zaobserwowano, że IL-1 powoduje nasilenie degeneracji komórek nerwowych. Cytokina IL-6 również zwiększa syntezę β APP, aktywuje komórki mikrogleju do procesu fagocytozy A β . Cytokina TNF- α zwiększa aktywność β -sekreazy (BACE 1) oraz γ -sekreazy, co przekłada się na nasilenie syntezy amyloidu- β . Poprzez stymulujący wpływ na NF- κ B, TNF- α nasila ekspresję czynników prozapalnych. Mózg osób zdrowych charakteryzuje się niskim poziomem TNF- α . Interleukina-1ra (IL-1ra) pełni funkcję inhibicyjną wobec IL-1 α i IL-1 β (formy IL-1). Wydzielana jest przez makrofagi i monocyty. Hamuje powstawanie cytotoksycznych uszkodzeń neuronów. IL-4 wywołuje odpowiedź komórek Th2, pośredniczy w rekrutacji i aktywuje mastocyty oraz pobudza proces wytwarzania przeciwciał IgE. IL-10 pełni istotną rolę w utrzymaniu homeostazy komórek nerwowych. Cytokina TGF- β wykazuje działanie cytoprotekcyjne i wspomaga przetrwanie komórek nerwowych. U pacjentów z chorobą Alzheimera wykazano wzrost jej poziomu w mózgu. Poza udziałem w procesie stanu zapalnego cytokiny odgrywają kluczową rolę w rozwoju ośrodkowego układu nerwowego w okresie embrionalnym [3, 14, 15, 53, 67, 68].

3.6 Udział chemokiny w patofizjologii choroby Alzheimera.

Chemokiny to cząsteczki białkowe (ponad 50 różnych molekuł), których głównym zadaniem jest kierowanie migracji komórek układu odpornościowego (m.in. mikrogleju i astrocytów) do obszarów objętych procesem zapalnym, poprzez mechanizm chemotaksji (ruch komórek w kierunku chemoatraktantu) oraz ekstrawazację (przenikanie ze światła naczyń krwionośnych do tkanek). W ośrodkowym układzie nerwowym chemokiny głównie wytwarzane są przez komórki mikrogleju i astrocyty, zaś receptory dla chemokin prezentowane są na powierzchni komórek nerwowych. Chemokiny i ich receptory biorą udział w mobilizowaniu limfocytów do migracji z układu limfatycznego do obszarów OUN objętych stanem zapalnym, przy czym w mózgu chorego na chorobę Alzheimera mechanizm ten ulega nadreaktywności. Biorą udział w procesie migracji mikrogleju i astrocytów do miejsc depozycji amyloidu- β . Różny poziom ekspresji chemokin wpływa na regulację poziomu fagocytozy A β przez komórki układu odpornościowego na wczesnym etapie rozwoju choroby Alzheimera. Monocyty aktywowane przez depozyty amyloidu- β , wytwarzają chemokiny takie jak IL-8, MCP-1 (ang. monocyte chemoattractant proteine), MIP-1 α i MIP-1 β (macrophage inflammatory protein). Ponadto astrocyty obecne w pobliżu depozytów amyloidowych wytwarzają MIP-1 α . Przewlekły stan zapalny i utrzymujący się wysoki poziom chemokin powodują nadmierne gromadzenie się komórek mikrogleju wokół agregatów amyloidu- β [3, 15].

4 LEKI STOSOWANE W TERAPII CHOROBY ALZHEIMERA

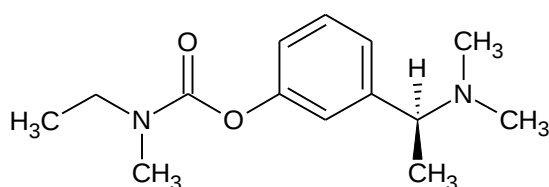
Na podstawie hipotezy cholinergicznego rozwoju choroby Alzheimera opierają się obecne i ogólnie przyjęte konwencjonalne metody leczenia tej choroby. Zakładają one poszukiwanie i wykorzystanie związków o aktywności inhibicyjnej wobec acetylo- i/lub butyrylocholinoesterazy (donepezyl, rywastygmina i galantamina), poprawie aktywności znanych leków oraz tworzenie hybryd związków o znanej aktywności. Skutkiem ich działania jest zwiększenie stężenia acetylocholiny (poprzez hamowanie jej rozkładu) w połączeniach synaptycznych, w wyniku czego łagodzeniu ulegają dysfunkcje systemu przekazywania cholinergicznego. Jest to szczególnie pożądane w obrębie kory przedczołowej mózgu. W efekcie u chorych leczonych inhibitorami cholinoesteraz obserwuje się złagodzenie zaburzeń zdolności poznawczych (poprawa pamięci, mowy, koncentracji) i spowolnienie postępu choroby. Związki wykazujące inhibicję AChE mogą obniżać neurotoksyczność glutaminianu chroniąc cholinergiczne receptory nikotynowe. Działanie opisywanych związków pozwala jedynie na złagodzenie skutków choroby Alzheimera poprzez poprawę zdolności poznawczych przez kilkanaście miesięcy, a terapia ma charakter paliatywny. Do chwili obecnej zaaprobowano do leczenia choroby Alzheimera jedynie cztery odwracalne inhibitory cholinoesteraz (hamujących działanie AChE i/lub BChE) przekraczające barierę krew – mózg. Rekomendowane jest stosowanie w terapii leków będących jednocześnie inhibitorami obu cholinoesteraz (np. rywastygminy), ze względu na wyższą skuteczność niż w przypadku zastosowania selektywnych inhibitorów wobec AChE [6, 8, 40].



Ryc. 5. Takryna

W 1993 roku amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Agency, FDA) zaakceptowała pierwszy lek do stosowania w terapii choroby Alzheimera, którym była takryna (**Ryc. 5**) (9- amino-1,2,3,4-tetrahydroakrydyna, THA, aminoakrydyna). Wykazuje ona odwracalną inhibicję zarówno acetylo- jak i butyrylocholinoesterazy, działa hamująco wobec monoaminooksydazy (MAO) oraz

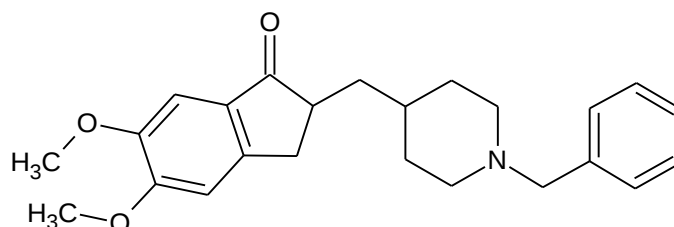
moduluje kanały jonowe. Inhibycyjne działanie takryny na AChE polega na odwracalnym wiązaniu związku z grupami aromatycznymi w miejscu aktywnym katalitycznie (CAS) cząsteczki enzymu. Wytwarza silne oddziaływania typu π z resztą Trp84, przez co blokuje dostęp cząsteczek neurotransmitera do CAS enzymu. Ze względu na silne działania niepożądane tj. zaburzenia ze strony układu pokarmowego, obniżenie ciśnienia krwi, a zwłaszcza zależna od dawki silna hepatotoksyczność, znacząco ograniczono jej stosowanie od 1998 roku. Takryna zwiększa powstawanie reaktywnych form tlenu i dodatkowo obniża poziom glutationu w wątrobie. Powodowała znaczny wzrost poziomu aminotransferazy alaninowej (ALAT) u ok. 30% leczonych nią pacjentów. Udział w metabolizmie takryny cytochromu P450 1A2, również mógł mieć wpływ na jej wysoką hepatotoksyczność dodatkowo zwiększając ryzyko interakcji z innymi lekami. Takryna dostępna jest na rynku amerykańskim pod postacią chlorowodorku w preparacie Cognex (kapsułki, 10, 20, 30, 40mg), w Polsce nie było żadnego zarejestrowanego preparatu. Dawka dobową 120 - 160mg w 4 podzielonych dawkach. Stosowanie leku wymaga stałej kontroli poziomu enzymów wątrobowych, a przy braku efektów leczenia po kilku miesiącach od rozpoczęcia terapii lek należy odstawić. Takryna stosowana jest w leczeniu choroby Alzheimera w jej umiarkowanej lub zaawansowanej fazie rozwoju [8, 40, 46, 55, 69-71].



Ryc. 6. Rywastygmina

Rywastygmina (**Ryc. 6**) podobnie jak takryna jest odwracalnym inhibitorem AChE oraz BChE. Nie jest metabolizowana przez cytochrom P450, co minimalizuje potencjalne ryzyko interakcji z innymi przyjmowanymi przez pacjenta lekami. Rywastygmina powoduje szybkie, zależne od dawki hamowanie acetylocholinoesterazy w płynie mózgowo-rdzeniowym [69]. Pacjenci leczeni rywastygminą wykazują poprawę zdolności poznawczych i relacji społecznych. Lek stosowany jest w łagodnej do średniozaawansowanej fazie rozwoju choroby Alzheimera. Efektem stosowania leku jest złagodzenie objawów neuropsychiatrycznych oraz depresji. Rywastygmina poprzez

czynnik wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor, NGF) indukuje różnicowanie i powstawanie nowych komórek nerwowych [72]. Rywastygmina dostępna jest w Polsce w preparatach w postaci systemów transdermalnych (plastrów), tabletek oraz kapsułek. Przykładami preparatów są Exelon, Evertas, Nimvastid, Rivaldo. Dawka dobową leku wynosi od 3mg do 6mg w dwóch dawkach podzielonych [6].

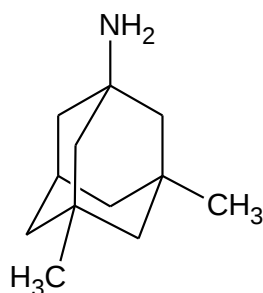


Ryc. 7. Donepezil

Donepezil (**Ryc. 7**) jest selektywnym odwracalnym inhibitorem AChE. Aktywność inhibicyjna związku wobec BuChE jest bardzo niska. Nie powoduje efektu hepatotoksycznego jak takryna. Obecnie jest najczęściej stosowanym lekiem w terapii choroby Alzheimera. Poza działaniem na układ cholinergiczny wykazuje również słabą inhibicję agregacji amyloidu- β [73]. W metabolizmie donepezilu udział bierze cytochrom P450 3A4 oraz 2D6, dlatego też może wchodzić w interakcje z alkoholem oraz innymi lekami metabolizowanymi przez te izoenzymy. Z podobną skutecznością do rywastygminy, leczenie donepezilem skutkuje u chorych poprawą zdolności poznawczych i relacji społecznych. Na rynku polskim dostępne są następujące preparaty donepezilu - Cogiton, Donecept, Donectil, Ricordo, Yasnal. Lek stosowany jest w łagodnej do umiarkowanej fazie rozwoju choroby Alzheimera w dawkach od 5mg do 10mg na dobę [6].

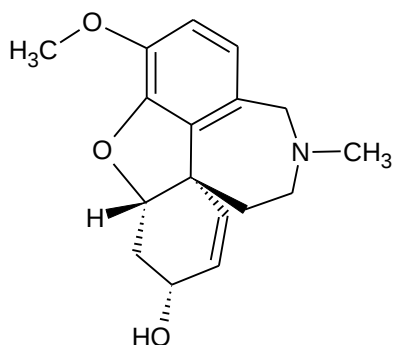
Podobnie jak rywastygmina, donepezil nasila dyferencjację (różnicowanie) komórek nerwowych. Działanie to jest niezwiązane z inhibicyjną aktywnością wobec AChE, a wynika z oddziaływania powyższych leków na receptory sigma (Sig-R). Wyróżniamy dwa rodzaje receptorów sigma (Sig-1R oraz Sig-2R) i należą do receptorów opioidowych. Występują w różnych rodzajach komórek i charakteryzują się wysoką konserwatywnością. W mózgu receptory Sig-R obecne są w takich strukturach jak hipokamp, podwzgórze czy kora przedczołowa. Rola receptorów Sig-R nie została w pełni określona, jednakże obserwacje wykazały ich udział w patofizjologii depresji czy choroby Alzheimera. Agonistyczne działanie wobec Sig-1R i/lub Sig-2R zwiększa

dyferencjację i wzrost neuronów indukowany przez NGF. Badania wykazały, że rywastygmina jest agonistą zarówno Sig-1R jak i Sig-2R, zaś donepezil wykazuje aktywność wyłącznie wobec Sig-1R. Selektywne agonistyczne oddziaływanie na receptory Sig-2R daje efekt neuroprotekcyny polegający na hamowaniu przyłączania amyloidu- β do neuronów oraz regulacji poziomu jonów wapniowych w tych komórkach [72].



Ryc. 8. Memantyna

Memantyna (**Ryc. 8**) wykazuje działanie neuroprotekcyny. Odwracalnie blokuje receptory błonowe dla NMDA, w fazie otwarcia. NMDA odgrywa istotną rolę w procesach poznawczych i pamięci. Memantyna wykazuje działanie cytoprotekcyny na komórki nerwowe kory mózgowej wystawione na długotrwałą nadmierną ekspozycję glutaminianu. Przewlekłe utrzymujący się nadmiar poziomu glutaminianu w połączeniach synaptycznych prowadzi do znacznego spadku wrażliwości komórek nerwowych na ten neuroprzekaźnik. Stosowana jest w terapii choroby Alzheimera w fazie umiarkowanej do zaawansowanej, samodzielnie lub w połączeniu z inhibitorami AChE. U pacjentów leczonych memantyną obserwuje się poprawę zdolności poznawczych, funkcjonowania i zachowania. Memantyna wykazuje interakcje z lekami działającymi na receptory NMDA, hydrochlorotiazidem, baklofenem, ranitydyną i nikotyną. Lek nie wykazuje wpływu na aktywność cytochromu P450. W Polsce memantyna dostępna jest w preparatach Axura, Biomentin, Ebixa, Memabix, Nemdatine oraz Polmatine. Zalecana dawka dobową wynosi 20mg przyjmowana jednorazowo [1, 6, 14, 17].



Ryc. 9. Galantamina

Galantamina (**Ryc. 9**) należy do rodziny alkaloidów izochinolinowych. Po raz pierwszy została wyizolowana z roślin *Galanthus nivalis* i *Galanthus woronowii*. Związek ten jest stosowany od wielu lat jako anestetyk w leczeniu bólu neuropatycznego. Charakter hydrofobowy cząsteczki daje jej możliwość przekraczania bariery krew-mózg. Galantamina posiada właściwości selektywnej, odwracalnej inhibicji acetylocholinoesterazy, poprzez tworzenie kowalencyjnych wiązań z resztą seryny. Wiązanie takie zachowuje stabilność przez kilkanaście minut powodując inhibicję aktywności enzymu. Dodatkowo galantamina jest agonistą receptorów nikotynowych układu cholinergicznego (nAChRs). Oddziaływanie na presynaptyczne receptory nAChRs powoduje zwiększenie uwalniania ACh. Wraz z wiekiem i w trakcie rozwoju choroby Alzheimera maleje ilość receptorów nikotynowych. Efektem jej działania na receptory postsynaptyczne nAChRs jest zwiększenie ich czułości na działanie acetylocholiny co daje podobne rezultaty jak zwiększenie stężenia samego neuroprzekaźnika. Wiązanie galantaminy z AChE w mózgu zmniejsza rozkład ACh przez co wzrasta poziom tego neuroprzekaźnika w połączeniach synaptycznych. Galantamina wykazuje 53-krotnie większe powinowactwo do acetylocholinoesterazy niż do butyrylocholinoesterazy. Dodatkowo wykazano, że galantamina hamuje agregację amyloidu- β oraz chroni komórki przed reaktywnymi formami tlenu. Stosowana jest pomocniczo w leczeniu łagodnej i umiarkowanej formy choroby Alzheimera. U osób leczonych galantaminą zauważalna jest poprawa pamięci, nauki i koncentracji. Efektami ubocznymi leczenia galantaminą są nudności, wymioty, biegunka i anoreksja. Związek metabolizowany jest przez izoenzymy 2D6 i 3A4 cytochromu P450, dlatego lek wchodzi w interakcje z ich inhibitorami np. fluoksetyną, ketokonazolem czy erytromycyną. Maksymalna dawka dobową galantaminy wynosi 20mg w 2 lub 3 dawkach podzielonych [6, 8, 14, 23, 32, 74, 75].

Terapia z zastosowaniem leków działających na układ cholinergiczny, powinna być niekiedy wsparta zastosowaniem leków przeciwdepresyjnych oraz przeciwpsychotycznych. Mają one na celu poprawę samopoczucia pacjenta i łagodzą objawy psychiatryczne towarzyszące chorobie Alzheimera, nie związane z zaburzeniem zdolności poznawczych [76].

5 NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWPALNE JAKO UZUPEŁNIENIE TERAPII CHOROBY ALZHEIMERA

Znacząca rola stanów zapalnych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego w postępie neurodegeneracji miała wpływ na rozpoczęcie badań nad przydatnością, w terapii choroby Alzheimera, związków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Wykazano, iż leki z grupy NLPZ dają pozytywne efekty zarówno w prewencji rozwoju choroby jak i łagodzeniu skutków w późniejszych fazach jej rozwoju [4, 6, 77, 78]. Jednakże działanie protekcyjne niesteroidowych leków przeciwzapalnych w terapii choroby Alzheimera jest zależne od czasu trwania terapii i od genotypu ApoE [20].

Jedno z kilkuletnich badań przeprowadzonych na dużej grupie osób w wieku powyżej 65 lat wykazało obniżenie ryzyka zachorowania na chorobę Alzheimera o 27% u osób stosujących prewencyjnie leki z grupy NLPZ [78]. Na fakt protekcyjnego działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych przeciwko rozwojowi choroby Alzheimera, wskazują też obserwacje pacjentów cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Stosują oni przewlekłe leki przeciwzapalne a przy tym odsetek występowania u nich choroby Alzheimera jest bardzo niski [11, 53, 60].

Mechanizm działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych polega na inhibicji cyklooksygenazy (jednego z głównych enzymów regulujących odpowiedź organizmu na stan zapalny) oraz czynnika NF- κ B [4, 20]. Niesteroidowe leki przeciwzapalne możemy podzielić na dwie grupy. Pierwszą z nich są nieselektywnie hamujące aktywność cyklooksygenazy 1 i 2. Zaliczamy do niej m.in. aspirynę, indometacynę, ibuprofen, naproksen, diklofenak, flurbiprofen, sulindak. Do drugiej grupy, hamującej selektywnie cyklooksygenazę 2, zaliczamy m.in. celekoksyb i rofekoksyb [6].

Zaobserwowano również, że niektóre niesteroidowe leki przeciwzapalne poza swoim głównym działaniem na redukcję stanu zapalnego, wykazują działanie antyagregacyjne amyloidu- β oraz hamują tworzenie neurofibryli białka Tau, zmniejszają aktywność mikrogleju i astrocytów. Leki z grupy NLPZ nasilając aktywność α -sekretazy oraz hamując aktywność γ -sekretazy, przestawiają metabolizm β APP na szlak nieamyloidogenny oraz zmniejszają ilość powstającego A β 1-42,

przestawiając szlak amyloidogennym w kierunku tworzenia krótszej, mniej toksycznej formy A β 1-40. Dodatkowo pod ich wpływem obniżeniu ulega ekspresja α 1 antychemotrypsyny wchodzącej w skład odkładających się blaszek amyloidu- β . Najbardziej obiecujące efekty zaobserwowano w przypadku indometacyny, ibuprofenu, flurbiprofenu i sulindaku. Zahamowanie wyżej wymienionych procesów wynika z inhibicji COX-1 i COX-2, których poziom znacznie wzrasta w ośrodkowym układzie nerwowym u osób z chorobą Alzheimera. Poprzez to zmniejszeniu ulega powstawanie mediatorów prozapalnych, głównie prostaglandyn, ale również cytokin - wśród wielu procesów, które one indukują jest agregacja A β oraz tworzenie neurofibryli białka τ [4, 11, 20, 53, 60, 63, 79].

Skutki uboczne długotrwałego stosowania leków z grupy NLPZ dotyczą m.in. ich toksycznego działania na śluzówkę układu pokarmowego (żołądek), co znacząco wpływa na ograniczenie stosowania tej grupy leków. Wynika to z długotrwałego hamowania COX-1, która fizjologicznie reguluje wydzielanie kwasu solnego i śluzu chroniącego ściany żołądka przed drażniącym działaniem kwasu. W konsekwencji długotrwałe stosowanie nioselektywnych inhibitorów cyklooksygenazy prowadzi do podrażnienia i perforacji ścian przewodu pokarmowego, krwawień oraz owrzodzeń. Zastosowanie w terapii lekami z grupy NLPZ dodatkowo leków o działaniu gastroprotekcyjnym tj. inhibitorów pompy protonowej lub leków COX-2 selektywnych pozwala złagodzić występujące efekty uboczne leczenia [66, 80].

Przeprowadzone badania w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem ibuprofenu, flurbiprofenu, fenoprofenu, indometacyny i sulindaku wykazały, że związki te hamują syntezę A β 1-42, przy jednoczesnym braku działania na powstawanie A β 1-40. Wyjaśnić można to prawdopodobną allosteryczną modulacją aktywności enzymu γ - sekretazy przez te leki, niezależną od działania na aktywność cyklooksygenazy [4, 63, 77]. W przypadku flurbiprofenu wykazano, że moduluje on aktywność preseniliny 1 (PS - 1) wchodzącej w skład kompleksu γ - sekretazy [9, 33, 78]. Ibuprofen poza hamowaniem powstawania amyloidu- β , redukuje również hiperfosforylację białka τ . U chorych przyjmujących ibuprofen zaobserwowano poprawę zdolności poznawczych [63].

Sześciomiesięczne badanie przeprowadzone z użyciem indometacyny na grupie 44 pacjentów z chorobą Alzheimera wykazało spowolnienie postępu choroby

u 24 osób przyjmujących lek i brak efektów u osób przyjmujących placebo [11]. U pacjentów z łagodną do umiarkowanej formy choroby Alzheimera, poprawia zdolności poznawcze [17]. Indometacyna hamuje neurotoksyczność indukowaną przez A β (redukuje jego stężenie w korze mózgowej i hipokampie), zmniejsza ilość powstającego A β 1-42, IL-1, IL-6, tlenku azotu i prostaglandyny E₂. Formowanie fibryli amyloidu- β jest proporcjonalne do dawki indometacyny. W badaniach na szczurach indometacyna zaobserwowano, że osłabia nadmierną aktywację komórek mikrogleju. Długotrwałe stosowanie indometacyny w połączeniu z omeprazolem w badaniach kontrolnych było dobrze tolerowane przez pacjentów i nie wywoływało istotnych incydentów ze strony układu pokarmowego [80].

Wyniki tych badań zaowocowały poszukiwaniem związku o silnym działaniu inhibicyjnym wobec γ -sekreazy wśród znanych NLPZ lub będącego pochodną któregoś z nich. Ostatecznie tarenflurbil, R-enancjomer flurbiprofenu, okazał się najbardziej obiecującym inhibitorem γ -sekreazy, znacznie obniżającym syntezę amyloidu- β 1-42. U pacjentów, na których badano wpływ działania R-flurbiprofenu obserwowano poprawę zdolności poznawczych. Tarenflurbil nie wykazuje działania przeciwzapalnego. Jest on obecnie badany pod względem potencjalnego zastosowania w leczeniu choroby Alzheimera [32, 63, 81]. Innym związkiem wykazującym inhibicję γ -sekreazy jest sulindak. Wiąże się on niekompetycyjnie z γ -sekreazą, hamując tym samym powstawanie A β 1-42. Redukujący wpływ na ilość powstającego A β 1-40 sulindak wykazuje dopiero w bardzo wysokich stężeniach [81]. Aspiryna hamuje proces rozcinania cząsteczki APP na s β APP i CTF- β , ale nie wykazuje wpływu na powstawanie cząsteczki amyloidu- β z CTF- β [4].

Zaobserwowano, że niektóre leki z grupy NLPZ mogą wpływać na konformację łańcucha aminokwasowego amyloidu- β . Konformacja typu β -kartki jest dominująca w powstających fibrylach toksycznego A β . Zaburzenie tej konformacji przekłada się na zmniejszenie agregacji amyloidu- β . Do leków wywierających taki wpływ można zaliczyć nieselektywne inhibitory COX - indometacynę, naproksen, ketoprofen, ibuprofen i aspirynę [81].

Poza działaniem NLPZ na proces zapalny oraz redukcję agregacji amyloidu- β , zaobserwowano modulujący wpływ tej grupy leków na aktywność komórek mikrogleju. Mechanizm ten polega na aktywacji receptora jądrowego PPAR γ i wiąże się

z aktywnością NLPZ wobec cyklooksygenazy. Receptor PPAR γ należy do rodziny jądrowych receptorów będących czynnikami transkrypcyjnymi, wraz z innymi białkami z tej rodziny aktywują lub hamują procesy transkrypcji. Receptor PPAR γ ulega ekspresji m.in. w komórkach układu odpornościowego tj. makrofagach i komórkach mikrogleju. Jego aktywacja powoduje zahamowanie wydzielania przez komórkę czynników prozapalnych a samą komórkę „przełącza” tryb przeciwzapalny. Ligandy wiążące się z receptorem PPAR γ i aktywujące go hamują produkcję cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF α). Aktywność wobec receptora PPAR γ zaobserwowano w przypadku indometacyny i ibuprofenu. Leki te pobudzając opisywany receptor hamują uwalnianie z komórek mikrogleju czynników prozapalnych indukowanych przez agregaty amyloidu- β . Efektem tego jest osłabienie neurotoksyczności aktywowanego mikrogleju. Działania osłabiającego aktywność komórek mikrogleju nie wykazują leki z grupy glikokortykoidów [4, 11, 81].

Aspiryna, kwas mefenamowy, indometacyna i ketoprofen prawdopodobnie posiadają właściwość neutralizowania reaktywnych form azotu co również nadaje im właściwości neuroprotektoryjne. Aspiryna i salicylan sodu wykazały dodatkowe działanie neuroprotektoryjne poprzez blokowanie transkrypcji czynnika jądrowego NF- κ B [81].

Badano również przydatność w leczeniu choroby Alzheimera selektywnych inhibitorów COX-2 np. nimesulidu, celekoksybu i rofekoksybu. Obserwacje nie wykazały pozytywnych rezultatów leczenia [11, 53, 81]. Nie wykazano również skuteczności stosowania glikokortykosteroidów w terapii choroby Alzheimera, pomimo ich właściwości przeciwzapalnych [11].

6 NOWE STRATEGIE LECZENIA CHOROBY ALZHEIMERA – TWORZENIE LEKÓW WIELOFUNKCYJNYCH

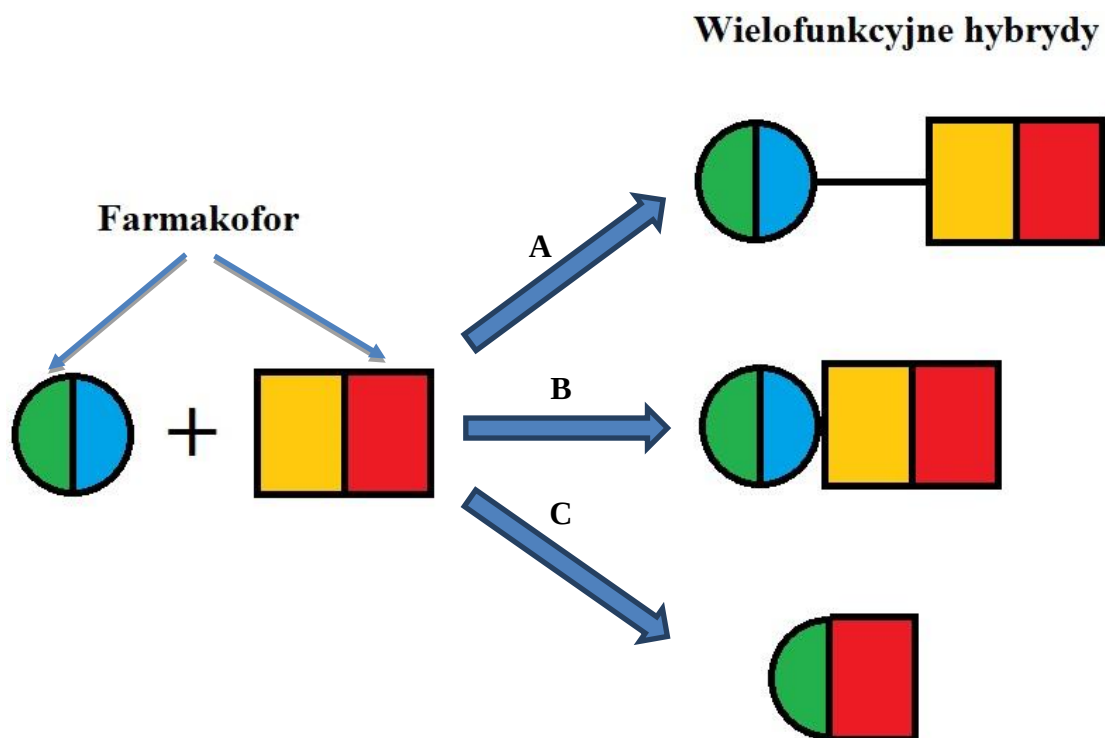
Oparcie ogólnie przyjętej metody leczenia choroby Alzheimera na hipotezie cholinergiczej i zastosowanie inhibitorów cholinoesteraz skutkuje jedynie spowolnieniem postępu choroby. Hipoteza cholinergiczna nie wyczerpuje w pełni patofizjologii rozwoju choroby, a prowadzone od lat badania wykazały, iż opisywane schorzenie ma wielokierunkową naturę, na którą składa się wiele czynników jednocześnie. Niepełna skuteczność terapii inhibitorami cholinoesteraz wymusiła poszukiwanie nowych związków, których aktywność skierowana byłaby na hamowanie agregacji amyloidu- β i tworzenia błędnego białka Tau, poprawę funkcjonowania receptorów w układzie nie tylko cholinergicznym, ale także glutaminergicznym, serotonergicznym, dopaminergicznym czy noradrenergicznym. Zarówno znane leki, jak i nowo powstające związki badane są pod względem ich potencjału inhibicyjnego wobec enzymów biorących udział w powstawaniu peptydów amyloidowych tj. β - i γ -sekreazy. W badaniach nad poprawą skuteczności terapii brane są pod uwagę czynniki towarzyszące i dopełniające jej patofizjologię [55, 70, 82]. Testowane są możliwości uzupełnienia terapii o leki:

- łagodzące stres oksydacyjny (związki o właściwościach antyoksydacyjnych),
- przywracające homeostazę biometali (związki o właściwościach chelatujących),
- łagodzące przewlekły stan zapalny tkanki nerwowej (niesteroidowe leki przeciwzapalne)
- hamujące syntezę i agregację neurotoksycznego amyloidu- β [55, 82].

Biorąc pod uwagę wielokierunkowy charakter patofizjologii choroby Alzheimera, najbardziej racjonalne wydaje się być wprowadzenie terapii skojarzeniowej (politerapii) opartej na jednoczesnym zastosowaniu kilku leków z różnych grup terapeutycznych, których jednoczesne działanie byłoby skierowane na kilka czynników. Niestety takie rozwiązanie niesie za sobą ryzyko wystąpienia, przede wszystkim interakcji metabolicznych pomiędzy przyjmowanymi w trakcie terapii lekami

zwłaszcza, że choroba Alzheimera dotyka głównie osoby w podeszłym wieku, u których metabolizm ulega na ogół spowolnieniu [7, 55, 56, 70, 82].

Alternatywnym rozwiązaniem dla wprowadzenia terapii skojarzonej jest poszukiwanie leków wielofunkcyjnych o działaniu wielokierunkowym (ang. multi-target-directed ligands, MTDL's). Z założenia związku tego typu, powinny wykazywać aktywność jednocześnie w kilku procesach patofizjologicznych, charakteryzować się wysoką bioselektywnością oraz minimalizować działania uboczne charakterystyczne dla poszczególnych ligandów, użytych do ich syntezy. Dotychczasowe próby projektowania i syntezy ligandów, które w późniejszych badaniach wykazały potencjał do aktywnego modulowania procesów biologicznych istotnych w rozwoju choroby Alzheimera, zdają się potwierdzać, że jest to obiecujący kierunek poszukiwania nowych związków z potencjałem do zastosowania leczniczego [7, 55, 56, 82]. Jedną z metod uzyskiwania MTDL's jest łączenie związków o znanym działaniu farmakologicznym, pochodzących z różnych grup terapeutycznych w jedną cząsteczkę z zastosowaniem odpowiedniego łącznika alifatycznego np. cząsteczki alkiloaminy („łączenie, wiązanie”, z ang. *linking*). Inną metodą tworzenia związków wielofunkcyjnych jest łączenie dwóch różnych struktur wykazujących aktywność farmakologiczną w jedną cząsteczkę poprzez bezpośrednie ich związanie bez zastosowania alifatycznego łącznika („kumulowanie, zrastanie”, z ang. *fusing*). Kolejny sposób polega na wykorzystaniu farmakoforów tj. fragmentów w strukturze poszczególnych związków, dzięki którym dany związek wykazuje pożądaną aktywność farmakologiczną i wykorzystania ich poprzez łączenie do stworzenia nowej cząsteczki („scalanie, zlanie”, z ang. *merging*). Planując tworzenie nowych hybryd, należy uwzględnić, że dobranie odpowiedniej metody syntezy z pośród opisanych powyżej pozwala na uzyskanie cząsteczek o różnej wielkości i masie cząsteczkowej co może mieć istotne znaczenie dla biodostępności. Metoda tworzenia nowych związków z grupy MTDL's na zasadzie scalania (*merging*) pozwala na otrzymanie produktów o łącznej masie cząsteczkowej niższej niż użyte do syntezy substraty. Powyższe sposoby tworzenia nowych cząsteczek MTDL's zostały zobrazowane na **Schemacie 5 s. 55**. Opisane metody mają charakter hybrydyzacji, a uzyskane tym sposobem związki nazywane są hybrydami [83, 84].



Schemat 5. Metody tworzenia nowych związków wielofunkcyjnych z cząsteczek związków o znanej aktywności farmakologicznej; *A-linking*, *B-fusing*, *C-merging* [84].

Uzyskane związki powinny wykazywać właściwości farmakologiczne będące połączeniem właściwości użytych do ich stworzenia cząsteczek. Tworzenie hybryd poza zwiększeniem efektywności leczenia ma na celu ograniczenie możliwych interakcji pomiędzy lekami oraz uproszczenie schematu dawkowania co pozwoliłoby na łatwiejsze utrzymanie reżimu terapii ze strony pacjenta. Otrzymane w ten sposób związki powinny oddziaływać jednocześnie na różne molekuły lub różne obszary (domeny) w obrębie tej samej cząsteczki np. białka. Wiązanie farmakoforów hybrydy może zachodzić np. jednocześnie w obrębie wewnętrznej części ortosterycznej oraz allosterycznej lub na zasadzie modulacji allosterycznej. Polega ona na wiązaniu cząsteczki ligandu z cząsteczką enzymu w miejscu innym niż ortosteryczne ale poprzez np. zmianę konformacji cząsteczki enzymu następuje oddziaływanie na możliwość wiązania odpowiednich ligandów z endogennym miejscem ortosterycznym. W wyniku oddziaływania allosterycznego, może dochodzić do zwiększenia lub zmniejszenia potencjału aktywującego endogennych ligandów wobec enzymu [82]. Skuteczne poszukiwanie potencjalnych leków poprzez tworzenie hybryd może komplikować fakt, iż często połączenie dwóch lub więcej aktywnych ligandów

proceeds to the obtaining of large molecules. Already at the stage of designing new compounds, it is necessary to take into account their final molecular mass and its influence on bioavailability (lipophilicity, ability to penetrate cell membranes, ability to form chemical bonds, etc.). Besides the appropriate selection of ligands as pharmacophores, whose task will be binding to the orthosteric and allosteric site of the enzyme, it is equally important to use a linker of appropriate length, which maximally optimizes the possibility of binding to the enzyme. The length of the linker connecting the pharmacophores in the hybrid molecule must ideally correspond to the distance between the binding sites of the enzyme [8, 85]. Among the MTDL hybrids, which have the potential for application in the therapy of Alzheimer's disease, it is worth noting the compounds, mainly of inhibitory activity against cholinesterases, with properties [7, 82]:

- inhibiting the aggregation of A β ,
- inhibiting the hyperphosphorylation of the Tau protein,
- chelating metal ions,
- antioxidant,
- inhibitory against secretase,
- inhibitory against monoamine oxidase [7, 82].

One of the compounds used for the synthesis of new MTDL hybrids in the search for new drugs for Alzheimer's disease is tacrine. It is characterized by a simple chemical structure (uncomplicated synthesis), low molecular mass, high activity inhibiting cholinesterases and A β aggregation. The creation of hybrids based on the tacrine structure also aims to reduce its side effects. High hepatotoxicity of tacrine probably results from the presence of a primary amine group in its structure. The process of creating new hybrid compounds with tacrine can be based on the substitution of the amine group with another therapeutic group. Research shows that such a process can significantly reduce the hepatotoxicity of the obtained hybrid compared to tacrine. The fragment of the hybrid molecule based on the tetrahydroacridine structure is responsible for binding to the acetylcholinesterase through interaction with aromatic amino acids entering the active site of the enzyme.

Skutkuje to aktywnością inhibicyjną takich hybryd wobec cholinoesteraz. W celu rozszerzenia profilu aktywności nowo powstałego związku, w strukturze hybrydy może znaleźć się związek posiadający możliwość wiązania z peryferyjnym miejscem anionowym (PAS) enzymu. Wiązanie z PAS może nadawać właściwość hamowania przez związek agregacji A β indukowanej przez AChE. Istotne w tworzeniu struktury hybrydy jest zastosowanie odpowiedniego łącznika o takiej długości, która w optymalny sposób umożliwia dostęp farmakoforów do fragmentów struktury enzymu, z którymi muszą utworzyć wiązanie, aby uzyskać pożądane działanie farmakologiczne [7, 46, 55, 70, 86].

W wyniku połączenia ze sobą dwóch cząsteczek takryny w dimer uzyskano bis-takrynę, która poza inhibicją AChE i BChE, dodatkowo hamuje agregację amyloidu- β . Hybryda zdolna jest do wiązania z acetylocholinoesterazą w dwóch istotnych miejscach jednocześnie – PAS oraz CAS. Równoczesne oddziaływanie zarówno z PAS jak i CAS nadaje bis-takrynie silną aktywność inhibicyjną wobec AChE (1000 razy silniejsze działanie niż samej takryny) [8, 87].

Przykładami dotychczas opisanych związków hybrydowych, pochodnych takryny, są połączenia m.in.:

- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z kwasem 4-fluorobenzoesowym – wykazuje wyższą inhibicję i selektywność wobec AChE niż takryna [5];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z flawonoidami – wykazują inhibicję agregacji amyloidu- β [86];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z flurbiprofenem – wykazuje wyższą od takryny inhibicję AChE i BChE, a dodatkowo hamuje agregację amyloidu- β [9, 33];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z melatoniną lub kwasem ferulowym – zaprojektowane jako potencjalne inhibitory cholinesteraz z właściwościami antyoksydacyjnymi [55, 86];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z 4-okso-4*H*-chromem – zaprojektowany jako potencjalny inhibitor cholinesteraz oraz β -sekreazy [86];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z 8-hydroksychinoliną – wykazuje działanie neuroprotektoryjne, cholinergiczne, przeciwutleniające, wiąże miedź [86];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z naftochinonem (witaminą K) – po utworzeniu tego związku hybrydowego dokonano następnie szeregu modyfikacji, otrzymując

grupę związków o właściwościach hamujących AChE i/lub BChE, które dodatkowo hamują agregację amyloidu- β [82];

- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z izoindigatonem – wykazuje działanie hamujące wobec cholinesteraz ale niższe niż sama takryna. Jednakże podstawienie atomu chloru w cząsteczce takryny w pozycji 6 wpływa na znaczące zwiększenie siły inhibicji wobec AChE [88];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z pochodną indolu – posiada aktywność inhibicyjną wobec AChE, właściwości antyoksydacyjne oraz hamuje agregację A β [8, 66];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z ksanomeliną - aktywuje receptory M1, zwiększa poziom ACh w synapsach poprzez hamowanie aktywności AChE [8];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z kwasem indoilo-3-octowym – posiada aktywność inhibicyjną wobec AChE oraz BChE wyższą od takryny [40];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z karwedilem – właściwości antyoksydacyjne, antagonistyczne wobec receptorom NMDA, hamujące agregację A β [55];
- 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z donepezilem – silnie hamuje agregację A β [55, 56].

W związku ze znacznym udziałem stanu zapalnego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego w patofizjologii choroby Alzheimera podjęto próby stworzenia hybryd takryny i związków o działaniu przeciwzapalnym. Wykazują one niejednokrotnie większy potencjał inhibicyjny wobec AChE i BChE niż sama takryna. Dodatkowo w badaniach *in vitro* ujawniają się dodatkowe właściwości jak hamowanie agregacji amyloidu- β . Tworzenie modyfikacji takryny (również poprzez związki hybrydowe) ma na celu dodatkowo uzyskanie związku o niższej toksyczności [9, 86].

Poza wykorzystaniem cząsteczki takryny jako podstawowej struktury, do której przyłączane są inne związki, w tworzeniu potencjalnych leków o działaniu wielokierunkowym użyto również memochinę. Wykazuje ona działanie hamujące wobec AChE oraz agregacji amyloidu- β . Cząsteczka memochiny zbudowana jest z benzochinonu i dołączonych do niego łańcuchów poliaminowych. Zsyntezowano związki będące połączeniem memochiny oraz różnych leków z grupy NLPZ tj. ibuprofen, flurbiprofen, sulindak, diklofenak, indometacyna. Poddane wstępnym badaniom uzyskane związki obniżały poziom powstającego i ulegającego agregacji A β

1-42, poprzez hamowanie aktywności β -sekreazy. Otrzymane związki obniżały również aktywność AChE i BChE [85].

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

7 CEL PRACY

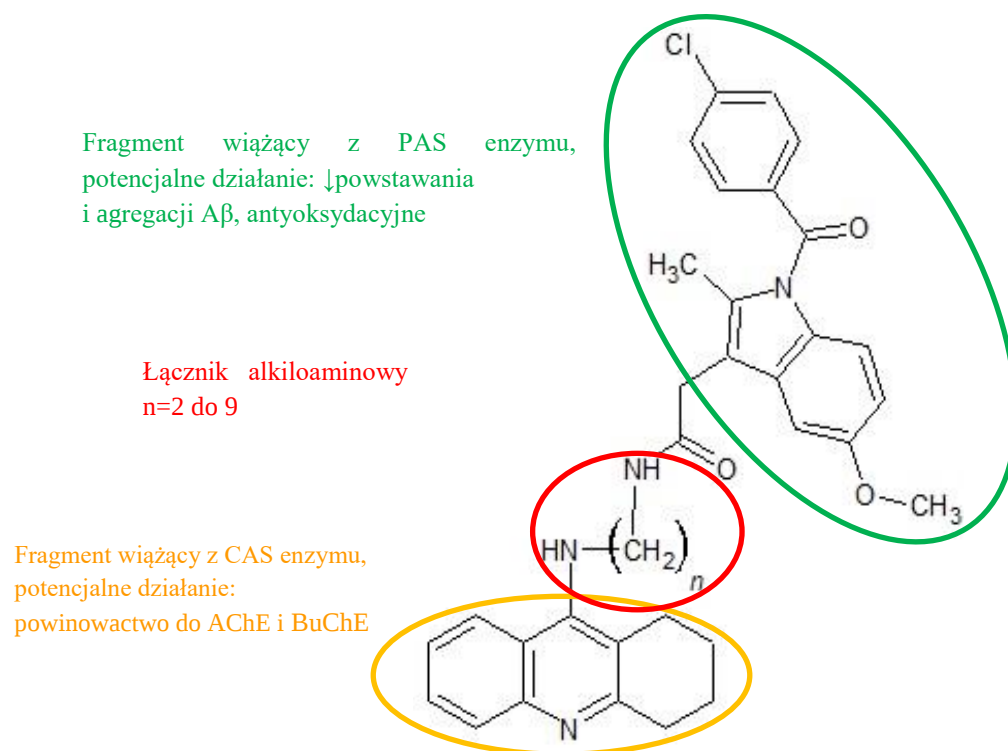
Choroba Alzheimera, charakteryzująca się postępującą neurodegeneracją, jest główną przyczyną demencji i zaburzeń zdolności poznawczych u osób starszych. Jako najważniejsze czynniki mające wpływ na rozwój choroby wyodrębniono zaburzenia w funkcjonowaniu układu cholinergicznego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, odkładanie się neurotoksycznych depozytów amyloidu- β oraz formowanie patologicznych neurofibryli białka Tau. Istotne znaczenie w rozwoju choroby przypisuje się również przewlekłemu występowaniu stanu zapalnego w obszarach mózgu odpowiadających za pamięć i koncentrację. Dotychczasowe metody leczenia choroby Alzheimera opierają się na zastosowaniu odwracalnych inhibitorów cholinoesteraz tj. donepezilu i rywastygminy wraz z leczeniem wspomagającym, jednakże tylko spowalniają one postęp choroby. Pierwszym lekiem zaakceptowanym w terapii choroby Alzheimera była takryna, ale ze względu na wysoką hepatotoksyczność została wycofana z użycia. Nieskomplikowana struktura cząsteczki takryny oraz wysoka biodostępność czyni ją nadal obiecującą strukturą do dalszych modyfikacji i poszukiwania nowych związków, przede wszystkim pozbawionych silnych działań niepożądanych. Złożona patofizjologia choroby wymusza poszukiwanie metod leczenia działających wielokierunkowo. Jedną ze strategii jest tworzenie nowych związków – hybryd, których cząsteczka składałaby się z farmakoforów, o różnym działaniu terapeutycznym, a sama hybryda wykazywałaby działanie wielokierunkowe (MTDL's, ang. multi-target-directed ligands) [2, 4, 7, 8, 11, 12, 84, 89-91].

Celem pracy było zaprojektowanie i otrzymanie nowej serii hybryd o strukturze złożonej z farmakoforów o aktywności inhibicyjnej wobec cholinoesteraz (AChE i/lub BuChE) oraz z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Do przeprowadzenia syntezy wybrano takrynę jako związek o udokumentowanej aktywności inhibicyjnej wobec cholinoesteraz oraz indometacynę jako komponentę przeciwzapalną.

Cel pracy planowano osiągnąć poprzez wykonanie:

- a) syntezy serii 8 związków, w których I-rzędowa grupa aminowa przy atomie węgla C9 w cząsteczce takryny, została podstawiona alifatyczną, nierozgałęzioną cząsteczką alkilodiaminy stanowiącą łącznik z cząsteczką indometacyny. Związki w serii różnią się ilością grup -CH₂- (od 2 do 9) w łańcuchu alkiloaminowym;
- b) badania *in vitro* aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków wobec cholinoesteraz AChE i BuChE;
- c) badania kinetyki reakcji enzymatycznej przez wybrany związek o najwyższej aktywności wobec AChE;
- d) badanie wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek, prowadzone na liniach komórkowych HepG2 i EA.hy926;
- e) wyznaczenie punktu pKa dla wybranego, najbardziej aktywnego związku;
- f) badanie aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS i DPPH;
- g) modelowanie molekularne.

Fragment cząsteczki zaprojektowanych hybryd, zbudowany jest z takryny, który odpowiada za wiązanie z miejscem aktywnym enzymu poprzez oddziaływania z grupami aromatycznymi aminokwasów. Cząsteczka indometacyny ustawiona względem cząsteczki enzymu za pomocą łańcucha alkiloaminowego o określonej długości (**Ryc. 10 s. 62.**). Założono, iż będzie ona tworzyć oddziaływania z grupami aromatycznymi aminokwasów wchodzących w skład peryferyjnego miejsca aktywnego acetylocholinoesterazy. Oddziaływanie indometacyny na PAS enzymu wzmacniałoby aktywność inhibicyjną hybrydy wobec AChE oraz dodatkowo mogłoby hamować indukowaną przez enzym agregację amyloidu- β , poprzez blokowanie peptydom amyloidowym dostępu do miejsca ich wiązania z acetylocholinoesterazą. Zastąpienie I - rzędowej grupy aminowej w cząsteczce takryny, prawdopodobnie obniży hepatotoksyczność związku co zostanie zbadane w warunkach *in vitro*. Aktywność biologiczna otrzymanych związków będzie określona w toku odpowiednio dobranych badań *in vitro* (badania z wykorzystaniem enzymów cholinoesteraz oraz linii komórkowych).



Ryc. 10. Struktura hybrydy takryny z indometacyną, połączonych łańcuchem alkiloaminowy.

Następnie planowane jest określenie zdolności otrzymanych związków do inhibicji agregacji neurotoksycznego amyloidu-β. Mając na względzie hepatotoksyczne działanie samej takryny, wykonane będą badania określające przeżywalność komórek wątroby względem najaktywniejszej pochodnej. Natomiast w celu wyjaśnienia wiązania otrzymanych substancji z enzymem wykonane zostaną badania modelowania molekularnego.

8 METODOLOGIA BADAŃ

8.1 Odczynniki:

- chloroform (POCH);
- metanol (POCH);
- amoniak (POCH);
- bezwodny siarczan (VI) magnezu (Sigma Aldrich);
- 9- chloro-1,2,3,4-tetrahydroakrydyna (Sigma Aldrich);
- fenol (Sigma Aldrich);
- jodek potasu (POCH);
- octan etylu (POCH);
- 10% roztwór wodorotlenku potasu (POCH);
- nasycony roztwór NaCl (ChemPur);
- 1,2-diaminoetan (Sigma Aldrich);
- 1,3-diaminopropan (Sigma Aldrich);
- 1,4-diaminobutan (Sigma Aldrich);
- 1,5-diaminopentan (Sigma Aldrich);
- 1,6-diaminoheksan (Sigma Aldrich);
- 1,7- diaminoheptan (Sigma Aldrich);
- 1,8- diaminooktan (Sigma Aldrich);
- 1,9- diaminononan (Sigma Aldrich);
- tetrahydrofuran (Sigma Aldrich);
- 2- chloro- 4,6- dimetylo-1,3,5-triazyna (CDMT) (Sigma Aldrich);
- indometacyna (Sigma Aldrich);
- N-metylomorfolina (Sigma Aldrich);
- 1,0M HCl w eterze dietylowym (Sigma Aldrich);
- takryna (Sigma Aldrich);
- donepezil (Sigma Aldrich);
- kwas ditiobis-(2-nitro)-benzoesowy (DTNB) (Sigma Aldrich);
- acetylocholinoesteraza (ze Strętwy, EC 3.1.1.7, Sigma Aldrich);
- butyrylocholinoesteraza (z surowicy końskiej, EC 3.1.1.8, Sigma Aldrich);
- PBS (Sigma Aldrich);
- jodek acetylocholiny (AChI) (Sigma Aldrich);

- linia komórkowa ludzkich komórek raka wątrobowokomórkowego HepG2 (Health Protection Agency Culture Collection, ECACC, Salisbury, UK);
- pożywka Eagle'a MEM (Sigma Aldrich, St. Louis, USA);
- 10% płodowa surowica bydlęca z roztworem aminokwasów (Sigma Aldrich, St. Louis, USA);
- 0,01% roztwór trypsyny-EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, USA);
- dimetylosulfotlenek (DMSO) (Serva);
- odczynnik CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96, PROMEGA, Fitchburg, USA);
- linia komórkowa EA.hy926 (American Type Culture Collection);
- pożywka Eagle'a- Dulbecco (DMEM, PAN-Biotech);
- 2mM glutamina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA);
- 100j/ml penicylina (Biological Industries, USA);
- 100mg/ml streptomycyna (Biological Industries, USA);
- bromek 3- (4,5- dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-1-tetrazol (Sigma Aldrich);
- glicyna (Sigma Aldrich);
- diwodorofosforanu potasu; roztwór buforowy o pH=4,01 (HI7004) (Hanna Instruments Inc., Woodsocket RI, USA);
- roztwór buforowy (pH=7,01) (HI7007) (Hanna Instruments Inc., Woodsocket RI, USA);
- 7mM roztwór wodny 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) kwas (ABTS) (Sigma Aldrich);
- roztwór nadsiarczanu potasu ($K_2S_2O_8$) (Sigma Aldrich);
- 0,2mM roztwór 2,2- difenilo-1-pikrylohydrazolu (DPPH) (Sigma Aldrich).

8.2 Aparatura:

- płytki aluminiowe pokryte żel krzemionkowym (25 DC-Alufohlen Kieselgel 60F254, Merck);
- lampa UV (254nm) (neoLab);
- wyparka rotacyjna (IKA);
- mieszadło magnetyczne (IKA);
- aparat Puri Flash 430 z kolumną 50µm (SiHP, 12g Interchim);
- spektrometr Bruker Avance III 600MHz (Bruker);

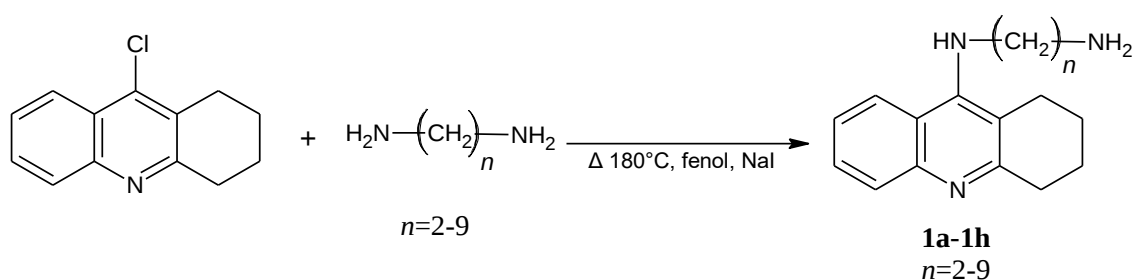
- aparat do pomiaru temperatury topnienia (MERAZET, Polska);
- aparat do pomiaru widma IR – Thermo Scientific Nicolet 6700, wyposażony w transformatę Fouriera z adapterem ITR (Madison, Wisconsin, USA);
- aparat do pomiaru widm masowych – Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS G6520B (Agilent Technologies, Santa Clara, USA);
- aparat do pomiaru absorbancji (TECAN, Infinite M200 Austria);
- pH-metr (Mettler Toledo FireEasy) z elektrodą laboratoryjną pH (LE438, Mettler Toledo);
- spektrofotometryczny czytnik mikropłytek (Synergy H1, BioTek).

8.3 Synteza

Przebieg przeprowadzanych reakcji syntezy kontrolowano przy użyciu cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC). Próbki badanych substancji nanoszono na płytki aluminiowe pokryte żelalem krzemionkowym (25 DC-Alufolien Kieselgel 60F254, Merck) i rozwijano w eluentach o składzie – chloroform/metanol (w stosunku 9:1) oraz chloroform/metanol/amoniak (w stosunku 10:3:0,25). Rozwinięte płytki obserwowano pod lampą UV (254nm). Rozpuszczalniki z mieszanin poreakcyjnych usuwano pod ciśnieniem przy pomocy wyparki z mieszałem magnetycznym. Otrzymane produkty oczyszczano za pomocą chromatografii typu „Flash” (aparat PuriFlash 430, kolumna 50µm SiHP, 12g Interchim). Dla otrzymanych związków **2a-2h** i **3a-3h** określono temperatury topnienia oraz obliczono wydajność przeprowadzonych reakcji. Widma IR związków **2a-2h** i **3a-3h** zarejestrowano metodą ATR (metoda osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia, ang. Attenuated Total Reflection) z użyciem aparatu Thermo Scientific Nicolet 6700, wyposażonym w transformatę Fouriera z adapterem ITR (Madison, Wisconsin USA). Widma masowe zsyntezowanych związków uzyskano przy pomocy aparatu Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS G6520B (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Widma ¹H NMR uzyskano za pomocą spektrometru Bruker Avance III 600 MHz. Jako wzorzec w określaniu widma ¹H NMR zastosowano tetrametylosilan.

Reakcję syntezy związków **1a-1h** przedstawiono na **Schemacie 6 s. 66**. Przygotowano roztwór 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroakrydyny w fenolu i dodano NaI jako katalizatora. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano odpowiednią diaminę i reakcję prowadzono przez 2 godz. w temperaturze 180°C, z użyciem chłodnicy zwrotnej

i mieszadła magnetycznego. Ilości użytych do reakcji reagentów zestawiono w Tabeli 1 s. 66. Otrzymany produkt reakcji, schłodzony i rozpuszczono w 25ml octanu etylu, a następnie oczyszczono poprzez ekstrakcję (trzykrotnie z 30ml 10% roztworem KOH oraz jednokrotnie z 30ml nasyconego roztworu NaCl). W celu usunięcia wody, do roztworu otrzymanego po ekstrakcji dodano bezwodnego $MgSO_4$, który usunięto po kilku minutach poprzez sączenie. Przesącz zatężono z użyciem wyparki, otrzymując produkt w postaci gęstej, oleistej cieczy. Metodę syntezy oraz parametry fizykochemiczne otrzymanych pochodnych tetrahydroakrydyny opisał Rangappa S. Keri i wsp. [51].

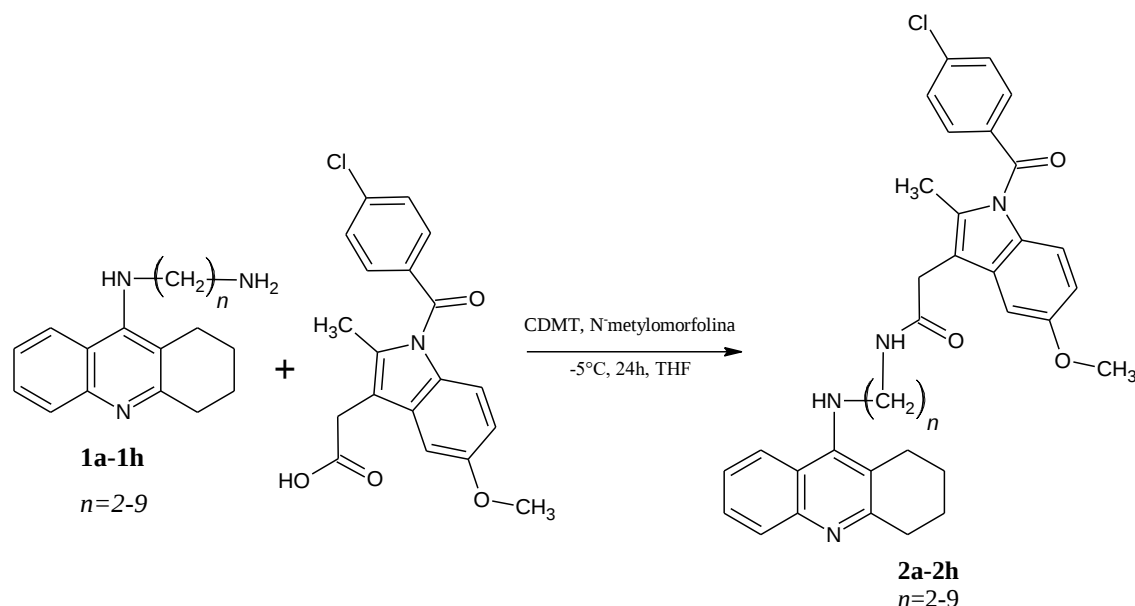


Schemat 6. Reakcja syntezy związków **1a-1h**.

Symbol związku	Chloro-akrydyna (ilość użyta do reakcji)	Fenol	NaI	Diamina (ilość użyta do reakcji)
1a	0,51g; 2,34mmol	1,50g; 15,94mmol	0,08g; 0,54mmol	1,2-diaminoetan 1,5ml; 22,44mmol
1b	0,51g; 2,34mmol	1,50g; 15,94mmol	0,08g; 0,54mmol	1,3-diaminopropan 1,5ml; 17,97mmol
1c	0,51g; 2,34mmol	1,50g; 15,94mmol	0,08g; 0,54mmol	1,4-diaminobutan 2ml; 19,90mmol
1d	0,51g; 2,34mmol	1,50g; 15,94mmol	0,08g; 0,54mmol	1,5-diaminopentan 2ml; 17,09mmol
1e	0,51g; 2,34mmol	1,50g; 15,94mmol	0,08g; 0,54mmol	1,6-diaminoheksan 1,5g; 12,91mmol
1f	0,51g; 2,34mmol	1,50g; 15,94mmol	0,08g; 0,54mmol	1,7-diaminoheptanu 3,50ml; 23,11mmol
1g	0,51g; 2,34mmol	1,50g; 15,94mmol	0,08g; 0,54mmol	1,8-diaminooktan 1,68g; 11,65mmol
1h	0,51g; 2,34mmol	1,50g; 15,94mmol	0,08g; 0,54mmol	1,9-diaminononan 1,70g; 10,53mmol

Tabela 1. Ilość reagentów wykorzystanych do syntezy związków **1a-1h**.

Reakcję syntezy związków **2a-2h** przedstawiono na **Schemacie 7**. Do kolby z tetrahydrofuranem (10ml; THF) dodano 2-chloro-4,6-dimetylo-1,3,5-triazynę (0,06g; 0,34mmol;) i mieszano do momentu uzyskania klarownego, bezbarwnego roztworu, do którego następnie dodano 2-[1-(4-chlorobenzoilo)-5-metoksy-2-metylindol-3-yl]octowy kwas (indometacynę) (0,12g; 0,34mmol) oraz N-metylomorfolinę (0,04ml; 0,36mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze -5°C przez 3 godz. z użyciem mieszadła magnetycznego. Uzyskano mętny roztwór koloru jasnożółtego. W drugim naczyniu w tetrahydrofuranie (3ml; THF) rozpuszczono odpowiednią diaminową pochodną akrydyny uzyskaną w pierwszym etapie reakcji (**1a-1h**). Oba roztwory połączono. Reakcję prowadzono przez 24 godz. w temperaturze -5°C z użyciem mieszadła magnetycznego.



Schemat 7. Reakcja syntezy związków **2a-2h**.

Otrzymane w wyniku syntezy związki (**2a-2h**), oczyszczono metodą chromatograficzną przy pomocy aparatu Puri Flash 430, osuszono i wykonano pomiary widm FTIR (ATR), MS (ESI), ¹H NMR oraz temperatury topnienia. W celu przygotowania próbek do badania widma ¹H NMR, otrzymane substancje chloroformie przeprowadzono w chlorowodorki. Obliczono wydajność reakcji. Otrzymane wyniki przedstawiono w **Tabeli 2 s. 68-70**.

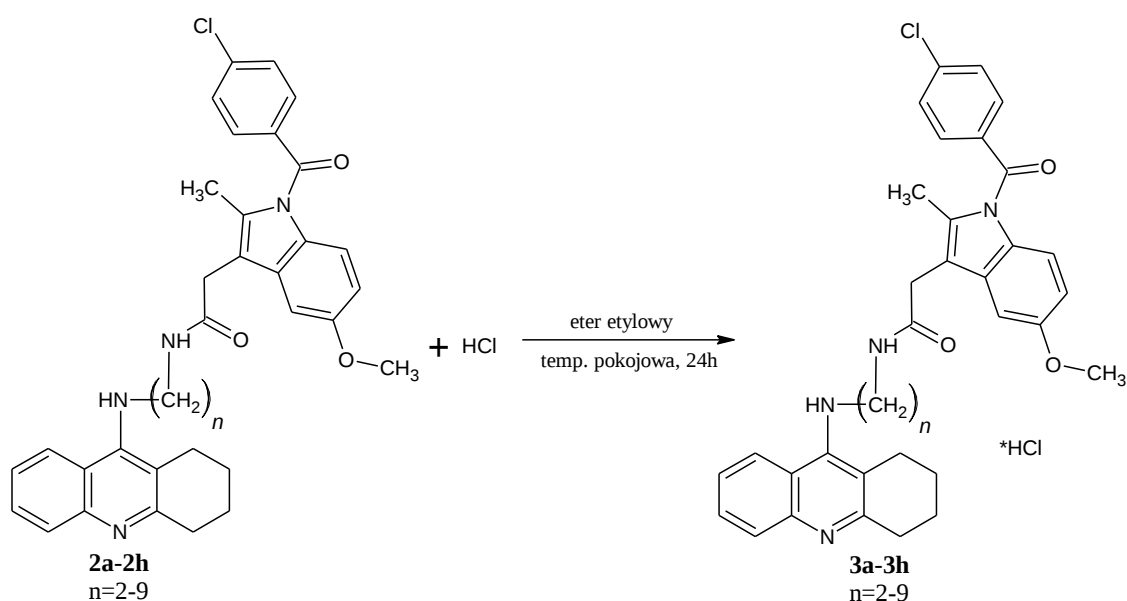
Symbol związku	Diamina, pochodna akrydyny		Wydajność reakcji, postać, temperatura topnienia	FTIR (ATR) ν (cm^{-1}):	MS (ESI) m/z (M+1)	^1H NMR (600 MHz, Chloroform- <i>d</i>)
	Symbol związku	Ilość użyta do reakcji				
2a	1a	0,08g; 0,33mmol	12,58% pomarańczowy osad, 163-165°C	749,6, 1224,1, 1324,1, 1475,2, 1588,8, 2939,6, 3184,8;	581,2, 199,1, 143,0;	δ 8,27 (1H, d, J = 8,4 Hz, Ar), 8,11 (1H, d, J = 8,8 Hz, Ar), 7,67–7,71 (2H, m, Ar), 7,44–7,49 (3H, m, Ar), 7,25 (1H, t, J = 7,9 Hz, Ar), 7,03 (1H, s, Ar), 6,87 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,60–6,63 (1H, m, Ar), 4,07–4,10 (2H, m, H2), 4,06 (3H, s, H2), 3,78 (3H, s, H2), 3,75 (2H, q, J = 5,8 Hz, H2), 3,52 (1H, s, CH2), 3,14 (2H, t, J = 6,0 Hz, H2), 2,48 (1H, t, J = 5,9 Hz, H2), 1,72–1,81 (4H, m, CH2);
2b	1b	0,27 g; 1,06mmol	82,64% beżowy osad, 143–145°C	753,6, 1227,7, 1313,8, 1477,5, 1570,4, 2937,9, 3230,2;	595,2, 199,1, 143,0;	δ 8,49 (1H, d, J = 8,3 Hz, Ar), 8,18 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar), 7,66–7,72 (3H, m, Ar), 7,49–7,52 (2H, m, Ar), 7,44 (1H, t, J = 8,1 Hz, Ar), 7,00 (1H, s, Ar), 6,86 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,70 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,85–3,89 (2H, m, H2), 3,82 (3H, s, H2), 3,78 (3H, s, H2), 3,52 (1H, s, CH2), 3,46 (2H, q, J = 6,3 Hz, H2), 3,31 (2H, t, J = 6,3 Hz, H2), 2,77 (2H, t, J = 6,2 Hz, H2), 1,86–1,98 (6H, m, CH2);
2c	1c	0,12 g; 0,45 mmol	37,33% żółty osad, 132–134°C	754,1, 1224,2, 1323,5, 1474,6, 1573,8, 2938,7, 3238,8	609,3, 199,1, 143,0;	δ 8,45 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar), 8,15 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar), 7,64–7,71 (3H, m, Ar), 7,49–7,52 (2H, m, Ar), 7,43 (1H, t, J = 7,5 Hz, Ar), 6,98 (1H, s, Ar), 6,86 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,67 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,87–3,92 (2H, m, H2), 3,79 (3H, s, H2), 3,71 (3H, s, H2), 3,52 (1H, s, H2), 3,34 (2H, q, J = 6,6 Hz, H2), 3,27 (2H, t, J = 6,2 Hz, H2), 2,61 (2H, t, J = 6,1 Hz, H2), 1,78–1,95 (6H, m, CH2), 1,62–1,69 (2H, m, CH2);

2d	1d	0,23 g; 0,81 mmol	42,98% żółty osad, 134–136°C	754,1, 1224,2, 1323,7, 1474,5, 1569,7, 2937,4, 3238,2;	623,3, 199,1, 143,0;	δ 8,54 (1H, d, J = 7,8 Hz, Ar), 8,18 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar), 7,66–7,73 (3H, m, Ar), 7,49–7,52 (2H, m, Ar), 7,45 (1H, t, J = 8,1 Hz, Ar), 6,93 (1H, s, Ar), 6,84 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,68 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,84–3,88 (2H, m, CH ₂), 3,80 (3H, s, H ₂), 3,69 (3H, s, H ₂), 3,52 (1H, s, H ₂), 3,33 (2H, t, J = 6,1 Hz, H ₂), 3,29 (2H, q, J = 6,6 Hz, H ₂), 2,62 (2H, t, J = 6,2 Hz, H ₂), 1,81–1,98 (6H, m, H ₂), 1,55 (2H, p, J = 7,0 Hz, H ₂), 1,43 (2H, p, J = 7,7 Hz, H ₂);
2e	1e	0,25 g; 0,84 mmol	15,59% brązowy osad, 145–147°C	754,2, 1224,1, 1357,5, 1474,6, 1588,3, 2932,1, 3231,6;	637,3, 308,2, 198,1, 143,0;	δ 8,54 (1H, d, J = 8,7 Hz, Ar), 8,17 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar), 7,67–7,75 (3H, m, Ar), 7,44–7,53 (2H, m, Ar), 6,93 (1H, s, Ar), 6,86 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,70 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,86 (2H, q, J = 6,5, 6,0 Hz, H ₂), 3,83 (3H, s, CH ₂), 3,68 (3H, s, H ₂), 3,52 (1H, s, H ₂), 3,34 (2H, t, J = 6,6 Hz, H ₂), 3,25 (2H, q, J = 6,8 Hz, H ₂), 2,61 (2H, t, J = 6,3 Hz, H ₂), 1,88–1,99 (4H, m, CH ₂), 1,77 (2H, p, J = 7,3 Hz, H ₂), 1,43–1,52 (4H, m, 6H), 1,30–1,35 (2H, m, H ₂);
2f	1f	0,44 g; 1,41 mmol	42,48% żółty osad, 119–121°C	753,9, 1224,5, 1325,4, 1473,8, 1576,8, 2932,1, 3231,3;	651,3, 322,2, 174,1, 143,0;	δ 8,56 (1H, d, J = 8,3 Hz, Ar), 8,16 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar), 7,68–7,74 (3H, m, Ar), 7,50–7,53 (2H, m, Ar), 7,47 (1H, t, J = 7,8 Hz, Ar), 6,92 (1H, s, Ar), 6,85–6,88 (1H, m, Ar), 6,71 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,86–3,90 (2H, m, H ₂), 3,83 (3H, s, CH ₂), 3,67 (3H, s, H ₂), 3,52 (1H, s, H ₂), 3,33–3,38 (2H, m, H ₂), 3,23 (2H, q, J = 6,8 Hz, H ₂), 2,61 (2H, t, J = 6,2 Hz, H ₂), 1,88–1,99 (4H, m, CH ₂), 1,82–1,75 (2H, m, CH ₂), 1,47–1,30 (8H, m, CH ₂);

2g	1g	0,44 g; 1,35 mmol	48,29% beżowy osad, 122–124°C	754,1, 1224,7, 1325,1, 1473,0, 1568,8, 2927,5, 3227,8;	665,3, 336,2, 174,1, 143,0;	δ 8,55 (1H, d, J = 8,5 Hz, Ar), 8,16 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar), 7,67–7,75 (3H, m, Ar), 7,49–7,53 (2H, m, Ar), 7,47 (1H, t, J = 7,7 Hz, Ar), 6,91 (1H, s, Ar), 6,87 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,71 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,87 (2H, t, J = 7,2 Hz, H2), 3,84 (3H, s, H2), 3,67 (3H, s, H2), 3,52 (1H, s, H2), 3,33–3,37 (2H, m, H2), 3,22 (2H, q, J = 6,9 Hz, H2), 2,61 (2H, t, J = 6,3 Hz, H2), 1,89–2,00 (4H, m, H2), 1,77–1,82 (2H, m, H2), 1,39–1,46 (4H, m, CH2), 1,29–1,35 (4H, m, CH2);
2h	1h	0,65 g; 1,91 mmol	17,38% brązowy osad, 96–98°C	754,3, 1219,5, 1355,1, 1471,4, 1587,44, 2926,6, 3238,1;	679,3, 350,3, 184,0, 174,1;	δ 8,56 (1H, d, J = 9,3 Hz, Ar), 8,16 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar), 7,71–7,76 (3H, m, Ar), 7,69 (1H, d, J = 8,5 Hz, Ar), 7,45–7,53 (2H, m, Ar), 6,92 (1H, s, Ar), 6,88 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,71 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,86–3,91 (2H, m, H2), 3,84 (3H, s, H2), 3,67 (3H, s, CH2), 3,52 (1H, s, CH2), 3,35 (2H, t, J = 5,8 Hz, H2), 3,21 (2H, q, J = 6,8 Hz, H2), 2,61 (2H, t, J = 6,2 Hz, H2), 1,89–2,00 (4H, m, CH2), 1,76–1,84 (2H, m, CH2), 1,56–1,64 (4H, m, H2), 1,32–1,54 (6H, m, H2);

Tabela 2, Wartości widm FTIR (ATR), MS (ESI) , ^1H NMR, temperatury topnienia związków **2a-2h** otrzymanych w wyniku syntezy oraz ilości substratów użytych do reakcji wraz z wydajnością reakcji.

Reakcję syntezy związków **3a-3h** przedstawiono na **Schemacie 8**. Związek otrzymany w drugim etapie reakcji (**2a-2h**) rozpuszczono w metanolu (1ml), a następnie dodano porcjami, w nadmiarze 1,0M roztwór chlorowodoru w eterze dietylowym (4ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej, przez 24h. Produkt reakcji (chlorowodorek) wytrącił się w postaci osadu, który wyizolowano przez dekantację i suszenie.



Schemat 8. Reakcja syntezy związków **3a-3h**.

Otrzymane w wyniku syntezy związki (**3a-3h**), osuszono i wykonano pomiary widm FTIR (ATR), MS (ESI), ^1H NMR oraz temperatury topnienia. W celu przygotowania próbek do badania widma ^1H NMR, otrzymane związki rozpuszczono w deuterowanym metanolu. Obliczono wydajność reakcji. Otrzymane wyniki przedstawiono w **Tabeli 3 s. 72-74**.

Symbol związku	Substrat		Wydajność reakcji, postać, temperatura topnienia	FTIR (ATR) ν (cm^{-1}):	MS (ESI) m/z (M+1)	^1H NMR (600 MHz, Metanol- d_4)
	Symbol związku	Ilość użyta do reakcji				
3a	2a	0,20 g; 0,34 mmol	80,77%, pomarańczowy osad, 182–184°C	757,0, 1231,4, 1323,7, 1475,2, 1578,5, 2944,1, 3215,8;	581,2, 201,0, 143,0, 81,0	δ 8,34 (1H, d, J = 8,9 Hz, Ar), 7,84 (1H, t, J = 8,2 Hz, Ar), 7,68–7,73 (3H, m, Ar), 7,57–7,61 (2H, m, Ar), 7,52 (1H, t, J = 8,4 Hz, Ar), 6,96 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,76 (1H, s, Ar), 6,56 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 4,16–4,20 (2H, m, CH ₂), 3,78 (2H, q, J = 5,9 Hz, H ₂), 3,62 (3H, s, CH ₂), 3,41 (2H, s, CH ₂), 2,85 (2H, t, J = 6,2 Hz, H ₂), 2,31–2,36 (2H, m, H ₂), 1,66–1,74 (4H, m, CH ₂);
3b	2b	0,20 g; 0,34 mmol	86,54%, beżowy osad, 160–162°C	756,1, 1230,2, 1322,7, 1474,5, 1578,1, 2942,2, 3216,3;	595,2, 199,1, 143,0;	δ 8,27 (1H, d, J = 8,5 Hz, Ar), 7,83 (1H, d, J = 7,3 Hz, Ar), 7,69–7,74 (3H, m, Ar), 7,57–7,60 (2H, m, Ar), 7,49 (1H, t, J = 8,2 Hz, Ar), 7,00 (1H, s, Ar), 6,86 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,60 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 3,87–3,90 (2H, m, CH ₂), 3,73 (3H, s, H ₂), 3,62 (1H, s, CH ₂), 3,43 (2H, q, J = 5,9 Hz, H ₂), 3,01 (1H, t, J = 5,2 Hz, H ₂), 2,66–2,69 (2H, m, H ₂), 2,03 (2H, p, J = 6,6 Hz, H ₂), 1,91–1,97 (4H, m, H ₂);
3c	2c	0,20 g; 0,33 mmol	92,31%, żółty osad, 157–159°C	756,3, 1219,7, 1323,4, 1473,8, 1576,9, 2941,4, 3223,2;	609,3, 199,1, 143,0;	δ 8,24 (1H, d, J = 8,7 Hz, Ar), 7,83 (1H, t, J = 7,7 Hz, Ar), 7,74 (1H, d, J = 9,3 Hz, Ar), 7,67–7,70 (2H, m, Ar), 7,56–7,60 (2H, m, Ar), 7,52 (1H, t, J = 8,4 Hz, Ar), 7,00 (1H, s, Ar), 6,84 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,53–6,56 (1H, m, Ar), 3,88–3,92 (2H, m, H ₂), 3,71 (3H, s, H ₂), 3,60 (1H, s, H ₂), 3,31 (2H, t, J = 6,7 Hz, H ₂), 3,01 (2H, t, J = 5,4 Hz, H ₂), 2,62 (2H, t, J = 5,3 Hz, H ₂), 1,91–1,97 (4H, m, H ₂), 1,80 (2H, p, J = 8,1, 7,7 Hz, H ₂), 1,63–1,69 (2H, m, H ₂);

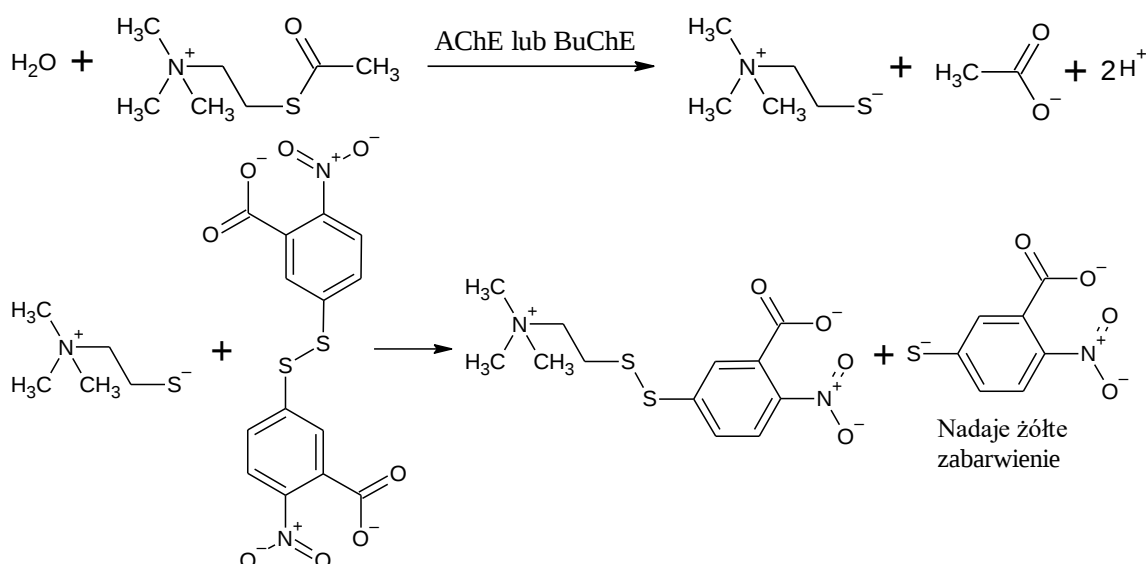
3d	2d	0,20 g; 0,32 mmol	87,50%, żółty osad, 158–160°C	754,5, 1223,8, 1323,2, 1455,4, 1587,5, 2937,7, 3207,7	623,3, 199,1, 143,0;	δ 8,33 (1H, d, J = 8,5 Hz, Ar), 7,85 (1H, t, J = 8,2 Hz, Ar), 7,75 (1H, d, J = 9,3 Hz, Ar), 7,67–7,70 (2H, m, Ar), 7,54–7,59 (3H, m, Ar), 7,03 (1H, s, Ar), 6,89 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,60 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,82–3,86 (2H, m, CH ₂), 3,77 (3H, s, H ₂), 3,61 (1H, s, CH ₂), 3,25–3,28 (2H, m, CH ₂), 3,02 (2H, t, J = 5,7 Hz, H ₂), 2,65–2,69 (2H, m, CH ₂), 2,00–1,93 (4H, m, H ₂), 1,83 (2H, p, J = 7,6 Hz, H ₂), 1,60 (2H, p, J = 7,0 Hz, H ₂), 1,42 (2H, p, J = 9,3, 8,6 Hz, H ₂);
3e	2e	0,20 g; 0,31 mmol	56,00%, brązowy osad 83–85°C	754,4, 1218,9, 1324,2, 1456,0, 1587,1, 2934,9, 3237,8	637,3, 308,2, 174,1, 143,0;	δ 8,30 (1H, d, J = 8,5 Hz, Ar), 7,82–7,87 (1H, m, Ar), 7,75 (1H, d, J = 7,7 Hz, Ar), 7,64–7,67 (2H, m, Ar), 7,54–7,58 (3H, m, Ar), 7,05 (1H, s, Ar), 6,86 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,59 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,79–3,83 (2H, m, CH ₂), 3,78 (3H, s, CH ₂), 3,61 (2H, s, H ₂), 3,24–3,28 (2H, m, H ₂), 3,02 (2H, t, J = 5,4 Hz, H ₂), 2,66 (2H, t, J = 5,1 Hz, H ₂), 1,95–2,00 (4H, m, H ₂), 1,74 (2H, p, J = 7,4 Hz, H ₂), 1,55 (2H, p, J = 7,0 Hz, H ₂), 1,40–1,46 (2H, m, H ₂), 1,38–1,31 (2H, m, H ₂);
3f	2f	0,20 g; 0,31 mmol	72,00%, żółty osad 150–152°C	754,5, 1224,4, 1323,5, 1456,1, 1587,5, 2931,3, 3207,8	651,3, 322,2, 174,1, 139,0	δ 8,36 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar), 7,86 (1H, t, J = 7,7 Hz, Ar), 7,76 (1H, d, J = 9,3 Hz, Ar), 7,67–7,70 (2H, m, Ar), 7,55–7,60 (3H, m, Ar), 7,04 (1H, s, Ar), 6,89–6,92 (1H, m, Ar), 6,63 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,87–3,91 (2H, m, H ₂), 3,80 (3H, s, H ₂), 3,61 (2H, s, H ₂), 3,21–3,25 (2H, m, H ₂), 3,03 (2H, t, J = 5,6 Hz, H ₂), 2,69 (2H, t, J = 5,3 Hz, H ₂), 1,95–2,00 (4H, m, H ₂), 1,77 (2H, p, J = 7,5 Hz, H ₂), 1,52 (2H, p, J = 6,9 Hz, H ₂), 1,27–1,39 (6H, m, H ₂);

3g	2g	0,20 g; 0,30 mmol	83,33% beżowy osad 146–148°C	754,3, 1222,6, 1319,9, 1455,9, 1588,0, 2926,5, 3207,1	665,3, 336,2, 174,1, 143,0	δ 8,37 (1H, d, J = 8,7 Hz, Ar), 7,86 (1H, t, J = 7,7 Hz, Ar), 7,76 (1H, d, J = 8,5 Hz, Ar), 7,66–7,70 (2H, m, Ar), 7,55–7,60 (3H, m, Ar), 7,04 (1H, s, Ar), 6,91 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,64 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,87–3,91 (2H, m, CH ₂), 3,80 (3H, s, H ₂), 3,61 (2H, s, CH ₂), 3,20–3,24 (2H, m, CH ₂), 3,02 (2H, t, J = 5,8 Hz, H ₂), 2,69 (2H, t, J = 5,4 Hz, 2H), 1,93–2,01 (4H, m, H ₂), 1,79 (2H, p, J = 7,6 Hz, H ₂), 1,51 (2H, p, J = 6,5 Hz, H ₂), 1,25–1,41 (8H, m, H ₂);
3h	2h	0,20 g; 0,29 mmol	56,52%, brązowy osad, 146–148°C	753,9, 1218,7, 1397,6, 1468,6, 1601,7	679,3, 174,1, 167,0	δ 8,38 (1H, d, J = 8,4 Hz, Ar), 7,86 (1H, t, J = 7,7 Hz, Ar), 7,76 (1H, d, J = 9,3 Hz, Ar), 7,67–7,71 (2H, m, Ar), 7,55–7,62 (3H, m, Ar), 7,04 (1H, s, Ar), 6,94 (1H, d, J = 9,0 Hz, Ar), 6,65 (1H, d, J = 11,5 Hz, Ar), 3,90–3,94 (2H, m, CH ₂), 3,81 (3H, s, H ₂), 3,61 (2H, s, CH ₂), 3,20–3,24 (2H, m, CH ₂), 3,02 (2H, t, J = 5,9 Hz, H ₂), 2,70 (2H, t, J = 5,7 Hz, H ₂), 1,94–2,02 (4H, m, H ₂), 1,80 (2H, p, J = 7,4 Hz, H ₂), 1,50 (2H, p, J = 6,8 Hz, H ₂), 1,27–1,43 (10H, m, CH ₂);

Tabela 3. Wartości widm FTIR (ATR), MS (ESI), ¹H NMR, temperatury topnienia związków **3a-3h** otrzymanych w wyniku syntezy oraz ilości substratów użytych do reakcji wraz z wydajnością reakcji

8.4 Badanie *in vitro* aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków (3a- 3h) wobec cholinesteraz AChE i BuChE.

Aktywność inhibicyjną otrzymanych chlorowodorków **3a-3h** wobec AChE oraz BuChE zbadano przy pomocy zmodyfikowanej metody Ellman'a. Wykorzystany do jej przeprowadzenia substrat, acetylotiocholina, ulega hydrolizie pod wpływem cholinesterazy (AChE lub BuChE), której aktywność jest badana. Powstająca w wyniku reakcji tiocholina reaguje z kwasem 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowym (DTNB), który stanowi reagent tiolowy. Produktem tej reakcji jest anion kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego (TNB), który barwi mieszaninę reakcyjną na kolor żółty. Reakcję chemiczną będącą podstawą metody Ellman'a badania aktywności inhibicyjnej przedstawiono na **Schemacie 9**. Ocena intensywności zabarwienia pozwala na określenie w jakim stopniu zaszła hydroliza acetylotiocholiny co pozwala na określenie aktywności badanej cholinesterazy oraz jej inhibicji przez testowany związek. Z wykorzystaniem spektroskopu UV- VIS mierzona jest absorpcja, a pomiar dokonywany jest przy długości fali 412nm. Wyniki badań przedstawiane są za pomocą wartości IC₅₀, która odpowiada stężeniu związku o właściwościach inhibicyjnych, powodującemu spadek aktywności enzymu do 50% [90].



Schemat 9. Reakcja chemiczna odczynników wykorzystywanych w ocenie aktywności inhibicyjnej badanych związków metodą Ellman'a [90].

Metoda Ellman'a charakteryzuje się dużą czułością i pozwala na pomiar aktywności enzymu w małej ilości materiału (tkanki, komórki) lub przy bardzo niskim

jego stężeniu. Metoda pozwala również na określenie kinetyki aktywności enzymu [89 - 91].

Aktywność inhibicyjną badanych związków porównano z aktywnością związków wzorcowych tj. znanych inhibitorów AChE – takryny i donepezilu, poprzez porównanie wartości IC_{50} . W celu wykonania badania przygotowano mieszaninę złożoną z roztworu kwasu ditiobis-(2-nitro)-benzoesowego (0,4mg/ml), roztworu AChE (2 U/ml, *Electrophorus electricus*, EC 3.1.1.7; Sigma-Aldrich) lub BuChE (4 U/ml, *Equus caballus*, EC 3.1.1.8; Sigma-Aldrich) oraz roztworów badanego związku o różnych stężeniach (0,0001-10 μ M). Jako rozpuszczalnika do przygotowania powyższych roztworów użyto PBS o pH=8,0. W celu zapoczątkowania reakcji do mieszaniny reakcyjnej dodano roztworu jodku acetylotiocholiny (AChI, 1mM). W próbie kontrolnej zamiast związku badanego użyto PBS (pH=8,0). Do pomiaru absorbancji tła użyto próbki, w której związek badany oraz jodek acetylotiocholiny zastąpiono używając PBS (pH=8,0). Próbkę z mieszaniną reakcyjną inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dokonano pomiaru spektrofotometrycznego zmian absorbancji przy długości fali 412nm (spektrofotometr Synergy H1, Bio-Tek). Badanie przeprowadzono trzykrotnie w trzech powtórzeniach dla każdego badanego związku. Z otrzymanych wartości absorbancji obliczono wartości średnie. Na podstawie uzyskanych średnich wartości absorbancji wyznaczono wartość IC_{50} dla badanych związków oraz związków wzorcowych [89-91].

8.5 Badanie kinetyki reakcji inhibicji AChE przez wybrany związek o najwyższej aktywności wobec enzymu.

Spośród badanych związków wybrano taki, który wykazywał najwyższą aktywność inhibicyjną wobec AChE (najniższe wartości IC_{50}) – posłużył on do scharakteryzowania kinetyki reakcji inhibicji obu cholinesteraz.. Przygotowano mieszaninę reakcyjną złożoną z jodku acetylotiocholiny (substratu) w różnych stężeniach (50-350 μ M), badanego związku w czterech różnych stężeniach dla AChE (4, 7, 14, 21 nM) oraz trzech dla BuChE (28, 42, 56 nM), roztworu kwasu ditiobis-(2-nitro)-benzoesowego (0,4 mg/ml), roztworu AChE (2 U/ml, *Electrophorus electricus*, EC 3.1.1.7; Sigma-Aldrich) lub BuChE (4 U/ml, *Equus caballus*, EC 3.1.1.8; Sigma Aldrich). W próbce kontrolnej roztwór badanego związku (inhibitora) zastąpiono używając PBS (pH=8,0). Absorbancję tła zmierzono z wykorzystaniem próbki, w której

roztwór substratu oraz inhibitora zastąpiono używając PBS (pH=8,0). Absorbancję przy długości fali 412nm mierzono w spektrofotometrze (Synergy H1, Bio-Tek), odczytu dokonując co 1 minutę. Otrzymane wyniki posłużyły do stworzenia wykresu (Lineweaver'a-Burk'a) zależności odwrotności szybkości reakcji od odwrotności stężenia substratu ($1/V$ vs $1/[S]$). Na podstawie otrzymanych wyników obliczono wartości K_m i V_{max} oraz określono typ inhibicji enzymu [89, 92].

8.6 Badanie wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek, prowadzone na linii komórkowej HepG2

Badania przeżywalności komórek przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej ludzkich komórek raka wątrobowokomórkowego HepG2 (Health Protection Agency Culture Collections, ECACC, Salisbury, UK). Wykorzystanie do badania linii komórkowej HepG2 pozwala na odtworzenie szlaków metabolicznych zachodzących w organizmie ludzkim, w których udział będzie mieć badana substancja [93]. W hodowli komórek zastosowano pożywkę Eagle'a MEM (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), wzbogaconą 10% płodową surowicą bydlęcą z roztworem aminokwasów (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) oraz 1% roztworem L-glutaminy (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Hodowlę komórkową utrzymywano w wilgotnym środowisku w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Pożywkę (medium) wymieniano co 2-3dni. W trakcie pasażowania komórki płukano PBS i inkubowano 5-7 minut w 1 ml 0,05% roztworze trypsyny-EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) w temperaturze 37°C. W procesie oceny toksycznego działania badanych związków, komórki HepG2 podzielono na dwie grupy, z których jedna podlegała ekspozycji na badany związek, a druga stanowiła grupę kontrolną.

Komórki umieszczono na 96-dołkowej płytce z zachowaniem gęstości około 10000 komórek na dołek. Przygotowano roztwór badanego związku w DMSO, a następnie rozcieńczono do wymaganego zakresu stężeń (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0μM). Płytkę z komórkami inkubowano 24 godziny, po tym czasie dodano roztwory badanego związku, w wymienionych powyżej stężeniach, w ilości 1μl. Badanie wykonano w trzech powtórzeniach. Wykonano również badanie w trzech powtórzeniach 100% przeżywalności komórek dodając do każdego dołka 1μl DMSO, 0% przeżywalności komórek dodając 10μl DMSO oraz kontrolę nośnika. Komórki inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Następnie do

każdego dołka dodano 20µl odczynnika CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96, PROMEGA, Fitchburg, USA) i inkubowano przez 80 minut. Po tym czasie dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 490nm (TECAN, Infinite M200 Austria). Wartość IC₅₀ badanego związku obliczono z zastosowaniem nieliniowej regresji z wykresu półlogarytmicznego zależności stężenia od procentu absorbancji względem komórek kontrolnych. Parametry statystyczne (średnie i odchylenia standardowe) obliczono z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism (wersja 6).

8.7 Badanie wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek, prowadzone na linii komórkowej EA.hy926

Do oceny wpływu badanego związku na przeżywalność komórek, przeprowadzono badanie z wykorzystaniem linii komórkowej EA.hy926 (American Type Culture Collection). Komórki tej linii pochodzą z ludzkiej żyły pępowinowej, przy czym zostały one pozbawione zdolności apoptozy (naturalnej zaprogramowanej śmierci). Posiadają one te same cechy morfologiczne, fenotypowe oraz czynnościowe co komórki żywego organizmu i stanowią one ogólnie przyjęty model do przesiewowych badań nowo powstających leków. Śródbłonek naczyń krwionośnych (w tym naczyń żylnych) stanowi naturalną barierę pomiędzy krwią a innymi tkankami organizmu, bierze udział w procesie krzepnięcia krwi oraz w odpowiedzi immunologicznej. Śródbłonek naczyniowy podatny jest na działanie różnych czynników chemicznych jak i patofizjologicznych np. związanych z przewlekłym stanem zapalnym, pod wpływem których, ulega uszkodzeniu oraz traci swoją integralność. Hodowlę komórek prowadzono na zmodyfikowanej pożywce Eagle'a – Dulbecco (DMEM) (PAN-Biotech), zawierającej 10% płodowej surowicy bydlęcej (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 2mM glutaminy (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) oraz 100 j./ml penicyliny (Biological Industries, USA) i 100mg/ml streptomycyny (Biological Industries, USA). Komórki pasażowano i inkubowano w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂ przed przystąpieniem do badania.

W celu określenia aktywności metabolicznej komórek oraz ich przeżywalności w warunkach ekspozycji na badany związek wykonano test MTT. Polega on na wykorzystaniu rozpuszczalnego w wodzie bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu, który redukowany jest przez enzymatycznie aktywne mitochondria do

nierozpuszczalnego formazanu wytrącającego się w postaci niebiesko-fioletowych kryształów. Na płytce 96-dołkowej umieszczono komórki z zachowaniem gęstości 104 komórek/dołek. Płytkę z komórkami inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie podłoże w każdym dołku zastąpiono 100µl roztworem badanego związku w stężeniu 1-35µM. W „ślepej próbie” stare podłoże wymieniono na nowe, również w objętości 100µl. Następnie płytkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂. Podłoże oraz roztwór badanego związku w każdym dołku całkowicie usunięto i dodano 50µl roztworu MTT o stężeniu 0,75mg/ml. Płytkę inkubowano bez dostępu światła przez 2 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Z każdego dołka usunięto roztwór MTT i dodano 100µl DMSO w celu rozpuszczenia kryształów formazanu i pozostawiono na 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym do każdego dołka dodano 5µl glicynowego bufora Sorensona o pH=10,5 złożonym z 0,1M glicyny oraz 0,1M NaCl. Płytkę pozostawiono w temperaturze pokojowej na 5 minut i wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 570nm (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, USA). Przeżywalność komórek wyrażono procentowo w stosunku do próby kontrolnej („ślepej próby”) [94-96].

8.8 Wyznaczenie punktu pKa dla wybranego, najbardziej aktywnego związku

Do wyznaczenia wartości pKa badanego związku, wykorzystano metodę opracowaną przez Musil’a i wsp. Przygotowano roztwór bufora złożony z diwodorofosforanu potasu, wodorotlenku potasu oraz metanolu. Do przygotowania podstawowego buforu fosforanowego użyto 500ml 0,02M roztworu diwodorofosforanu potasu, do którego dodano 500ml metanolu. Z uzyskanej mieszaniny przygotowano 35 buforów roboczych, poprzez miareczkowanie podstawowego buforu fosforanowego 0,1M roztworem wodorotlenku potasu rozpuszczonym w mieszaninie metanol/woda (1:1). Zakres pH buforów roboczych ustawiono od pH=5,6 do pH=12,4, ze wzrostem co 0,2 w każdej kolejnej próbce. Pomiaru pH buforów dokonano w temperaturze pokojowej przy użyciu pH-metru (Mettler Toledo FiveEasy) z elektrodą laboratoryjną pH (LE438, Mettler Toledo). Kalibrację pH-metru dokonano z użyciem roztworu buforowego o pH=4,01 (HI7004) oraz pH=7,01 (HI7007) (Hanna instruments Inc., Woodsocket RI, USA). Przygotowano roztwór badanego związku o stężeniu 5µM

w mieszaninie metanol/woda (1:1). Do przeprowadzenia pomiaru spektrofotometrycznego użyto płytki 96-dołkowej, czytnika mikropłetek (Synergy H1, BioTek) oraz oprogramowania Gen5 (BioTek). Dla każdego roboczego roztworu buforowego wykonano pomiar widma UV – łącznie pomiar przeprowadzono dla 35 próbek umieszczonych na płytce 96-dołkowej. W celu wykonania pomiaru w 35 dołkach umieszczono 180µl buforu roboczego oraz 20µl roztworu badanego związku. W badaniu „ślepej próby” w 35 dołkach umieszczono wyłącznie po 200µl roztworu buforu roboczego. Pomiar przeprowadzono w temperaturze 23°C, w zakresie widm 280-380nm. Długość fali zwiększano co 1nm. Uzyskane widma dla badanego związku odjęto od widm uzyskanych w „ślepej próbie”. Do dalszej analizy wybrano widma uzyskane z pomiaru przy długości fali 310nm oraz 336nm. Wszystkie obliczenia wykonano z użyciem stosunku 310/336nm oraz 336/310nm. Wartości pKa obliczono dla obu stosunków oraz wyciągnięto z nich średnią, którą przyjęto za ostateczną wartość pKa. Uzyskane wyniki porównano z wartością pKa, uzyskaną w toku obliczeń przeprowadzonych przy pomocy oprogramowania chemicalize.com (ChemAxon 2018) [97].

8.9 Badanie aktywności antyoksydacyjnej otrzymanych związków (3a-3h) metodą ABTS i DPPH

Aktywność antyoksydacyjna badanych związków została zbadana z wykorzystaniem dwóch metod, z wykorzystaniem związków o charakterze wolnych rodników. W pierwszej metodzie 5ml roztworu wodnego 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy kwas) (ABTS) (7mM) zmieszano z 88µl roztworem nadsiarczanu potasu ($K_2S_2O_8$, 140mM, końcowe stężenie wynosiło 2,45mM) w celu uzyskania kationowej formy $ABTS^{•+}$. Mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 16 godzin, bez dostępu do światła. ABTS i $K_2S_2O_8$ reagują ze sobą stechiometrycznie w stosunku 2:1, dlatego też mieszając powyższe roztwory w podanej ilości uzyskano niekompletnie utlenioną formę ABTS. Następnie $ABTS^{•+}$ rozcieńczano w metanolu do osiągnięcia wartości mierzonej absorbancji $0,7 \pm 0,02$ przy długości fali 734nm. Roztwory każdego badanego związku rozcieńczano metanolem do uzyskania stężeń od 0-15µM i mierzono spadek absorbancji bezpośrednio po rozcieńczeniu oraz po upływie 6 minut [98, 99].

W drugiej metodzie 50µl roztworów badanych związków o różnych stężeniach mieszano z równą ilością roztworu 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) (0,2mM). Próbkę inkubowano 30 minut bez dostępu światła i zmierzono absorbancję przy długości fali 517nm. Związki wykazujące aktywność antyoksydacyjną zmniejszają intensywność barwy roztworu DPPH. DPPH[•] jest stabilnym związkiem o charakterze wolnego rodnika, wykazującym absorpcję światła o długości fali 517nm. Podczas reakcji chemicznej z udziałem związków o charakterze przeciwutleniającym z DPPH[•], dochodzi do przeniesienia elektronu lub atomu wodoru z cząsteczki przeciwutleniacza do cząsteczki DPPH[•]. W wyniku reakcji DPPH[•], traci wolnorodnikowy charakter, a roztwór z mieszaniną reakcyjną zmienia barwę z fioletowej na żółtą, a poziom absorbancji wykazywanej przez DPPH[•] spada. Potencjał działania antyoksydacyjnego badanego związku określa się poprzez pomiar zmiany absorbancji mieszaniny reakcyjnej (wizualnie obserwowany jako intensywność zmiany barwy roztworu) [29, 100, 101].

Do przeprowadzenia badania wykorzystano płytki 96-dółkowe oraz czytnik mikroplatek (Synergy H1, BioTek). Pomiarów wykonano w trzech powtórzeniach. W każdym z pomiarów wykonano próbę kontrolną, a jako związki wzorcowe użyto kwas 6-hydrokso-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksylowy (Trolox – rozpuszczalna w wodzie pochodna witaminy E, wykazuje silne działanie antyoksydacyjne [7]), kontrolę pozytywną oraz takrynę i indometacynę, jako kontrolę negatywną, ponieważ związki te pozbawione są aktywności antyoksydacyjnej (brak zdolności wychwytu wolnych rodników). Uzyskane wyniki porównano z odnośnikami. Stężenia związków, przy których inhibicja wynosiła 50% (FRS₅₀) obliczono z wykorzystaniem wykresu graficznego i przedstawiono jako procent inhibicji względem stężenia badanego związku.

8.10 Modelowanie molekularne

Badania określające miejsce wiązania (dokowanie) badanych związków z cholinoesterazami wykonano z wykorzystaniem programu GoldSuite 5.1 (The Cambridge Crystallographic Data Centre). Trójwymiarowa struktura badanych związków została przygotowana przy pomocy programu Corina on-line (Molecular Networks i Altamira). Do sprawdzenia typów atomów, cząstkowych ładunków

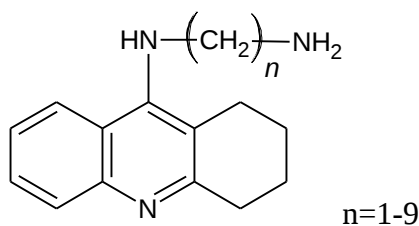
atomowych (Gasteiger'a-Marsili), dodania atomów wodoru użyto oprogramowania Sybyl X 1.1 (Tripos).

Aminokwasy (Phe330 oraz Trp279) istotne dla wiązania liganda z miejscem aktywnym acetylocholinoesterazy wykazują dużą swobodę konformacyjną, dlatego też badane ligandy zostały przyłączone do trzech struktur acetylocholinoesterazy (oznaczonych w systemie Protein Data Bank jako: 1EVE, 1ACJ, 2CKM). Do dokowania testowanych związków wybrano, jako najbardziej odpowiedni, kompleks acetylocholinoesterazy z bis-(7)-takryną (Protein Data Bank: 2CKM). Kompleks ten wykazywał największą zgodność wyników uzyskanych we wstępnych badaniach. Do badań dokowania do butyrylocholinoesterazy wybrano kompleks butyrylocholinoesterazy z maślanem (Protein Data Bank: 1P0I). Struktury enzymów przygotowano z wykorzystaniem Oprogramowania Hermes 1.7.0 – sprotonowano wszystkie reszty histydynowe w pozycji Nε, dodano wszystkie atomy wodoru, usunięto zbędne ligandy oraz cząsteczki wody. Dokowanie przeprowadzono w miejscach wiążących złożonych ze wszystkich aminokwasów w promieniu 10Å od bis-(7)-takryny dla AChE oraz 20Å od cząsteczki glicerolu obecnej w centrum aktywnym BuChE. Zastosowano standardowe ustawienia algorytmu genetycznego. Uzyskane pozycje w ilości 10/ligand posortowano według wartości GoldScore dla AChE oraz wartości ChemScore dla BuChE. Do przedstawienia rezultatów dokowania wykorzystano oprogramowanie PyMOL 0.99rc6 (DeLano Scientific LLC).

9 WYNIKI I DYSKUSJA

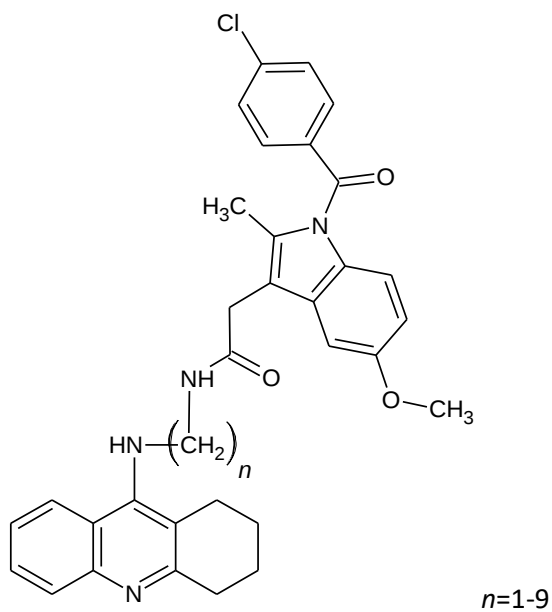
W wyniku syntezy otrzymano osiem nowych związków o aktywności inhibicyjnej wobec cholinoesteraz, będących połączeniem cząsteczki 9- chloro-1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z cząsteczką indometacyny poprzez łącznik diaminowy zawierający od dwóch do dziewięciu atomów węgla.

Reakcje łączenia cząsteczki 9- chloro-1,2,3,4-tetrahydroakrydyny z diamina prowadzono w temperaturze 180°C, w obecności fenolu jako rozpuszczalnika oraz jodku sodu jako katalizatora. Każda z ośmiu reakcji charakteryzowała się wysoką wydajnością wynoszącą ponad 90%. Uzyskane związki **1a-1h**, przedstawiono na **Ryc 11**. Związki zsyntezowano w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji, Wydziału Farmaceutycznego w Łodzi, na podstawie metody syntezy opracowanej przez Rangappa S. Keri i wsp. [51].



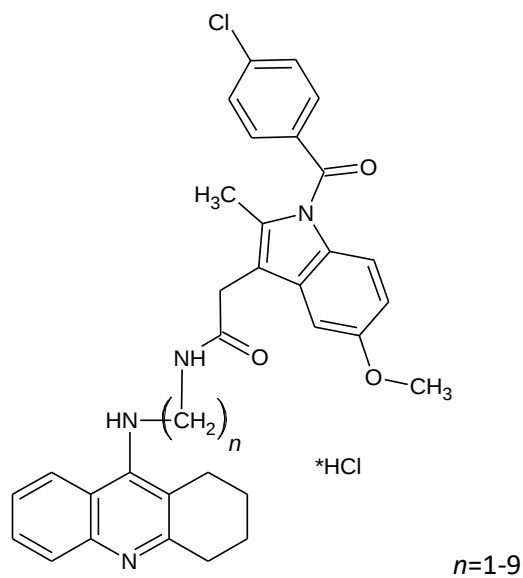
Ryc 11. Wzór ogólny związków **1a-1h**.

W kolejnym etapie syntezy związki **1a-1h** łączono z indometacyną poprzez wiązanie aminowe. Reakcje prowadzone były w obecności 2-chloro-4,6-dimetylo-1,3,5-triazyny (CDMT, karboksylowej tworząc produkt przejściowy z cząsteczką indometacyny) oraz N- metylomorfoliny. W toku syntezy każdego ze związków przygotowano dwie mieszaniny reakcyjne. Pierwszą składającą się z CDMT, indometacyny oraz N-metylomorfoliny rozpuszczonych w tetrahydrofuranie (THF) oraz drugą stanowiącą roztwór odpowiedniej aminy (**1a-1h**) w tetrahydrofuranie (THF). Obie mieszaniny połączono i prowadzono reakcję przez 24 godziny w temperaturze -5°C w wyniku czego uzyskano szereg produktów stanowiących połączenie związków **1a - 1h** z indometacyną. Otrzymane związki roboczo oznaczono symbolami **2a-2h**, a ogólny wzór chemiczny przedstawiono na **Ryc 12 s. 84**. Punkt końcowy poszczególnych reakcji syntezy określano za pomocą metody cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC). Związki **2a-2h** oczyszczono za pomocą chromatografii typu „Flash” z użyciem aparatu PuriFlash 430 (Interchem Inc).



Ryc 12. Wzór ogólny związków **2a-2h**.

W ostatnim etapie syntezy związki **2a-2h**, przeprowadzono w chlorowodorki, w celu poprawy ich rozpuszczalności. Otrzymane chlorowodorki oznaczono symbolami **3a - 3h**, a ogólny wzór chemiczny przedstawiono na **Ryc 13**.



Ryc 13. Wzór ogólny związków **3a-3h**

9.1 Badanie *in vitro* aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków (3a- 3h) wobec cholinoesteraz AChE i BuChE.

Aktywność inhibicyjną, wobec acetylocholinoesterazy oraz butyrylocholinoesterazy, uzyskanych związków **3a-3h** zmierzono z zastosowaniem metody Ellman'a. Aktywności badanych związków zostały porównane z aktywnością związków referencyjnych – dobrze znanych inhibitorów AChE tj. takryny i donepezilu. Związki **3b-3h** wykazywały wysoką aktywność inhibicyjną wobec AChE z wartościami IC_{50} od 9,50nM do 260,28nM. Związek **3a** wykazywał znacznie niższy niż pozostałe badane związki, potencjał inhibicyjny z IC_{50} równym 7078,29nM. W porównaniu do takryny, której IC_{50} wynosi 173,93nM, związki **3b-3d** oraz **3f-3h** wykazywały wyższą aktywność inhibicyjną wobec AChE w porównaniu do donepezilu, którego IC_{50} =86,98nM. Najwyższą aktywność inhibicyjną wobec AChE spośród badanych związków wykazywał związek **3h** z IC_{50} =9,50nM, posiadający w łączniku alkiloaminowym dziewięć atomów węgla, jednakże analiza wartości IC_{50} poszczególnych związków nie wykazała zależności między wydłużaniem łącznika alkiloaminowego i wzrostem aktywności inhibicyjnej związku wobec cholinesteraz. Związek **3h** wykazywał osiemnastokrotnie wyższą aktywność inhibicyjną wobec AChE niż takryna oraz dziewięciokrotnie wyższą niż donepezil, w związku z tym został wybrany do przeprowadzenia badań kinetyki reakcji inhibicji AChE.

Związek **3d**, którego IC_{50} =30,07nM, oraz **3f**, z IC_{50} =6,49nM, wykazywały wyższą aktywność inhibicyjną wobec BuChE niż takryna, której IC_{50} =32,23nM. Wszystkie badane związki **3a-3h**, z wartościami IC_{50} od 6,49nM do 334,65nM, wykazywały znacznie wyższy potencjał inhibicyjny wobec BuChE niż donepezil, którego IC_{50} =9756,53nM. Związek **3f** wykazywał pięciokrotnie wyższą aktywność inhibicyjną wobec BuChE niż takryna oraz tysiąc pięćset krotnie wyższą niż donepezil, w związku z tym został wybrany do przeprowadzenia badań kinetyki reakcji inhibicji BuChE.

Wszystkie wartości IC_{50} oraz selektywność wobec acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy badanych związków zostały przedstawione w **Tabeli 4 s. 86**.

Związek	AChE IC ₅₀ ±SD ^A (nM)	BuChE IC ₅₀ ±SD ^B (nM)	Selektywność wobec AChE ^C	Selektywność wobec BuChE ^D
3a	7085,82 ± 1355,34	288,56 ± 35,92	0,04	24,56
3b	41,60 ± 3,56	334,99 ± 32,89	8,05	0,12
3c	25,03 ± 2,02	229,20 ± 30,49	9,16	0,11
3d	61,99 ± 7,98	30,10 ± 4,19	0,49	2,06
3e	260,52 ± 6,10	245,74 ± 26,48	0,94	1,06
3f	99,09 ± 3,27	6,50 ± 0,77	0,07	15,25
3g	28,70 ± 2,37	241,24 ± 43,62	8,40	0,12
3h	9,50 ± 1,39	57,17 ± 4,34	6,02	0,17
Takryna	173,93 ± 31,15	32,23 ± 4,94	0,19	5,40
Donepezil	86,98 ± 15,41	9756,53 ± 1112,80	112,17	0,01

Tabela 4. Aktywność inhibycyjna badanych związków wobec AChE i BuChE.

A – Stężenie związku (± SD) przy, którym aktywność AChE spada do 50%.

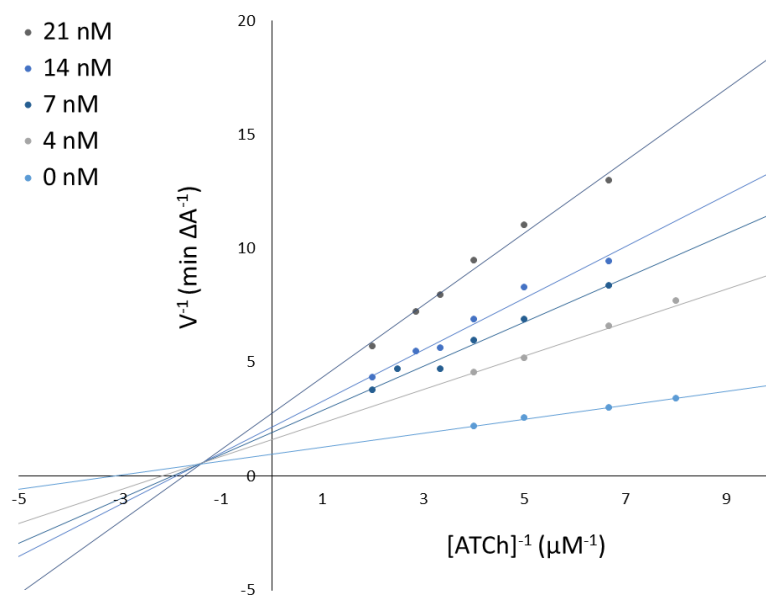
B - Stężenie związku (± SD) przy, którym aktywność BuChE spada do 50%.

C - IC₅₀(BuChE)/IC₅₀(AChE).

D - IC₅₀(AChE)/IC₅₀(BuChE).

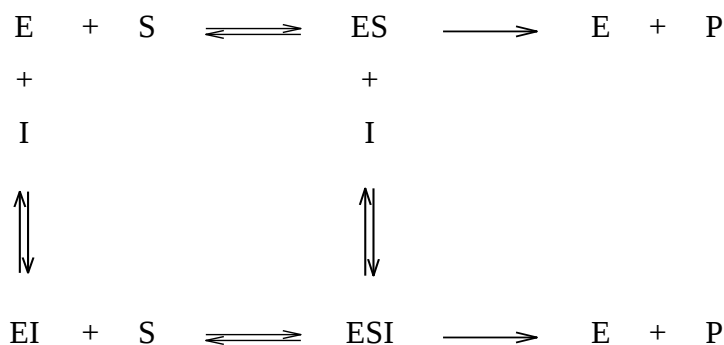
9.2 Kinetyka reakcji inhibicji AChE i BuChE przez wybrany związek

W badaniu potencjału inhibycyjnego związków **3a-3h** wobec AChE wykazano, że związek **3h** wykazywał najwyższą aktywność, z wartością IC₅₀=9,50nM. Związek **3h** wybrano do określenia charakterystyki kinetyki reakcji inhibicji AChE oraz BuChE. Zmierzono aktywność enzymu przy różnym stężeniu substratu – acetylotiocholiny (AChI). Na podstawie uzyskanych wyników dla AChE sporządzono **Wykres 1 s. 87** zależności odwróconej szybkości reakcji (1/V) od odwróconego stężenia substratu (1/[AChI]) dla różnych stężeń inhibitora - związku **3h**.

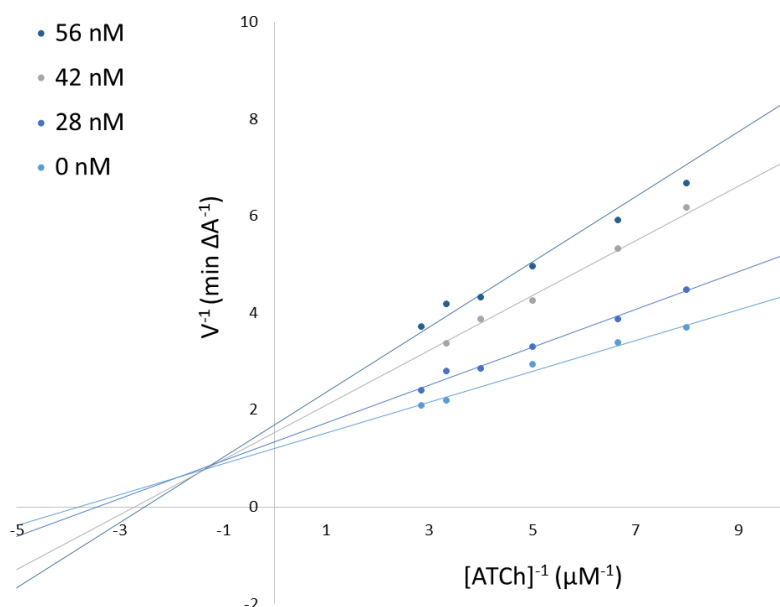


Wykres 1. Wykres Lineweaver’a-Burk’a przedstawiający mieszany typ inhibicji AChE przez badany związek **3h**.

Obliczono wartości K_m oraz V_{max} , które są zmienne dla różnych stężeń inhibitora. Wartości K_m spadają a V_{max} rosną przy wzrastającym stężeniu inhibitora. Zmienne wartości K_m i V_{max} są charakterystyczne dla mieszanego typu inhibicji, w rozpatrywanym przypadku badany związek **3h** wykazuje mieszany typ inhibicji enzymu AChE. Wykres Lineweaver’a-Burk’a dla inhibicji mieszanej charakteryzuje się tym, że linie na wykresie przecinają się poza osią odciętych (x) i rzędnych (y). Inhibicja mieszana wykazuje podobieństwo do inhibicji niekompetycyjnej, jednakże powstający w wyniku reakcji kompleks enzym-substrat-inhibitor, zachowuje ograniczoną aktywność enzymatyczną. Nie dochodzi do całkowitej inhibicji enzymu przez badany związek, a do ograniczonego spadku aktywności enzymu. Sama reakcja chemiczna (enzymatyczna) w wyniku, której powstaje produkt zachodzi wolniej. Przebieg reakcji enzymatycznej, przy udziale inhibitora, o charakterze inhibicji mieszanej przedstawiono na **Schemacie 10 s. 88**.



Schemat 10. Ogólny przebieg reakcji enzymatycznej przy udziale związku wykazującego inhibicję mieszaną wobec enzymu (E-enzym, S-substrat, I-inhibitor, P - produkt, EI- kompleks enzym-inhibitor, ESI-kompleks enzym-substrat-inhibitor, ES-kompleks enzym-substrat) [38, 102].



Wykres 2. Wykres Lineweaver’a-Burk’a przedstawiający mieszany typ inhibicji BuChE przez badany związek **3h**.

Na podstawie uzyskanych wyników dla BuChE sporządzono **Wykres 2** zależności odwróconej szybkości reakcji ($1/V$) od odwróconego stężenia substratu ($1/[AChI]$) dla różnych stężeń inhibitora - związku **3h**. Obliczono wartości K_m oraz V_{max} , które są zmienne dla różnych stężeń inhibitora. Podobnie jak w przypadku inhibicji badanego związku wobec acetylocholinoesterazy tak i inhibicja butyrylocholinoesterazy charakteryzuje się spadkiem wartości K_m i wzrostem wartości V_{max} przy wzrastającym stężeniu inhibitora. Badany związek **3h** wykazuje mieszany rodzaj inhibicji enzymu BuChE.

9.3 Badanie wpływu otrzymanych związków (3a-3h) na przeżywalność komórek, prowadzone na linii komórkowej HepG2

W celu określenia i porównania wpływu badanych związków na przeżywalność komórek, posłużono się parametrem IC_{50} . Jest to stężenie badanego związku, które powoduje obniżenie przeżywalności komórek w populacji użytej do badania do 50%, podczas gdy przeżywalność komórek w próbie kontrolnej przyjmuje się na poziomie 100%. Określone w wyniku badania wartości IC_{50} dla wszystkich związków **3a-3h** były zbliżone. Najniższą wartość IC_{50} wykazywał związek **3d** i była ona równa $4,507\mu M$, a najwyższą wartość IC_{50} wykazywał związek **3c**, dla którego wynosiła $17,49\mu M$. Badanie wykazało, że istotny wpływ na komórki wątroby HepG2, badane związki wykazywały przy stężeniach mikromolowych. Wysoką aktywność inhibicyjną wobec AChE i BuChE badane związki wykazują w stężeniach nanomolowych. Obserwacja ta wykazała wysokie bezpieczeństwo zastosowania otrzymanych związków jako potencjalnych leków w terapii choroby Alzheimera. Potencjalny lek charakteryzowałby się wysokim indeksem terapeutycznym tj. stosunkiem dawki leku, przy której lek wykazuje działanie toksyczne do dawki leku działającej leczniczo. Hybryda takryny i indometacyny nie wykazuje silnego działania hepatotoksycznego, w przeciwieństwie do samej takryny.

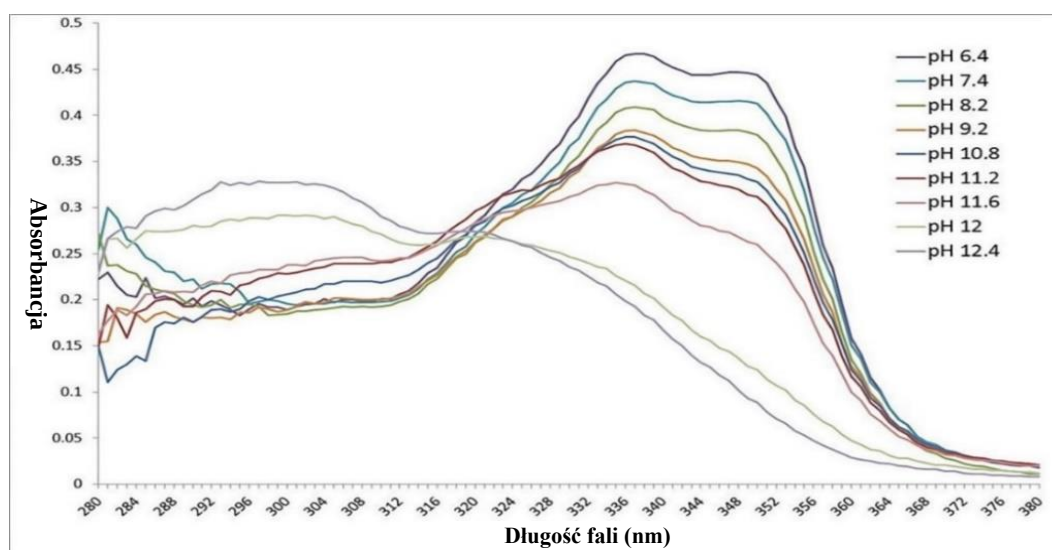
9.4 Badanie wpływu otrzymanych związków (3a-3h) na przeżywalność komórek, prowadzone na linii komórkowej EA.hy926

Do badania wpływu zsyntezowanych związków na przeżywalność ludzkich komórek śródbłonka żylnego wybrano związek **3h**. Badanie przeprowadzono na linii komórkowej EA.hy926. Podobnie jak w badaniu na linii komórkowej HepG2, również w tym przypadku określono wartość IC_{50} dla badanego związku i wynosiła ona $20,06\pm 1,64\mu M$. Związek **3h** wykazywał mniej toksyczne działanie na komórki z linii EA.hy926 niż na komórki z linii HepG2. Nie zaobserwowano znacznego uszkodzenia komórek śródbłonka żylnego pod wpływem ekspozycji na związek **3h**. Badanie wykazało, że istotne działanie toksyczne wobec komórek śródbłonka żylnego EA.hy926, podobnie jak wobec komórek wątroby HepG2, badane związki wykazywały przy stężeniach mikromolowych. Wysoką aktywność inhibicyjną wobec AChE i BuChE badane związki wykazują w stężeniach nanomolowych. Hybryda takryny i indometacyny nie wykazuje działania toksycznego wobec nabłonka naczyń

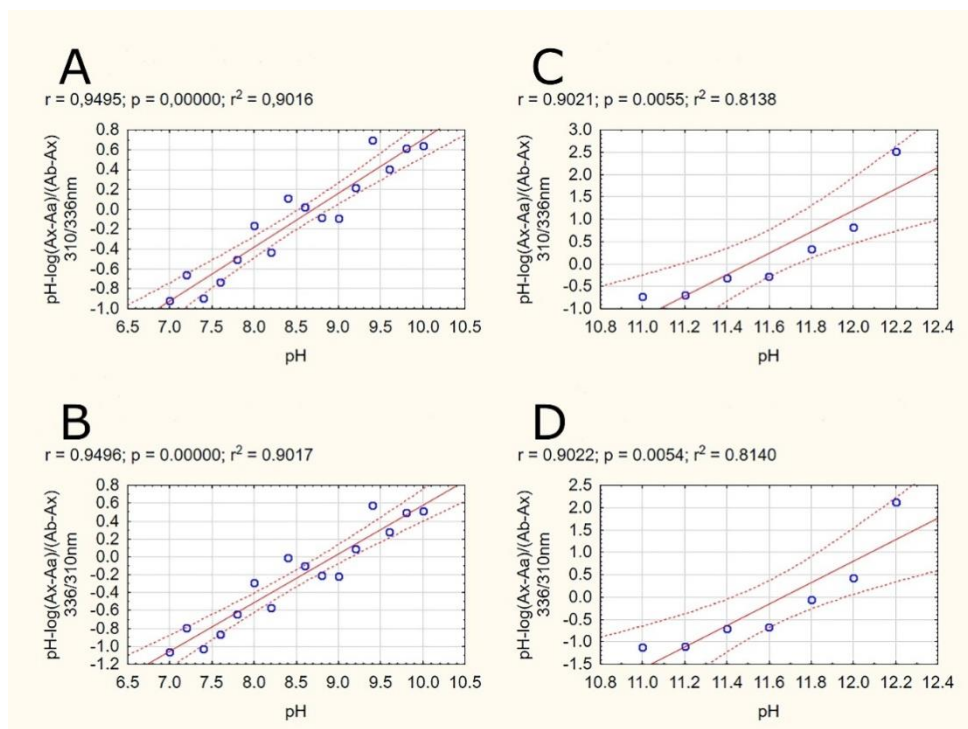
krwionośnych co może pozytywnie rokować na potencjał związków do przekraczania bariery krew-mózg.

9.5 Wyznaczanie punktu pKa dla wybranego, najbardziej aktywnego związku

Za pomocą zastosowanej metody Musil'a i wsp. określono dwie wartości pKa dla badanego związku **3h**, w zakresie pH od 5,6 do 12,4. Przeprowadzono pomiar absorbancji metodą spektrofotometryczną w zakresie światła UV, przy długości fali 280 - 380nm. Zmianę wartości absorbancji przez badany związek, w zależności od długości fali światła UV i przy różnych wartościach pH przedstawiono na **Wykresie 3**. Dla każdej zjonizowanej formy badanego związku wyznaczono specyficzne wartości pH. W celu określenia pH, przeprowadzono analizę absorbancji oraz obliczono wartości pKa. Przygotowano wykresy punktowe oraz wyznaczono linie regresji przedstawione na **Wykresie 4 s. 91**, które pozwoliły na obliczenie wartości pKa. Przeprowadzono obliczenie wartości pKa, dla badanego związku, za pomocą oprogramowania chemicalize.com (ChemAxon 2018) i porównano z wartościami uzyskanymi eksperymentalnie. Wartość pKa₁ uzyskana eksperymentalnie była zbliżona do wartości pKa (dla formy silnej zasady) uzyskanej z obliczeń komputerowych, zaś wartość pKa₂ znacznie różniła się od wartości pKa (formy silnego kwasu) uzyskanej z obliczeń z wykorzystaniem oprogramowania chemicalize.com (ChemAxon 2018). Uzyskane eksperymentalnie oraz poprzez obliczenia komputerowe wartości pKa₁, pKa₂, pKa przedstawiono w **Tabeli 5 s. 91**.



Wykres 3. Zmiana wartości absorbancji przez badany związek **3h**, w zależności od długości fali światła UV i przy różnych wartościach pH.



Wykres 4. Wykresy punktowe oraz linie regresji przygotowane na podstawie obliczeń matematycznych z wykorzystaniem wyników otrzymanych dla związku **3h**.

pKa1 310/336nm	pKa1 336/310nm	pKa1 śr.	pKa2 310/336nm	pKa2 336/310nm	pKa2 śr.	pKa silnej zasady*	pKa silnego kwasu*
8,94	8,70	8,82	11,67	11,50	11,58	8,89	15,59

Tabela 5. Wartości pKa dla badanego związku **3h** wyznaczone eksperymentalnie oraz obliczone komputerowo. *Wartości wyznaczone w programie ChemAxon.

9.6 Badanie aktywności antyoksydacyjnej otrzymanych związków **3a-3h** metodą ABTS i DPPH

Aktywność antyoksydacyjna otrzymanych związków **3a-3h** została zbadana w dwóch testach z wykorzystaniem 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy kwasu) (ABTS) oraz 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH). W celu porównania otrzymanych wyników badania przeprowadzono również z wykorzystaniem odnośników o znanej wysokiej aktywności antyoksydacyjnej lub pozbawione tej aktywności. Do wykonania kontroli pozytywnej wykorzystano kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksylowy (Trolox, rozpuszczalna w wodzie pochodna witaminy E). Kontrola negatywna została wykonana z użyciem takryny oraz

indometacyny, ponieważ związki te pozbawione są aktywności antyoksydacyjnej (brak zdolności wychwyty wolnych rodników). Otrzymane wyniki przedstawiono w **Tabeli 6**. Przeprowadzone badania wykazały, iż połączenie takryny oraz indometacyny łańcuchem alkiloaminowym spowodowało znaczący wzrost aktywności antyoksydacyjnych w porównaniu do samej takryny i indometacyny. Wyższy potencjał do wychwyty wolnych rodników wykazują zbadane związki o dłuższym łańcuchu (łączniku) alkiloaminowym. Zarówno w badaniu ABTS jak i DPPH, najwyższą aktywność antyoksydacyjną wykazywał związek **3h**.

Związek	ABTS (FRS50, mM)	DPPH (FRS50, mM)
3a	3,955 ± 0,173	>10
3b	2,355 ± 0,488	>10
3c	3,851 ± 0,611	>10
3d	1,339 ± 0,132	>10
3e	>10	>10
3f	0,887 ± 0,113	5,031 ± 0,667
3g	1,406 ± 0,143	3,615 ± 0,459
3h	0,506 ± 0,040	0,596 ± 0,115
Takryna	>10	>10
Indometacyna	>10	>10
Trolox	0,042 ± 0,004	4,858 ^{10⁻³} ± 0,418 ^{10⁻³}

Tabela 6. Wyniki testów *in vitro* DPPH i ABTS przeprowadzonych dla związków **3a-3h**.

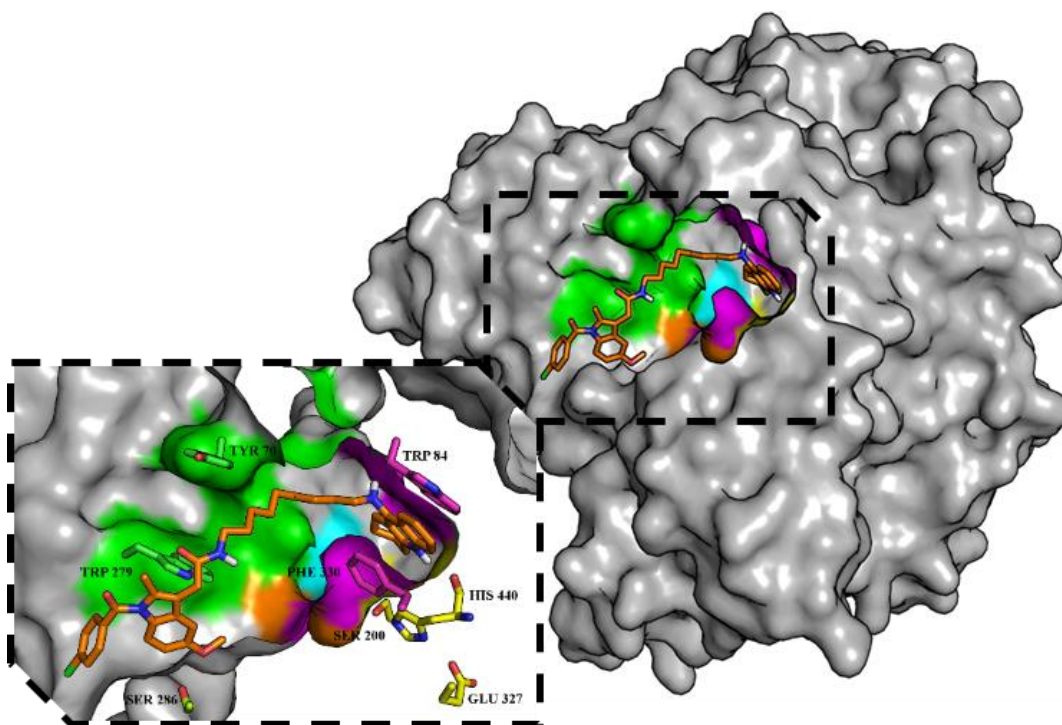
Każde badanie wykonano w trzech powtórzeniach, a uzyskane wartości podano wraz z odchyleniem standardowym (±SD).

Analiza powyższych danych pokazuje, że otrzymana hybryda **3h**, wykazuje nowe właściwości antyoksydacyjne, których nie posiadają takryna i indometacyna jako osobne cząsteczki. Związek ten może być przedmiotem dalszych badań, mających na celu poszukiwanie potencjalnego leku działającego wielokierunkowo tj. będącego jednocześnie inhibitorem cholinesteraz przy jednoczesnym działaniu antyoksydacyjnym, co może mieć np. hamujący wpływ na rozwój stanu zapalnego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Dodatkowo obniżenie stężenia wolnych

rodników przez związki o działaniu antyoksydacyjnym zmniejsza przepuszczalność i uszkodzenia bariery krew-mózg i wykazuje działanie neuroprotekcyjne.

9.7 Modelowanie molekularne

W celu wyjaśnienia jak otrzymane w wyniku syntezy związki **3a-3h** oddziałują na cholinesterazy przeprowadzono badanie modelowania molekularnego. Zaobserwowano, że wszystkie badane związki charakteryzowały się tym samym sposobem wiązania z cząsteczką acetylocholinoesterazy. Sposób ten był analogiczny do sposobu wiązania bis-(7)-takryny do cząsteczki acetylocholinoesterazy. Model oddziaływań między badanymi związkami a enzymem przedstawiono na **ryc. 14**, na podstawie modelowania molekularnego przeprowadzonego dla najbardziej aktywnego z całej badanej grupy, związku **3h**.



Ryc. 14. Model wiązania ligandu **3h** do miejsca aktywnego katalitycznie w cząsteczce AChE. Cząsteczkę ligandu **3h** oznaczono kolorem pomarańczowym. Poszczególne części aktywnych fragmentów w cząsteczce enzymu oznaczono kolorami: żółty -triada katalityczna, różowy (magenta) – miejsce anionowe, pomarańczowy – „kiesz” acylowa, niebieski (cyjan) – oksyanion, zielony – PAS. Powiększony fragment szczegółowo przedstawia miejsce wiązania związku **3h** z AChE.

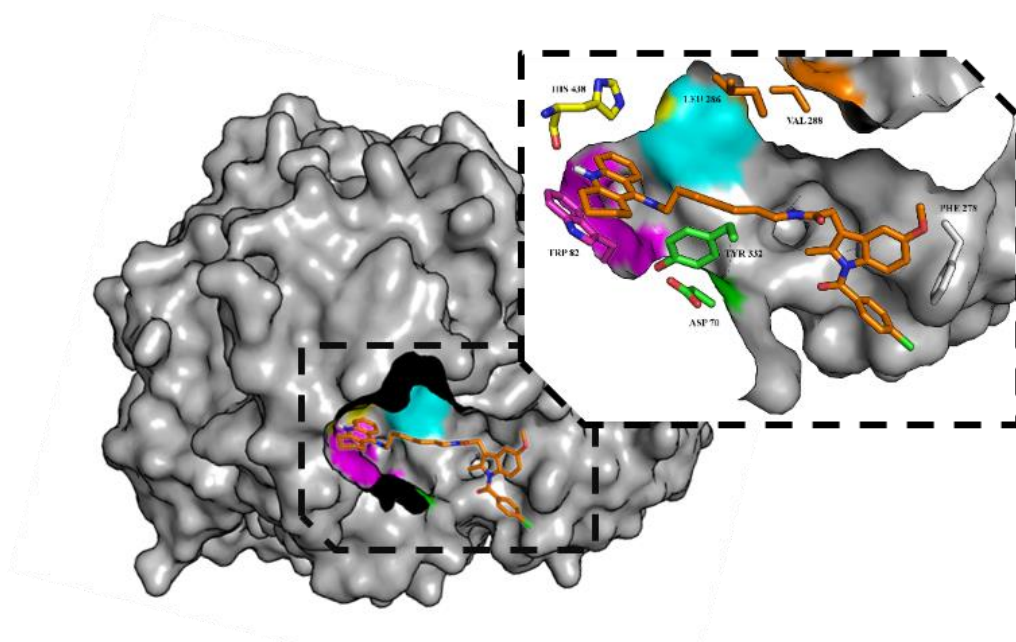
Z miejscem aktywnym katalitycznie w cząsteczce enzymu oddziaływał fragment ligandu zbudowany z takryny. Zaobserwowano charakterystyczne oddziaływania π - π oraz kation- π pomiędzy badanym związkiem a aminokwasami w miejscu aktywnym katalitycznie enzymu – Trp84 oraz Phe330. Obecne były również wiązania wodorowe pomiędzy protonowanym atomem azotu w cząsteczce takryny i tlenem w grupie karbonylowej His440.

Łańcuch alkiloaminowy w cząsteczce ligandu, skierowany był w kierunku wejścia do miejsca aktywnego katalitycznie w cząsteczce enzymu. W miejscu tym zaobserwowano, że indometacyna tworzy oddziaływania z ugrupowaniem aromatycznym z Trp279. Cząsteczka tryptofanu (Trp279) pochodzi z peryferyjnego miejsca anionowego (ang. peripheral anionic site, PAS).

Zaobserwowano, że długość łańcucha alkiloaminowego łączącego takrynę oraz indometacynę w badanych związkach wpływa na interakcję pomiędzy indometacyną a obwodowym miejscem anionowym (PAS) w cząsteczce enzymu. Łańcuch alkiloaminowy o mniejszej długości obecny w związkach **3b-3d** tworzy oddziaływania typu π - π z Tyr70 oraz Trp279, a optymalną długość łącznika do wiązania z wymienionymi aminokwasami wykazywał związek **3c** z czterema atomami węgla w łańcuchu alkiloaminowym. Podobny charakter oddziaływań obserwowany jest w przypadku drugiej cząsteczki takryny wchodzącej w skład bis-(7)-takryny. W przypadku dłuższych łańcuchów alkiloaminowych - w związkach **3e-3h** - nie zaobserwowano interakcji między indometacyną w ligandzie a Tyr70 w cząsteczce enzymu. Dwa najdłuższe łączniki alkiloaminowe, występujące w związkach **3g** i **3h** spowodowały powstanie specyficznego oddziaływania indometacyny z Ser286. Efektem tego jest zwiększenie siły wiązania ligandów **3g** i **3h** z cząsteczką acetylocholinoesterazy.

Miejsce aktywne w cząsteczce butyrylocholinoesterazy jest szersze niż w przypadku acetylocholinoesterazy, jednakże konformacje ligandów wchodzących w interakcje z miejscem aktywnym w obu przypadkach są podobne. Sposób oddziaływania badanych związków z butyrylocholinoesterazą przedstawiono na **ryc. 15 s. 95**, na podstawie najbardziej aktywnego wobec BuChE związku **3f**. Fragment cząsteczki ligandu zbudowany z takryny przyjmuje podobną konforamację wobec BuChE jak w przypadku AChE. Takryna tworzy oddziaływania typu π - π oraz

kation- π z Trp82 w cząsteczce enzymu. Dodatkowo obecne są wiązania wodorowe pomiędzy protonowanym atomem azotu i grupą karbonylową z His438. Wszystkie ligandy **3a-3h**, pomimo różnej długości łącznika alkiloaminowego, wykazują wydłużoną konformację co wymuszone zostało przez indometacynę. Obwodowe miejsce anionowe (PAS) w cząsteczce butyrylocholinoesterazy jest zredukowane w porównaniu do acetylocholinoesterazy. Ligandy z krótszym łańcuchem alkiloaminowym w cząsteczce wykazywały interakcje z PAS w BuChE. W przypadku badanych związków z dłuższym łącznikiem zaobserwowano wiązanie z Phe278 – cząsteczka ligandu sięga poza PAS w enzymie. Optymalną długość łącznika do wiązania z Phe278 posiada związek **3f** z siedmioma atomami węgla w łańcuchu alkiloaminowym. Indometacyna wchodząca w skład cząsteczki ligandu **3f** tworzy optymalne oddziaływania aromatyczne z tą resztą aminokwasową. Cząsteczki z łącznikiem o innej długości wykazywały słabszą zdolność lub traciły możliwość wiązania indometacyny z Phe278 co skutkowało spadkiem ich aktywności inhibicyjnej wobec butyrylocholinoesterazy.



Ryc. 15. Model wiązania ligandu **3f** do miejsca aktywnego katalitycznie w cząsteczce butyrylocholinoesterazy. Cząsteczkę ligandu **3f** oznaczono kolorem pomarańczowym. Poszczególne części aktywnych fragmentów w cząsteczce enzymu oznaczono kolorami: żółty -triada katalityczna, różowy – miejsce anionowe, pomarańczowy – „kieszne” acylowa, niebieski (cyjan) – oksyanion, zielony – PAS. Powiększony fragment szczegółowo przedstawia miejsce wiązania związku **3f** z BuChE.

9.8 Tabele zbiorcze właściwości oraz wyników badań zsyntezowanych związków (2a-2h, 3a-3h)

Zestawienie właściwości związków 2a-2h						
Symbol	Wzór sumaryczny	Masa molowa teoretyczna*	Temperatura topnienia	Postać	Barwa	Nazwa chemiczna
2a	C ₃₄ H ₃₃ ClN ₄ O ₃	581,10382	163-165°C	Osad	Pomarańczowa	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(2-aminoetylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamid
2b	C ₃₅ H ₃₅ ClN ₄ O ₃	595,13040	143-145°C	Osad	Beżowa	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(3-aminopropylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamid
2c	C ₃₆ H ₃₇ ClN ₄ O ₃	609,15698	132-135°C	Osad	Żółta	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(4-aminobutylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamid
2d	C ₃₇ H ₃₉ ClN ₄ O ₃	623,18356	134-137°C	Osad	Żółta	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(5-aminopentylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamid
2e	C ₃₈ H ₄₁ ClN ₄ O ₃	637,21014	144-148°C	Osad	Brązowa	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(6-aminoheksylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamid
2f	C ₃₉ H ₄₃ ClN ₄ O ₃	651,23672	118-121°C	Osad	Żółta	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(7-aminoheptylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamid
2g	C ₄₀ H ₄₅ ClN ₄ O ₃	665,26330	121-124°C	Osad	Beżowa	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(8-aminooktylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamid
2h	C ₄₁ H ₄₇ ClN ₄ O ₃	679,28988	96-98°C	Osad	Brązowa	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(9-aminononylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamid

Tabela 7. Zestawienie wybranych właściwości związków **2a-2h**.

* obliczona za pomocą programu ACD/ChemSketch 2018.2.1

Zestawienie wyników pomiarów związków 2a-2h					
Sym-bol	Wzór sumaryczny	MS-HR (ESI)		FTIR (ATR) ν (cm ⁻¹)	MS (ESI) m/z (M+1)
		Obliczone	Wyznaczone w badaniu		
2a	C ₃₄ H ₃₃ ClN ₄ O ₃	580,22412	580,22430	749,6 ; 1224,1 ; 1324,1 ; 1475,2 ; 1588,8 ; 2939,6 ; 3184,8	581,2 ; 199,1 ; 143,0
2b	C ₃₅ H ₃₅ ClN ₄ O ₃	594,23977	594,24012	753,6 ; 1227,7 ; 1313,8 ; 1477,5 ; 1570,4 ; 2937,9 ; 3230,2	595,2 ; 199,1 ; 143,0
2c	C ₃₆ H ₃₇ ClN ₄ O ₃	608,25542	608,25646	754,1 ; 1224,2 ; 1323,5 ; 1474,6 ; 1573,8 ; 2938,7 ; 3238,8	609,3 ; 199,1 ; 143,0
2d	C ₃₇ H ₃₉ ClN ₄ O ₃	622,27107	622,27177	754,1 ; 1224,2 ; 1323,7 ; 1474,5 ; 1569,7 ; 2937,4 ; 3238,2	623,3 ; 199,1 ; 143,0
2e	C ₃₈ H ₄₁ ClN ₄ O ₃	636,28672	636,28742	754,2 ; 1224,1 ; 1357,5 ; 1474,6 ; 1588,3 ; 2932,1 ; 3231,6	637,3 ; 308,2 ; 198,1
2f	C ₃₉ H ₄₃ ClN ₄ O ₃	650,30237	650,30350	753,9 ; 1224,5 ; 1325,4 ; 1473,8 ; 1576,8 ; 2932,1 ; 3231,3	651,3 ; 322,2 ; 174,1
2g	C ₄₀ H ₄₅ ClN ₄ O ₃	664,31802	664,31861	754,1 ; 1224,7 ; 1325,1 ; 1473,0 ; 1568,8 ; 2927,5 ; 3227,8	665,3 ; 336,2 ; 174,1
2h	C ₄₁ H ₄₇ ClN ₄ O ₃	678,33367	678,33401	754,3 ; 1219,5 ; 1355,1 ; 1471,4 ; 1587,44 ; 2926,6 ; 3238,1	679,3 ; 350,3 ; 184,0 ; 174,1

Tabela 8. Zestawienie wybranych wyników pomiarów związków **2a-2h**, wyniki uzyskane w pomiarze widm MS-HR, IR, MS (ESI).

Zestawienie właściwości związków 3a-3h						
Sym-bol	Wzór sumaryczny	Masa molowa teoretyczna*	Tempera-tura topnienia	Postać	Barwa	Nazwa chemiczna
3a	C ₃₄ H ₃₄ Cl ₂ N ₄ O ₃	617,56476	182-184°C	Osad	Pomarań-czowa	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(2-aminoetylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamidu chlorowodorek
3b	C ₃₅ H ₃₆ Cl ₂ N ₄ O ₃	613,59134	160-162°C	Osad	Beżowa	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(3-aminopropylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamidu chlorowodorek
3c	C ₃₆ H ₃₈ Cl ₂ N ₄ O ₃	645,61792	157-159°C	Osad	Żółta	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(4-aminobutylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamidu chlorowodorek
3d	C ₃₇ H ₄₀ Cl ₂ N ₄ O ₃	659,64450	158-160°C	Osad	Żółta	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(5-aminopentylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamidu chlorowodorek
3e	C ₃₈ H ₄₂ Cl ₂ N ₄ O ₃	673,67108	83-85°C	Osad	Brązowa	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(6-aminohexylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamidu chlorowodorek
3f	C ₃₉ H ₄₄ Cl ₂ N ₄ O ₃	687,69766	150-152°C	Osad	Żółta	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(7-aminoheptylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamidu chlorowodorek
3g	C ₄₀ H ₄₆ Cl ₂ N ₄ O ₃	701,72424	146-148°C	Osad	Beżowa	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(8-aminooktylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamidu chlorowodorek
3h	C ₄₁ H ₄₈ Cl ₂ N ₄ O ₃	715,75082	146-148°C	Osad	Brązowa	<i>N</i> -(1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydynylo)-(9-aminononylo)-2-{1-[(4-chlorofenylo)karbonylo]-5-metoksy-2-metylo-1 <i>H</i> -indol-3-yl}acetamidu chlorowodorek

Tabela 9. Zestawienie wybranych właściwości związków 3a-3h.

* Obliczona za pomocą programu ACD/ChemSketch 2018.2.1

Zestawienie wyników pomiarów związków 3a-3h					
Symbol	Wzór sumaryczny	MS-HR (ESI)*		FTIR (ATR) ν (cm ⁻¹):	MS (ESI) m/z (M+1)
		Obliczone	Wyznaczone w badaniu		
3a	C ₃₄ H ₃₄ Cl ₂ N ₄ O ₃	580,22412	580,22391	757,0 ; 1231,4 ; 1323,7 ; 1475,2 ; 1578,5 ; 2944,1 ; 3215,8	581,2 ; 201,0 ; 143,0 ; 81,0
3b	C ₃₅ H ₃₆ Cl ₂ N ₄ O ₃	594,23977	594,24029	756,1 ; 1230,2 ; 1322,7 ; 1474,5 ; 1578,1 ; 2942,2 ; 3216,3	595,2 ; 199,1 ; 143,0
3c	C ₃₆ H ₃₈ Cl ₂ N ₄ O ₃	608,25542	608,25597	756,3 ; 1219,7 ; 1323,4 ; 1473,8 ; 1576,9 ; 2941,4 ; 3223,2	609,3 ; 199,1 ; 143,0
3d	C ₃₇ H ₄₀ Cl ₂ N ₄ O ₃	622,27107	622,27072	54,5 ; 1223,8 ; 1323,2 ; 1455,4 ; 1587,5 ; 2937,7 ; 3207,7	623,3 ; 199,1 ; 143,0
3e	C ₃₈ H ₄₂ Cl ₂ N ₄ O ₃	636,28672	636,28658	754,4 ; 1218,9 ; 1324,2 ; 1456,0 ; 1587,1 ; 2934,9 ; 3237,8	637,3 ; 308,2 ; 174,1 ; 143,0
3f	C ₃₉ H ₄₄ Cl ₂ N ₄ O ₃	650,30237	650,30199	754,5 ; 1224,4 ; 1323,5 ; 1456,1 ; 1587,5 ; 2931,3 ; 3207,8	651,3 ; 322,2 ; 174,1 ; 139,0
3g	C ₄₀ H ₄₆ Cl ₂ N ₄ O ₃	664,31802	664,31826	754,3 ; 1222,6 ; 1319,9 ; 1455,9 ; 1588,0 ; 2926,5 ; 3207,1	665,3 ; 336,2 ; 174,1 ; 143,0
3h	C ₄₁ H ₄₈ Cl ₂ N ₄ O ₃	678,33367	678,33207	753,9 ; 1218,7 ; 1397,6 ; 1468,6 ; 1601,7 ; 2916,0 ; 3208,0	679,3 ; 174,1 ; 167,0

Tabela 10. Zestawienie wybranych wyników pomiarów związków **3a-3h**, wyniki uzyskane w pomiarze widm MS-HR, IR, MS.

* Nie uwzględnia obecności HCl w strukturze badanej cząsteczki.

Zestawienie wyników badań aktywności związków 3a-3h				
Symbol	IC₅₀±SD AChE (nM)	IC₅₀±SD BuChE (nM)	ABTS±SD (FRS50, mM)	DPPH±SD (FRS50, mM)
3a	7085,82 ± 1355,34	288,56 ± 35,92	3,955 ± 0,173	>10
3b	41,60 ± 3,56	334,99 ± 32,89	2,355 ± 0,488	>10
3c	25,03 ± 2,02	229,20 ± 30,49	3,851 ± 0,611	>10
3d	61,99 ± 7,98	30,10 ± 4,19	1,339 ± 0,132	>10
3e	260,52 ± 6,10	245,74 ± 26,48	>10	>10
3f	99,09 ± 3,27	6,50 ± 0,77	0,887 ± 0,113	5,031 ± 0,667
3g	28,70 ± 2,37	241,24 ± 43,62	1,406 ± 0,143	3,615 ± 0,459
3h	9,50 ± 1,39	57,17 ± 4,34	0,506 ± 0,040	0,596 ± 0,115

Tabela 11. Zestawienie wybranych wyników badań aktywności związków **3a-3h**, badanie aktywności inhibicyjnej wobec cholinoesteraz oraz aktywności antyoksydacyjnej w teście z ABTS i DPP

10 WNIOSKI

W toku syntezy uzyskano 8 nowych związków o charakterze hybryd, powstałych z połączenia cząsteczki takryny z cząsteczką indometacyny przy pomocy łącznika alkiloaminowego zawierającego od 2 do 9 atomów węgla. Otrzymane związki przeprowadzono w postaci rozpuszczalnych soli (chlorowodorków), które poddano szeregowi badań *in vitro*. Zbadano aktywność inhibicyjną wobec AChE i BuChE, każdego otrzymanego związku i porównano z aktywnością związków referencyjnych o znanej aktywności - takryną oraz donepezilem. Sześć związków wykazało wyższą aktywność inhibicyjną wobec AChE niż takryna, a pięć wyższą aktywność inhibicyjną niż donepezil. Dwa z przebadanych związków wykazało wyższą aktywność inhibicyjną wobec BuChE niż takryna oraz wszystkie związki były aktywniejsze od donepezilu. Oprócz związku **3a** wszystkie wykazywały wobec cholinoesteraz wartość IC_{50} na poziomie nanomolarnym. Związek **3h** wykazujący najwyższą aktywność inhibicyjną ($IC_{50}=9,50nM$) wobec acetylocholinoesterazy posłużył do opracowania kinetyki reakcji inhibicji enzymu przez badany związek. Otrzymane wyniki i sporządzone wykresy wykazały mieszany typ inhibicji, zarówno AChE jak i BuChE. W badaniu wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek, przeprowadzonym na liniach komórkowych HepG2 oraz EA.hy926, nie zaobserwowano znacznego uszkodzenia komórek przy ekspozycji na związek **3h**. Wszystkie związki poddano badaniu aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem rodników $ABTS^{+}$ i $DPPH^{\bullet}$. W obu testach związek **3h** ponownie wykazał najwyższą aktywność z całej serii. Wartości FRS_{50} dla związku **3h** w obu testach były na poziomie mikromolowym. Modelowanie molekularne wykazały obecność silnych oddziaływań związku **3h** z aminokwasami wchodzącymi w skład CAS i PAS zarówno AChE, jak i BuChE co potwierdzają wyniki uzyskane w badaniu aktywności inhibicyjnej wobec powyższych enzymów.

Otrzymane wyniki badań pozwalają wnioskować, iż uzyskano nowy związek wykazujący aktywność inhibicyjną wobec AChE i BuChE, posiadający właściwości antyoksydacyjne oraz wykazujący niski wpływ na przeżywalność komórek wątroby i śródbłónka naczyń krwionośnych. Dla uzyskanego związku **3h**, ze względu na oddziaływanie z PAS cholinoesteraz, można w przyszłości przeprowadzić badanie określające jego potencjał do inhibicji powstawania kompleksów $A\beta$ -AChE co byłoby równoznaczne z hamowaniem agregacji amyloidu- β . W celu określenia potencjału

związku **3h** jako leku w terapii choroby Alzheimera, w dalszych badaniach należy określić jego potencjał do przekraczania bariery krew-mózg oraz ustalić jakim przemianom metabolicznym podlegałby w warunkach *in vivo*.

11 STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Celem pracy było otrzymanie nowych związków o charakterze hybryd, wykazujących działanie inhibicyjne wobec acetylo- oraz butyrylocholinoesterazy z dodatkową aktywnością przeciwzapalną i antyoksydacyjną. Seria związków została zaprojektowana i zsyntezowana, w wyniku czego otrzymano osiem nowych hybryd pochodnych 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakrydyny i indometacyny, połączonych za pomocą łańcucha alkilodiaminowego o różnej długości – od 2 do 9 atomów węgla w łańcuchu. Otrzymane związki poddano badaniom mającym na celu określenie ich biologicznej aktywności np. aktywności inhibicyjnej wobec AChE i BuChE. Badane związki wykazały wysoką aktywność inhibicyjną wobec cholinoesteraz. Wartości IC_{50} wszystkich otrzymanych związków wynosiły od 10 nM do 7 μ M. Porównanie wyników pozwoliło na stwierdzenie, że badane związki wykazują znacznie wyższy potencjał inhibicyjny niż dobrze znane inhibitory AChE i BuChE tj. takryna i donepezyl. Spośród otrzymanych i przebadanych związków wybrano jeden o najwyższym potencjale inhibicyjnym - **3h**. Dla wybranego związku przeprowadzono badanie kinetyki reakcji inhibicji zarówno AChE jak i BuChE. Badanie wykazało mieszany typ inhibicji enzymu przez testowany związek. Otrzymane związki przebadano pod względem cytotoksyczności wobec komórek HepG2 oraz EA.hy96, przy użyciu testów MTT i MTS. Wszystkie badane związki wykazywały podobną niską cytotoksyczność na poziomie mikromolowych stężeń. Aktywność inhibicyjna wobec cholinoesteraz na poziomie nanomolowym, pozwala sądzić, że otrzymane związki mogą charakteryzować się wysokim indeksem terapeutycznym jako potencjalne leki. Wszystkie otrzymane związki przebadano pod względem właściwości antyoksydacyjnych, a wyniki porównano ze znanymi związkami o silnych właściwościach antyoksydacyjnych – Trolox, a także pozbawionych takiego działania – takryna i indometacyna. Wśród badanych związków można stwierdzić, że o dłuższym łączniku alkilodiaminowym wykazywały znacznie wyższą aktywność antyoksydacyjną, przy czym najsilniejsze właściwości do wyłapywania wolnych rodników wykazywał związek **3h**. Modelowanie molekularne potwierdziło możliwość oddziaływania związków o dłuższym łańcuchu w łączniku z istotnymi fragmentami cząsteczek enzymów AChE i BuChE. Potwierdzone badaniami wielokierunkowe działanie tj. wysoka aktywność wobec obu cholinoesteraz, aktywność antyoksydacyjna oraz niska

cytotoksyczność związku **3h**, czyni ten związek obiecującym potencjalnym lekiem w terapii choroby Alzheimer'a.

12 STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

The aim of the study has been synthesized new series of compounds (hybrids), showing an inhibition activity against to acetyl- and butyrylcholinesterase, with an additional anti-inflammatory and antioxidant activity. The new series of eight compounds - 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine and indomethacin derivatives, linked by an alkyldiamine chain of various length - from 2 to 9 carbon atoms in the chain - was designed and synthesized. Inhibitory potency against AChE and BuChE was studied. All of tested compounds were showed a high inhibitory activity against cholinesterases with the IC₅₀ values between 10nM and 7μM, higher than the well-known inhibitors of AChE and BuChE - tacrine and donepezil. Compounds **3h** showed the highest inhibitory potency and was selected to the study of reaction kinetics on AChE and BuChE – mixed type of enzyme inhibition has been specified. The cytotoxicity against HepG2 and EA.hy96 cells, using the MTT and MTS tests, for obtained compounds were studied and showed similar low cytotoxicity at the micromolar concentrations. The inhibitory activity against cholinesterase at the nanomolar level suggests that the obtained compounds may have a high therapeutic index as potential drugs. The antioxidant properties for all obtained compounds were studied and compared with known strong antioxidant – Trolox, and compounds without antioxidant activity – tacrine and indomethacin. The compounds with longer alkyldiamine linker showed much higher antioxidant activity, while the compound **3h** was the strongest. Molecular modeling confirmed the possibility of binding between tested compounds with a longer linker and significant fragments of the AChE and BuChE enzyme molecules. Multidirect activity of **3h** compounds confirmed by research (high inhibitory potency against cholinesterases, antioxidant activity) and low cytotoxicity, makes of it a promising potential drug in the treatment of Alzheimer's disease.

13 BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Bajda, J. Jończyk, B. Malawska, K. Czarnecka, M. Girek, P. Olszewska, J. Sikora, E. Mikiciuk-Olasik, R. Skibiński, A. Gumieniczek i P. Szymański, „Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of new tetrahydroacridine derivatives as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer’s disease,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**, 23, 5610 - 5618.
- [2] M. Obulesu i M. Jhansilakshmi, „Neuroinflammation in Alzheimer’s disease: an understanding of physiology and pathology,” *International Journal of Neuroscience*, **2014**, 124, 227–235.
- [3] J. M. Rubio-Perez i J. M. Morillas-Ruiz, „A Review: Inflammatory Process in Alzheimer’s Disease, Role of Cytokines,” *The Scientific World Journal*, **2011**, 2012, (756357), 1-15.
- [4] K. P. Townsend i D. Pratico, „Novel therapeutic opportunities for Alzheimer’s disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs,” *The FASEB Journal*, **2005**, 19, 1592-1601.
- [5] K. Czarnecka, P. Szymański, M. Girek, E. Mikiciuk-Olasik, R. Skibiński, J. Kabziński, I. Majsterek, B. Malawska, J. Jończyk i M. Bajda, „Tetrahydroacridine derivatives with fluorobenzoic acid moiety as multifunctional agents for Alzheimer’s disease treatment,” *Bioorganic Chemistry*, **2017**, 72, 315 - 322.
- [6] H. O. Tayeb, H. D. Yang, B. H. Price i F. I. Tarazi, „Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors,” *Pharmacology & Therapeutics*, **2012**, 134, 8-25.
- [7] W.Y. Wu, Y.C. Dai, N.G. Li, Z.X. Dong, T. Gu, Z.H. Shi, X. Xue, Y. P. Tang i J.A. Duan, „Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer’s disease,” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2017**, 32, (1), 572-587.

- [8] D. Volpato i U. Holzgrabe, „Designing Hybrids Targeting the Cholinergic System by Modulating the Muscarine and Nicotinic Receptors: A Concept to Treat Alzheimer's Disease.,” *Molecules*, **2018**, 23, (3230), 1-28.
- [9] Y. Chen, J. Sun, S. Peng, H. Liao, Y. Zhang i J. Lehmann, „Tacrine–Flurbiprofen Hybrids as Multifunctional Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer’s Disease,” *Archiv der Pharmazie – Chemistry in Life Sciences*, **2013**, 346, 865 - 871.
- [10] J. P. Blass, „Alzheimer’s disease and Alzheimer’s dementia: distinct but overlapping entities,” *Neurobiology of Aging*, **2002**, 23, 1077–1084.
- [11] P. L. McGeer, „Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitors. Rationale and Therapeutic Potential for Alzheimer’s Disease,” *Drugs & Aging*, **2000**, 17, 1-11.
- [12] U. Lucca, „Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Alzheimer’s Disease; Update on Recent Data and Their Therapeutic Implications,” *CNS Drugs*, **1999**, 11, (3), 207-224.
- [13] S.Y. Chen, Y. Chen, Y.P. Li, S.H. Chen, J.H. Tan, T.M. Ou, L.Q. Gu i Z.S. Huang, „Design, synthesis, and biological evaluation of curcumin analogues as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer’s disease,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, 19, 5596–5604.
- [14] M. Heneka, M. Carson, J. E. Khoury, G. Landreth, F. Brosseon, D. Feinstein, A. Jacobs, T. Wyss-Coray, J. Vitorica, R. Ransohoff, K. Herrup, S. Frautschy, B. Finsen, G. Brown, A. Verkhratsky, K. Yamanaka, J. Koistinaho, E. Latz i A. Halle, „Neuroinflammation in Alzheimer's Disease,” *The Lancet Neurology*, **2015**, 14, (4), 388-405.
- [15] M. A. Meraz-Ríos, D. Toral-Rios, D. Franco-Bocanegra, J. Villeda-Hernández i V. Campos-Peña, „Inflammatory process in Alzheimer’s Disease,” *Frontiers in Integrative Neuroscience*, **2013**, 7, (59), 1-15.

- [16] F. Pistollato, E. L. Ohayon, A. Lam, G. R. Langley, T. J. Novak, D. Pamies, G. Perry, E. Trushina, R. S. Williams, A. E. Roher, T. Hartung, S. Harnad, N. Barnard, M. C. Morris, M.-C. Lai, R. Merkley i P. C. Chandrasekera, „Alzheimer disease research in the 21st century: past and current failures, new perspectives and funding priorities,” *Oncotarget*, **2016**, 7, (26), 38999-39016.
- [17] P. M. Doraiswamy, „Non-Cholinergic Strategies for Treating and Preventing Alzheimer’s Disease,” *CNS Drugs*, **2002**, 16, (12), 811-824.
- [18] L. Nobis i M. Husain, „Apathy in Alzheimer’s disease,” *Current Opinion in Behavioral Sciences*, **2018**, 22, 7-13.
- [19] G. R. Grøntvedt, T. N. Schröder, S. B. Sando, L. White, G. Bråthen i C. F. Doeller, „Alzheimer’s disease,” *Current Biology*, **2018**, 28, 645-649.
- [20] B. P. Imbimbo, V. Solfrizzi i F. Panza, „Are NSAIDs useful to treat Alzheimer’s disease or mild cognitive impairment?,” *Frontiers in Aging Neuroscience*, **2010**, 2, (19), 1-14.
- [21] H. Solleiro-Villavicencio i S. Rivas-Arancibia, „Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4+T Cells in Neurodegenerative Diseases,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **2018**, 12, (114), 1-13.
- [22] Y. M. Flores-Martinez, M. A. Fernandez-Parrilla, J. Ayala-Davila, D. Reyes-Corona, V. M. Blanco-Alvarez, L. O. Soto-Rojas, C. Luna-Herrera, J. A. Gonzalez-Barrios, B. A. Leon-Chavez, M. Gutierrez-Castilo, I. Martínez-Dávila i D. Martinez-Fong, „Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide,” *Journal of Immunology Research*, **2018**, 2018, (1838921), 1-19.
- [23] B. Shal, W. Ding, H. Ali, Y. S. Kim i S. Khan, „Anti-neuroinflammatory Potential of Natural Products in Attenuation of Alzheimer’s Disease,” *Frontiers in Pharmacology*, **2018**, 9, (548), 1-17.

- [24] G. Gelders, V. Baekelandt i A. Van der Perren, „Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson’s Disease,” *Journal of Immunology Research*, **2018**, 2018, (4784268), 1-12.
- [25] S. Rangaraju, E. B. Dammer, S. A. Raza, P. Rathakrishnan, H. Xiao, T. Gao, D. M. Duong, M. W. Pennington, J. J. Lah, N. T. Seyfried i A. I. Levey, „Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer’s disease,” *Molecular Neurodegeneration*, **2018**, 13, (24), 1-25.
- [26] S. L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini i B. E. Saway, „Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview,” *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **2009**, 29, (6), 313–326.
- [27] Y. Zhou, G. Wang, D. Li, Y. Wang, Q. Wu, J. Shi i F. Zhang, „Dual modulation on glial cells by tetrahydroxystilbene glucoside protects against dopamine neuronal loss,” *Journal of Neuroinflammation*, **2018**, 15, (161), 1-15.
- [28] R. Medeiros, M. Kitazawa, G. F. Passos, D. Baglietto-Vargas, D. Cheng, D. H. Cribbs i F. M. LaFerla, „Aspirin-Triggered Lipoxin A4 Stimulates Alternative Activation of Microglia and Reduces Alzheimer Disease-Like Pathology in Mice,” *The American Journal of Pathology*, **2013**, 182, (5), 1780-1789.
- [29] S. Vladimir-Knežević, B. Blažeković, M. Kindl, J. Vladić, A. D. Lower-Nedza i A. H. Brantner, „Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family,” *Molecules*, **2014**, 19, 767-782.
- [30] G. Hasbal, T. Yilmaz-Ozden i A. Can, „Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz (wild service tree) fruits,” *Journal of food and drug analysis*, **2015**, 23, 57-62.

- [31] S. Zara, M. De Colli, M. Rapino, S. Pacella, C. Nasuti, P. Sozio, A. Di Stefano i A. Cataldi, „Ibuprofen and Lipoic Acid Conjugate Neuroprotective Activity Is Mediated by Ngb/Akt Intracellular Signaling Pathway in Alzheimer’s Disease Rat Model,” *Gerontology*, **2013**, 59, 250-260.
- [32] A. Kurz i R. Perneczky, „Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease,” *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **2011**, 35, 373 - 379.
- [33] Y. Chen, J. Sun, Z. Huang, H. Liao, S. Peng, J. Lehmann i Y. Zhang, „Design, synthesis and evaluation of tacrine–flurbiprofen–nitrate trihybrids as novel anti-Alzheimer’s disease agents,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2013**, 21, 2462 - 2470.
- [34] T.J. Gould, P.T. Leach, "Cellular, molecular, and genetic substrates underlying the impact of nicotine on learning.", *Neurobiology of Learning and Memory*, **2014**, 107, 108–132.
- [35] C. J.G. Tessier, J. R. Emlaw, Z.Q. Cao, F. J. Pérez-Areales, J.P.J. Salameh, J.E. Prinston, M.S. McNulty, C.J.B. daCosta, „Back to the future: Rational maps for exploring acetylcholine receptor space and time,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **2017**, 1865, (11), 1522–1528.
- [36] A. Martín, M. Domercq i C. Matute, „Inflammation in stroke: the role of cholinergic, purinergic and glutamatergic signaling,” *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, **2018**, 11, 1-14.
- [37] Y. Xu, S. Cheng, J. L. Sussman, I. Silman i H. Jiang, „Computational Studies on Acetylcholinesterases,” *Molecules*, **2017**, 22, (1324).
- [38] D. M. Quinn, „Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States,” *Chemical Reviews*, **1987**, 87, 955-979.
- [39] J. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker i I. Silman, „Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein.”, *Science*, **1991**, 253, (5022), 872-879.

- [40] Z.Q. Cheng, K.K. Zhu, J. Zhang, J.L. Song, L. A. Muehlmann, C.S. Jiang, C.L. Liu i H. Zhang, „Molecular-docking-guided design and synthesis of new IAA-tacrine hybrids as multifunctional AChE/BChE inhibitors,” *Bioorganic Chemistry*, **2019**, 83, 277-288.
- [41] L. Jean, S. Brimijoin i D. J. Vaux, „In vivo localization of human acetylcholinesterase-derived species in a β -sheet conformation at the core of senile plaques in Alzheimer’s disease,” *The Journal of Biological Chemistry*, **2019**, 294, 6253-6272.
- [42] B. Bukowska, D. Pieniążek, K. Hutniki i W. Duda, „Acetylo- i butyrylocholinoesteraza - budowa, funkcje i ich inhibitory,” *Current Topics in Biophysics*, **2007**, 30, 11-23.
- [43] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T. L. Rosenberry i J. L. Sussman, „Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function,” *Chemico-Biological Interactions*, **2010**, 187, (1-3), 10–22.
- [44] M. Son, C. Park, S. Rampogu, A. Zeb i K. W. Lee, „Discovery of Novel Acetylcholinesterase Inhibitors as Potential Candidates for the Treatment of Alzheimer’s Disease,” *International Journal of Molecular Sciences*, **2019**, 20, (1000), 1-15.
- [45] M. Pohanka, „Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology,” *Biomedical papers*, **2011**, 155, (3), 219–230.
- [46] X. Chen, S. Wehle, N. Kuzmanovic, B. Merget, U. Holzgrabe, B. König, C. A. Sotriffer i M. Decker, „Acetylcholinesterase Inhibitors with Photoswitchable Inhibition of β -Amyloid Aggregation,” *ACS Chemical Neuroscience*, **2014**, 5, (5), 377-389.
- [47] S. N. Dighe, G. S. Deora, E. De la Mora, F. Nachon, S. Chan, M.O. Parat, X. Brazzolotto i B. P. Ross, „Discovery and Structure–Activity Relationships of a Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor by Structure-Based Virtual Screening,” *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, 59, 7683–7689.

- [48] M. C. Dinamarca, J. P. Sagal, R. A. Quintanilla, J. A. Godoy, M. S. Arrázola i N. C. Inestrosa, „Amyloid- β -Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the Ab peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.,” *Molecular Neurodegeneration*, **2010**, 5, (4), 1-15.
- [49] G. V. De Ferrari, M. A. Canales, I. Shin, L. M. Weiner, I. Silman i N. C. Inestrosa, „A Structural Motif of Acetylcholinesterase That Promotes Amyloid β -Peptide Fibril Formation,” *Biochemistry*, **2001**, 40, (35), 10447–10457.
- [50] P. Taylor, „Anticholinesterase Agents,” w *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, **2006**, wydanie 11, 201-216.
- [51] R. S. Keri, C. Quintanova, S. Chaves, D. F. Silva, S. M. Cardoso i M. A. Santos, „New Tacrine Hybrids with Natural-Based Cysteine Derivatives as Multitargeted Drugs for Potential Treatment of Alzheimer's Disease,” *Chemical Biology & Drug Design*, **2016**, 87, (1), 101-111.
- [52] I. L. Sumner, R. A. Edwards, A. A. Asuni i J. L. Teeling, „Antibody Engineering for Optimized Immunotherapy in Alzheimer's Disease,” *Frontiers in Neuroscience*, **2018**, 12, (254), 1-12.
- [53] E. R. Zimmer, A. Leuzy, A. L. Benedet, J. Breitner, S. Gauthier i P. Rosa-Neto, „Tracking neuroinflammation in Alzheimer's disease: the role of positron emission tomography imaging,” *Journal of Neuroinflammation*, **2014**, 11, (120).
- [54] P. L. McGeer i E. G. McGeer, „The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy,” *Acta Neuropathologica*, **2013**, 126, 479–497.
- [55] V. Tumiatti, A. Minarini, M. Bolognesi, A. Milelli, M. Rosini i C. Melchiorre, „Tacrine Derivatives and Alzheimers Disease,” *Current Medicinal Chemistry*, **2010**, 17, (17).
- [56] A. Cavalli, M. L. Bolognesi, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, M. Recanatini i C. Melchiorre, „Multi-target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases,” *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 51, (3), 347-372.

- [57] M. Marszałek, „Alzheimer’s disease against peptides products of enzymatic cleavage of APP protein. Forming and variety of fibrillating peptides – some aspects,” *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej*, **2016**, 70, 787-796.
- [58] L. Huang, H. Miao, Y. Sun, F. Meng i X. Li, „Discovery of indanone derivatives as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 87, 429-439.
- [59] R. Postina, „Activation of α -secretase cleavage,” *Journal of Neurochemistry*, **2012**, 120, 46-54.
- [60] E. Cudaback, N. L. Jorstad, Y. Yang, T. J. Montine i C. D. Keene, „Therapeutic implications of the prostaglandin pathway in Alzheimer’s disease,” *Biochemical Pharmacology*, **2014**, 88, 565-572.
- [61] C. G. Ballard, N. H. Greig, A. L. Guillozet-Bongaarts, A. Enz i S. Darvesh, „Cholinesterases: Roles in the Brain During Health and Disease,” *Current Alzheimer Research*, **2005**, 2, (3).
- [62] M. Bartolini, C. Bertucci, V. Cavrini i V. Andrisano, „ β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies,” *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 65, (3), 407-416.
- [63] I. Carreras, A. C. McKee, J.-K. Choi, N. Aytan, N. W. Kowall, B. G. Jenkins i A. Dedeoglu, „R-flurbiprofen improves tau, but not A β pathology in a triple transgenic model of Alzheimer's disease,” *Brain Research*, **2013**, 1541, 115-127.
- [64] M. Berk, O. Dean, H. Drexhage, J. J. McNeil, S. Moylan, A. O’Neil, C. G. Davey, L. Sanna i M. Maes, „Aspirin: a review of its neurobiological properties and therapeutic potential for mental illness,” *BMC Medicine*, **2013**, 11, (74).
- [65] Y. Chi, S. O. Suadican i V. L. Schuster, „Regulation of prostaglandin EP1 and EP4 receptor signaling by carrier-mediated ligand reuptake,” *Pharmacology Research & Perspectives*, **2014**, 2, (4), 1-11.

- [66] M. A. Bhat, M. A. Al-Omar, M. Raish, M. A. Ansari, H. A. Abuelizz, A. H. Bakheit i A. M. Naglah, „Indole Derivatives as Cyclooxygenase Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation and Docking Studies,” *Molecules*, **2018**, 23, (1250), 1-19.
- [67] W. Zou, R. Feng i Y. Yang, „Changes in the serum levels of inflammatory cytokines in antidepressant drug-naïve patients with major depression,” *PLoS ONE*, **2018**, 13, ((6):e0197267), 1-10.
- [68] E. G. Hain, M. Sparenberg, J. Rasińska, C. Klein, L. Akyüz i B. Steiner, „Indomethacin promotes survival of new neurons in the adult murine hippocampus accompanied by anti-inflammatory effects following MPTP-induced dopamine depletion,” *Journal of Neuroinflammation*, **2018**, 15, (162), 1-16.
- [69] J. J. Sramek i N. R. Cutler, „Recent Developments in the Drug Treatment of Alzheimer’s Disease,” *Drugs & Aging*, **1999**, 14, (5), 359-373.
- [70] M. M. Ibrahim i M. T. Gabr, „Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer’s disease,” *Neural Regeneration Research*, **2018**, 14, (3), 437-440.
- [71] S. M. Park, S. H. Ki, N. R. Han, I. J. Cho, S. K. Ku, S. C. Kim, R. J. Zhao i Y. W. Kim, „Tacrine, an Oral Acetylcholinesterase Inhibitor, Induced Hepatic Oxidative Damage, Which Was Blocked by Liquiritigenin through GSK3-beta Inhibition,” *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2015**, 38, (2), 184-192.
- [72] K. Terada, K. Migita, Y. Matsushima, Y. Sugimoto, C. Kamei, T. Matsumoto, M. Mori, K. Matsunaga, J. Takata i Y. Karube, „Cholinesterase inhibitor rivastigmine enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells via sigma - 1 and sigma-2 receptors,” *PLOS One*, **2018**, 13, (12), 1-16.
- [73] A. Ibrar, A. Khan, M. Ali, R. Sarwar, S. Mehsud, U. Farooq, S. M. Halimi, I. Khan i A. Al-Harrasi, „Combined in Vitro and in Silico Studies for the Anticholinesterase Activity and Pharmacokinetics of Coumarinyl Thiazoles and Oxadiazoles,” *Frontiers in Chemistry*, **2018**, 6, (61), 1-12.

- [74] L. Fang, X. Fang, S. Gou, A. Lupp, I. Lenhardt, Y. Sun, Z. Huang, Y. Chen, Y. Zhang i C. Fleck, „Design, synthesis and biological evaluation of D-ring opened galantamine analogs as multifunctional anti-Alzheimer agents,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 76, 376-386.
- [75] Y. P. Ng, T. C. T. Or i N. Y. Ip, „Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease,” *Neurochemistry International*, **2015**, 89, 260-270.
- [76] „Non-cholinergic strategies have a potential role in the management of Alzheimer's disease,” *Drugs & Therapy Perspectives*, **2003**, 19, (10), 7-10.
- [77] The Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial Research Group, „Results of a follow-up study to the randomized Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT),” *Alzheimer's & Dementia*, **2013**, 9, 714 - 723.
- [78] S. Cote, P.H. Carmichael, R. Verreault, J. Lindsay, J. Lefebvre i D. Laurin, „Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of cognitive impairment and Alzheimer's disease,” *Alzheimer's & Dementia*, **2012**, 8, 219-226.
- [79] S. Weggen, J. L. Eriksen, P. Das, S. A. Sagi, R. Wang, C. U. Pietrzik, K. A. Findlay, T. E. Smith, M. P. Murphy, T. Bulter, D. E. Kang, N. Marquez-Sterlingk, T. E. Golde i E. H. Koo, „A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity,” *Nature*, **2001**, 414, 212-216.
- [80] D. de Jong, R. Jansen, W. Hoefnagels, M. Jellesma-Eggenkamp, M. Verbeek, G. Borm i B. Kremer, „No Effect of One-Year Treatment with Indomethacin on Alzheimer's Disease Progression: A Randomized Controlled Trial,” *PLoS ONE*, **2008**, 3, (1:e1475), 1-7.
- [81] L. Gasparini, E. Ongini i G. Wenk, „Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action,” *Journal of Neurochemistry*, **2004**, 91, 521-536.

- [82] E. Nepovimova, E. Uliassi, J. Korabecny, L. E. Peña-Altamira, S. Samez, A. Pesaresi, G. E. Garcia, M. Bartolini, V. Andrisano, C. Bergamini, R. Fato, D. Lamba, M. Roberti, K. Kuca, B. Monti i M. L. Bolognesi, „Multitarget Drug Design Strategy: Quinone–Tacrine Hybrids Designed To Block Amyloid- β Aggregation and To Exert Anticholinesterase and Antioxidant Effects,” *Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 57, 8576-8589.
- [83] M. Fereidoonhezad, A. Mostoufi, M. Eskandari, S. Zali i F. Aliyan, „Multitarget Drug Design, Molecular Docking and PLIF Studies of Novel Tacrine–Coumarin Hybrids for the Treatment of Alzheimer’s Disease,” *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2018**, 17, (4), 1217-1228.
- [84] F. Prati, M. Bartolini, E. Simoni, A. D. Simone, A. Pinto, V. Andrisano and M.L. Bolognesi, "Quinones bearing non-steroidal anti-inflammatory fragments as multitarget ligands for Alzheimer’s disease," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23, 6254-6258.
- [85] F. Prati, A. Cavalli i M. L. Bolognesi, „Navigating the Chemical Space of Multitarget-Directed Ligands: From Hybrids to Fragments in Alzheimer’s Disease,” *Molecules*, **2016**, 21, (466), 1-12.
- [86] S.Y. Li, X.B. Wang, S.S. Xie, N. Jiang, K. D. Wang, H.Q. Yao, H.B. Sun i L.Y. Kong, „Multifunctional tacrine-flavonoid hybrids with cholinergic, β - amyloid-reducing, and metal chelating properties for the treatment of Alzheimer’s disease,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, 69, 632 - 646.
- [87] W. Li, M. Mak, H. Jiang, Q. Wang, Y. Pang, K. Chen i Y. Han, „Novel Anti-Alzheimer’s Dimer Bis(7)-Cognitin: Cellular and Molecular Mechanisms of Neuroprotection Through Multiple Targets,” *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, **2009**, 6, (1), 187-201.
- [88] J.W. Yan, Y.P. Li, W.J. Ye, S.B. Chen, J.Q. Hou, J.H. Tan, T.M. Ou, D. Li, L.Q. Gu i Z.-S. Huang, „Design, synthesis and evaluation of isaindigotone derivatives as dual inhibitors for acetylcholinesterase and amyloid beta aggregation,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**, 20, 2527-2534.

- [89] K. Czarnecka, N. Chufarova, K. Halczuk, K. Maciejewska, M. Girek, R. Skibiński, J. Jończyk, M. Bajda, J. Kabziński, I. Majsterek i P. Szymański, „Tetrahydroacridine derivatives with dichloronicotinic acid moiety as attractive, multipotent agents for Alzheimer's disease treatment,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, 145, 760-769.
- [90] G. L. Ellman, K. D. Courtney, A. Valentino jr. i R. M. Featherstone, „A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity,” *Biochemical Pharmacology*, **1961**, 7, (2), 88-90.
- [91] M. Benabent, E. Vilanova, M. Á. Sogorb i J. Estévez, „Cholinesterase assay by an efficient fixed time endpoint method,” *MethodsX*, **2014**, 1, 258-263.
- [92] USP XXII-NF XVII United States Pharmacopeia Convention, Inc., **1990**, 644 - 645.
- [93] M. Pawłowska i E. Augustin, „Systemy ekspresyjne białek cytochromu P450 w badaniach in vitro metabolizmu leków,” *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **2011**, 65, 367-376.
- [94] J. A. Plumb, „Cell sensitivity assays: the MTT assay,” *Methods in Molecular Medicine*, **1999**, 28, 25-30.
- [95] H. Lu, X. Li, J. Zhang, H. Shi, X. Zhu i X. He, „Effects of cordycepin on HepG2 and EA.hy926 cells: Potential antiproliferative, antimetastatic and anti-angiogenic effects on hepatocellular carcinoma,” *Oncology Letters*, **2014**, 7, (5), 1556-1562.
- [96] A. Mailloux, K. Grenet, A. Bruneel, B. Bénétteau-Burnat, M. Vaubourdolle i B. Baudin, „Anticancer drugs induce necrosis of human endothelial cells involving both oncosis and apoptosis,” *European Journal of Cell Biology*, **2001**, 80, (6), 442-449.
- [97] K. Musil, V. Florianova, P. Bucek, V. Dohnal, K. Kuca i K. Musilek, „Development and validation of a FIA/UV-vis method for pKa determination of oxime based acetylcholinesterase reactivators,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2016**, 117, 240-246.

- [98] N. Nenadis, O. Lazaridou i M. Z. Tsimidou, „Use of Reference Compounds in Antioxidant Activity Assessment.,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, (14), 5452-5460.
- [99] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang i C. Rice-Evans, „Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.,” *Free Radical Biology and Medicine*, **1999**, 26, (9), 1231-1237.
- [100] M. S. Blois, „Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical,” *Nature*, **1958**, 181, 1199–1200.
- [101] K. Chand, H. Alsoghier, S. Chaves i M. A. Santos, „Tacrine-(hydroxybenzoyl-pyridone) hybrids as potential multifunctional anti-Alzheimer's agents: AChE inhibition, antioxidant activity and metal chelating capacity.,” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2016**, 163, 266-277.
- [102] T. Szegletes, W. D. Mallender i T. L. Rosenberry, „Nonequilibrium Analysis Alters the Mechanistic Interpretation of Inhibition of Acetylcholinesterase by Peripheral Site Ligands,” *Biochemistry*, **1998**, 37, (12), 4206-4216.