

**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**mgr farm. Karolina Maciejewska-Stupska**

**Ocena nowych hybryd akrydyny w kierunku poszukiwania ligandów wielofunkcyjnych.**

**Evaluation of the new acridine hybrids toward the search for multifunctional ligands.**

Promotor pracy:

prof. dr hab. n. farm. Paweł Szymański

Promotor pomocniczy:

dr n. farm. Kamila Czarnecka

Katedra Chemii Farmaceutycznej

Zakład Chemii Farmaceutycznej,

Analizy Leków i Radiofarmacji

## **Podziękowania**

Pragnę złożyć najszczerze podziękowania mojemu promotorowi prof. dr hab. n. farm Pawłowi Szymańskiemu za niecenioną pomoc i życzliwość, którą otrzymałam na każdym etapie naszej współpracy.

Chciałabym również podziękować dr n. farm. Kamili Czarneckiej oraz dr n. farm. Pawłowi Kręciszowi. Dziękuję Wam za wszelkie rady i okazaną pomoc. Cieszę się, że przez te kilka lat mogłam z Wami pracować.

W sposób szczególny pragnę podziękować moim bliskim – Mężowi, Rodzicom i Siostrze za wiarę we mnie i moje możliwości. Dziękuję Wam za wsparcie, ogromną cierpliwość i zrozumienie jakie okazaliście mi na tak ważnym dla mnie etapie życia.

## Spis treści

Wykaz skrótów.....	5
1 CZĘŚĆ TEORETYCZNA .....	8
1.1 Wstęp.....	8
1.2 Choroba Alzheimera .....	9
1.2.1 Epidemiologia .....	11
1.2.2 Etiologia .....	12
1.2.3 Czynniki ryzyka .....	15
1.2.4 Diagnostyka.....	16
1.3 Hipotezy rozwoju choroby Alzheimera .....	19
1.3.1 Hipoteza cholinergiczna.....	19
1.3.2 Hipoteza amyloidowa.....	27
1.3.3 Hipoteza białka tau.....	32
1.4 Farmakoterapia choroby Alzheimera .....	36
1.5 Wielokierunkowe działanie akrydyny i chinoliny .....	43
1.5.1 Akrydyna.....	43
1.5.2 Chinolina .....	47
2 Cel pracy .....	51
3 CZĘŚĆ PRAKTYCZNA.....	53
3.1 Metodologia badań.....	53
3.1.1 Odczynniki chemiczne .....	53
3.1.2 Aparatura .....	54
3.1.3 Synteza .....	55
3.1.3.1 Synteza związków 1a-1h.....	55
3.1.3.2 Synteza związków 2a-2h.....	57
3.1.3.3 Synteza związków 3a-3h.....	59
3.2 Badania biologiczne .....	60
3.2.1 Metodologia przygotowania odczynników i roztworów do badań biologicznych .	60
3.2.1.1 Bufor fosforanowy soli fizjologicznej (PBS).....	60
3.2.1.2 Acetylocholinoesteraza (AChE).....	60
3.2.1.3 Butyrylocholinoesteraza (BuChE) .....	60
3.2.1.4 Roztwór kwasu 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB).....	60
3.2.1.5 Roztwór jodku acetylotiocholiny .....	60
3.2.1.6 Roztwór dichlorowodorku 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny) (APPH)....	60
3.2.1.7 Roztwór podstawowy fluoresceiny sodowej (FL) .....	61
3.2.1.8 Roztwór roboczy fluoresceiny sodowej (FL).....	61

3.2.2 Ocena <i>in vitro</i> aktywności inhibicyjnej zsyntetyzowanych związków 3a-3h wobec cholinoesteraz.....	61
3.2.3 Badanie <i>in vitro</i> kinetyki reakcji enzymatycznej wobec cholinoesteraz.....	61
3.2.4 Ocena aktywności antyoksydacyjnej przy użyciu metody ORAC-FL.....	62
3.2.5 Badanie hepatotoksyczności na linii ludzkich komórek gwiaździstych wątroby (HSCs).....	63
3.3 Modelowanie molekularne.....	63
3.4 Analiza ADMET.....	64
4 Wyniki i dyskusja.....	65
4.1 Synteza.....	65
4.1.1 Synteza związków 1a-1h.....	67
4.1.2 Synteza związków 2a-2h.....	68
4.1.3 Synteza związków 3a-3h.....	75
4.2 Ocena aktywności inhibicyjnej <i>in vitro</i> związków 3a-3h wobec AChE i BuChE.....	82
4.3 Charakterystyka kinetyki reakcji enzymatycznej AChE i BuChE.....	85
4.4 Ocena właściwości antyoksydacyjnych wybranych związków metodą ORAC-FL.....	87
4.5 Badanie hepatotoksyczności wybranych pochodnych na linii ludzkich komórek gwiaździstych wątroby (HSCs).....	88
4.6 Modelowanie molekularne.....	89
4.7 Analiza ADMET.....	97
5 Wnioski.....	99
6 Streszczenie w języku polskim.....	102
7 Streszczenie w języku angielskim.....	104
8 Bibliografia.....	106

## Wykaz skrótów

**ACh** – ang. acetylcholine, acetylocholina

**AChE** - ang. acetylcholinesterase, acetylocholinoesteraza

**AChEIs** - ang. acetylcholinesterase inhibitors, inhibitory acetylocholinoesterazy

**ADAM10** - ang. a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10, gen kodujący błonową metaloproteazę dysintegrynową 10

**AICD** - ang. APP intracellular domain, wewnątrzkomórkowy fragment białka APP

**aMCI** - ang. amnestic MCI, amnestyczna forma MCI

**APOD** - ang. apolipoprotein D, apolipoproteina D

**APOE** - ang. apolipoprotein E, apolipoproteina E

**APP** - ang. amyloid precursor protein, białko prekursorowe amyloidu

**APPH** - dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny)

**ARIA** - ang. amyloid-related imaging abnormalities, zaburzenia obrazowania związane z amyloidem

**ATCh** - ang. acetylthiocholine, acetylotiocholina

**A $\beta$**  - ang. amyloid-beta,  $\beta$ -amyloid

**BACE1** - ang. beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1,  $\beta$ -sekretaza 1

**BACE2** - ang. beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2,  $\beta$ -sekretaza 2

**BAD hypothesis** - ang.  $\beta$ -amyloid dysfunction hypothesis, hipoteza dysfunkcji  $\beta$ -amyloidu

**BBB** - ang. blood-brain barrier, bariera krew-mózg

**BuChE** - ang. butyrylcholinesterase, butyrylocholinoesteraza

**cAMP** - ang. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate, cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan

**CAS** - ang. catalytic active site, miejsce aktywne katalitycznie

**CDK5** - ang. cyclin-dependent kinase 5, zależna od cyklin kinaza 5

**ChAT** - ang. choline acetyltransferase, transferaza acetylocholiny

**CNS** - ang. central nervous system; centralny układ nerwowy

**CSF** - ang. cerebrospinal fluid, płyn mózgowo-rdzeniowy

**CT** - ang. computed tomography, tomografia komputerowa

**DFT** - ang. density functional theory, teoria funkcjonału gęstości

**DTNB** - kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy)

**EEG** - elektroencefalografia

**ELISA** - ang. enzyme-linked immunosorbent assay, test immunoenzymatyczny

**EMA** - ang. European Medicine Agency, Europejska Agencja Leków

**EOAD** - ang. early onset Alzheimer's disease, choroba Alzheimera o wczesnym początku

**FAD** - ang. familial Alzheimer's disease, rodzinna postać choroby Alzheimera

**FDA** - ang. Food and Drug Administration, Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków

**FL** - fluoresceina sodowa

**GABA** - kwas  $\gamma$ -aminomasłowy

**GSK-3 $\beta$**  - ang. glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , kinazy syntazy glikogenu 3 $\beta$

**GWAS** - ang. genome-wide association study, szeroko zakrojone badania genomu

**HSCs** - ang. human hepatic stellate cells, linia ludzkich komórek gwiazdzistych wątroby

**IL** - interleukina

**LOAD** - ang. late onset Alzheimer's disease, choroba Alzheimera o późnym początku

**LTD** - ang. long-term depression, długotrwałe osłabienie synaptyczne

**LTP** - ang. long-term potentiation, długotrwałe wzmocnienie synaptyczne

**mAChRs** - ang. muscarinic acetylcholine receptors, receptory muskarynowe

**MAO** - ang. monoaminooxidase, monoaminoksydaza

**MAP** - ang. microtubule-associated protein, białko związane z mikrotubulami

**MAPT** - ang. microtubule-associated protein tau, białko tau związane z mikrotubulami

**MBD** - ang. microtubule-binding domain, domena wiążąca microtubule

**MCI** - ang. mild cognitive impairment, łagodne upośledzenie funkcji poznawczych

**M-EOAD** - ang. Mendelian early onset Alzheimer's disease, choroba Alzheimera o wczesnym początku z dziedziczeniem mendlowskim

**MMSE** - ang. Mini-Mental State Examination, Krótka Skala Oceny Stanu Psychicznego

**MoCA** - ang. Montreal Cognitive Assessment, Montrealska Skala Oceny Funkcji Poznawczych

**MRI** - ang. magnetizing resonance imaging, rezonans magnetyczny

**MTDL's** - ang. multi-target directed ligands, ligandy wielofunkcyjne

**nAChRs** - ang. nicotinic acetylcholine receptors, receptory nikotynowe

**naMCI** - ang. nonamnestic MCI, nieamnesticzna forma MCI

**NFTs** - ang. neurofibrillary tangles, splątki neurofibrylarne

**NGS** - ang. next generation sequencing, sekwencjonowanie nowej generacji

**NIA-AA** - ang. National Institute on Aging and Alzheimer's Association, Narodowy Instytut

**NMDA** - kwas *N*-metylo-D-asparaginowy

**NM-EOAD** - ang. Non-Mendelian early onset Alzheimer's disease, choroba Alzheimera o wczesnym początku z dziedziczeniem niemendlowskim

**OH** - ang. oxyanion hole, otwór (kieszka) oksyanionowy

**OUN** - ośrodkowy układ nerwowy

**PAS** - ang. peripheral anionic site, peryferyjne miejsce anionowe

**PET** - ang. positron emission tomography, pozytonowa tomografia emisyjna

**PLD3** - ang. phospholipase D3, fosfolipaza D3

**PSEN** - presenilina

**p-tau** - ang. phosphorylated tau, ufosforylowane tau

**ROS** - ang. reactive oxygen species, reaktywne formy tlenu

**SAD** - ang. sporadic Alzheimer's disease, sporadyczna forma choroby Alzheimera

**SORL1** - ang. sortilin related receptor 1, gen kodujący receptor związany z sortyliną

**SPECT** - ang. single-photon emission computed tomography, tomografia emisyjna pojedynczych fotonów

**TGF $\beta$**  - ang. transforming growth factor  $\beta$ , transformujący czynnik wzrostu  $\beta$

**TLC** - ang. thin-layer chromatography, chromatografia cienkowarstwowa

**TNF $\alpha$**  - ang. Tumor necrosis factor  $\alpha$ , czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$

**TPSA** - ang. Topological Polar Surface Area, Topologiczna Powierzchnia Polarna

**TREM2** - ang. triggering receptor expressed on myeloid cells 2, gen kodujący białko wyzwalające receptor komórek mieloidalnych 2

**VACHT** - ang. vesicular acetylcholine transporter, pęcherzykowy transporter acetylocholin

**WHO** - ang. World Health Organization, Światową Organizacja Zdrowia

# 1 CZĘŚĆ TEORETYCZNA

## 1.1 Wstęp

Demencja, zwana inaczej otępieniem, charakteryzuje się przewlekłym i postępującym upośledzeniem funkcji poznawczych, w szczególności zapamiętywania, myślenia, orientacji, rozumienia, możliwości uczenia się oraz zmianami zachowania. Otępienie ma ogromny wpływ na jakość codziennego życia osób chorych jak również ich rodzin oraz opiekunów. Dotyczy głównie osób starszych, po 65 roku życia[1].

Demencja dotyka około 50 milionów ludzi na świecie[2]. Prognozy na przyszłość nie są optymistyczne. Szacuje się, że do 2050 roku liczba osób cierpiących na demencję wyniesie około 139 milionów. Otępienie starcze jest błędnie przypisywaną chorobą krajów rozwiniętych, gdyż ponad połowa chorych obecnie żyje w krajach rozwijających się, a liczba ta ma znacząco wzrosnąć w przyszłości. Koszty leczenia i opieki nad chorymi są ogromne. Obecnie wynoszą one około 1,3 trylionu USD na świecie i ciągle rosną. Ponadto warto zwrócić uwagę na obciążenie psychiczne z jakim muszą się mierzyć pacjenci, ich rodziny i opiekunowie wobec tej postępującej i wyniszczającej choroby[2].

Kolejnym ważnym problemem jest diagnostyka otępienia, a co za tym idzie wdrożenie odpowiedniego leczenia i opieki nad pacjentem. Badania pokazują, że w krajach rozwiniętych tylko 20-50% przypadków demencji jest właściwie zdiagnozowanych. Sytuacja w krajach rozwijających się jest znacznie gorsza. Przewiduje się, że odsetek osób niezdiagnozowanych może wynosić nawet 90%. Wczesna diagnostyka demencji oraz wdrożenie leczenia i odpowiedniej opieki nad pacjentem na wczesnym etapie rozwoju choroby jest kluczowe dla zwiększenia komfortu oraz jakości życia pacjentów i ich rodzin[2, 3].

Najczęstszą przyczyną demencji na świecie jest choroba Alzheimera, stanowiąca około 50-60% przypadków. Oprócz choroby Alzheimera możemy również wyróżnić otępienie naczyniowe, demencję z ciałami Lewy'ego oraz otępienie czołowo-skroniowe. Wszystkie te jednostki chorobowe różnią się patogenezą, nie mniej skutkują nieodwracalnym uszkodzeniem mózgu, prowadzącym do upośledzenia funkcji kognitywnych oraz w konsekwencji do śmierci[1, 4].

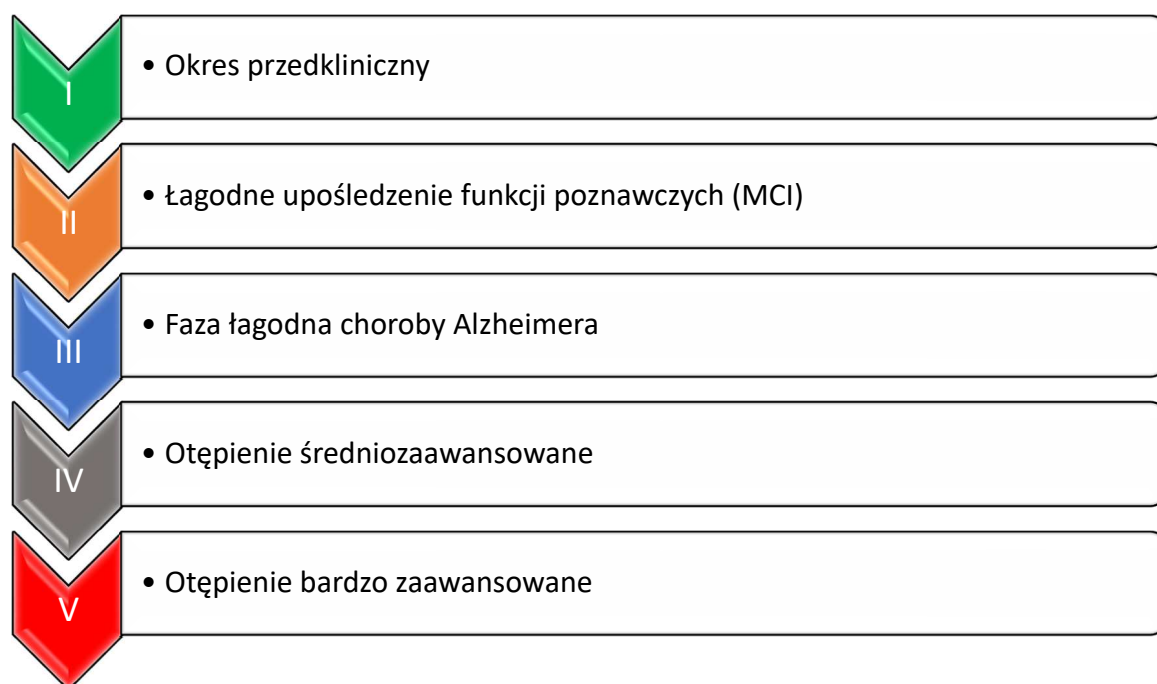
Prawdziwym wyzwaniem dla farmacji i medycyny jest farmakoterapia demencji, w tym choroby Alzheimera. Obecnie leczenie demencji ma charakter symptomatyczny, nie wpływający na patogenezę choroby. Poszukiwanie nowych leków, które będą działać na przyczynę choroby, a nie jedynie łagodzić objawy powinno stać się sprawą priorytetową dla świata nauki w obliczu rosnącego problemu demencji na świecie[5].



## 1.2 Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera jest najczęściej występującą chorobą neurodegeneracyjną oraz najczęstszą przyczyną demencji na świecie. Po raz pierwszy opisał ją niemiecki psychiatra Alois Alzheimer w 1906 roku badając przypadek 51-letniej pacjentki, Auguste Deter. Chorobę wyróżnia skomplikowany patomechanizm i zróżnicowana etiologia, która pomimo ponad 100 lat badań nie została w pełni odkryta i wyjaśniona[1].

Choroba Alzheimera charakteryzuje się nieodwracalnym i postępującym procesem neurodegeneracyjnym centralnego układu nerwowego (CNS) prowadzącym do upośledzenia funkcji poznawczych: pamięci, uczenia się, orientacji, mowy oraz funkcji motorycznych a w konsekwencji do śmierci[1]. Diagnostyka choroby Alzheimera stanowi duży problem w większości opierając się na wywiadzie i testach pamięciowych, takich jak „test zegara” oraz test MMSE[4]. Niestety ostateczna diagnoza jest możliwa jedynie po śmierci. Zgodnie z nowymi wytycznymi amerykańskiego NIA-AA[2], termin „choroba Alzheimera” odnosi się do pacjentów ze zdiagnozowanymi charakterystycznymi biomarkerami tej choroby jak: blaszki  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ) i złoży białka tau[3, 6], wykrytymi w badaniach *in vivo* płynu mózgowodzeniowego oraz badaniami obrazowymi wykorzystującymi rezonans magnetyczny (MRI), pozytonową tomografię emisyjną (PET), tomografię komputerową pojedynczego fotonu (SPECT) lub w badaniu post-mortem[7]. „Kliniczny zespół Alzheimera” to zalecana terminologia dla pacjentów z klinicznymi objawami otępienia, ale nie potwierdzoną obecnością biomarkerów charakterystyczną dla choroby Alzheimera. NIA-AA opracowała również koncepcję „patologicznych zmian charakterystycznych dla choroby Alzheimera”, która odnosi się do wczesnego etapu rozwoju choroby Alzheimera, zdefiniowanego *in vivo* przez obecność  $A\beta$  bez potwierdzonej obecności patologicznego białka tau. Termin „Alzheimer’s continuum” odnosi się do wszystkich pacjentów w trakcie rozwoju choroby z potwierdzoną obecnością  $A\beta$ [2].



**Ryc. 1** Fazy rozwoju choroby Alzheimera[8].

W chorobie Alzheimera z racji progresywnego charakteru wyróżniamy kilka faz rozwoju choroby (**Ryc. 1**)[8]. W zależności od pacjenta, tempo rozwoju choroby jest zróżnicowane. Średnio, osoba ze zdiagnozowaną chorobą Alzheimera żyje od 4 do 8 lat[9]. Jednak ten okres może trwać nawet 20 lat w zależności od różnych czynników[9]. Charakterystyczne zmiany w mózgu związane z chorobą Alzheimera, które obejmują pojawienie się patologicznego A $\beta$  i białka tau, stanu zapalnego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), uszkodzenie mitochondriów, mogą pojawić się nawet 15-20 lat przed pierwszymi zauważalnymi objawami[10]. Okres ten, zwany jest przedklinicznym[11, 12].

Kolejnym etapem rozwoju choroby Alzheimera jest łagodne upośledzenie funkcji poznawczych (MCI - ang. mild cognitive impairment), charakteryzujące się lekkim upośledzeniem pamięci i myślenia[11]. Wyróżniamy dwie formy MCI: amnestyczny MCI (aMCI) – MCI z przeważającymi objawami utraty pamięci oraz nonamnestyczny MCI (naMCI), gdzie przeważają zaburzenia mowy, orientacji oraz problemy z podejmowaniem decyzji[4]. Zmiany te nie wpływają znacząco na funkcjonowanie pacjenta w życiu codziennym. Zaniki pamięci najczęściej dotyczą rzeczy z życia codziennego jak rozmów czy, umówionych spotkań. Pacjenci mogą również przejawiać trudności z osądem i podjęciem decyzji. MCI jest rozpatrywane również jako odrębna jednostka chorobowa niezwiązana z chorobą Alzheimera[13]. Niemniej, uważa się, że w zdecydowanej większości zdiagnozowane aMCI stanowi preludium choroby Alzheimera[1, 4].

Choroba Alzheimerera jest najczęściej diagnozowana w fazie łagodnej, kiedy pacjent i jego rodzina zauważają znaczące problemy z pamięcią i myśleniem, mające wpływ na codzienne życie[14]. Pacjent doświadcza problemów z zapamiętywaniem nowych informacji, ma trudności z podejmowaniem decyzji, rozwiązywaniem problemów i złożonych zadań. W tej fazie charakterystyczne jest pojawienie się zmian w osobowości, szczególnie drażliwości i złości[4]. Pacjenci wykazują również upośledzoną orientację, często gubiąc się w swoim otoczeniu[8].

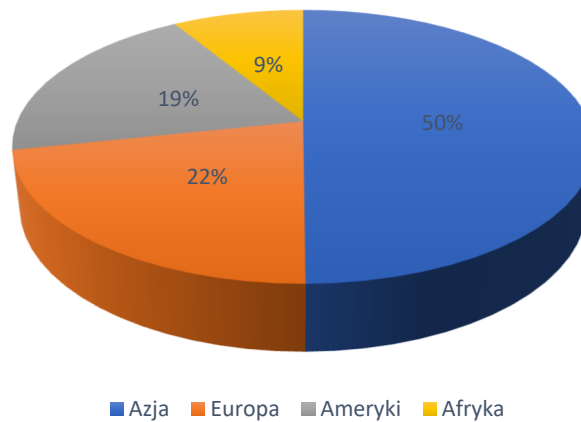
Na kolejnym etapie, w otępieniu średniozaawansowanym oprócz pogłębiających się problemów z pamięcią i orientacją występują również zaburzenia mowy[8, 14]. Pacjenci myślą wtedy słowa, mają trudności ze znalezieniem odpowiedniego słowa w zdaniu oraz wykazują znaczące zubożenie słownictwa. U części pacjentów rozwijają się poważne zaburzenia zachowania w tym epizody psychotyczne np. omamy wzrokowe i słuchowe, napady manii prześladowczej, zaburzenia rytmu snu i czuwania[15-17]. W tym stadium pacjenci wymagają większej pomocy w codziennych aktywnościach[8].

W ostatnim etapie rozwoju choroby – otępienia zaawansowanego, pacjenci stają się całkowicie zależni od opiekunów[8]. Komunikacja staje się bardzo utrudniona. Chorzy nie odróżniają osób najbliższych ani pór dnia. Pacjenci doświadczają również poważnego upośledzenia funkcji motorycznych oraz problemów z utrzymaniem moczu i stolca[18, 19]. Pojawiają się również problemy z połykaniem przez co dochodzi do osłabienia i wyniszczenia organizmu[8, 20].

### **1.2.1 Epidemiologia**

W 2016 roku liczba osób cierpiących z powodu demencji na świecie wyniosła ok 47 milionów[21, 22]. Zgodnie z szacunkami liczba ta co 20 lat ma ulec podwojeniu osiągając w 2050 roku ponad 130 milionów[22]. Zgodnie z przewidywaniami, w 2015 Azja przodowała w ilości osób cierpiących na demencję (22,9 milionów). Szacunkowe dane dotyczące Europy wskazywały na ponad 10 milionów chorych. Ponad 9 milionów chorych przewidywano w obu Amerykach oraz około 4 milionów w Afryce (**Ryc. 2, str. 12**)[22]. Chociaż demencje uważa się za chorobę głównie krajów rozwiniętych, ze względu na różne czynniki m.in. dłuższą przeciętną długość życia oraz lepszą opiekę medyczną, to według nowych danych największy wzrost nowych przypadków demencji będzie dotyczył krajów rozwijających się - w regionach Afryki Północnej oraz Bliskiego Wschodu[22].

## Częstość występowania demencji na świecie w 2015 roku [%]



**Ryc. 2** Procentowy rozkład występowania demencji na świecie[22].

Choroba Alzheimera jest przyczyną 50-60% przypadków demencji na świecie[11]. Wraz z wiekiem zapadalność na demencję gwałtownie rośnie. Zgodnie z wynikami badań, zapadalność na demencję podwaja się co 6,5 roku dla Europy Zachodniej i Centralnej[22]. W grupie osób w wieku 60-69 lat wynosi ona 0,6%, a w grupie w wieku 90 lat i więcej aż 22,2%[21].

Demencja jest obecnie piątą, najczęstszą przyczyną śmierci na świecie[23]. Śmiertelność z powodu demencji na świecie między 1990 a 2016 rokiem wzrosła o 148%[21]. Zarówno w aspekcie zapadalności na demencję, jak i skutku śmiertelności obserwuje się znaczące zróżnicowanie ze względu na płeć. Zapadalność na demencję wśród kobiet w 2016 roku była większa 1,17 razy niż u mężczyzn. W 2016 roku zmarło ok. 1,5 miliona kobiet z demencją natomiast mężczyzn ok. 0,8 miliona[21].

### 1.2.2 Etiologia

Ze względu na wiek pacjenta, który jest głównym czynnikiem ryzyka wyróżniamy dwa typy choroby Alzheimera: chorobę Alzheimera o wczesnym początku (ang. early onset Alzheimer's disease, EOAD) oraz chorobę Alzheimera o późnym początku (ang. late onset Alzheimer's disease, LOAD)[24].

EOAD rozwija się u pacjentów przed 65 rokiem życia. Stanowi ok 5% wszystkich diagnozowanych przypadków choroby Alzheimera. EOAD charakteryzuje się często atypowymi objawami i agresywnym przebiegiem rozwoju choroby. Wyróżniamy dwie formy EOAD: z dziedziczeniem mendlowskim (ang. Mendelian EOAD, M-EOAD) oraz

z dziedziczeniem niemendlowskim (ang. Non-Mendelian EOAD, NM-EOAD)[25]. M-EOAD jest ściśle związane z mutacjami genów zaangażowanych przede wszystkim w powstawanie patologicznego A $\beta$  takimi jak: białko prekursorowe amyloidu (ang. amyloid precursor protein, APP), presenilina 1 i 2 (*PSENI*, *PSEN2*) regulująca potranslacyjne modyfikacje APP[26]. Mutacje w obrębie tych trzech genów odpowiadają za 10-15% przypadków EOAD, a częstość występowania M-EOAD w ogólnej statystyce choroby Alzheimera nie przekracza 1%[25]. EOAD z mendelowskim wzorem dziedziczenia zwane jest również rodzinną postacią choroby Alzheimera (ang. familial Alzheimer's disease, FAD). Średni wiek pojawienia się patologicznych zmian u pacjentów z M-EOAD wynosi 46,2 lata, przy czym pierwsze objawy mogą pojawić się już w 20 roku życia[11]. M-EOAD najczęściej objawia się u pacjentów cierpiących na zespół Downa, gdzie w wyniku częściowej lub całkowitej trisomii chromosomu 21, na którym leży jeden z kluczowych genów kodujących APP, zmiany patologiczne charakterystyczne dla AD pojawiają się przed 40 rokiem życia[11]. EOAD z niemendlowskim wzorem dziedziczenia stanowi zdecydowaną większość przypadków wczesnej postaci choroby Alzheimera[25]. Intensywne badania genomu osób cierpiących na NM-EOAD w Stanach Zjednoczonych ujawniły, że to kombinacja zarówno rzadkich, jak i pospolitych wariantów genów oraz czynniki środowiskowe prowadzą do powstania i ujawnienia się patologicznych zmian w mózgu przed 65 rokiem życia. Jednym z głównych genów rozpatrywanych przez badaczy w kontekście zarówno NM-EOAD jak i LOAD są wariacje genu kodującego receptor sortylinę (ang. sortilin related receptor 1, *SORL1*), który jest neuronalnym receptorem dla apolipoproteiny E (APOE) ulegającym ekspresji głównie w OUN[25]. Receptor ten zaangażowany jest w transport białka APP. Ponadto odpowiada za zmniejszanie ilość A $\beta$  poprzez bezpośredni transport do lizosomów i jego degenerację lub transport APP do aparatu Golgiego i spowolnienie uwalniania białka do lizosomów[27, 28]. Badania wykazały, że rzadkie warianty genu *SORL1* zwiększają pięciokrotnie ryzyko NM-EOAD co jest porównywalne z ryzykiem posiadania dwóch alleli APOE-e4[25]. Nowe metody sekwencjonowania genomu jak sekwencjonowanie nowej generacji (ang. next generation sequencing, NGS), obejmujące sekwencjonowanie całego genomu, pozwoliło zidentyfikować kolejne geny zaangażowane w rozwój choroby Alzheimera[29]. Jednym z nich jest gen *TREM2* (ang. triggering receptor expressed on myeloid cells 2), kodujący białko wyzwalające receptor komórek mieloidalnych 2, *TREM2*[25]. Rzadkie mutacje w obrębie genu *TREM2* zostały powiązane z zwiększeniem depozycji A $\beta$  oraz jego wychwytu przez mikroglej, a także zwiększoną ilością białka tau w płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. cerebrospinal fluid, CSF). *TREM2* pełni ważną funkcję w aktywacji mikrogleju, uczestnicząc

w modulacji odpowiedzi immunologicznej. Badania wykazały, że *TREM2* stanowi swojego rodzaju miecz obosieczny. O ile na wczesnym etapie choroby aktywacja mikrogleju znacząco ogranicza wzrost blaszek amyloidowych oraz ułatwia ich rozkład, to na zaawansowanym etapie choroby Alzheimera nadmierna aktywacja mikrogleju przyspiesza amyloidogenezę[25, 30, 31].

LOAD, zwana również sporadyczną formą choroby Alzheimera (ang. sporadic Alzheimer's disease, SAD)[32], jest zdecydowanie najczęściej spotykaną postacią choroby Alzheimera, odpowiadającą za około 95% przypadków[25]. W zdecydowanej większości diagnozowana jest u osób po 65 roku życia[33]. Chociaż LOAD nie jest ściśle związane z dziedziczeniem mutacji genów tak jak w przypadku EOAD[34], niemniej do tej pory dzięki sekwencjonowaniu genomu udało się powiązać ponad dwadzieścia genów zwiększających ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera po 65 roku życia m.in. *TREM2* (związany również z EOAD), *ADAM10* i *PLD3*[11]. Wśród nich największy udział ma gen kodujący *APOE*, w szczególności wariant  $\epsilon 4$ [35]. Ryzyko uzależnione jest od ilości alleli  $\epsilon 4$ . Według badań, ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera u heterozygoty posiadającej jeden allel *APOE4* jest 2-3 razy większe niż u osób nieposiadających tego wariantu. Z kolei homozygotyczny układ dwóch alleli *APOE4* zwiększa ryzyko rozwoju choroby aż o 12 razy[36]. Ponadto udowodniono, że obecność *APOE4* związana jest z ogólnym upośledzeniem funkcji kognitywnych niezwiązanych z rozwojem choroby Alzheimera[37]. Wśród przypadków LOAD tylko około 40% posiadało chociaż jeden allel *APOE4*[38, 39]. Rozwój LOAD nie jest więc uzależniony od obecności *APOE4*, lecz znacząco zwiększa ryzyko jej wystąpienia. Istotne okazały się mutacje w obrębie genu *ADAM10* kodującego błonową metaloproteazę dysintegrynową 10 (ang. a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10, *ADAM10*)[40]. Odpowiedzialne są za wzrost ilości toksycznego  $A\beta$  w przestrzeni pozakomórkowej poprzez zwiększenie udziału  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekreazy w obróbce potranslacyjnej białka APP na drodze amyloidogennej. Poszukiwanie związków stymulujących *ADAM10* stało się jednym z możliwych kierunków rozwoju terapii choroby Alzheimera[40, 41].

Szeroko zakrojone badania genomu (ang. genome-wide association study, GWAS) wykazały, że nowo zidentyfikowane geny powiązane z LOAD, zaangażowane są w metabolizm oraz transport cholesterolu i lipidów, endocytozę oraz odpowiedź immunologiczną w obrębie OUN[11, 38]. Zrozumienie roli nowych, zidentyfikowanych czynników powinno pomóc zrozumieć mechanizmy molekularne zaangażowane w rozwój choroby Alzheimera.

### 1.2.3 Czynniki ryzyka

Głównym czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera jest wiek[42]. Choroba zazwyczaj ujawnia się po 65 roku życia. W przypadku EOAD pierwsze zauważalne objawy najczęściej pojawiają się między 40 a 50 rokiem życia. Wzrost zapadalności na chorobę Alzheimera i demencję jest związany z wydłużeniem się średniej długości życia oraz stylem życia[42, 43].

Wszystkie zidentyfikowane czynniki prowadzące do rozwoju choroby Alzheimera możemy podzielić na czynniki genetyczne oraz środowiskowe (**Ryc. 3, str. 16**)[44]. Do czynników genetycznych zaliczmy mutacje w określonych genach m.in. *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *APOE*, *SORL1*, *TREM2*, *ADAM10*, *PLD3*[43, 45]. Mutacje w obrębie tych genów, które zaangażowane są bezpośrednio w metabolizm i usuwanie A $\beta$ , endocytozę, metabolizm i transport cholesterolu oraz lipidów oraz w odpowiedź immunologiczną znacząco zwiększają ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera[45, 46].

Do czynników środowiskowych, a więc modyfikowalnych zaliczamy choroby współistniejące, urazy czaszki, udary mózgu, infekcje i stany zapalne w obrębie OUN, a także siedzący styl życia, otyłość, niezdrową dietę, niedobór witamin, słabą aktywność intelektualną, palenie papierosów, picie alkoholu, zanieczyszczenie środowiska, ekspozycję na metale (szczególnie glin, miedź i cynk) i wiele innych[42-44, 47]. Ryzyko rozwoju choroby znacząco wzrasta u pacjentów obciążonych ryzykiem sercowo-naczyniowym[46]. Wśród chorób współistniejących mających największe znaczenie w rozwoju choroby Alzheimera oraz jego progresji wyróżniamy: nadciśnienie, cukrzycę typu 2, hipercholesterolemię, miażdżycę oraz zespół Downa[43, 46, 48]. Ponadto u pacjentów z zaburzeniami snu oraz rytmu okołodobowego, bezsennością oraz obturacyjnym bezdechem sennym zaobserwowano zwiększenie ryzyka upośledzenia funkcji kognitywnych w późniejszym etapie życia[44]. Długotrwały stres, depresja oraz choroby psychiczne jak schizofrenia, choroba afektywna dwubiegunowa przyczyniają się do pogorszenia funkcji poznawczych u pacjentów, który jest związany jest zarówno z procesem chorobowym jak i leczeniem[47, 49]. Osoby cierpiące na epilepsję stanowią również grupę zwiększonego ryzyka rozwoju choroby Alzheimera[47, 48]. Wpływ chorób współistniejących i choroby Alzheimera na ich wzajemną progresję jest przedmiotem intensywnych badań[48, 50-54]. Wczesna diagnostyka oraz wczesne wdrożenie leczenia chorób współistniejących połączone ze zdrowym stylem życia może mieć kluczowe znaczenie w zapobieganiu, jak i kontrolowaniu rozwoju choroby Alzheimera.



**Ryc. 3** Czynniki ryzyka rozwoju choroby Alzheimera[44].

#### 1.2.4 Diagnostyka

Diagnostyka choroby Alzheimera stanowi duże wyzwanie dla lekarzy. W zależności od dostępności metod diagnostycznych opiera się ona na dokładnym wywiadzie rodzinnym, oceny funkcji poznawczych przy pomocy testów kognitywnych, ogólnym badaniu fizykalnym, badaniu neurologicznym, badaniu elektroencefalograficznym oraz badań z wykorzystaniem technik obrazowania i/lub oznaczenia obecności charakterystycznych biomarkerów w płynie mózgowo-rdzeniowym[4, 33, 55, 56]. W przypadku oceny funkcji poznawczych stosowane są głównie dwa testy: Montrealska Skala Oceny Funkcji Poznawczych (ang. Montreal Cognitive Assessment, MoCA) oraz Krótka Skala Oceny Stanu Psychicznego (ang. Mini-Mental State Examination, MMSE)[1, 55]. Dzięki nim można scharakteryzować obecność, nasilenie oraz naturę zaburzeń kognitywnych biorąc pod uwagę zaburzenia pamięci, orientacji, mowy oraz obecność dodatkowych objawów takich jak niepokój, agresja, depresja, epizody psychotyczne czy zaburzenia snu[33, 55]. Dostępność technik obrazowania i oznaczenia obecności biomarkerów w CSF jest w wielu miejscach na świecie ograniczona, dlatego często ostateczne potwierdzenie choroby Alzheimera możliwe jest jedynie w badaniu *post mortem*.

Techniki obrazowania pełnią obecnie kluczową rolę w klinicznej ocenie pacjentów z podejrzeniem choroby Alzheimera[13, 44]. Podstawowymi technikami obrazowymi wykorzystywanymi w diagnostyce jest tomografia komputerowa (ang. computed tomography, CT) oraz strukturalny i funkcjonalny rezonans magnetyczny (ang. magnetic resonance,



MRI)[13]. Dzięki nim możemy ocenić zmiany strukturalne oraz funkcjonalne w pewnych obszarach mózgu charakterystycznych dla choroby Alzheimera[44]. Zaliczamy do nich przyśrodkowy płat skroniowy, a w szczególności obszar skroniowy oraz obszar skroniowo-ciemieniowy, górny zakręt skroniowy, tylny zakręt obręczy, hipokamp, ciało migdałowate, miejsce sinawe oraz obszary korowe[11, 13]. Zmiany atroficzne i wolumetryczne wymienionych struktur mózgowych wraz z pozytywnymi wynikami testów kognitywnych oraz badań neurologicznych mogą z dużym prawdopodobieństwem potwierdzić diagnozę[6, 13]. Rozwój medycyny nuklearnej pozwolił na wykorzystanie nowych technik obrazowych w diagnostyce choroby Alzheimera, w szczególności wśród pacjentów z atypowym obrazem klinicznym. W tym celu wykorzystuje się PET i SPECT oraz techniki hybrydowe łączące co najmniej dwie metody obrazowania np. PET-CT, SPECT-CT, PET-MRI[13, 44, 56]. Wykorzystywane w medycynie nuklearnej radiofarmaceutyki zawierające w swojej strukturze radioizotopy. Łączone są z nośnikami (najczęściej cząsteczkami organicznymi) o wysokim powinowactwie do badanej tkanki bądź narządu[56]. W diagnostyce choroby Alzheimera najczęściej stosowane są połączenia technetu ( $Tc^{99m}$ ) w SPECT oraz fluoru ( $F^{18}$ ) w PET[13, 44, 55]. Dzięki tym metodom możliwa jest ocena ukrwienia oraz metabolizmu poszczególnych struktur mózgowych i ich stopnia uszkodzenia. PET z wykorzystaniem fluorodeoksyglukozy znakowanej  $F^{18}$  jest metodą stosunkowo najczęściej stosowaną w różnicowaniu demencji na podstawie zmian metabolizmu komórkowego konkretnych obszarów mózgu[1, 13, 25, 55]. Dzięki niej możemy na przykład odróżnić chorobę Alzheimera od otępienia skroniowo-czołowego oraz zróżnicować jego typ w zależności czy spadek metabolizmu dotyczy płata czołowego (typ behawioralny) czy płata skroniowego (typ semantyczny)[13].

Najbardziej innowacyjną metodę diagnostyczną stanowi obecnie PET wykorzystujący znaczniki specyficznie wiążące się z markerami choroby Alzheimera –  $\beta$ -amyloidem oraz białkiem tau[1, 44]. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration, FDA) oraz Europejska Agencja Leków (ang. European Medicine Agency, EMA) zatwierdziły trzy ligandy do wykrywania  $\beta$ -amyloidu wykorzystujące technikę PET: florbetapir (Amyvid<sup>TM</sup>), flutemetamol (Vizamyl<sup>TM</sup>) i florbetaben (Neuraceq<sup>TM</sup>) oraz jeden znacznik do wykrywania białka tau wykorzystujący technikę PET – flortaucipir (Tauvid<sup>TM</sup>)[13, 25, 44, 57]. Znaczniki te wiążą się specyficznie z blaszkami  $\beta$ -amyloidu bądź spletkami neurofibrylarnymi (ang. neurofibrillary tangles, NFTs) składającymi się z zagregowanego białka tau[3, 58]. Dzięki tej metodzie można precyzyjnie zlokalizować zmiany amyloidogenne oraz skupiska NFTs oraz określić ich gęstość i dystrybucję

w mózgu[25, 56]. Metoda ta odznacza się wysoką czułością. Obecność markerów jest konieczna dla potwierdzenia choroby Alzheimera, ale może być również oznaką starzenia się lub innych chorób neurodegeneracyjnych[13, 57]. 35% osób po 65 roku życia bez oznak upośledzenia funkcji poznawczych wykazuje pozytywny test na obecność A $\beta$  w skanach PET-u. Związek między amyloidozą a wiekiem został potwierdzony w badaniach[13]. W związku z tym, metodę PET z wykorzystaniem znaczników specyficznych wobec A $\beta$  oraz tau powinno się traktować jako kryterium wykluczające chorobę Alzheimera, bądź w połączeniu z pozytywnymi wynikami innych badań jako dodatkowe kryterium potwierdzające obecność choroby Alzheimera[13, 25].

Nowe techniki obrazowania wykorzystujące przede wszystkim PET i SPECT pozwalają potwierdzić obecność depozytów patologicznych białek oraz zlokalizować uszkodzone obszary mózgu wykazujące zmniejszony metabolizm komórkowy na wczesnym etapie rozwoju choroby. Wdrożenie i upowszechnienie wczesnej diagnostyki choroby Alzheimera na etapie przedklinicznym z wykorzystaniem technik obrazowych pozwoliłoby na wcześniejsze rozpoczęcie leczenia, monitorowanie efektów oraz rozwój nowoczesnych terapii.

W celu potwierdzenia obecności charakterystycznych markerów dla choroby Alzheimera, A $\beta$ <sub>40</sub>, A $\beta$ <sub>42</sub>, tau i ufosforylowane tau (ang. phosphorylated tau, p-tau), stosuje się ilościowe i jakościowe pomiary obecności tych markerów w CSF[13, 55, 58]. Poziomy A $\beta$ <sub>42</sub> w CSF wskazuje na korową depozycję A $\beta$ [25, 34, 44]. Poziomy całkowitego tau odzwierciedlają stopień zaawansowania procesu neurodegeneracyjnego w mózgu, a p-tau koreluje z poziomem NFTs w mózgu[3, 7, 25, 34]. Oznaczenia markerów w CSF charakteryzują się wysoką dokładnością i specyficznością na poziomie 85-90%[13]. Dzięki takim pomiarom można wstępnie zdiagnozować chorobę Alzheimera już na etapie przedklinicznym lub MCI[56]. Większość tego typu badań była wykonywana przy użyciu testów immunoenzymatycznych (ang. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), charakteryzujących się rozbieżnością wynikającą z różnic analitycznych procedur między laboratoriami[13]. Dodatkowo inwazyjność badania ograniczała użycie tej metody w diagnostyce choroby Alzheimera. Obecnie testy wykonuje się przy użyciu spektrometrii mas. Metoda ta jest zwalidowana oraz używa się w niej certyfikowane materiały referencyjne[13]. Biorąc pod uwagę powyższe zalety, pomiary markerów w CSF mają szansę stać się standardem w diagnostyce choroby Alzheimera.

Oznaczanie poziomów A $\beta$  i tau we krwi oczywiście stanowiłoby bardziej dogodną metodę diagnostyczną[25]. Niestety, poziomy specyficznych białek dla choroby Alzheimera we krwi

są tak niskie, że w tym momencie nie istnieją wystarczająco czułe techniki do ich wykrycia[13, 56]. Niski poziom A $\beta$  i tau we krwi wynika z ich słabej przenikalności przez barierę krew-mózg (ang. blood-brain barrier - BBB), degradacji przez proteazy osocza oraz interferencji spowodowanej dużą ilością białek w osoczu[13]. Niemniej jednak, rozwój ultraczułych technik wykrywania białkowych markerów choroby Alzheimera stanowiłby krok milowy we wczesnej diagnostyce procesów neurodegeneracyjnych.

### **1.3 Hipotezy rozwoju choroby Alzheimera**

Od momentu opisanego po raz pierwszy choroby przez Aloisa Alzheimera w 1906 roku prowadzono intensywne badania nad poznaniem patomechanizmów prowadzących do jej rozwoju. W ciągu ponad 100 lat zidentyfikowano wiele czynników mających wpływ na rozwój choroby. Naukowcy sformułowali trzy główne hipotezy rozwoju choroby Alzheimera w oparciu o różne zmiany patologiczne obserwowane u chorych. Hipoteza cholinergiczna, kaskady  $\beta$ -amyloidu oraz związana z białkiem tau stały się głównymi kierunkami badań nad rozwojem choroby oraz metod leczenia[59].

#### **1.3.1 Hipoteza cholinergiczna**

Hipoteza cholinergiczna jest najstarszą teorią dotyczącą rozwoju choroby Alzheimera. Została sformułowana w latach 70 XX wieku na podstawie badań tkanki mózgowej pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera oraz wyników badań wskazujących na kluczową rolę acetylocholiny (ang. acetylcholine, ACh) w procesach pamięciowych i uczenia się[59, 60]. Pomimo, iż teoria obecnie straciła na znaczeniu to dzięki niej znacząco pogłębiła się wiedza na temat choroby Alzheimera i procesów neurodegeneracyjnych. Ponadto, większość stosowanych obecnie leków w chorobie Alzheimera to inhibitory acetylocholinoesterazy (ang. acetylcholinesterase inhibitors, AChEIs), które opierają się na tej teorii[5, 61].

W przebiegu choroby Alzheimera obserwuje się korelację między stopniem upośledzenia przewodnictwa cholinergicznego w charakterystycznych dla choroby obszarach mózgu a pogorszeniem funkcji kognitywnych[61]. Na upośledzenie przewodnictwa cholinergicznego składa się: atrofia neuronów cholinergicznyc, przede wszystkim w obrębie części podstawnej kresomózgowia w tym jądra podstawnego Meynerta łączącym się z hipokampem oraz korą mózgową płata skroniowego oraz skroniowo-ciemieniowego, spadek ilości ACh w szczelinie synaptycznej, upośledzenie wychwytu choliny z przestrzeni synaptycznej, spadek poziomu oraz aktywności transferazy acetylocholiny (ang. choline

acetyltransferase, ChAT), wzrost aktywności acetylocholinoesterazy (ang. acetylcholinesterase, AChE) oraz butyrylocholinoesterazy (ang. butyrylcholinesterase, BuChE) oraz spadek ekspresji postsynaptycznych receptorów muskarynowych i presynaptycznych receptorów nikotynowych[61, 62].

ACh pełni istotną rolę nie tylko w przewodzeniu impulsów w tkance mięśniowej, ale również w OUN[63]. Badania przeprowadzone w latach 70 XX wieku na zwierzętach udowodniły, że ACh uczestniczy w przewodzeniu impulsów między strukturami mózgu odpowiedzialnymi za zapamiętywanie, koncentrację oraz orientację[62, 64]. Podanie skopolaminy młodym osobnikom spowodowało znaczący spadek funkcji kognitywnych podobny do tych obserwowanych u starszych osobników, który był związany z procesem starzenia. Natomiast podanie fizostygminy, jednego ze znanych AChEI, spowodowało przywrócenie prawidłowych funkcji pamięciowych[64, 65]. Przewodnictwo cholinergiczne w OUN bazuje na synergii między syntezą neuroprzekaźnika, jego magazynowaniem, transportem oraz degradacją[66]. ACh jest syntetyzowana w cytoplazmie neuronów cholinergicznym przez enzym ChAT z choliny oraz acetylo-CoA[62]. Cholina w większości pochodzi z pożywienia, jedynie niewielka frakcja choliny jest syntetyzowana w neuronach *de novo*. Acetylo-CoA pozyskiwany jest do syntezy neuroprzekaźnika z mitochondriów. Następnie ACh jest transportowana z cytozolu do pęcherzyków synaptycznych przez pęcherzykowy transporter acetylocholine (ang. vesicular acetylcholine transporter, VAChT), uwalniana do przestrzeni synaptycznej, gdzie łączy się z receptorami nikotynowymi lub muskarynowymi wywołując efekt stymulujący bądź hamujący. Aktywność ChAT jest regulowana przez depolaryzacyjny napływ jonów  $Ca^{2+}$  do wnętrza neuronu oraz kinazy białkowe fosforylujące enzym[62]. U pacjentów z chorobą Alzheimera zaobserwowano znaczący spadek poziomu ChAT odpowiedzialnej za syntezę ACh, który korelował z poziomem zaawansowania choroby, upośledzeniem uwalniania ACh z pęcherzyków synaptycznych oraz zmniejszeniem aktywności specyficznego transportera odpowiedzialnego za wychwyt choliny[62, 66]. Zmiany te nie występują u osób we wczesnym i łagodnym stadium choroby, co uniemożliwia użycie markerów cholinergicznym we wczesnej diagnostyce choroby Alzheimera[65].

Kolejnym ważnym elementem hipotezy cholinergicznym jest rola esteraz: AChE oraz BuChE w rozwoju choroby Alzheimera[65]. Zgodnie z hipotezą cholinergiczną, redukcja poziomu ACh w mózgu stanowi główną przyczynę upośledzenia funkcji kognitywnym. Logicznym sposobem przeciwdziałania tym skutkom jest podniesienie poziomu ACh w przestrzeni synaptycznej poprzez stymulację produkcji ACh przez ChAT bądź hamowanie

aktywności esteraz odpowiadających za rozkład ACh. Zdecydowanie prostszym rozwiązaniem okazała się inhibicja cholinoesteraz i jak wspomniano wcześniej obecnie farmakoterapia choroby Alzheimera opiera się właśnie na inhibitorach AChE[65, 67].

AChE (EC 3.1.1.7) jest specyficzną esterazą zbudowaną z 537 aminokwasów należącą do rodziny karboksyloesteraz, grupy hydrolaz serynowych, występującą głównie w OUN, erytrocytach oraz połączeniach nerwowo-mięśniowych[68, 69]. Głównym substratem dla AChE jest ACh[70]. Hydrolizuje ona ACh do choliny i jonu octanowego, a sam proces odznacza się znaczącą szybkością katalityczną ( $\sim 10^{-9} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )[71]. AChE odpowiada za niemal 90% aktywności cholinoesteraz w obszarach korowych mózgu. AChE w niskich stężeniach ACh jest bardzo efektywna, natomiast przy wysokich stężeniach następuje inhibicja enzymu przez substrat. Szybkość reakcji hydrolizy jest ograniczana jedynie przez wpływ stężenia substratu oraz szybkość wiązania się ACh w miejscu aktywnym enzymu[68].

Struktura krystaliczna AChE została opisana w 1991 roku[72]. Obie cholinoesterazy wykazują znaczną konserwatywność budowy, co oznacza, że struktura enzymu u ludzi i zwierząt jest wysoce podobna[72]. Umożliwia to przeprowadzanie badań z wykorzystaniem zwierzęcych enzymów z jednoczesnym zachowaniem dobrej projekcji w stosunku do ludzkiej AChE (ang. human acetylcholinesterase, hAChE). Najczęściej w badaniach wykorzystuje się AChE pochodzącą z Strętwy (*Electrophorus electricus*) EeAChE oraz Drętwy kalifornijskiej (*Tetronarce californica*) TcAChE[72].

W strukturze AChE wyróżniamy kilka głównych miejsc odpowiedzialnych za interakcje enzymu z substratem: miejsce aktywne katalitycznie (ang. catalytic active site, CAS), peryferyjne miejsce anionowe (ang. peripheral anionic site, PAS), otwór oksyanionowy (ang. oxyanion hole, OH) oraz kieszeń wiążąca grupy acylowe[72]. Badania kinetyczne wykazały obecność dwóch specyficznych miejsc w CAS – estrowego i anionowego[72]. W miejscu anionowym następuje wiązanie z dodatnio naładowaną cząsteczką aminy IV-rzędowej ACh, bądź innymi cząsteczkami substratów lub inhibitorów będących kationami[72]. Natomiast miejsce estrowe zawiera tzw. triadę katalityczną, czyli specyficzny układ aminokwasów SER200, GLU327, HIS440, odpowiadający za hydrolizę wiązania estrowego w cząsteczce ACh na zasadzie transferu protonu[69, 72]. Triada katalityczna zlokalizowana jest w szczeliny o głębokość 20 Å i szerokości 5 Å ciągnącej się od powierzchni, rozszerzając się w głąb cząsteczki enzymu[70, 71]. Powierzchnia szczeliny zawiera kilkanaście reszt aminokwasów aromatycznych, z których przede wszystkim trzy: GLU199, TRP84 i PHE330 uczestniczą w stabilizacji cząsteczki ACh po wejściu do enzymu na drodze oddziaływań kation- $\pi$  między IV-rzędową aminą a resztą aromatyczną

aminokwasów[73]. Badania z wykorzystaniem TcAChE wykazały, że Trp84 jest kluczowym aminokwasem dla interakcji AChE z ACh[69]. Zmiana w tym miejscu tryptofanu na alaninę skutkowałą 3000-krotnym zmniejszeniem aktywności katalitycznej enzymu[69]. Charakterystyczną częścią szczeliny jest tzw. „wąskie gardło” utworzone przez dwa aminokwasy fenyloalaninę (PHE330) oraz tyrozynę (TYR121). Miejsce to jest bardzo wąskie, ale wykazuje swoistą elastyczność w trakcie interakcji z substratem[71, 72]. Całość szczeliny ma charakter dipola. Oddziaływania elektrostatyczne między grupami aromatycznymi aminokwasów i dodatnio naładowaną cząsteczką substratu, oddziaływania dipol-dipol, słabe wiązania wodorowe oraz oddziaływania kation- $\pi$  pozwalają na przemieszczenie substratu w głąb enzymu w kierunku triady katalitycznej oraz jego stabilizację[69]. Dodatkowo kieszeń acylowa złożona z fenyloalaniny zawierającej pierścień aromatyczny (PHE295, PHE297), wchodząca w skład podstawy szczeliny, nadaje specyficzność substratową oraz ułatwia prawidłowe ułożenie ACh w szczelinie dzięki interakcji z jej grupą acetylową[69]. Ważnym elementem jest również otwór oksyanionowy (GLY118, GLY119, ALA201), który reaguje z powstającym w trakcie katalizy oksyanionem (ujemnie naładowanym tlenem z grupy karbonylowej), stabilizując ładunek ujemny stanu przejściowego (enzym-substrat). Dzięki temu, obniża energię aktywacji, zwiększając wydajność katalityczną enzymu[69]. Ważnym miejscem uczestniczącym w interakcji między enzymem i substratem jest PAS, znajdujące się blisko wejścia do „wąskiego gardła”[70]. Uważa się, że ACh początkowo wiąże się z resztami aminokwasowymi (TRP286, TYR341, TYR124) w PAS[73], a następnie przechodzi do CAS. PAS odpowiada za wiązanie dodatnio naładowanych cząsteczek substratu i przesuwaniu ich w głąb szczeliny[70]. PAS zaangażowany jest w inhibicję enzymu wysokimi stężeniami substratu lub cząsteczkami charakteryzującymi się podobną budową do enzymu. Badania z udziałem acetylotiocholiny (ATCh) wykazały, że ATCh wiąże się przejściowo z PAS[72]. Wysokie stężenia ATCh powodowały inhibicję enzymu, natomiast w niskich stężeniach wiązanie się ATCh w PAS przyspieszało katalizę. Ponadto, wiązanie substratu w PAS blokuje dalsze wejście substratów do miejsca aktywnego oraz wyjście produktów na zasadzie zawady sterycznej[72]. Jest to znaczący mechanizm pod względem konstruowania nowych inhibitorów AChE, gdyż zablokowanie PAS spowoduje inhibicję enzymu, a w konsekwencji podniesienie poziomu ACh w szczelinie synaptycznej. Związki blokujące w sposób funkcjonalny AChE w miejscu CAS, jak i sterycznie w miejscu PAS odznaczają się wysoką efektywnością[72].

BuChE (EC 3.1.1.8) zwana również „pseudocholinoesterazą” odznacza się znacznie mniejszą specyficznością substratową niż AChE[68]. Substratem dla BuChE są różne estry

choliny. BuChE jest wszechobecna w organizmie. Najwięcej BuChE występuje w wątrobie, trzustce, surowicy krwi oraz OUN, gdzie związana jest głównie z komórkami glejowymi i komórkami śródbłonna[74]. BuChE jest w 65% strukturalnie homologiczna w stosunku do AChE[68]. W OUN BuChE pełni rolę pomocniczą w hydrolizie ACh odpowiadając za ok. 10% aktywności cholinesteraz. BuChE różni się od AChE wartościami  $K_m$  oraz odpowiedzią na różne stężenia substratu. ACh w wysokich stężeniach wywołuje efekt inhibicji w stosunku do AChE i jej aktywność znacząco spada, natomiast aktywność katalityczna BuChE jest wysoka[75]. Z kolei w niskich stężeniach ACh, BuChE staje się mniej efektywna katalitycznie[68]. BuChE znacząco różni się budową aminokwasową miejsc zaangażowanych w interakcje enzymu z substratem. BuChE posiada głęboką na 20 Å szczelinę jak AChE, lecz bez „wąskiego gardła”. Ponadto w skład aminokwasów tworzących szczelinę wchodzi sześć aminokwasów alifatycznych o charakterze polarnym. BuChE posiada w miejscu CAS triadę katalityczną składającą się z SER198, GLU325 i HIS438. Ponadto kieszeń acylowa w BuChE jest większa ze względu na obecność strukturalnie mniejszych aminokwasów (LEU286, VAL288)[76]. Otwór oksyanionowy podobnie jak w AChE utworzony jest z aminokwasów glicyny i alaniny (GLY116, GLY117, ALA119). Aminokwasy aromatyczne wchodzące w skład PAS AChE, w BuChE zostały zastąpione krótszymi, alifatycznymi i bardziej polarnymi aminokwasami jak ASN68, GLN119, ALA277[73]. Zmiana aromatycznych aminokwasów na alifatyczne znacząco osłabia specyficzne interakcje między substratem a resztami aminokwasowymi w PAS[76]. Różnice strukturalne BuChE znacząco zwiększyły miejsce aktywne enzymu, a przez to specyficzność substratową enzymu.

Początkowo rola BuChE w rozwoju choroby Alzheimera była marginalizowana ze względu na małą ilość enzymu w mózgu w porównaniu do AChE[72]. Dopiero dalsze badania udowodniły znaczącą rolę BuChE w regulacji poziomu cholinesteraz w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. U osób cierpiących na chorobę Alzheimera zauważono spadek poziomu AChE w pewnych obszarach mózgu nawet o 85%[68]. Znaczącej zmianie ulega w ten sposób stosunek BuChE do AChE w obszarach korowych – z 0,2 do 11 (u pacjentów z bardzo zaawansowaną chorobą Alzheimera)[68, 74]. To sprawia, że funkcjonalna rola BuChE w rozwoju choroby Alzheimera jest o wiele większa niż pierwotnie zakładano[73, 74].

AChE i BuChE zaangażowane są w rozwój choroby Alzheimera poprzez kilka mechanizmów. Po pierwsze, ich podwyższony poziom prowadzi do obniżenia poziomu ACh co odpowiada za pogorszenie funkcji kognitywnych[68]. Ponadto, sama ACh posiada przeciwzapalne właściwości poprzez modulowanie odpowiedzi między systemem

immunologicznym a nerwowym. Zwiększony poziom cholinesteraz w przebiegu choroby Alzheimera przyczynia się do znacznego obniżenia poziomu ACh, a przez to zwiększenia stanu zapalnego w obrębie OUN[68]. Po drugie, badania udowodniły, że AChE może stymulować powstawanie złogów  $\beta$ -amyloidu[73, 77]. Zgodnie z wynikami badań C-terminalny fragment AChE jest w pewnym stopniu homologiczny do N-terminalnego fragmentu amyloidu- $\beta$ [68, 73]. Zaobserwowano łączenie się cząsteczek  $A\beta$  z AChE w PAS[73, 78]. Powstałe kompleksy  $A\beta$ -AChE wykazują dużą stabilność oraz większą neurotoksyczność niż same agregaty  $A\beta$ [74, 79]. Kompleksy AChE z  $A\beta$  powodują niekontrolowany napływ jonów  $Ca^{2+}$  do wnętrza neuronu, co powoduje dysfunkcję mitochondriów poprzez utratę ich potencjału błonowego[79]. Badania na szczurach, którym wstrzyknięto kompleksy  $A\beta$ -AChE wykazały, że kompleksy enzymu z białkiem amyloidowym promowały powstawanie nowych blaszek amyloidowych, astrogliozę oraz większą utratę neuronów niż po wstrzyknięciu tylko agregatów  $A\beta$ [68, 79]. Ponadto badania na transgenicznym myszom posiadającym nadekspresję AChE oraz APP wykazały, że u tych osobników dochodziło do rozwoju blaszek amyloidowych o ok. 50 % szybciej niż u myszy wykazujących nadekspresję jedynie APP[68]. Również BuChE (szczególnie wariant K) działa synergistycznie z APOE4 promując amyloidogenezę oraz powstawanie splątków neurofibrylarnych w obszarach kory nowej[73, 74]. Zwiększa również ryzyko rozwoju choroby Alzheimera po 65 roku życia[68, 74]. BuChE podobnie jak AChE intensywnie wiąże się z  $A\beta$  oraz NFTs. Badania wykazały pozytywną korelację między poziomem BuChE w stosunku do ilości blaszek amyloidowych oraz NFTs[73]. BuChE wiąże się z blaszkami  $\beta$ -amyloidu w momencie osiągnięcia konformacji harmonijki[68, 73, 80]. Ponadto udowodniono, że BuChE promuje powstawanie i rozprzestrzenianie się neurotoksycznych form  $A\beta$  przyspieszając neurodegenerację tkanki mózgowej, a w konsekwencji pojawienie się otępienia[68, 73].

ACh w OUN wiąże się z dwoma rodzajami receptorów: jonotropowymi receptorami nikotynowymi (ang. nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) oraz metabotropowymi receptorami muskarynowymi (ang. muscarinic acetylcholine receptors, mAChRs)[81]. Rola obu klas receptorów w patofizjologii choroby Alzheimera jest przedmiotem intensywnych badań[82-84].

Receptory nikotynowe to transbłonowe białka pentameryczne należące do rodziny jonotropowych receptorów sprzężonych z kanałem jonowym bramkowanym ligandami[84]. Pięć podjednostek receptora skupionych jest wokół centralnego hydrofilowego kanału pośredniczącego w przepływie kationów  $K^+$ ,  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$ [81]. nAChRs odpowiadają



bezpośrednio na sygnał po związaniu ligandu z receptorem bez udziału wtórnego przekaźnika jak w przypadku mAChRs[85]. Receptor składa się z podjednostek  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ) i  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ), które determinują rozmieszczenie receptorów oraz ich właściwości farmakologiczne i elektrofizjologiczne[81, 83]. Receptory te są następnie różnicowane na typ neuronalny i mięśniowy w zależności od ich rozmieszczenia w organizmie[85]. Najbardziej rozpowszechnione w OUN są receptory składające się z podjednostek  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$  i  $\beta 2$ [84, 85]. Wśród nich największe znaczenie w chorobie Alzheimera posiada typ  $\alpha 7$ -nAChRs, który ulega znacznej ekspresji m.in. w hipokampie oraz części podstawnej kresomózgowia i jest zaangażowany w procesy pamięciowe[82]. Receptory te charakteryzują się wysoką przepuszczalnością dla jonów  $Ca^{2+}$  oraz szybką desensytyzacją[81]. Presynaptyczne  $\alpha 7$ -nAChRs pełnią istotną funkcję w uwalnianiu innych neurotransmiterów, natomiast od postsynaptycznych i somatycznych receptorów  $\alpha 7$ -nAChRs uzależnione są wewnątrzkomórkowe zmiany stężenia  $Ca^{2+}$ , które zaangażowane są w aktywowanie wtórnych przekaźników pośredniczących w procesach komórkowych, takich jak ekspresja genów czy plastyczność neuronów[81, 83, 84]. Ponadto wykazano, że aktywacja receptorów  $\alpha 7$ -nAChRs jest kluczowa w rozwoju neuronów glutaminergicznych[85]. W badaniach *post mortem* pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera wykazano znaczący deficyt receptorów typu  $\alpha 7$ -nAChRs[82]. Ostatnie badania blaszek starczych osób chorujących na sporadyczną formę choroby Alzheimera wykazały, że ten typ receptorów jest szczególnie wrażliwy na toksyczne działanie  $A\beta$  poprzez wiązanie się  $\alpha 7$ -nAChRs z  $A\beta$ [82, 83, 85]. Dzięki badaniu immunoprecypitacyjnemu potwierdzono silną interakcję tych dwóch molekuł oraz zidentyfikowano sekwencję aminokwasową  $A\beta_{1-42}$  odpowiedzialną za wiązanie z  $\alpha 7$ -nAChRs (fragment 12-28  $A\beta$ )[83]. Badania immunohistochemiczne wykazały obecność  $\alpha 7$ -nAChRs związanych z  $A\beta_{1-42}$  w blaszkach starczych zlokalizowanych w konkretnych neuronach korowych[85].  $A\beta_{1-42}$  poprzez wiązanie z  $\alpha 7$ -nAChRs blokuje napływ jonów  $Ca^{2+}$  skutkujący inaktywacją receptorów, zmniejszeniem wydzielania acetylocholinoi odpowiadający za upośledzenie funkcji kognitywnych w przebiegu choroby Alzheimera[82, 84]. Stymulacja receptorów  $\alpha 7$ -nAChRs zmniejsza toksyczność  $A\beta$  poprzez promowanie obróbki potranslacyjnej białka APP przez  $\alpha$ -sekretazę oraz działa ochronnie w stosunku do neuronów i BBB[85].  $\alpha 7$ -nAChRs wydają się obiecującym celem terapeutycznym w projektowaniu nowych terapii choroby Alzheimera[82, 84]. Obecnie trwają prace nad syntezą nowych związków o działaniu agonistycznym w stosunku do  $\alpha 7$ -nAChRs[82]. Kilku agonistów receptorów  $\alpha 7$ -nAChRs przeszło do fazy badań klinicznych, niestety w wyniku braku efektywności w poprawie funkcji kognitywnych u pacjentów dalsze badania zostały

przerwane[84]. Jedynymi związkami, które działają w sposób nieselektywny na receptory nAChRs są stosowane obecnie w leczeniu AChEIs[84].

mAChRs należą do klasy metabotropowych receptorów związanych z białkiem G bądź fosfolipazą[85]. Na podstawie ich agonistów i antagonistów wyróżniono pięć typów mAChRs: M1, M2, M3, M4 i M5[62]. Typ M1, M3 i M5 związane są z białkiem Gs, Gq/G<sub>11</sub> lub Gp. Natomiast typ M2 i M4 związane są z białkiem Gi oraz Gk[85]. Typ M1 związany z białkiem Gs stymuluje cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan (cAMP), natomiast M2 związany z Gi powoduje inhibicję cAMP[85]. Typ M3 związany jest z białkiem Gq/G<sub>11</sub> oraz fosfolipazą C, a M5 z fosfolipazą A<sub>2</sub>[62]. mAChRs są rozpowszechnione w mózgu za wyjątkiem typu M5 występującego jedynie w istocie czarnej[85]. Wykazano, że u pacjentów z chorobą Alzheimera ilość receptorów M1-M4 jest znacząco obniżona w korze nowej i hipokampie[86]. Ponadto udowodniono, że zmiany zachowania u pacjentów z chorobą Alzheimera wraz z obecnością stanów depresyjnych, lękowych i psychozy związana jest m.in. z znacznie obniżoną ilością receptorów M2[86, 87]. Stymulacja tych receptorów prowadzi do zmniejszenia aktywności  $\beta$ -sekreazy, a przez to zmniejszenia produkcji A $\beta$ [87]. Analogicznie stymulacja receptorów M1 i M3 prowadzi do redukcji ilości A $\beta$ , ale poprzez aktywację  $\gamma$ -sekreazy[85]. Typ receptorów M1 wydaje się szczególnie ważny, gdyż został on powiązany ze stopniem nasilenia zaburzeń funkcji kognitywnych u pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera[87]. Ustalono, że w przebiegu tej choroby dochodzi do uszkodzenia receptorów M1 zwłaszcza w obszarze kory nowej poprzez rozprzęgnięcie ich z białkiem Gs[85]. Stymulacja receptorów mAChRs, zwłaszcza M1, ma wpływ na metabolizm białka APP przez promowanie jego obróbki szlakiem nieamyloidogennym z zaangażowaniem  $\alpha$  i  $\gamma$ -sekreazy[87], zmniejsza ilość ufosforylowanego białka tau dzięki inhibicji kinazy syntazy glikogenu 3 $\beta$  (ang. glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )[65, 85], stymuluje neurotransmisję glutaminergiczną oraz hamuje transmisję GABA-ergiczną[62]. Agoniści receptorów mAChRs stanowią obiecujący cel terapeutyczny w terapii choroby Alzheimera[85].

Obecnie teoria cholinergiczna straciła na znaczeniu jako samoistna przyczyna choroby Alzheimera, przede wszystkim z powodu braku znaczącej skuteczności AChEIs w poprawie funkcji kognitywnych podczas długoterminowej terapii[64]. W badaniach klinicznych jedynie donepezyl wykazywał nieznaczną poprawę funkcji kognitywnych[61]. Naukowcy zaproponowali zrewidowanie tezy cholinergicznej pod kątem nie przyczynowym, a skutkowym[87]. Degeneracja neuronów cholinergicznych oraz spadek ilości ACh w mózgu nie jest przyczyną rozwoju choroby Alzheimera, a wynikiem zachodzących zmian patologicznych w obrębie obszarów kory nowej spowodowanych akumulacją i toksycznością

dwóch białek: A $\beta$  oraz tau[64]. Upośledzenie cholinergicznego przekazywania występujące na wczesnym etapie rozwoju choroby Alzheimera odpowiada utracie zdolności kompensacyjnych mózgu w odpowiedzi na toksyczne działanie  $\beta$ -amyloidu oraz białka tau, które jest przyczyną upośledzenia funkcji poznawczych[64, 65]. Chociaż badania nad chorobą Alzheimera oraz jej farmakoterapią opierają się obecnie głównie na A $\beta$  oraz białku tau, niemniej pogłębianie wiedzy o roli neurotransmisji cholinergicznej w patogenezie tej choroby powinno być nadal kontynuowane[65].

### 1.3.2 Hipoteza amyloidowa

Agregacja  $\beta$ -amyloidu oraz jego akumulacja w postaci zewnątrzkomórkowych złogów tzw. blaszek starczych jest jedną z charakterystycznych zmian neuropatologicznych obserwowanych w przebiegu choroby Alzheimera.[88, 89] Blaszkę starczą występują w różnych postaciach morfologicznych. Wyróżniamy kilka form morfologicznych blaszek starczych: rozproszoną (pre-amyloidową), neurytyczną, klasyczną oraz kompaktową[90]. Najbardziej rozpowszechnioną formą blaszek starczych w chorobie Alzheimera jest forma klasyczna, składająca się z centralnego rdzenia złożonego z fibryli amyloidowych otoczonych komórkami mikrogleju, astrocytami oraz pozostałymi składnikami białkowymi oraz jonami metali[88]. Fibryle amyloidowe tworzą różne peptydy A $\beta$ , przede wszystkim A $\beta$ 40, zawierający fragment zbudowany z 40 aminokwasów i A $\beta$ 42 złożony odpowiednio z 42 aminokwasów[90]. W skład złogów amyloidowych (oprócz A $\beta$ ) wchodzi inne białka: apolipoproteiny, w tym APOE i APOD, proteoglikany, glikozaminoglikany, katepsyny B i D, klasteryny, fibronektyny, białka ostrej fazy ( $\alpha$ -antychemotrypsyny i  $\alpha$ 2-makroglobuliny), enzymy (proteazy, enzymów zaangażowanych w metabolizm glukozy), składniki układu dopełniacza (głównie białka C3, C4, C5 i C1q) oraz cytokiny (IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), cząsteczki odpowiedzialne za adhezję międzykomórkową (CAM1) oraz jony metali (żelaza, glinu i cynku)[88, 90].

A $\beta$  jest peptydem o masie 4kDa składającym się z 39-43 aminokwasów[11]. Polipeptyd amyloidowy ma zdolność do tworzenia fibryli oraz akumulacji[88]. Jest produktem proteolizy białka prekursorowego APP (obecnego na powierzchni wielu komórek w tym neuronów) przez enzymy z grupy sekretazy[89]. Białko APP częściowo przenika błonę komórkową końcem N-terminalnym, natomiast koniec C-terminalny jest obecny w cytozolu komórki[89]. Mutacje w obrębie genu kodującego białko APP, który zlokalizowany jest na 21 chromosomie są przyczyną wystąpienia wczesnej postaci choroby Alzheimera[91]. Osoby

cierpiące na zespół Downa, czyli trisomie 21 chromosomu są szczególnie narażone na rozwój choroby Alzheimera już w wieku ok 40 lat[91, 92].

Białko APP może ulec przemianie na drodze dwóch szlaków: nieamyloidogennego i amyloidogennego[89]. W szlaku nieamyloidogennym białko APP ulega proteolizie przez  $\alpha$ -sekretazę (metaloproteinaza należąca do rodziny ADAM, posiadająca jon  $Zn^{2+}$  w strukturze), w wyniku czego powstaje fragment sAPP $\alpha$ , który posiada właściwości neuroprotektcyjne oraz pobudzające wzrost neuronów oraz związany z C-terminalnym końcem fragment zbudowany z 83 aminokwasów[88, 89]. Fragment ten następnie ulega przemianie w wyniku działania  $\gamma$ -sekretazy, tworząc P3 uwalniany do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz wewnątrzkomórkowy fragment białka APP (ang. APP intracellular domain, AICD)[88, 89]. Produkty szlaku nieamyloidogennego nie posiadają zdolności do akumulacji oraz tworzenia fibryli[88].

Szlak amyloidogenny angażuje w pierwszej kolejności w proteolizę białka APP enzym  $\beta$ -sekretazę, która jest proteazą aspartylową[88]. Istnieją dwa homologi  $\beta$ -sekretazy: BACE1 (ang. beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) i BACE2 (ang. beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2), ale główną rolę w powstawaniu A $\beta$  pełni BACE1[93]. W wyniku działania  $\beta$ -sekretazy dochodzi do „rozcięcia” cząsteczki APP i powstania dwóch fragmentów: rozpuszczanego fragmentu APP (sAPP $\beta$ ) oraz fragmentu błonowego składającego się z 99 aminokwasów[89, 91]. W kolejnym etapie,  $\gamma$ -sekretaza, a właściwe transmembranowy kompleks składający się z czterech białek: PSEN1, PSEN2, nikastryny oraz APH-1 (ang. anterior pharynx-defective 1)[91] oddziałuje na fragment błonowy tworząc AICD oraz A $\beta$  o różnej długości (38-43) aminokwasów[88]. W przeważającej większości powstają monomery A $\beta$  zawierające 40 aminokwasów (A $\beta$ 40)[89], a tylko około 5-10% stanowią monomery A $\beta$ 42[89].  $\alpha$ - i  $\beta$ -sekretaza konkurują ze sobą o substrat, więc w sytuacji zwiększonej ekspresji białka APP udział  $\beta$ -sekretazy w proteolizie białka ulega znaczącemu zwiększeniu[88]. Ponadto mutacje w obrębie  $\gamma$ -sekretazy, a w szczególności PSEN1, w wyniku których dochodzi do upośledzenia aktywności tego enzymu, prowadzą do rozwoju wczesnej, rodzinnej formy choroby Alzheimera[91, 94, 95].

Wszystkie powstające w szlaku amyloidogennym monomery A $\beta$  posiadają zdolność do agregacji oraz tworzenia fibryli, ale różnią się kinetyką tego procesu[89, 93]. Izoforma A $\beta$ 40 jest bardziej rozpowszechniona oraz charakteryzuje się większą rozpuszczalnością niż hydrofobowy A $\beta$ 42[96]. Mimo to, A $\beta$ 42 posiada większą tendencję do agregacji i tworzenia fibryli, a co za tym idzie większą neurotoksyczność[11, 89]. A $\beta$ 42 spontanicznie agreguje w ciągu minut, natomiast A $\beta$ 40 potrzebuje godzin, a nawet dni by wytworzyć fibryle[97].

A $\beta$ 42 jest głównym komponentem blaszek amyloidowych[11, 89]. Zwiększona ilość A $\beta$ 42 oraz zwiększony stosunek A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 indukuje powstawanie fibryli, ich agregację oraz przemianę w dojrzałe formy blaszek amyloidowych[91]. Proces powstawania w pełni wykształconych blaszek amyloidowych jest kilkietapowy i rozpoczyna się od łączenia się ze sobą monomerów w zróżnicowane formy oligomeryczne[89]. Monomery A $\beta$ , które naturalnie pełnią ważne funkcje w regulacji aktywności synaptycznej występują w tzw. równowadze dynamicznej obejmującej różne konformacje peptydu[89, 93]. W formie  $\beta$ -harmonijki monomery posiadają największą zdolność do agregacji i tworzenia oligomerów[89, 96]. Badania z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wykazały, że minimalną częścią monomeru A $\beta$ , która jest konieczna do powstania fibryli jest decapeptyd 14-23[89]. Natomiast reszty aminokwasowe 17-21 odpowiadają za stworzenie konformacji  $\beta$ -harmonijki[89]. Powstałe oligomery ulegają fibrylizacji tworząc fibryle, protowłókna oraz zróżnicowane formy polimorficzne, które agregują ze sobą tworząc zewnątrzkomórkowe płytki amyloidowe – charakterystyczny biomarker choroby Alzheimera[96]. Płytki amyloidowe indukują szereg reakcji ze strony układu immunologicznego m.in. aktywują układ dopełniacza oraz białka ostrej fazy, zwiększają uwalnianie glutaminianu oraz produkcję cytokin, przede wszystkim IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ [96]. Dodatkowo aktywują komórki mikrogleju i astrocyty[89, 96]. Ponadto agregaty A $\beta$  powodują zwiększenie stresu oksydacyjnego i produkcję wolnych rodników, które prowadzą do dalszych uszkodzeń neuronów[89]. Odkładające się agregaty A $\beta$  w postaci blaszek amyloidowych działają neurotoksycznie indukując hiperfosforylację białka tau oraz tworzenie spletków fibrylarnych, a w konsekwencji śmierć neuronów i neurodegenerację[11, 91, 96].

Hipotezę amyloidową (kaskadę  $\beta$ -amyloidu) jako przyczynę choroby Alzheimera po raz pierwszy zaproponowano w roku 1992[88]. Zgodnie z tą teorią nadmierna produkcja A $\beta$  oraz jego upośledzony klirens jest przyczyną rozwoju procesu neurodegeneracyjnego z obecnością specyficznych markerów oraz umiejscowieniem zmian patologicznych w mózgu charakterystycznym dla przebiegu tej jednostki chorobowej[88, 91]. Według pierwotnej wersji hipotezy amyloidowej to złogi A $\beta$  są powodem upośledzenia funkcji kognitywnych u pacjentów z chorobą Alzheimera[88]. Poparcie tej teorii stanowiła identyfikacja specyficznych mutacji genów odpowiedzialnych za ekspresję białka APP oraz mutacji genów kodujących komponenty kompleksu  $\gamma$ -sekreazy jako czynników odpowiedzialnych za rozwój rodzinnej formy choroby Alzheimera[88]. Jednakże, teoria ta ostatnio jest poddawana w wątpliwość przez wielu badaczy[88, 89, 94]. Przyczyną tego jest niepowodzenie projektowanych terapii antyamyloidowych w badaniach klinicznych, pomimo zadawalających

wyników w modelach zwierzęcych[88]. Dwuznaczne wyniki badań mogą wynikać ze zdolności A $\beta$  do indukowania nieodwracalnych uszkodzeń przed rozpoczęciem terapii[88]. W dodatku, akumulacja A $\beta$  często towarzyszy starszym osobom bez wyraźnych objawów upośledzenia funkcji kognitywnych[88, 95]. Świadczy to o powiązaniu odkładania się A $\beta$  w przestrzeni zewnątrzkomórkowej jako elementu procesu starzenia się mózgu[88, 95]. Kolejnym problemem jest słaba korelacja między pojawieniem się pierwszych objawów a lokalizacją powstałych blaszek, tzw. charakterystyka czasoprzestrzenna blaszek amyloidowych[88]. Powyższe powody doprowadziły do ponownego rozważenia teorii amyloidowej oraz jej przededefiniowania. *Dennis J. Selkoe*[98] w 2008 roku przedstawił teorię, według której to rozpuszczalne cząsteczki oligomeryczne A $\beta$  stanowią główny czynnik patologiczny w chorobie Alzheimer[88, 89, 97, 98]. Według modeli zwierzęcych, proste oligomery A $\beta$  odpowiedzialne są za upośledzenie zarówno struktury jak i funkcji synaps neuronów glutaminergicznych zlokalizowanych w hipokampie[98]. Oligomery A $\beta$  powodują redukcję kolców dendrytycznych, co prowadzi do zmian w przekaźnictwie aktywując szlaki zależne od receptorów NMDA (*N*-metylo-D-asparaginowych) indukując długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. long-term depression, LTD) oraz hamując długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. long-term potentiation, LTP)[98]. Według *Selkoe* to właśnie przewlekła aktywacja tych szlaków przez rozpuszczalne oligomery A $\beta$  leży u podstaw uszkodzeń i zaników synaps w hipokampie charakterystycznych dla wczesnego stadium choroby Alzheimer, które ilościowo korelują ze stopniem upośledzenia funkcji poznawczych[98]. Dalsze badania ujawniły naturę wysokiej toksyczności oligomerów w stosunku do neuronów. A $\beta$  w postaci rozpuszczalnych oligomerów wchodzi w interakcje z błoną komórkową neuronów zaburzając jej integralność oraz właściwości[98]. Oligomery A $\beta$  wiążąc się z dwuwarstwą lipidową błony komórkowej powodują powstawanie porów, przez które w niekontrolowany sposób dochodzi do napływu jonów Ca<sup>2+</sup> do wnętrza neuronu. Zaburzona homeostaza jonów wapnia przyczynia się do upośledzenia działania mitochondriów, prowadząc do nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS). Wymienione efekty działania oligomerów A $\beta$  są przyczyną wielokierunkowych strukturalnych i biochemicznych zmian komórek nerwowych skutkujący zmniejszeniem plastyczności synaps, ich utratą, a w konsekwencji atrofią neuronów[95, 97, 98].

A $\beta$  jest ważnym czynnikiem indukującym rozprzestrzenianie się pozostałych zmian patologicznych charakterystycznych dla choroby Alzheimer, takich jak: hiperfosforylacja i agregowanie białka tau oraz upośledzenie przekaźnictwa cholinergicznego[68, 89, 99, 100].

Odkładanie się A $\beta$  powoduje uszkodzenie neuronów cholinergicznym skutkujące obniżeniem poziomu ACh w przestrzeni synaptycznej[68, 73]. Ponadto, A $\beta$  bezpośrednio wchodzi w interakcje z receptorami  $\alpha 7$ -nAChRs upośledzając ich funkcję[83]. W badaniach mikroskopowych wykryto obecność obu cholinesteraz w dojrzałych blaszkach amyloidowych[73]. Dalsze badania udowodniły silne powiązanie tych struktur, których neurotoksyczność była znacznie wyższa niż samego A $\beta$ [68, 79]. Również hiperfosforylacja białka tau oraz jego agregacja zdaje się być silnie powiązana z A $\beta$ [89]. Badania z wykorzystaniem transgenicznych gryzoni wykazały, że rozprzestrzenianie się A $\beta$  w mózgu indukuje rozprzestrzenianie się białka tau wzdłuż aksonów podobnie do rozprzestrzeniania się prionów oraz zwiększa jego toksyczność[99, 100].

Chociaż od momentu opublikowania teorii amyloidowej minęło 30 lat, naukowcy nie ustają w wysiłkach nad zgłębianiem roli A $\beta$  w rozwoju choroby Alzheimera[77, 95]. Na podstawie wyników badań i ich skrupulatnej analizy „klasyczna” teoria amyloidowa została zrewidowana na rzecz nowej tzw. dysfunkcji  $\beta$ -amyloidu (ang.  $\beta$ -amyloid dysfunction hypothesis, BAD hypothesis)[94]. Zgodnie z nowymi założeniami, A $\beta$  nie jest czynnikiem indukującym rozwój choroby Alzheimera, ale w wyniku zaburzenia homeostazy spowodowanej jego nadmierną produkcją oraz upośledzonym wydalaniem dochodzi do poważnych zmian strukturalnych i funkcjonalnych neuronów, które promują rozwój pozostałych patologii kluczowych w rozwoju choroby Alzheimera[94]. Ważną sprawą pozostaje identyfikacja czynnika wyzwalającego zaburzenie homeostazy  $\beta$ -amyloidu w mózgu[94, 95]. O ile w przypadku rodzinnej formy choroby Alzheimera jest on znany, o tyle u pacjentów cierpiących na formę sporadyczną tej choroby wciąż jest on niezidentyfikowany[77, 94, 95]. Oczywiście operując słowem ‘czynnikiem’ pozwalamy sobie na pewnego rodzaju uproszczenie, gdyż na podstawie 30-letnich badań ukierunkowanych na A $\beta$  i jego rolę w patogenezie choroby Alzheimera, większość naukowców jest przekonana, że owym induktorem jest kombinacja różnych czynników, zarówno środowiskowych jak i genetycznych[91, 94]. Pomimo wielu niepowodzeń projektowanych leków ukierunkowanych na A $\beta$  w badaniach klinicznych[91], w czerwcu 2021 FDA dopuściła do stosowania pierwszy lek, Aducanumab (Aduhelm™, firma Biogen), będący przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko depozytom A $\beta$  w mózgu[95, 101, 102]. Powstanie tego leku jest wynikiem wielu lat pracy nad teorią amyloidową, i z pewnością zaowocuje w przyszłości dalszym pogłębianiem wiedzy na temat A $\beta$  oraz powstawaniem nowych, skutecznych terapii.

### 1.3.3 Hipoteza białka tau

Hiperfosforylacja białka tau oraz jego agregacja w formie neurofibrylarnych splątków stanowi ważną patologię obserwowaną u pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera[77, 88]. NFTs są głównie zbudowane z zagregowanych par filamentów w postaci helisy, które złożone są z nadmiernie ufosforylowanego białka tau[11]. Białko tau należy do rodziny białek kodowanych przez gen *MAPT* zlokalizowany na 17 chromosomie[103]. W wyniku alternatywnej obróbki potranslacyjnej powstaje sześć wysoce rozpuszczalnych izoform białka tau w obrębie CNS oraz 6 izoform białka tau w obwodowym układzie nerwowym[103]. Masa białka różni się w zależności od danej izoformy i wynosi średnio od 58 do 66 kDa[103]. W wyniku alternatywnej obróbki potranslacyjnej białka w obrębie końca N-terminalnego oraz domeny wiążącej mikrotubule (ang. microtubule-binding domain, MBD) powstają dwie główne izoformy zawierające trzy (3R) oraz cztery (4R) powtórzenia, składające się z 29 reszt aminokwasowych[103]. Dwie izoformy pozostają w równowadze (w stosunku 1:1) w mózgu osób dorosłych[103]. Zaburzenie tej równowagi leży u podstaw wielu tauopatii, m.in. choroby Picka, zwyrodnienia korowo-podstawnego, postępującego porażenia nadjądrowego czy otępienia z ziarnami argylofilnymi, które współistnieją w obrazie klinicznym pacjentów cierpiących na inne choroby neurodegeneracyjne[91]. W przypadku choroby Alzheimera nie zidentyfikowano konkretnego wzoru zmian stosunku obu izoform białka tau. Różnice te występują niejednorodnie, tylko w nielicznych przypadkach[103].

Główną funkcją białka tau jest promowanie wydłużania się mikrotubul oraz ich stabilizacji[103]. Ponadto białko tau reguluje proces translacji białek oraz uczestniczy w wielu podstawowych funkcjach komórkowych, takich jak: apoptoza, neuroprotekcja, sygnalizacja komórkowa czy rozwój neuronów[103]. Pośrednio, białko tau uczestniczy także w transporcie komórkowym, podziale komórki oraz stabilizuje chromosomy[104]. Jednakże, badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych dowiodły, że zmniejszenie ilości białka tau nie prowadzi do gwałtownego upośledzenia funkcjonowania mikrotubul oraz transportu komórkowego[103]. Prawdopodobnie związane jest to z mechanizmami kompensacyjnymi, w których to inne białka (m.in. MAP1A, MAP1B i MAP2) przejmują funkcje białka tau[105]. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach u ludzi posiadających mutacje w obrębie genów kodujących białko tau. Jedynie u kilku pacjentów posiadających mutacje w regionie kodującym *MAPT* oraz kilka innych genów, charakteryzujących się zmniejszeniem ilości wytwarzanego białka tau o 50%, zaobserwowano lekkie upośledzenie w rozwoju OUN[103]. Niemniej jednak, wciąż trwają intensywne badania nad naturą i funkcją białka tau przez



pryzmat jego wpływu na procesy życiowe komórek nerwowych w tym ich przeżywalność[103].

Hiperfosforylacja białka tau oraz jego akumulacja w postaci nierozpuszczalnych splątków neurofibrylarnych odgrywa istotną rolę w patogenezie choroby Alzheimera[105]. Na podstawie badań patomorfologicznych oraz z wykorzystaniem nowoczesnych technik obrazowania ustalono pewnego rodzaju wzorzec rozwoju i dystrybucji NFTs w mózgu osób cierpiących na chorobę Alzheimera[106]. Pierwsze patologiczne zmiany białka tau pojawiają się najczęściej w obrębie kory śródwęczowej, rozprzestrzeniając się poprzez struktury układu limbicznego do hipokampu i kory nowej. Wyniki badań sugerują, że mechanizm rozprzestrzeniania się patologicznego białka tau w mózgu osób z chorobą Alzheimera jest podobny do rozprzestrzeniania się prionów[106]. Inwazyjność białka tau potwierdzają badania z wykorzystaniem zdrowych myszy, którym wstrzyknięto ekstrakty komórkowe ludzkie bądź zwierzęce zawierające NFTs. Zaobserwowano dynamiczny rozwój patologicznego białka tau od miejsca wstrzyknięcia oraz rozprzestrzenianie się go wzdłuż połączeń nerwowych[91]. Ponadto, wyniki badań PET z wykorzystaniem substancji wiążących się z białkiem tau wykazały, że schemat rozprzestrzeniania się patologicznego białka tau w mózgu jest ściśle związany z wzorcem procesu neurodegeneracyjnego oraz klinicznymi objawami choroby Alzheimera[107, 108].

Pomimo wielu lat badań nie udało się zidentyfikować czynnika powodującego pojawienie się patologicznych form białka tau i A $\beta$ . Naukowcy spierają się nad rolą tych patologii i ich wzajemnym oddziaływaniem na siebie[91]. Wielu z nich jest zdania, że to białko tau może być kluczem do całej kaskady patologicznych zmian prowadzących w konsekwencji do neurodegeneracji[99]. Wynika to z rozprzestrzeniania się białka tau zgodnego z modelem prionowym oraz faktu, że pierwsze zmiany związane z hiperfosforylacją białka tau i jego odkładaniem występują na wiele lat przed pojawieniem się pierwszych objawów klinicznych choroby oraz wyprzedzają patologiczne zmiany związane z A $\beta$ [99]. Niestety na niekorzyść tej teorii przemawia fakt, że w wielu znanych tauopatiach, które mają m.in. podłoże genetyczne nie obserwuje się agregatów A $\beta$ [91]. Zgodnie z drugą teorią to upośledzenie metabolizmu białka APP promuje rozwój NFTs[100]. Zaburzenia metabolizmu białka APP, w tym jego nadmierna produkcja prowadzi do upośledzenia działania synaps i aksonów wyzwalającego nieprawidłowe przemieszczanie się białka tau w obrębie ciała neuronu, co skutkuje jego akumulacją oraz formowaniem nierozpuszczalnych fibryli[106, 109]. Zagregowane fibryle białka tau powodują dalsze uszkodzenia neuronu oraz upośledzają funkcjonowanie synaps, promując dalszy rozwój

patologii[91]. Ponadto, zasugerowano, że białko APP, a w szczególności jego koniec C-terminalny może działać jako receptor dla fibryli białka tau, indukując postęp i rozprzestrzenianie się ich w mózgu[91, 100, 109]. Dodatkowo indukowana przez agregaty A $\beta$  odpowiedź układu immunologicznego i rozwój procesu zapalnego wspomagają dalszy rozwój patologicznych form białka tau[100]. Jednakże, dotychczasowe badania nie udowodniły ponad wszelką wątpliwość, że A $\beta$  wpływa bezpośrednio na rozwój patologicznego białka tau. Obecnie coraz częściej wysuwany jest postulat, że w przypadku sporadycznej formy choroby Alzheimera rozwój dwóch głównych czynników patologicznych: białka tau i A $\beta$  zachodzi niezależnie od siebie, przede wszystkim w początkowej fazie choroby[91, 110]. Ponadto, ostatnie badania nad głównymi czynnikami ryzyka w chorobie Alzheimera: ApoE4 i TREM2 powiązały ich obecność z białkiem tau[91, 110]. Również w przypadku cukrzycy typu 2, która głównie była rozpatrywana w kontekście promowania zaburzeń metabolizmu A $\beta$  udowodniono związek z białkiem tau poprzez jego wpływ na szlak sygnałowy insuliny w mózgu[91]. Niepowodzenia terapii antyamyloidowych na przestrzeni lat przemawiają na korzyść białka tau jako niezależnego czynnika powodującego uszkodzenia mózgu i zaburzenia pamięci u osób cierpiących na chorobę Alzheimera.

NFTs odkładające się wewnątrz neuronu uszkadzają mikrotubule, co skutkuje uszkodzeniem oraz upośledzeniem funkcji synaps mające znaczący wpływ na funkcjonowanie oraz przeżywalność neuronów[103]. Zagregowane białko tau zmniejsza plastyczność synaps zarówno w aspekcie krótkotrwałym jak i długotrwałym[106]. W badaniach z wykorzystaniem transgenicznych myszy udowodniono spadek LTP u osobników z genetycznie lub sztucznie wywołaną hiperfosforylacją białka tau[99, 110]. Co więcej, zmniejszenie fosforylacji białka tau po zastosowaniu inhibitorów kinaz prowadziło do przywrócenia prawidłowych wartości LTP oraz zmniejszało utratę synaps u transgenicznych myszy[99, 110]. Obecność patologicznych form białka tau wpływa negatywnie na neurony i synapsy nie tylko pod względem strukturalnym, ale również funkcjonalnym osłabiając przewodzenie impulsów[103]. W konsekwencji u osób cierpiących na chorobę Alzheimera dochodzi do uszkodzenia neuronów skutkującego zaburzeniami pamięci.

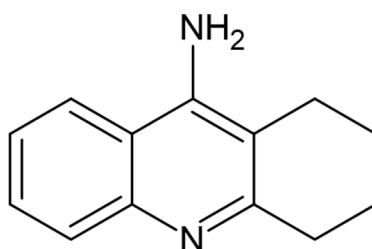
Starania nad opracowaniem skutecznej terapii przeciwko białku tau skupiają się głównie na zablokowaniu możliwości jego hiperfosforylacji, a więc inhibicji kinaz i fosforylaz zaangażowanych w ten proces[77]. Spośród wielu zidentyfikowanych enzymów biorących udział w fosforylacji białka tau największe znaczenie ma zależna od cyklin kinaza 5 (z ang. cyclin-dependent kinase 5, CDK5) oraz GSK-3 $\beta$ [99, 111]. Aktywność CDK5

związana jest z toczącym się procesem zapalnym w obrębie OUN charakterystycznym w chorobie Alzheimera[88]. W wyniku postępującego procesu zapalnego wywołanego różnymi czynnikami m.in. stresem oksydacyjnym, urazami głowy, zaburzeniem metabolizmu cukrów i lipidów czy nadmierną ilością jonów metali w tym żelaza, glinu lub cynku dochodzi do aktywacji mikrogleju oraz astrocytów i uwalniane są cytokiny prozapalne m.in. IL6, IL1 $\beta$  oraz TNF- $\alpha$ [112]. Interakcja IL6 z receptorem NMDA prowadzi do uruchomienia szlaków sygnałowych, które odpowiadają za aktywację CDK5, która fosforyluje białko tau[112, 113]. Przewlekły proces zapalny towarzyszący chorobie Alzheimera znacząco podnosi aktywność CDK5, promując nadmierną fosforylację białka tau i tworzenie NFTs[88]. GSK-3 jest kinazą seryno-treoninową fosforylującą syntazę glikogenową. GSK-3 jest wszechobecną w OUN kinazą, której substratem jest wiele czynników transkrypcyjnych i translacyjnych, białek cytoszkieletu oraz innych białek wchodzących w skład szlaków metabolicznych[114]. U ssaków występują dwie izoformy GSK-3, GSK-3 $\alpha$  i GSK-3 $\beta$ , przy czym to forma GSK-3 $\beta$  ulega głównie ekspresji w OUN[115]. GSK-3 $\beta$  reguluje wiele kluczowych procesów związanych z rozwojem układu nerwowego m.in. neurogenezę, rozwój dendrytów oraz aksonów, synaptogenezę oraz przeżywalność komórek nerwowych[114, 116]. Badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych potwierdziły udział GSK-3 $\beta$  w kluczowych dla funkcjonowania mózgu procesach takich jak uczenie się, pamięć, rozwój emocjonalny oraz psychoruchowy[114]. Zaburzenia ekspresji lub aktywności GSK-3 $\beta$  leżą u podstaw nie tylko procesów neurodegeneracyjnych, ale również epilepsji, depresji, choroby dwubiegunowej[115, 116]. W kontekście choroby Alzheimera, GSK-3 $\beta$  uważana jest za ważny czynnik łączący dwie najważniejsze patologie charakterystyczne dla tej jednostki chorobowej: białko tau i A $\beta$ [99, 114]. Z jednej strony GSK-3 $\beta$  odpowiada za fosforylację białka tau. Z drugiej reguluje metabolizm białka APP oraz produkcję A $\beta$ , jednocześnie będąc nadmiernie aktywowane przez A $\beta$ , skutkując hiperfosforylacją białka tau[99, 114, 116]. Wielu naukowców upatruje w GSK-3 $\beta$  potencjalnego celu dla skutecznej terapii choroby Alzheimera[111, 114]. Trwają badania nad poszukiwaniem skutecznych inhibitorów GSK-3 $\beta$ [77, 111, 114]. Obecnie w fazie II badań klinicznych nad efektywnością inhibitora GSK-3 $\beta$  w leczeniu łagodnej/umiarkowanej postaci choroby Alzheimera znajduje się tideglusib/NP12 (NCT00948259)[117].

## 1.4 Farmakoterapia choroby Alzheimera

Farmakoterapia chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera, stanowi ogromne wyzwanie dla farmacji i medycyny, gdyż przyczyny ich rozwoju nie są całkowicie zbadane. W konsekwencji, farmakoterapia ma charakter głównie symptomatyczny, a nie przyczynowy[118].

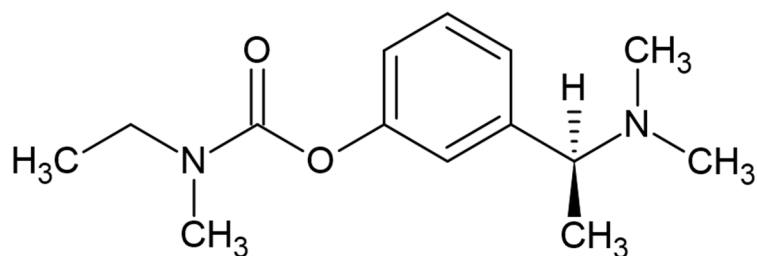
Obecnie farmakoterapia choroby Alzheimera bazuje na teorii cholinergiczej i wykorzystaniu inhibitorów cholinesteraz (takryny, rywastygminy, galantaminy i donepezilu) w celu złagodzenia objawów ośrodkowych i somatycznych oraz opóźnieniu procesu upośledzenia funkcji kognitywnych[119-121]. Inhibitory cholinesteraz hamują rozkład acetylocholino, dzięki czemu zwiększają jej stężenie w przestrzeni synaptycznej, w konsekwencji zwiększając przewodnictwo cholinergiczne w OUN[120]. AChEIs wykazują czasową poprawę funkcji kognitywnych, opóźniając demencję. Jednakże nie zatrzymują postępu choroby[119].



**Ryc. 4** Takryna.

Pierwszym zatwierdzonym lekiem w leczeniu choroby Alzheimera była takryna (**Ryc. 4**)[121]. W 1993 roku FDA zatwierdziło preparat Cognex® zawierający chlorowodorek takryny (jednowodny chlorowodorek 1,2,3,4-tetrahydro-9-akrydinoaminy) w leczeniu łagodnej i umiarkowanej choroby Alzheimera[122]. Takryna jako inhibitor zarówno AChE jak i BuChE szybko przenikała BBB, wykazując również działanie hamujące wobec monoaminooksydazy (ang. monoaminoxidase, MAO) oraz modulując działanie kanałów jonowych[123]. Działanie takryny polega na odwracalnym wiązaniu się jej cząsteczki do miejsca aktywnego katalitycznie AChE oraz BuChE, powodując czasowe zablokowanie enzymu rozkładającego ACh[124]. Dzięki temu, takryna zwiększa stężenie ACh w szczelinie synaptycznej pobudzając neurotransmisji cholinergiczną[124]. Preparat Cognex® dostępny był w dawkach: 10, 20, 30 i 40 mg[124]. Schemat dawkowania u pacjentów był zróżnicowany w zależności od tolerancji preparatu i pojawiających się efektów ubocznych[122]. Dawka początkowa wynosiła 40 mg na dzień[124]. W systemie czterotygodniowym dawkę

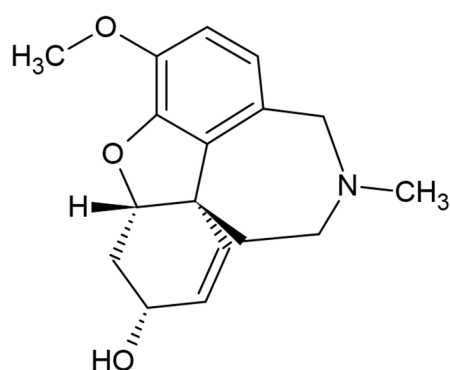
podwajano do maksymalnej ilości 120-160 mg dziennie[122]. Ze względu na krótki okres półtrwania (2-4 godzin) terapia takryną wymagała podawania preparatu w dawkach podzielonych, cztery razy dziennie[122]. Niestety terapia takryną wiązała się z poważnymi skutkami ubocznymi obejmującymi przede wszystkim zależną od dawki hepatotoksyczność, hipotonię oraz zaburzenia ze strony układu pokarmowego[121]. Ponadto, stosowanie takryny wiązało się z częstym monitorowaniem poziomu enzymów wątrobowych oraz z racji metabolizowania takryny w wątrobie przez cytochrom P450 (CYP1A2) wchodziła w interakcje z wieloma substancjami[122]. Z tego powodu do roku 1999 ograniczono jej stosowanie, a w 2013 FDA wycofała ją z obrotu[121]. W Polsce nie zarejestrowano ani nie dopuszczono do obrotu żadnego preparatu zawierającego chlorowoderek takryny.



**Ryc. 5** Rywastygmina.

Rywastygmina (**Ryc. 5**) należy do drugiej generacji leków cholinergicznym stosowanych do dzisiaj w farmakoterapii choroby Alzheimera[119, 120]. Jest niekompetycyjnym, odwracalnym inhibitorem AChE i BuChE przenikającym dobrze BBB[122]. Większe powinowactwo wykazuje jednak w stosunku do BuChE[121, 125]. Badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych dowodzą, że rywastygmina oprócz oddziaływania na układ cholinergiczny, pobudza również aktywność  $\alpha$ -sekreazy, zmniejszając ilość syntetyzowanego A $\beta$ [125]. Rywastygmina stosowana jest w leczeniu choroby Alzheimera we wszystkich stadiach, jednakże jej najwyższa skuteczność obserwowana jest w stadium łagodnym oraz średniozaawansowanym[126, 127]. Dzięki minimalnemu metabolizmowi przez CYP450 nie wchodzi w interakcje z inhibitorami i induktorami tego cytochromu[128]. Stosowana jest w postaci tabletek, kapsulek oraz systemów transdermalnych[128]. Badania kliniczne nad skutecznością rywastygminy w terapii choroby Alzheimera wykazały korzyści płynące z jej stosowania na funkcje kognitywne u pacjentów z łagodną oraz średniozaawansowaną postacią choroby Alzheimera[126]. Ze względu na krótki okres półtrwania formy doustnej, stosowana jest w dawkach podzielonych, dwa razy dziennie[122]. Dawka początkowa wynosi 1,5 mg,

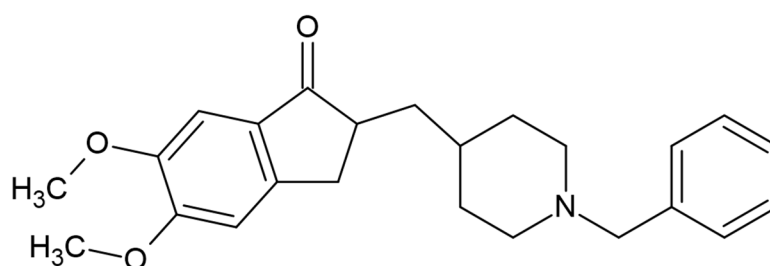
natomiast maksymalna dawka dobową nie przekracza 12 mg[124]. Doustna terapia rywastygminą wiąże się z częstymi efektami ubocznymi ze strony układu pokarmowego, m.in. wymioty, biegunka, utrata wagi, anoreksja oraz ze strony układu pozapiramidowego takimi jak: zawroty głowy, zaburzenia snu czy rozbieżność[122]. Działania niepożądane mają charakter dawko-zależny[122]. Rywastygmina w postaci plastrów transdermalnych charakteryzuje się dłuższym okresem półtrwania, dzięki czemu w celu uzyskania efektu terapeutycznego wystarcza podanie raz na dobę[122]. Dawka początkowa wynosi 4,6 mg rywastygminy na dobę, natomiast maksymalna dawka dobową to 13,3 mg[124]. Aplikacja rywastygminy w postaci systemów transdermalnych znacząco zmniejsza ilość działań niepożądanych ze strony układu pokarmowego oraz ułatwia terapię osób w zaawansowanym stadium choroby[122]. Na świecie zarejestrowano wiele preparatów zawierających rywastygminę oraz wodorowinian rywastygminy, m.in. Exelon, Nimvastid, Ricordo, Evertras, Rivaldo.



**Ryc. 6** Galantamina.

Galantamina (**Ryc. 6**) jest trzeciorzędowym alkaloidem izochinolinowym wyizolowanym z bulw roślin z rodziny amarylkowatych (łac. *Amarylidaceae*) m.in. *Galanthus woronowii* oraz *Galanthus nivalis*[129]. Galantamina stosowana jest w terapii łagodnej oraz średniozaawansowanej postaci choroby Alzheimera[127]. Działanie galantaminy ma charakter dwukierunkowy. Po pierwsze galantamina jest specyficznym, odwracalnym i kompetycyjnym inhibitorem AChE. Po drugie, galantamina jest allosterycznym modulatorem receptorów nikotynowych (nAChRs), których ilość ulega zmniejszeniu w chorobie Alzheimera[129-131]. Galantamina jednocześnie zwiększa ilość ACh w przestrzeni synaptycznej poprzez blokadę AChE oraz stymuluje receptory nikotynowe[130]. Dalsze badania wykazały, że stymulowanie nAChRs przez galantaminę powoduje zwiększenie wydzielania innych neurotransmiterów takich jak: glutaminian,

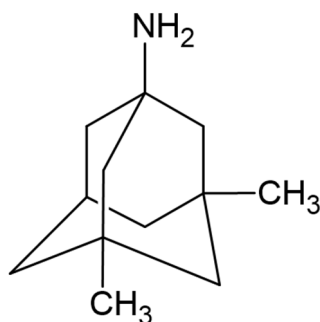
serotonina, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy oraz dopamina[131]. Ta pośrednia stymulacja i uwolnienie neuroprzekazników mogą być przyczyną poprawy funkcji kognitywnych oraz zmniejszenia nasilenia objawów psychiatrycznych takich jak: agresja, halucynacje, omamy, niepokój[131]. Szeroko zakrojone badania nad efektywnością stosowania ChEIs w farmakoterapii choroby Alzheimera wykazały, że galantamina jako jedyna znacząco zmniejszała ryzyko rozwinięcia się ciężkiej postaci demencji[67]. Galantamina metabolizowana jest w wątrobie głównie przez CYP2D6 oraz CYP3A4[131]. Może wchodzić w interakcje z innymi lekami, przede wszystkim inhibitorami obu izoenzymów[131]. Galantamina charakteryzuje się stosunkowo krótkim okresem półtrwania[122]. W farmakoterapii choroby Alzheimera galantaminą stosowana jest w postaci tabletek, kapsułek o przedłużonym uwalnianiu oraz roztworu doustnego. Podawana jest dwa razy dziennie, początkowo w dawce 4 mg zwiększając do 8 mg dwa razy dziennie. Maksymalna dawka zazwyczaj nie przekracza 16 mg dziennie[122, 124]. Preparatami zawierającymi galantaminę są: Galsya SR, Galamir oraz Reminyl. Galantamina stosowana jest również w postaci roztworu do wstrzykiwań (Nivalin) w terapii bólu neuropatycznego. Galantamina jest wydalana z moczem, dlatego dawkowanie w przypadku pacjentów z niewydolnością nerek powinno być odpowiednio modyfikowane[131]. Działania niepożądane obejmują głównie zaburzenia ze strony układu pokarmowego, a także zawroty głowy, zmęczenie czy bóle głowy.



**Ryc. 7** Donepezil.

Donepezil (**Ryc. 7**) jest selektywnym, odwracalnym i niekompetycyjnym inhibitorem AChE[132]. Należy do drugiej generacji ChEIs. Metabolizowany jest w wątrobie przez CYP2D6 oraz CYP3A4[122]. Podobnie jak rywastygmina może wchodzić w interakcje z inhibitorami i induktorami tych izoenzymów. Donepezil poza głównym działaniem hamującym wobec AChE, zmniejsza produkcję A $\beta$ , chroni neurony przed toksycznym działaniem glutamianu, zwiększa ekspresję receptorów nikotynowych oraz zapobiega apoptozie komórek[130, 133]. Donepezil jest najczęściej stosowanym lekiem we wszystkich stadiach rozwoju choroby Alzheimera. Dzięki relatywnie długiemu okresowi półtrwania

(około 70 godzin) stosowany jest raz dziennie w dawce 5 lub 10 mg[122]. Działania niepożądane donepezilu obejmują głównie zaburzenia ze strony układu pokarmowego, które są nasilone w pierwszym miesiącu terapii, omdlenia, bradykardię oraz rzadziej zaburzenia rytmu serca[120]. Wyniki badań potwierdziły skuteczność terapii donepezilem u osób w każdym stadium choroby Alzheimera w porównaniu do placebo[130, 134]. Donepezil wpływał pozytywnie na funkcje kognitywne, codzienną aktywność pacjentów oraz ich zachowanie[130]. W sposób szczególny terapia donepezilem oddziałuje na pacjentów z zaburzeniami snu, wzmacniając pamięć oraz uwagę oraz zmniejszając opóźnienie w kojarzeniu[122]. Obecnie na rynku funkcjonuje wiele preparatów zawierających chlorowoderek donepezilu w postaci tabletek powlekanych oraz tabletek ulegających rozpadowi w jamie ustnej, m.in. Aricept, Donepex, Cogiton, Donecept, Donectil ODT, Ricordo, Yasnal Q-Tab.



**Ryc. 8** Memantyna.

Memantyna (**Ryc. 8**) jako niekompetycyjny antagonist receptorów NMDA, obok donepezilu jest najczęściej stosowanym lekiem w chorobie Alzheimera[120]. Zaleca się jej stosowanie u pacjentów z umiarkowaną oraz zaawansowaną postacią choroby Alzheimera[120, 130]. Mechanizm działania memantyny polega na selektywnym blokowaniu błonowych, jonotropowych receptorów dla glutaminianu[121, 122]. Nadmierna ilość glutaminianu jest toksyczna dla neuronów. Powoduje nadmierny napływ jonów  $Ca^{2+}$ , co prowadzi do uszkodzenia neuronów i śmierci komórki[130]. Memantyna jako modulator receptorów NMDA przywraca prawidłowe funkcje neuronów oraz zabezpiecza je przed uszkodzeniem spowodowanym nadmierną ilością glutaminianu[130]. Jednocześnie, memantyna nie blokuje fizjologicznej neurotransmisji glutaminergicznej w komórce[122]. W rezultacie, zmniejsza uszkodzenia synaptyczne neuronów, co według badaczy odpowiada za poprawę funkcji kognitywnych u pacjentów leczonych memantyną[122, 130]. Dodatkowo, memantyna wykazuje działanie neuroprotekcjne poprzez przyspieszenie autofagii uszkodzonych mitochondriów[135]. Badania udowodniły skuteczność memantyny w terapii



średniozaawansowanej i zaawansowanej chorobie Alzheimera[130]. Memantyna znacząco poprawiała funkcje kognitywne i pamięć, bez wpływu na zachowanie oraz objawy neuropsychiatryczne u osób z chorobą Alzheimera[130, 136-139]. Memantyna została wprowadzona na rynek europejski w 2002 roku[130]. Dostępna jest w postaci tabletek (5 oraz 10 mg), roztworu doustnego oraz w niektórych krajach w postaci kapsułek o przedłużonym uwalnianiu w dawce 28 mg[130]. Podawana jest raz do dwóch razy dziennie w dawce 5 lub 10 mg. Memantyna jest dobrze tolerowana przez pacjentów. Najczęstsze działania niepożądane to: zawroty głowy, rozdrażnienie, uczucie rozbicia, bezsenność, halucynacje i omamy[120, 122]. Chlorowoderek memantyny dostępny jest w preparatach takich jak: Polmatine, Biomentin, Zenmem. Na rynku amerykańskim obecny jest preparat Namzaric®, który zawiera chlorowoderek memantyny w postaci kapsułek o przedłużonym uwalnianiu w dawkach 7, 14, 21 i 28 mg oraz chlorowoderek donepezylu w dawce 10 mg. Ten kombinacyjny preparat jest biorównoważny z pojedynczymi preparatami memantyny i donepezylu[140]. Połączenie memantyny i donepezylu w jednej kapsułce pozwala na lepszą kontrolę terapii, zmniejszenie ilości przyjmowanych leków oraz umożliwia wysypanie leku z kapsułki i przyjęcie go z miękkim pokarmem, co ma duże znaczenie u chorych z rozwiniętą dysfagią[140]. Terapia preparatem Namzaric, z reguły jest dobrze tolerowana przez pacjentów, chociaż przy wyższych dawkach mogą pojawić się nasilone działania niepożądane takie jak: wymioty, utrata wagi oraz omdlenia[140]. Badania nad preparatem Namzaric w porównaniu do placebo wykazały pewne korzyści z przyjmowania tego preparatu na funkcje poznawcze i aktywność dzienną pacjentów[140]. Jednakże, dalsze badania nad efektywnością preparatu Namzaric w porównaniu do pojedynczych preparatów zawierających chlorowoderek memantyny w postaci tabletek oraz kapsułek o przedłużonym uwalnianiu powinny być przeprowadzone[140].

Prawdziwym przełomem w farmakoterapii choroby Alzheimera stało się zaaprobowanie przez FDA 7 czerwca 2021 roku aducanumabu, pierwszego leku skierowanego bezpośrednio na przyczynę rozwoju choroby[141]. Aducanumab (nazwa handlowa Aduhelm™, firma Biogen) jest ludzkim przeciwciałem monoklonalnym, które w sposób selektywny wiąże się z agregatami A $\beta$ , zarówno rozpuszczalnymi oligomerami, jak i nierozpuszczalnymi fibrylami, zwiększając klirens A $\beta$  skutkujący zmniejszeniem ilości blaszek amyloidowych w mózgu[141-143]. Preparat został zatwierdzony wyłącznie w terapii MCI oraz łagodnej postaci choroby Alzheimera[144].

Preparat Aduhelm występuje w postaci roztworu do iniekcji w stężeniu 100 mg/ml w jednodawkowych fiolkach o objętościach 1,7 ml oraz 3 ml[142]. Preparat podawany jest

w postaci infuzji dożylniej po rozcieńczeniu w 0.9% NaCl. Wlew podawany jest przez około godzinę co 21-28 dni[142]. Dawka jest stopniowo zwiększana. W pierwszych dwóch miesiącach 1 mg/kg, następnie 3 mg/kg, 6 mg/kg, aż do 10 mg/kg w siódmym miesiącu terapii[142]. Przed i w trakcie terapii obligatoryjne jest wykonanie badania obrazowego mózgu przy użyciu techniki MRI. Na podstawie oceny zaburzeń obrazowania związanych z amyloidem (ang. amyloid-related imaging abnormalities, ARIA) m.in. obrzęków bruzd mózgowych, mikrokrwotoków oraz obecności powierzchniowej syderozy, kwalifikuje się pacjentów do terapii oraz kontroluje przebieg terapii preparatem Aduhelm[142]. W przypadku obecności umiarkowanych oraz ostrych zmian w trakcie terapii (po 7 lub 10 infuzjach) należy przerwać leczenie[142]. Po podaniu istnieje ryzyko wystąpienia reakcji nadwrażliwości obejmującej pokrzywkę oraz obrzęk naczyniowy. W tym wypadku należy przerwać terapię. Do działań niepożądanych terapii preparatem Aduhelm oprócz ARIA należy zaliczyć również bóle głowy, zaburzenia równowagi, biegunkę dezorientację, uczucie rozbicia, pobudzenie oraz delirium[142].

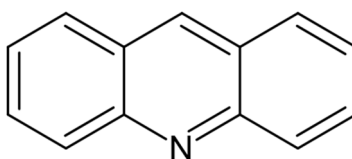
Zgoda FDA na wprowadzenie aducanumabu do lecznictwa wywołała wiele kontrowersji za sprawą sprzecznych wyników III fazy badań klinicznych[141, 143, 145]. Część członków komitetu opiniującego aducanumab była przeciwna wprowadzeniu go na rynek ze względu na niejednoznaczne wyniki oraz potencjalne ryzyko dla bezpieczeństwa pacjentów[141]. Preparat Aduhelm został zatwierdzony w formie przyspieszonej zgody na podstawie redukcji ilości blaszek amyloidowych u pacjentów leczonych preparatem[143]. Jednakże, firma Biogen została zobowiązana do wykazania korzyści klinicznych w badaniu IV fazy po 9 latach od wprowadzenia leku na rynek w celu utrzymania zgody na dopuszczenie do obrotu[143].

Aducanumab jest pierwszym lekiem zarejestrowanym w terapii choroby Alzheimera od 2003 roku, a co istotniejsze jest pierwszym lekiem działającym na przyczynę tej wyniszczającej choroby[143]. Zgoda FDA stała się swojego rodzaju przełomem, niosącym nadzieje na przyszłość w leczeniu innych chorób neurodegeneracyjnych[146]. Wprowadzenie Aduhelmu na rynek ponownie przyciągnęło uwagę badaczy i dużych koncernów farmaceutycznych, co w przyszłości może zaowocować innowacyjnymi terapiami chorób neurodegeneracyjnych[143, 146].

## 1.5 Wielokierunkowe działanie akrydyny i chinoliny

### 1.5.1 Akrydyna

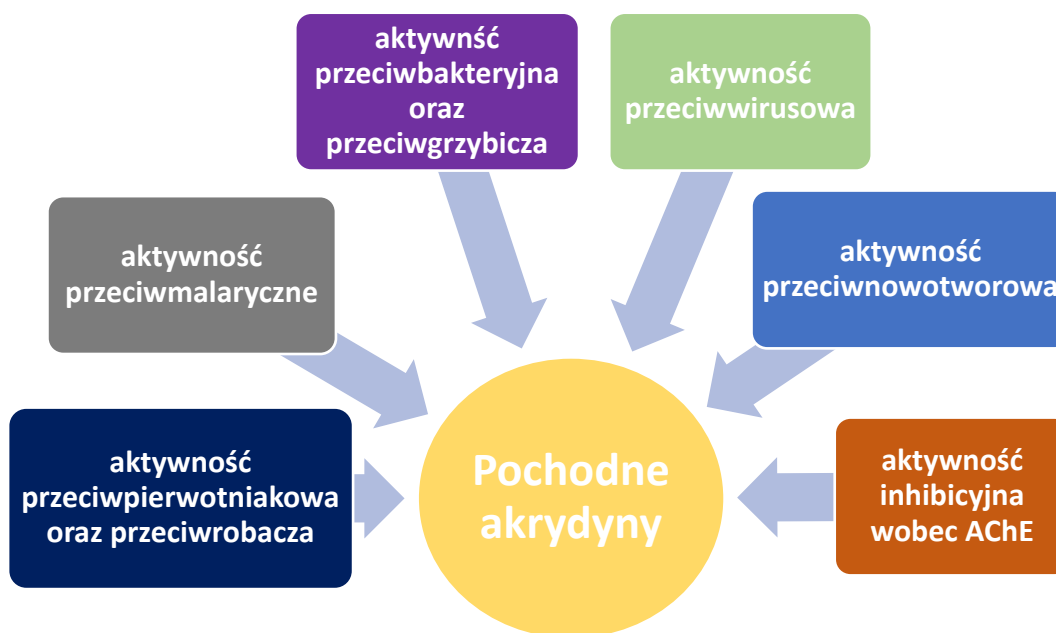
Akrydyna (**Ryc. 9**) jest związkiem heterocyklicznym o budowie planarnej, zawierającej w swojej cząsteczce atom azotu[147]. Strukturalnie zbliżona jest do antracenu. Posiada słabe właściwości zasadowe[148]. Po raz pierwszy została wyizolowana w 1870 roku przez Carla Gräbe i Heinricha Caro ze smoły pogazowej. Pochodne akrydyny izolowano z materiałów roślinnych oraz organizmów morskich[147, 148].



**Ryc. 9** Akrydyna.

Ze względu na swoje unikalne właściwości chemiczne i biologiczne pochodne akrydyny znalazły zastosowanie w farmacji i przemyśle[147]. Już w XIX wieku pochodne akrydyny były wykorzystywane w przemyśle jako pigmenty i barwniki. Unikalna budowa trójpierścieniowa akrydyny stała się punktem wyjścia dla badań biochemicznych oraz medycznych nad zastosowaniem akrydyny i jej pochodnych[147].

Akrydyna i jej pochodne posiadają wielokierunkowe działanie biologiczne m.in. przeciwbakteryjne, przeciwprzywrotniakowe, przeciwmalaryczne, przeciwgrzybiczne, przeciwwirusowe, przeciwrobacze, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne oraz jako inhibitory AChE (**Ryc. 10, str. 44**)[147]. Dodatkowo dzięki posiadaniu w swojej budowie grupy chromoforowej, akrydyny posiadają właściwości fluorescencyjne przez co mogą być wykorzystywane jako znaczniki w badaniach obrazowych[149]. Ponadto akrydyny mogą być wykorzystywane w technologii laserowej oraz w badaniach nad organicznymi materiałami półprzewodnikowymi[147].



**Ryc. 10** Wielokierunkowa aktywność pochodnych akrydyny[147].

Pochodne akrydyny o właściwościach przeciwbakteryjnych (akryflawina i proflawina) (**Ryc. 11, str. 47**) zyskały dużą popularność w czasie I wojny światowej jako miejscowe środki przeciwbakteryjne[150]. Mleczan etakrydyny (Rivanol) wykorzystywany jest do dzisiaj jako związek antyseptyczny w formie 0,1% roztworu wodnego[148]. Wykazuje działanie przeciwbakteryjne wobec Gram (+) bakterii z rodzaju *Streptococcus* i *Staphylococcus*[148]. W latach 40 XX wieku eksplorowano przeciwmalaryczne oraz przeciwpierwotniakowe działanie pochodnych akrydyny[150]. Mepakryna do 2020 roku była wykorzystywana w leczeniu malarii, skojarzonym z chlorochiną. Pyronarydyna w skojarzeniu z artezunatem są podstawowymi lekami zalecanymi przez Światową Organizację Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) w leczeniu ostrej, niepowikłanej malarii[148]. Nieustannie trwają badania nad nowymi pochodnymi akrydyny o właściwościach przeciwmalarycznych i przeciwpierwotniakowych[149]. Malaria, trypanosomoza, lamblioza oraz leiszmanioza stanowią poważny problem zdrowotny krajów rozwijających się[151]. Akrydyny stanowią dogodny punkt wyjścia do opracowywania nowych leków ze względu na ich udowodnioną aktywność biologiczną. Problem stanowi silna interakcja akrydyn z DNA[151]. Kilka z zsyntetyzowanych bistakryn przez francuski zespół z Uniwersytetu w Lille wykazały aktywność przeciwko *Plasmodium falciparum* w stężeniach nanomolowych oraz całkowicie hamowało rozwój *Trypanosoma brucei*[151].

Działanie inhibicyjne pochodnych akrydyny wobec cholinesteraz stało się podstawą stworzenia pierwszej terapii ukierunkowanej na chorobę Alzheimera. Takryna (1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoakrydyna) została wprowadzona na rynek jako preparat Cognex® w 1993 roku[152]. Uwodornienie jednego pierścienia zmniejszyło cytotoksyczność takryny w stosunku do akrydyny oraz zwiększyło aktywność związku wobec cholinesteraz[153]. Niestety, niezablokowana grupa aminowa w położeniu 9 odpowiadała za działania niepożądane związku, przede wszystkim hepatotoksyczność, która stała się powodem wycofania preparatu z lecznictwa[154]. Niemniej struktura takryny stała się układem podstawowym dla tworzenia nowych, wielofunkcyjnych pochodnych akrydyny o aktywności inhibicyjnej wobec cholinesteraz oraz dodatkowych właściwościach biologicznych takich jak: działanie antyoksydacyjne, hamowanie agregacji A $\beta$ , inhibicja MAO, inhibicja białka tau, działanie neuroprotektoryjne, inhibicja  $\beta$ -sekretazy oraz chelatowanie metali[147, 154-156].

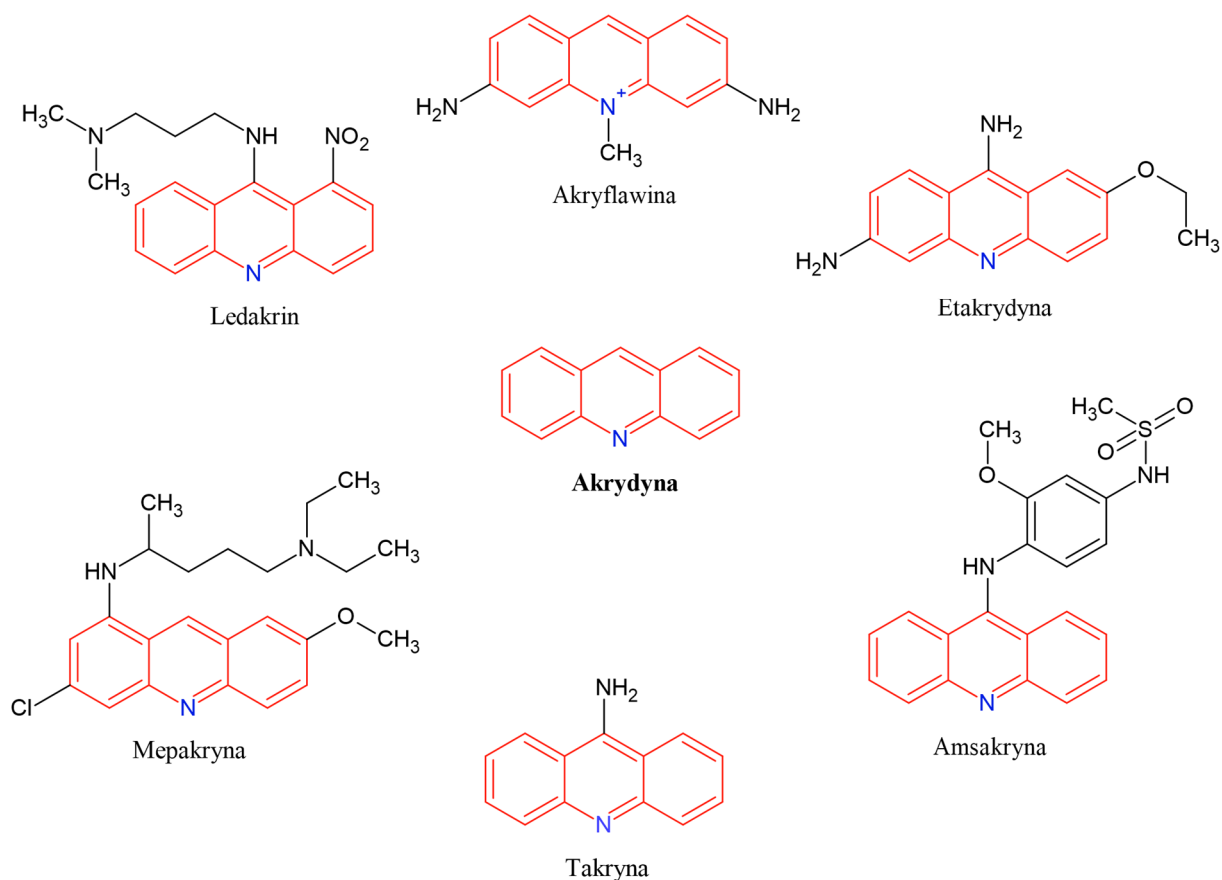
Najważniejszym działaniem biologicznym akrydyn jest ich aktywność przeciwnowotworowa[148, 150]. Wynika ona z budowy cząsteczki akrydyny. Trójpierścieniowa cząsteczka akrydyny posiada charakter planarny, dzięki czemu wchodzi między parę zasad azotowych, działając jako interkalator nici DNA[148]. Dalsze badania pokazały, że działanie przeciwnowotworowe akrydyny i jej pochodnych polega nie tylko na interkalacji nici DNA, ale również na specyficznym wiązaniu się z białkami jądrowymi m.in. enzymami[147]. Pod uwagę wzięto klasę kluczowych enzymów w procesie replikacji, topoisomeras. Biorą one udział w procesie replikacji, odpowiadając za rozkręcenie jednej nici DNA (topoisomerasa I) lub obu nici (topoisomerasa II)[147]. W szczególności topoisomerasa II jest celem wielu związków o aktywności przeciwnowotworowej[150]. Akrydyna i jej pochodne wchodzi w interakcję z kompleksem topoisomerasy II i DNA[148, 149]. W warunkach fizjologicznych ilość kompleksów topoisomerasa II-DNA jest niewielka. Zastosowanie inhibitorów topoisomerasy II znacząco zwiększa ilość kompleksów oraz ilość rozluźnionych i rozkręconych nici DNA[148]. To z kolei stymuluje szereg procesów komórkowych takich jak rekombinacje i mutacje, co ostatecznie skutkuje śmiercią komórki[148]. Związki przeciwnowotworowe wykazujące aktywność inhibicyjną wobec topoisomerasy II przekształcają ten kluczowy enzym komórkowy w swego rodzaju czynnik toksyczny[148].

Badania nad przeciwnowotworowym działaniem akrydyny i jej pochodnych rozpoczęły się w latach 70 XX wieku. Pierwszym związkiem o działaniu przeciwnowotworowym była pochodna 1-nitroakrydyny (dichlorowodorek 1-nitro-9-(3-

dimetyloaminopropylamino)-akrydyny) zsyntetyzowana przez prof. Andrzeja Ledóchowskiego na Politechnice Gdańskiej[150]. Ledakrin (Nitracrine) był wykorzystywany w leczeniu nowotworów jajników, piersi, płuc i skóry[148]. Ze względu na jego silnie toksyczny charakter i poważne działania niepożądane został wycofany[148]. W 1976 roku wprowadzono do leczenia kolejną pochodną akrydyny o działaniu przeciwnowotworowym, amsakrynę[150]. Amsakryna jest pochodną 9-anilinoakrydyny do dzisiaj stosowana w leczeniu ostrej białaczki szpikowej i jej nawrotów w skojarzeniu z innymi lekami cytostatycznymi[147, 148]. Mechanizm działania amsakryny był przedmiotem szczegółowych badań. W ich wyniku udowodniono powstawanie trójskładnikowego kompleksu amsakryna-topoizomeraza II-DNA, gdzie fragment akrydyny interkaluje się między parę zasad azotowych, a fragment aniliny oddziałuje na topoizomerazę II[148]. Ten trójskładnikowy kompleks skutkuje apoptozą komórki[147]. Amsakryna wykazuje również działanie mutagenne, powodując m.in. mutacje punktowe i delecje[150].

Przeciwgrzybicze właściwości akrydyny i jej pochodnych stały się przedmiotem zainteresowania naukowców[157, 158]. Zakażenia grzybicze stanowią poważny problem, szczególnie u pacjentów z upośledzonym układem odpornościowym m.in. pacjentów onkologicznych[159]. Często rozwijające się u nich zakażenia grzybicze wynikające z postępującej choroby czy agresywnej chemioterapii stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia[159]. Naukowcy uważają, że działanie hamujące topoizomerazę II pochodnych akrydyny można selektywnie wykorzystać w stosunku do komórek grzybów patogennych[157]. Projektowanie nowych pochodnych akrydyny ukierunkowanych na różniącą się od ludzkiej topoizomerazę II grzybów może okazać się korzystnym kierunkiem walki z ciężkimi zakażeniami grzybiczymi[160]. Do tej pory zsyntetyzowano oraz poddano ocenie aktywności przeciwgrzybiczej kilkadziesiąt pochodnych akrydyny[159]. Wśród nich są znane związki o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwmalarycznym jak akryflawina i mepakryna[157]. Wykazały one znaczącą aktywność wobec grzybów z rodzaju *Candida*, *Saccharomyces* oraz *Trichophyton*, wpływając m.in. na zmiany aktywności enzymów mitochondrialnych, cytochromów zaangażowanych w układ oddechowy, transport błonowy, endocytozę oraz kondensację chromatyny i ekspresję genów[157]. Mepakryna dodatkowo oddziałuje na ważny czynnik wirulencji grzybów jakim jest tworzenie biofilmu u *Candida albicans*[157]. Struktura oraz rozwój biofilmu jest jednym z mechanizmów rozwoju oporności drobnoustrojów[157]. Terapie ukierunkowane na czynniki wirulencji zamiast na

tradycyjne cele komórkowe, mogą okazać się obiecującą alternatywą w leczeniu zakażeń grzybiczych[157, 160].



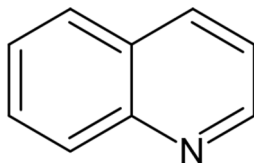
**Ryc. 11** Struktura akrydyny w związkach chemicznych stosowanych w medycynie i farmacji[147].

Akrydyna i jej pochodne dzięki unikatowej budowie chemicznej i wielokierunkowym działaniu biologicznym są przedmiotem ciągłego zainteresowania naukowców (**Ryc. 11**). Nowe badania dostarczają precyzyjnych informacji na temat mechanizmów działania pochodnych akrydyny oraz odkrywają ich nowe właściwości biologiczne, które mogą zostać wykorzystywane w przyszłości w medycynie i przemyśle[147, 149].

### 1.5.2 Chinolina

Chinolina (benzo[*b*]pirydyna) jest aromatycznym związkiem heterocyklicznym zawierającym w swojej budowie atom azotu (**Ryc. 12, str. 48**). Chinolina chemicznie jest III-rzędową aminą wykazującą słabe właściwości zasadowe[161]. Posiada zdolność tworzenia soli z kwasami oraz ulega podstawieniu nukleofilowemu, jak i elektrofilowemu. Chinolina oraz jej pochodne są związkami często występującymi w naturalnych produktach roślinnych

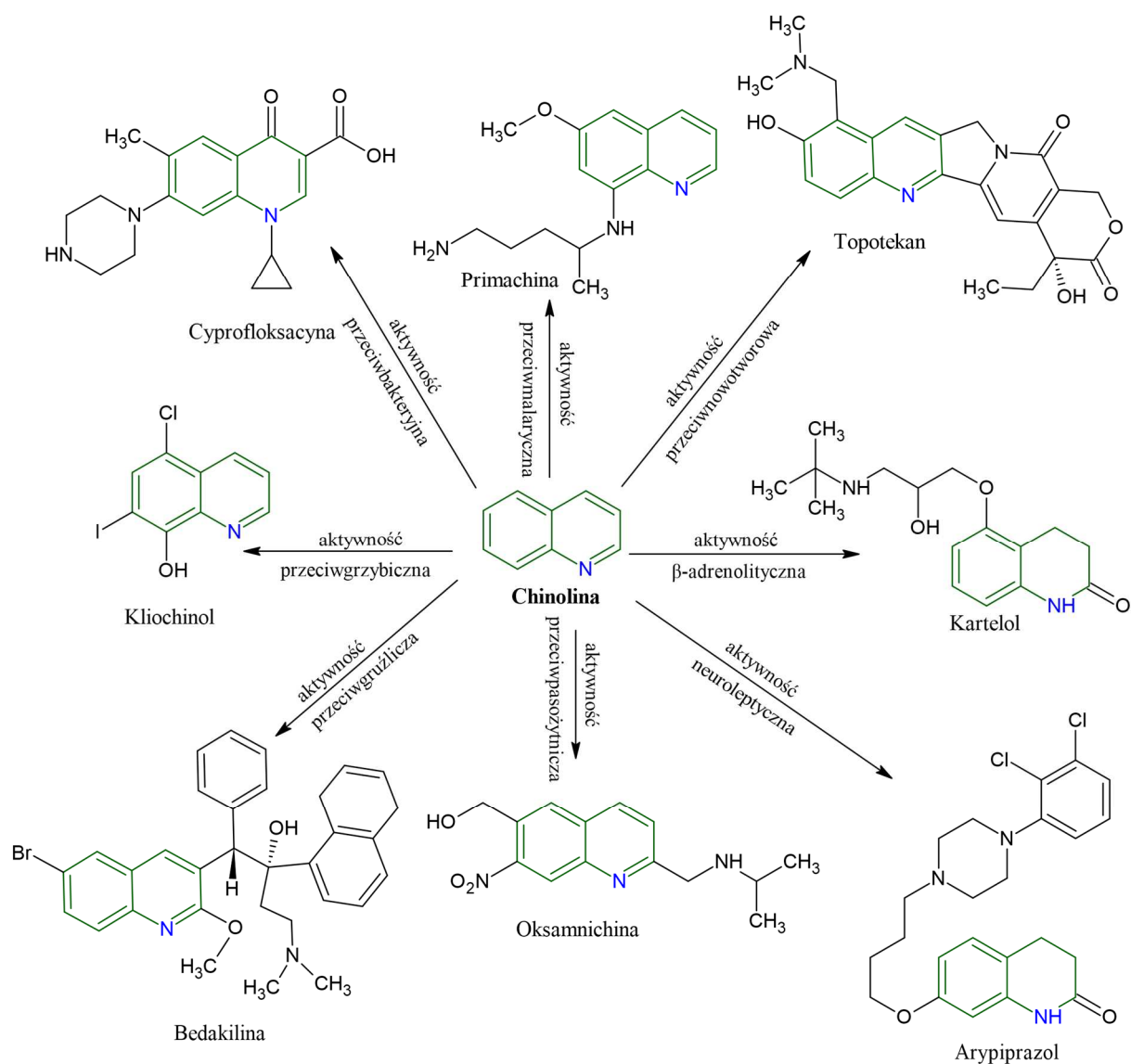
m.in. jako alkaloidy roślin z gatunku *Cinchona* o potwierdzonym działaniu przeciwmalarycznym[162, 163].



**Ryc. 12** Struktura chinoliny.

Chinolina jako struktura wiodąca dla projektowania nowych związków biologicznie czynnych ma ogromne znaczenie w chemii medycznej. Pochodne chinoliny wykazały wielokierunkowy mechanizm działania i szerokie zastosowanie w medycynie i farmacji[164]. Obecnie wiele stosowanych leków ma w swojej budowie cząsteczkę chinoliny. Pochodne chinoliny posiadają działanie: przeciwmalaryczne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciw pasożytnicze, przeciw pierwotniakowe, przeciwgruźlicze, przeciwzapalne, przeciwbólowe, kardiologiczne, przeciwastmatyczne, przeciwdrgawkowe oraz przeciwnowotworowe(**Ryc. 13, str. 49**)[162, 163]. Leki przeciwmalaryczne, które zawierają w swojej budowie strukturę chinoliny to: chinina, chinidyna, chlorochina, meflochina, primachina oraz amodiachina[161]. Chemioterapeutyk, cyprofloksacyna z grupy fluorowanych chinolonów, często stosowana w leczeniu zakażeń dolnych dróg moczowych i dróg oddechowych spowodowanych rozwojem bakterii Gram (-) również posiada w swojej budowie cząsteczkę chinoliny[161]. Wśród przedstawicieli leków zawierających w swojej budowie chinolinę wyróżniamy również kliochinol, będący lekiem przeciwgrzybiczym oraz bedakilinę zarejestrowaną w leczeniu wieloopornej gruźlicy[161]. W leczeniu jaskry stosowany jest miejscowy  $\beta$ -adrenolityk, kartelol. Wśród leków działających ośrodkowo zawierających cząsteczkę chinoliny w swojej budowie można przytoczyć aripiprazol oraz breksipiprazol. Chinolina stanowi ważny punkt rozwoju terapii przeciwnowotworowych[165]. Kamptotecyna oraz jej pochodne topotekan oraz irynotekan jako inhibitory topoizomerazy I stosowane są w leczeniu nowotworów jelita grubego, płuc jajnika oraz szyjki macicy[161].





**Ryc. 13** Wielokierunkowy mechanizm działania pochodnych chinoliny[164].

Struktura chinoliny stała się inspiracją do projektowania nowych leków oraz poszukiwania nieznanymi mechanizmami działania biologicznego jej pochodnych[161]. Obecnie pochodne chinoliny stały się przedmiotem badań na temat ich aktywności oraz potencjalnej możliwości wykorzystania w leczeniu chorób wirusowych spowodowanych m.in. wirusem Zika, wirusem opryszczki, wirusem zapalenia wątroby typu C czy koronawirusem[162]. Ponadto pochodne chinoliny, w szczególności cyklopentachinolina, której budowa jest analogiczna ze strukturą tetrahydroakrydyny stanowi przedmiot badań nad jej aktywnością wobec cholinesteraz oraz wykorzystaniem w terapii choroby Alzheimera[166, 167].

Chinolina jest jedną z najpowszechniej wykorzystywanych struktur w projektowaniu związków biologicznie czynnych[164]. Jej ogromny potencjał biologiczny, o którym

świadczy ilość leków stosowanych obecnie w medycynie zawierających w swojej budowie strukturę chinoliny jest chętnie wykorzystywany przez naukowców[168]. Dalszy rozwój badań nad nowymi pochodnymi chinoliny może przynieść w przyszłości wiele innowacyjnych leków o szerokim spektrum działania biologicznego[165].

## 2 Cel pracy

Choroba Alzheimera jest nieuleczalnym oraz postępującym schorzeniem neurodegeneracyjnym dotykającym coraz więcej osób na świecie. Pomimo, iż od jej odkrycia minęło ponad 100 lat, wciąż nieznanym jest dokładny mechanizm jej powstawania. Na przestrzeni lat naukowcom udało się zidentyfikować kilka charakterystycznych czynników patologicznych pojawiających się w trakcie rozwoju choroby. Są nimi m.in. obecność zewnątrzkomórkowych złogów A $\beta$ , hiperfosforylacja białka tau oraz odkładanie się ich w formie splotków neurofibrylarnych wewnątrz neuronu, upośledzenie neurotransmisji cholinergicznej, stan zapalny, zaburzenie homeostazy metali oraz dysfunkcja mitochondriów. Wymienione czynniki patologiczne stały się celem dla projektowania nowych substancji leczniczych w chorobie Alzheimera.

Pierwszym lekiem, który został zarejestrowany oraz wprowadzony do leczenia choroby Alzheimera była takryna, pochodna akrydyny. Jest ona inhibitorem cholinesteraz. Zablokowanie enzymu rozkładającego acetylocholinę, zwiększało jej stężenie w przestrzeni synaptycznej zmniejszając skutki upośledzenia neurotransmisji cholinergicznej, które wynikało z toczącego się procesu neurodegeneracyjnego. Niestety terapia takryną wiązała się z poważnymi działaniami niepożądanymi, przede wszystkim hepatotoksycznością, co było powodem jej wycofania. Pomimo niepowodzenia takryny, sama cząsteczka stała się strukturą wiodącą dla tworzenia nowych pochodnych o wielokierunkowym działaniu na kilka mechanizmów choroby Alzheimera jednocześnie przy zmniejszonej toksyczności. Taka strategia tworzenia leków wielofunkcyjnych (ang. multi-target directed ligands, MTDL's) stała się powszechnie uznaną metodą dla tworzenia nowych leków w chorobach o wieloczynnikowym i skomplikowanym patomechanizmie, jak choroba Alzheimera.

Celem mojej pracy doktorskiej było zaprojektowanie oraz zbadanie serii nowych pochodnych kwasu akrydynowego oraz cyklopentachinoliny jako związków o wielokierunkowym mechanizmie działania i potencjalnym wykorzystaniu w terapii choroby Alzheimera. Struktura związków bazowała na układach akrydyny i chinoliny o potwierdzonej, wielokierunkowej aktywności biologicznej wobec cholinesteraz.

Cel pracy doktorskiej osiągnęłam poprzez:

1. Zaprojektowanie oraz syntezę ośmiu nowych pochodnych, hybryd kwasu 9-akrydynokarboksyłowego oraz cyklopentachinoliny, połączonych za pomocą łańcucha alifatycznego o różnej długości w postaci wolnej zasady oraz chlorowodorów.
2. Oczyszczenie uzyskanych produktów za pomocą technik chromatograficznych oraz potwierdzenie ich struktury przy użyciu metod spektroskopowych.
3. Ocenę aktywności biologicznej *in vitro* wobec cholinoesteraz przy użyciu spektrofotometrycznej metody Ellmana.
4. Zbadanie kinetyki działania inhibicyjnego nowych związków w obecności AChE oraz BuChE.
5. Ocenę aktywności antyoksydacyjnej nowych pochodnych przy użyciu fluorymetrycznej metody ORAC-FL.
6. Ocenę cytotoksyczności związków o największej aktywności na linii ludzkich komórek gwiazdzistych wątroby (ang. human hepatic stellate cells, HSCs).
7. Analizę otrzymanych substancji technikami modelowania molekularnego polegającymi na wykonaniu dokowania do receptora AChE oraz BuChE.
8. Określenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych związków o najwyższej aktywności poprzez wykonanie komputerowych symulacji procesów ADMET.

## 3 CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

### 3.1 Metodologia badań

#### 3.1.1 Odczynniki chemiczne

- metanol (POCH S.A.)
- metanol-d (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- chloroform (POCH S.A.)
- amoniak (POCH S.A.)
- tetrahydrofuran (Chempur)
- dimetyloformamid (Chempur)
- eter dietylowy (Chempur)
- 1 M kwas solny (POCH S.A.)
- bufor fosforanowy soli fizjologicznej (PBS, Biochrom AG)
- 1,2-diaminoetan (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- 1,3-diaminopropan (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- 1,4-diaminobutan (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- 1,5-diamnipentan (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- 1,6-diaminoheksan (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- 1,7-diaminoheptan (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- 1,8-diaminooktan (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- 1,9-diaminononan (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- kwas 9-akrydynokarboksylowy (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitro)-benzoesowy (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- jodek acetylotiocholiny (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- acetylocholinoesteraza (*EeAChE*; EC 3.1.1.7; Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- butyrylocholinoesteraza (*EqBuChE*; EC 3.1.1.8; Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- chlorowodorek takryny (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- bistakryna (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy (Trolox; Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- fluoresceina disodowa (Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny) (APPH; Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- dimetylosulfotlenek (DMSO; Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
- linia komórkowa ludzkich komórek gwiaździstych wątroby (Human hepatic stellate cells,

- HSCs, Sciencell Inc.)
- medium komórkowe (Stellate Cell Medium, Sciencell Inc.)
  - 1% suplement wzrostu komórek gwiazdzistych (Sciencell Inc.)
  - 2% płodowa surowica bydłęca (FBS, Sciencell Inc.)
  - penicylina (100 j.m./ml, Biological Industries, USA)
  - streptomycyna (100 mg/ml, Biological Industries, USA)
  - bufor Sorensena (Witko Sp. z o.o.)
  - bromek dimetylotiazolilodifenylotetrazolu (MTT, Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
  - fluoresceina sodowa (FL, Sigma Aldrich Sp. z o.o.)
  - kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylo-chromano-2-karboksylowy (Trolox®, Sigma Aldrich Sp. z o.o.)

### **3.1.2 Aparatura**

- mieszadło magnetyczne (IKA POL RET control/t IKAMAG®)
- wyparka rotacyjna (IKA POL RV 10 digital V)
- lampa UV 254 nm (Camag UV cabinet)
- waga analityczna (WPE 60, Radwag)
- pH-metr (Mettler Toledo FireEasy)
- elektroda laboratoryjna pH (LE438, Mettler Toledo)
- płytki aluminiowe z żelem krzemionkowym (25 DC-Alufolien Kieselgel 60F<sub>254</sub>, Merck)
- pipety automatyczne jednokanałowe oraz wielokanałowe 10-200 µl (CappTronic)
- aparat PuriFlash 430 (Interchim)
- kolumny SiHP 30 µm 4g oraz 12g (Interchim)
- aparat do pomiaru temperatury topnienia (Elektrothermal 9300)
- spektrometr Bruker Avance III 600 MHz (Bruker)
- spektrometr FTIR z przystawką ATR Thermo Scientific Nicolet 6700 (Madison, Winsconsin, USA)
- spektrometr mas Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS G6520B (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- spektrofotometryczny czytnik mikroplitek Synergy H1 (BioTek)
- powietrzna chłodnica zwrotna (Radleys Mini Findenser B14)

### 3.1.3 Synteza

#### 3.1.3.1 Synteza związków 1a-1h

W szklanej kolbie sercowatej o pojemności 50 ml umieszczono 1,5 g fenolu, 0,7 g 9-chloro-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]-chinoliny oraz 0,07 g NaI. Reakcję prowadzono pod powietrzną chłodnicą zwrotną. Mieszaninę reakcyjną ogrzano na mieszadle magnetycznym do temperatury 50 °C. Następnie dodano 3 ml odpowiedniej diaminy i ogrzewano przez 2 godz. w 180 °C. W celu potwierdzenia przebiegu reakcji wykonano TLC. Płytki rozwijano w komorze chromatograficznej. Przebieg pierwszego etapu syntezy kontrolowano przy użyciu fazy ruchomej składającej się z chloroformu i metanolu w stosunku 9:1. Po upływie 2 godz., kolbę schłodzono. Następnie zawartość kolby rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przeniesiono do rozdzielacza. Mieszaninę poreakcyjną trzykrotnie ekstrahowano 50 ml 10% KOH. Warstwę organiczną przemyto jednokrotnie 20 ml nasyconego roztworu NaCl, a następnie dodano do niej bezwodnego MgSO<sub>4</sub> w celu osuszenia fazy organicznej. Po kilku minutach, roztwór przesączono przez sączek bibułowy, a przesącz zatężono na wyparce rotacyjnej. Produkt przeniesiono do probówki Eppendorfa. Dokładną ilość użytych reagentów do reakcji zestawiono w **Tabeli 1, str. 56**.

**Tabela 1.** Ilości reagentów użytych w I etapie syntezy związków **1a-1h**.

Symbol związku	Nazwa	odczynniki	Masa [g] /objętość [ml]	n [mmol]
<b>1a</b>	<i>N</i> -(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[ <i>b</i> ]chinolin-9-ylo)etylo-1,2-diamina	9-chlorocyklopentachinolina	0,30 g	1,48
		fenol	1,59 g	16,89
		NaI	0,07 g	0,47
		1,2-diaminoetan	2,00 ml	29,91
<b>1b</b>	<i>N</i> -(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[ <i>b</i> ] chinolin-9-ylo)propylo-1,3-diamina	9-chlorocyklopentachinolina	0,32 g	1,55
		fenol	1,53 g	16,26
		NaI	0,08 g	0,50
		1,3-diaminopropan	2,00 ml	23,96
<b>1c</b>	<i>N</i> -(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[ <i>b</i> ] chinolin-9-ylo)butylo-1,4-diamina	9-chlorocyklopentachinolina	0,31 g	1,52
		fenol	1,62 g	17,21
		NaI	0,06 g	0,42
		1,4-diaminobutan	2,00 ml	19,89
<b>1d</b>	<i>N</i> -(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[ <i>b</i> ] chinolin-9-ylo)pentyl-1,5-diamina	9-chlorocyklopentachinolina	0,31 g	1,53
		fenol	1,51 g	16,05
		NaI	0,07 g	0,487
		1,5-diaminopentan	2,00 ml	17,09
<b>1e</b>	<i>N</i> -(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[ <i>b</i> ] chinolin-9-ylo)heksylo-1,6-diamina	9-chlorocyklopentachinolina	0,34 g	1,64
		fenol	1,66 g	17,64
		NaI	0,08 g	0,54
		1,6-diaminoheksan	2,50 g	21,51
<b>1f</b>	<i>N</i> -(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[ <i>b</i> ] chinolin-9-ylo) heptylo-1,7-diamina	9-chlorocyklopentachinolina	0,32 g	1,58
		fenol	1,57 g	16,68
		NaI	0,08 g	0,513
		1,7-diaminoheptan	2,5 g	19,20
<b>1g</b>	<i>N</i> -(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[ <i>b</i> ] chinolin-9-ylo)oktylo-1,8-diamina	9-chlorocyklopentachinolina	0,31 g	1,50
		fenol	1,49 g	15,83
		NaI	0,08 g	0,53
		1,8-diaminooktan	2,50 g	17,33
<b>1h</b>	<i>N</i> -(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[ <i>b</i> ] chinolin-9-ylo)nonylo-1,9-diamina	9-chlorocyklopentachinolina	0,29 g	1,44
		fenol	1,54 g	16,36
		NaI	0,07 g	0,46
		1,9-diaminononan	3,00 g	18,95



### 3.1.3.2 Synteza związków 2a-2h

Do szklanej kolby sercowatej o pojemności 50 ml, umieszczonej w kąpeli lodowej, dodano 7 ml THF oraz odważony na wadze analitycznej kwas 9-akrydynokarboksyłowy. W celu całkowitego rozpuszczenia kwasu akrydynowego dodawano 2-3 krople DMF. Całość mieszano w temperaturze  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 45 minut. Następnie, do roztworu kwasu akrydynowego w THF dodano CDMT (2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę) oraz N-metylomorfolinę. Reakcję prowadzono przez 3 godz. w temperaturze  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . W drugiej kolbie o objętości rozpuszczono odpowiednią pochodną **1a-1h** w 3 ml THF i energicznie dodano do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję po dodaniu pochodnej diaminowej prowadzono przez 24 godz. w temperaturze pokojowej. Szczegółowe ilości użytych reagentów przedstawiono w **Tabeli 2, str. 58**. Po 24 godz. powstały osad odsączono na lejku oraz przemyto roztworem THF. W celu potwierdzenia przebiegu reakcji wykonano analizę TLC. Płytki rozwijano w komorze chromatograficznej. Produkty syntezy kontrolowano w fazie 10:1 składającej się z chloroformu oraz mieszaniny metanolu z amoniakiem (10:0,5). Otrzymane produkty, związki **2a-2h** oczyszczono metodą chromatografii typu „Flash” przy użyciu aparatu PuriFlash 430 oraz kolumn SiHP 30  $\mu\text{m}$  w fazie 9,5:1 składającej się z chloroformu oraz mieszaniny metanolu z amoniakiem (10:0,5). Oczyszczone i wysuszone związki **2a-2h** zważono oraz obliczono wydajność reakcji. Określono temperatury topnienia dla produktów syntezy (**Tabela 4, str. 71**). Struktury chemiczne produktów drugiego etapu syntezy zostały potwierdzone przy użyciu metod spektroskopowych: IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS, HR-MS (**Tabela 5, str. 72-75**).

**Tabela 2.** Ilości reagentów użytych w II etapie syntezy związków **2a-2h**.

Symbol związku	Nazwa	odczynniki	Masa [g] /objętość [ml]	n [mmol]
<b>2a</b>	N-[2-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)etylo]akrydyno-9-karboksamid	<b>1a</b>	0,171 g	0,752
		kwasy 9-akrydyno-karboksylowe	0,168 g	0,752
		CDMT	0,132 g	0,752
		N-metylomorfolina	0,083 ml	0,752
<b>2b</b>	N-[3-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)propylo]akrydyno-9-karboksamid	<b>1b</b>	0,167 g	0,693
		kwasy 9-akrydyno-karboksylowe	0,155 g	0,693
		CDMT	0,122 g	0,693
		N-metylomorfolina	0,076 ml	0,693
<b>2c</b>	N-[4-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)butylo]akrydyno-9-karboksamid	<b>1c</b>	0,130 g	0,509
		kwasy 9-akrydyno-karboksylowe	0,114 g	0,509
		CDMT	0,089 g	0,509
		N-metylomorfolina	0,056 ml	0,509
<b>2d</b>	N-[5-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)pentylo]akrydyno-9-karboksamid	<b>1d</b>	0,197 g	0,730
		kwasy 9-akrydyno-karboksylowe	0,163 g	0,730
		CDMT	0,128 g	0,730
		N-metylomorfolina	0,080 ml	0,730
<b>2e</b>	N-[6-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)heksylo]akrydyno-9-karboksamid	<b>1e</b>	0,220 g	0,776
		kwasy 9-akrydyno-karboksylowe	0,173 g	0,776
		CDMT	0,136 g	0,776
		N-metylomorfolina	0,085 ml	0,776
<b>2f</b>	N-[7-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)heptylo]akrydyno-9-karboksamid	<b>1f</b>	0,269 g	0,904
		kwasy 9-akrydyno-karboksylowe	0,202 g	0,904
		CDMT	0,159 g	0,904
		N-metylomorfolina	0,099 ml	0,904
<b>2g</b>	N-[8-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)oktylo]akrydyno-9-karboksamid	<b>1g</b>	0,303 g	0,973
		kwasy 9-akrydyno-karboksylowe	0,217 g	0,973
		CDMT	0,171 g	0,973
		N-metylomorfolina	0,107 ml	0,973
<b>2h</b>	N-[9-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)nonylo]akrydyno-9-karboksamid	<b>1h</b>	0,313 g	0,962
		kwasy 9-akrydyno-karboksylowe	0,215 g	0,962
		CDMT	0,169 g	0,962
		N-metylomorfolina	0,106 ml	0,962

### 3.1.3.3 Synteza związków 3a-3h

Serię związków **2a-2h** rozpuszczono w 1 ml metanolu i przeniesiono do szklanych kolbek o pojemności 25 ml. Następnie do uzyskanych roztworów porcjami dodano w nadmiarze 1 M roztwór eteru dietylowego nasyconego chlorowodorem (ok. 10 ml) do wystąpienia widocznego zmętnienia. Kolbki zamknięto korkiem i pozostawiono do wykrystalizowania produktu. Reakcję prowadzono przez ok. 24 godz. w temperaturze pokojowej. Po upływie 24 godz., roztwór zdekantowano z nad osadu. Sam osad wysuszono za pomocą pompy próżniowej. Ilości reagentów użytych w III etapie syntezy przedstawiono w **Tabeli 3**. Wysuszone związki **3a-3h** zważono oraz obliczono wydajność reakcji. Określono temperatury topnienia dla każdej pochodnej (**Tabela 6, str. 77**). Struktury chemiczne produktów trzeciego etapu syntezy zostały potwierdzone przy użyciu metod spektroskopowych: IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS, HR-MS (**Tabela 7, str. 78-81**).

**Tabela 3.** Ilości reagentów użytych w III etapie syntezy związków **3a-3h**.

Symbol związku	Nazwa	odczynniki	Masa [g]	n [mmol]
<b>3a</b>	N-[2-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)etylo]akrydino-9-karboksamidu chlorowodorek	<b>2a</b>	0,0697	0,1611
<b>3b</b>	N-[3-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)propylo]akrydino-9-karboksamidu chlorowodorek	<b>2b</b>	0,039	0,0873
<b>3c</b>	N-[4-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)butylo]akrydino-9-karboksamidu chlorowodorek	<b>2c</b>	0,0543	0,1179
<b>3d</b>	N-[5-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)pentylo]akrydino-9-karboksamidu chlorowodorek	<b>2d</b>	0,0714	0,1504
<b>3e</b>	N-[6-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)heksylo]akrydino-9-karboksamidu chlorowodorek	<b>2e</b>	0,0338	0,0692
<b>3f</b>	N-[7-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)heptylo]akrydino-9-karboksamidu chlorowodorek	<b>2f</b>	0,0313	0,0623
<b>3g</b>	N-[8-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)oktylo]akrydino-9-karboksamidu chlorowodorek	<b>2g</b>	0,0309	0,0598
<b>3h</b>	N-[9-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)nonylo]akrydino-9-karboksamidu chlorowodorek	<b>2h</b>	0,0359	0,0676

## **3.2 Badania biologiczne**

### **3.2.1 Metodologia przygotowania odczynników i roztworów do badań biologicznych**

#### **3.2.1.1 Bufor fosforanowy soli fizjologicznej (PBS)**

Roztwór buforu przygotowano w kolbie miarowej na 1 litr. W 800 ml wody destylowanej rozpuszczono: 8,00 g (NaCl), 0,20 g (KCl), 1,44 g (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) i 0,24 g (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). pH buforu w zależności od rodzaju badania doprowadzono przy użyciu 36 M HCl do wartości 8,0 (badanie Ellmana) bądź 7,4 (badanie ORAC-FL). Roztwór PBS w trakcie analiz przechowywano w lodówce.

#### **3.2.1.2 Acetylocholinoesteraza (AChE)**

Enzym przygotowano poprzez rozpuszczenie 4 µl enzymu o stężeniu AChE (1 U/µl) w 2 ml PBS (pH 8,0), w ten sposób otrzymano roztwór o stężeniu 2 U/ml. Przygotowany roztwór enzymu w trakcie pomiarów przechowywano w kąpielii lodowej.

#### **3.2.1.3 Butyrylocholinoesteraza (BuChE)**

Enzym przygotowano poprzez rozpuszczenie 4 µl enzymu o stężeniu BuChE (1 U/µl) w 1 ml PBS (pH 8,0), w ten sposób otrzymano roztwór o stężeniu 4 U/ml. Przygotowany roztwór enzymu w trakcie pomiarów przechowywano w kąpielii lodowej.

#### **3.2.1.4 Roztwór kwasu 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB)**

W celu otrzymania roztworu o stężeniu 0,4 mg/ml na wadze analitycznej odważono 18 mg DTNB i rozpuszczono w 45 ml PBS (pH 8,0). Roztwór w trakcie badań przechowywano w kąpielii lodowej.

#### **3.2.1.5 Roztwór jodku acetylotiocholiny**

W celu otrzymania roztworu o stężeniu 1 mM na wadze analitycznej odważono 2 mg jodku acetylotiocholiny i rozpuszczono w 6,92 ml PBS (pH 8,0). Roztwór w trakcie badań przechowywano w kąpielii lodowej.

#### **3.2.1.6 Roztwór dichlorowodorku 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny) (APPH)**

W celu otrzymania roztworu o stężeniu 40 mM na wadze analitycznej odważono 150 mg APPH i rozpuszczono w 13,83 ml PBS (pH 7,4). Roztwór przechowywano w lodówce.

### **3.2.1.7 Roztwór podstawowy fluoresceiny sodowej (FL)**

W celu otrzymania roztworu o stężeniu 1,17 mM na wadze analitycznej odważono 2 mg fluoresceiny i rozpuszczono w 4,54 ml PBS (pH 7,4). Roztwór przechowywano w lodówce, bez dostępu do światła do czterech tygodni.

### **3.2.1.8 Roztwór roboczy fluoresceiny sodowej (FL)**

W celu otrzymania roztworu o stężeniu 117 nM pobrano 3 µl roztworu podstawowego i rozcieńczono go PBS (pH 7,4) do 30 ml.

### **3.2.2 Ocena *in vitro* aktywności inhibicyjnej zsyntetyzowanych związków 3a-3h wobec cholinoesteraz**

Badanie kinetyki reakcji enzymatycznej przeprowadzono przy użyciu zmodyfikowanej metody Ellmana[166, 170, 171]. Roztwory wszystkich substancji biorących udział w oznaczeniu zostały przygotowane przez rozpuszczenie danej substancji (**3a-3h**) w buforze fosforanowym soli fizjologicznej (PBS) o pH 8,0. Badanie wykonywano w 96-dółkowych płytkach polistyrenowych z transparentnym, płaskim dnem o pojemności 200 µl. W pierwszej kolejności do każdego dołka dodano 14 µl badanego związku o określonym stężeniu. W miejsce tła i kontroli dodano 14 µl PBS. Następnie do każdego dołka oprócz tła odmierzone i dodano 40 µl 1mM roztworu jodku acetylotiocholiny dla pomiarów w obecności AChE. Dla pomiarów w obecności BuChE dodawano 40 µl 2mM roztworu jodku acetylotiocholiny. W miejscu tła dodano 40 µl PBS. Następnie, do wszystkich dołków dodano 76 µl 0,4 mg/ml roztworu DTNB. W celu rozpoczęcia reakcji do każdego dołka odpipetowano odpowiednio 10 µl enzymu: AChE (2 U/ml) lub BuChE (4 U/ml) przetrzymywanego w kąpeli lodowej. Płytkę z mieszaniną reakcyjną inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Zmiany absorbancji przy długości fali 412 nm rejestrowano przy użyciu czytnika mikropłytek Synergy H1 firmy BioTek. Jako związków referencyjnych użyto chlorowodoru takryny i bistakryny. Wszystkie testy przeprowadzono w trzech niezależnych eksperymentach oraz trzech powtórzeniach dla każdej próbki substancji i wzorców. Na podstawie wyników otrzymanych absorbancji obliczono średnie wartości IC<sub>50</sub> wraz z odchyleniem standardowym dla każdego badanego związków.

### **3.2.3 Badanie *in vitro* kinetyki reakcji enzymatycznej wobec cholinoesteraz**

Badanie kinetyki reakcji enzymatycznej przeprowadzono przy użyciu zmodyfikowanej metody Ellmana[166, 170, 171]. Roztwory wszystkich substancji biorących udział

w oznaczeniu, w tym najaktywniejszych pochodnych (**3b** i **3f**) zostały przygotowane przez rozpuszczenie danej substancji w buforze fosforanowym soli fizjologicznej (PBS) o pH 8,0. Badanie przeprowadzono w wybranych stężeniach jodku acetylotiocholiny (350, 315, 280, 245, 210, 175, 140, 105, 70, 35  $\mu\text{M}$ ) oraz trzech stężeniach badanego związku **3f** dla AChE (200, 400, 800 nM) i trzech stężenia związku **3b** (150, 200, 250 nM) dla BuChE. Badanie wykonano na płytkach 96-dołkowych z płaskim i transparentnym dnem. Na początku naniesiono 14  $\mu\text{l}$  wybranego inhibitora w danym stężeniu. W miejscu kontroli oraz tła zamiast inhibitora naniesiono 14  $\mu\text{l}$  PBS. Następnie na płytkę naniesiono 40  $\mu\text{l}$  jodku acetylocholinę w wybranych stężeniach (350, 315, 280, 245, 210, 175, 140, 105, 70, 35  $\mu\text{M}$ ) oraz 76  $\mu\text{l}$  0,4 mg/ml roztworu DTNB. Po dodaniu 10  $\mu\text{l}$  AChE (2 U/ml) lub BuChE (4 U/ml) płytkę niezwłocznie umieszczono w czytniku płytek Synergy H1 (BioTek). Zmiany absorbancji rejestrowano przy długości fali 412 nm. Odczytu dokonywano co 1 minutę przez 15 minut. Wszystkie testy przeprowadzono w trzech niezależnych eksperymentach oraz trzech powtórzeniach dla każdej próbki.

#### **3.2.4 Ocena aktywności antyoksydacyjnej przy użyciu metody ORAC-FL**

Aktywność antyoksydacyjną wybranych związków (**3b** i **3f**) określono za pomocą fluometrycznego testu ORAC-FL (ang. Oxygen Radical Absorbance Capacity) zgodnie z metodologią Ou i wsp.[172], z modyfikacjami opisanymi przez Davalos i wsp.[173]. Roztwory wszystkich substancji biorących udział w oznaczeniu, w tym najaktywniejszych pochodnych (**3b** i **3f**) zostały przygotowane przez rozpuszczenie danej substancji w buforze fosforanowym soli fizjologicznej (PBS) o pH 7,4. W eksperymencie użyto stężeń zarówno dla Troloxu (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylo-chromano-2-karboksyłowy), jak i związków badanych z zakresu 1-13  $\mu\text{M}$  (1; 2,5; 4; 5,5; 7; 8,5; 10; 11,5; 13  $\mu\text{M}$ ). Stężenia związków badanych przygotowano poprzez serię rozcieńczeń z roztworu 5 mM. Serię rozcieńczeń Troloxu w tym samym zakresie stężeń (1-13  $\mu\text{M}$ ) uzyskano z roztworu 9 mM. Badania prowadzono na 96-dołkowych, czarnych, polistyrenowych płytkach z płaskim, przezroczystym dnem o maksymalnej pojemności 200  $\mu\text{l}$ . Na początku do dołków dodano 20  $\mu\text{l}$  roztworu testowanych związków/Troloxu oraz 120  $\mu\text{l}$  fluoresceiny (FL) w stężeniu 70 nM. Mieszaninę wstępnie inkubowano przy braku dostępu do światła w 37°C przez 15 minut. Po inkubacji reakcję zainicjowano poprzez dodanie 60  $\mu\text{l}$  APPH (dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny) (12 mM) przy użyciu pipety wielokanałowej. Płytkę umieszczono w wielofunkcyjnym czytniku mikropłytek (Synergy H1, BioTek). Następnie płytkę wytrząsano liniowo przed każdym pomiarem przez 10 sekund. Pomiary fluorescencji

prowadzono kinetycznie w 70-sekundowych odstępach przez 140 minut w 37°C. Tryb odczytu danych – odczyt „od góry” płytki. Zmiany fluorescencji rejestrowano przy długości fali wzbudzenia 485 nm oraz emisji 520 nm z zastosowaniem monochromatorów fluorescencyjnych. Jako ślełą próbę (FL + APPH), zastosowano 75 mM bufor fosforanowy (pH=7,4). Objętość ślepej próby w dołku była taka sama jak w przypadku dołków testowych i wynosiła 200 µl. Wszystkie testy przeprowadzono w trzech niezależnych eksperymentach oraz trzech powtórzeniach dla każdej próbki. Jako związku referencyjnego użyto chlorowodoru takryny w tym samym zakresie stężeń.

### **3.2.5 Badanie hepatotoksyczności na linii ludzkich komórek gwiaździstych wątroby (HSCs)**

Ludzkie komórki gwiaździste wątroby (ang. human hepatic stellate cells, HSCs, Sciencell) wątroby hodowano w dedykowanej im pożywce (Stellate Cell Medium, Sciencell) z dodatkiem 1% suplementu wzrostu komórek gwiaździstych, 2% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i 1% roztworem penicyliny/streptomycyny (Sciencell) zawierającym 10000 U/ml penicyliny oraz 10000 U/ml streptomycyny. Hodowlę prowadzono w inkubatorze w temp 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>). Komórki wysiano na 96-dołkowe płytki z gęstością 5x10<sup>3</sup> komórek na dołek i inkubowano w inkubatorze przez 24 godziny. Po okresie inkubacji pożywkę usunięto, a komórki poddano ekspozycji na 100 µl roztworów związków w zakresie stężeń (0,1-10 µM) lub tylko w obecności pożywki (kontrola). Następnie komórki inkubowano przez 24 godziny. W kolejnym etapie pożywka została usunięta, komórki przemyto roztworem PBS i do komórek dodano 50 µl roztworu MTT (0,75 mg/ml). Płytki inkubowano przez 2 godziny w 37 ° C. Ostatecznie roztwór MTT został usunięty i dodano 100 µl DMSO do każdego dołka. Płytki z DMSO trzymano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po tym czasie, do każdego dołka dodano 5 µl buforu Sorensena Płytki wytrząsano i zmierzono absorbancję przy długość fali 570 nm przy użyciu czytnik mikroplatek (Synergy H1, BioTek). Żywotność komórek wyrażono w wartościach IC<sub>50</sub> jako procent wartości próby kontrolnej[174-176].

### **3.3 Modelowanie molekularne**

Modelowanie molekularne obejmujące określenie miejsca dokowania (wiązania) badanych pochodnych z acetylocholinoesterazą oraz butyrylocholinoesterazą wraz z identyfikacją reszt aminokwasowych enzymu zaangażowanych w oddziaływanie z badanymi związkami wykonano przy użyciu oprogramowania Avogadro 1.2.0.. W celu

uzyskania dokładnych informacji na temat struktury molekularnej związków, m.in. konformacji o najniższej energii, potencjału elektrostatycznego oraz elastyczności łącznika alifatycznego wykorzystano teorię funkcjonału gęstości (ang. density functional theory, DFT). Obliczenia wykonano technikami obliczeń kwantowych przy pomocy programu Gaussian 09[177]. Dokowanie związków do miejsc aktywnych enzymu wykonano przy użyciu programów Flare 5.0.0. oraz AutoDockVina 1.2.0[178, 179]. Modele molekularne cholinioesteraz: AChE oraz BuChE zostały oparte na strukturach krystalicznych związków z systemu Protein Data Bank (7D90 oraz 7BGC)[180, 181]. Dzięki oprogramowaniu Flare 5.0.0. przygotowano modele AChE i BuChE do dokowania, m.in. dodano wszystkie atomy wodorów, usunięto zbędne ligandy oraz cząsteczki wody oraz sprotonowano reszty histydyny w pozycji Nε[178]. Dokowanie do miejsc aktywnych enzymu przeprowadzono w promieniu 10 Å od oryginalnych ligandów. Wszystkie obliczenia dotyczące dokowania wykonano przy użyciu algorytmu Extra Precision Docking Algorithm oprogramowania Flare 5.0.0. oraz optymalizatora Iterated Local Search oprogramowania AutoDockVina[178, 179]. Wyniki najlepszych konformacji ligandów zostały uzyskane z obliczeń przy użyciu oprogramowania Flare 5.0.0. oraz zostały porównane z wynikami minimalnej energii dokowania uzyskanymi za pomocą oprogramowania AutoDockVina. Wyniki najlepszych konformacji dla procesu dokowania zwizualizowano i zanalizowano przy użyciu oprogramowania VMD 1.9.3[182].

### **3.4 Analiza ADMET**

W celu określenia farmakokinetycznych i toksykologicznych parametrów. Wzory strukturalne związków poddanych analizie zostały przygotowane za pomocą programu ChemSketch ACDLabs. Wszystkie struktury z serii badanych związków zostały poddane analizie komputerowej za pomocą oprogramowania ACDLabs Percepta software ver. 14.0.0 (Advanced Chemistry Development, Inc. Metropolitan Toronto, Canada), SwissADME service (Swiss Institute of Bioinformatics 2021)[183], admetSAR 2.0 service (admetSAR 2019)[184] oraz ProTOX II service[185].



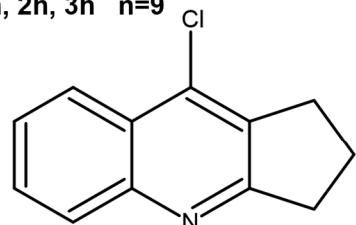
## 4 Wyniki i dyskusja

### 4.1 Synteza

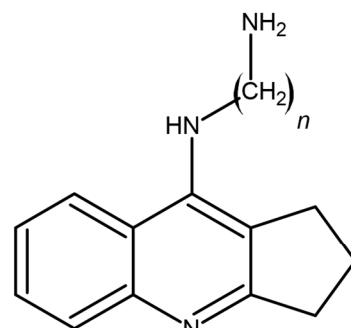
Syntezę nowej serii związków, pochodnych kwasu akrydynowego i cyklopentachinoliny przeprowadzono w trzech etapach (**Schemat 1, str. 66**). Związek 9-chloro-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolina, będący substratem dla pierwszego etapu reakcji został wcześniej otrzymany w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji[166, 169, 170]. Przebieg reakcji oraz wstępną identyfikację produktów reakcji kontrolowano przy użyciu techniki chromatografii cienkowarstwowej (ang. thin-layer chromatography, TLC) na płytkach aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym. Płytki TLC po rozwinięciu oceniano pod lampą UV (254/366 nm). Produkty syntezy, będące jednocześnie substratami do dalszych etapów syntezy oraz produkt końcowy oczyszczono za pomocą chromatografii typu „Flash” w normalnym układzie faz, na kolumnach SiHP o średnicy ziarna 30 µm.

W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymano serię ośmiu nowych, zaprojektowanych, wcześniej nieopublikowanych związków, pochodnych 9-chloro-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinoliny oraz kwasu 9-akrydynokarboksylowego. Pochodne wielopierścieniowe zostały połączone łańcuchem alifatycznym (od 2 do 9 atomów węgla w łańcuchu). Struktury nowych pochodnych bazują na heterocyklicznych cząsteczkach akrydyny oraz chinoliny o udowodnionym, wielokierunkowym działaniu biologicznym powyższych układów jako grup farmakoforowych. Ponadto, zsyntetyzowane wcześniej związki w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji przez dr n.farm. Ninę Chufarovą[170] bazujące na połączeniu 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroakrydyny oraz kwasu 9-akrydynokarboksylowego wykazały w badaniach *in vitro* wysoką aktywność inhibicyjną wobec cholinoesteraz.

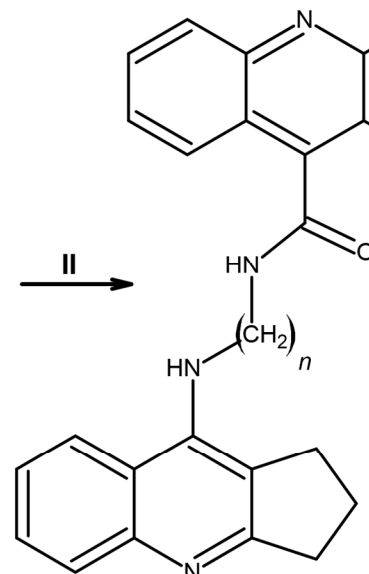
1a, 2a, 3a n=2  
 1b, 2b, 3b n=3  
 1c, 2c, 3c n=4  
 1d, 2d, 3d n=5  
 1e, 2e, 3e n=6  
 1f, 2f, 3f n=7  
 1g, 2g, 3g n=8  
 1h, 2h, 3h n=9



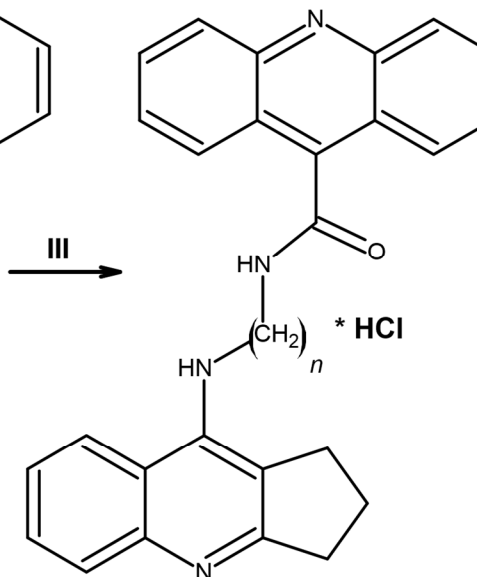
9-chloro-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolina



1a-1h



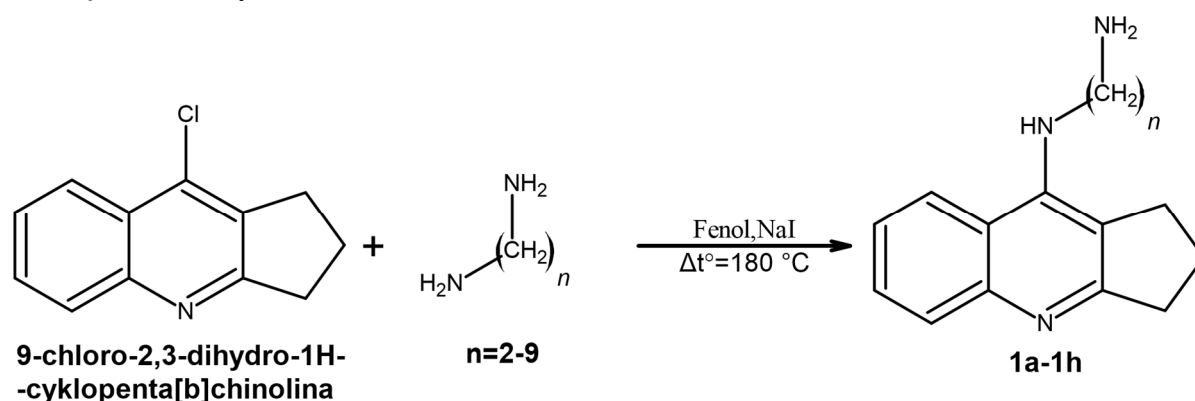
2a-2h



3a-3h

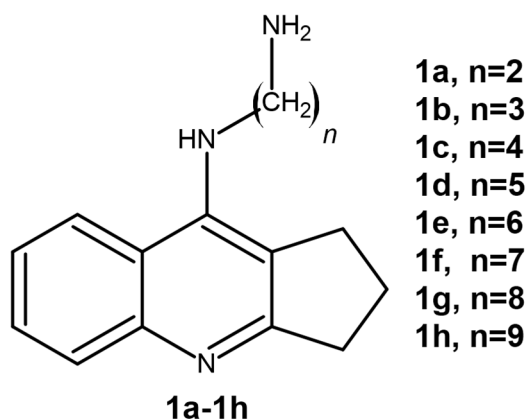
Schemat 1. Trój etapowa synteza serii nowych związków pochodnych kwasu akrydynowego i cyklopentachinoliny.

#### 4.1.1 Synteza związków 1a-1h



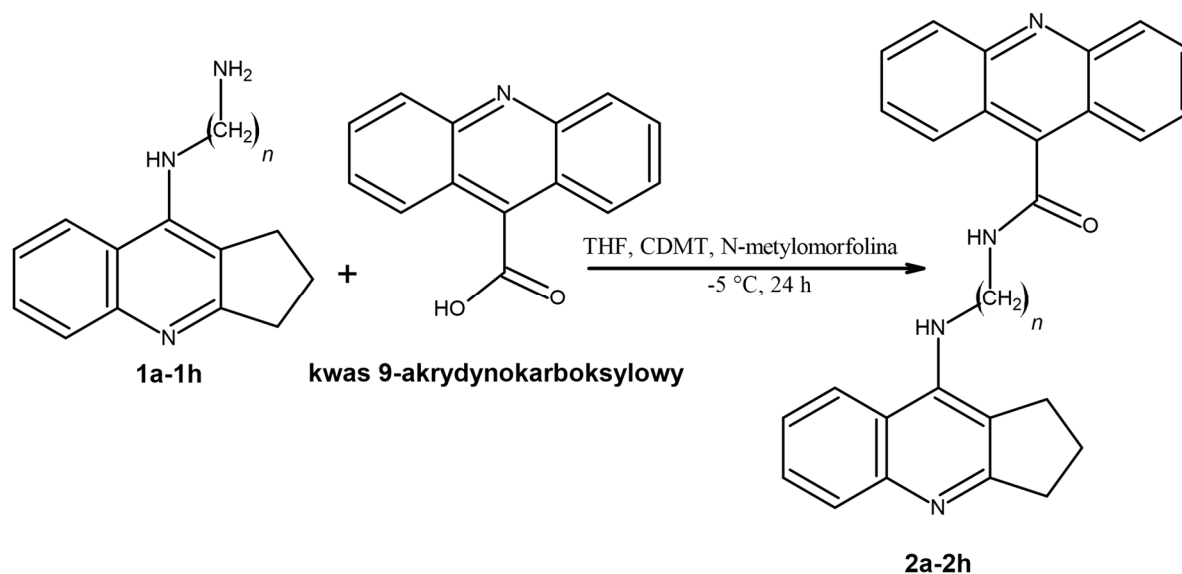
**Schemat 2.** Reakcja syntezy związków **1a-1h** (I etap).

I etap syntezy (**Schemat 2**) polegał na substytucji atomu chloru w położeniu 9 w cząsteczce 9-chloro-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinoliny odpowiednią diamina alifatyczną. W wyniku tej reakcji otrzymano serię ośmiu pochodnych **1a-1h** o różnej długości łańcucha alifatycznego, które stały się substratami do dalszego etapu syntezy (**Ryc. 14**). Przebieg reakcji kontrolowano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej TLC. Reakcja cechowała się wysoką wydajnością, a wszystkie produkty końcowe miały charakter ciemnobrązowego, gęstego oleju.



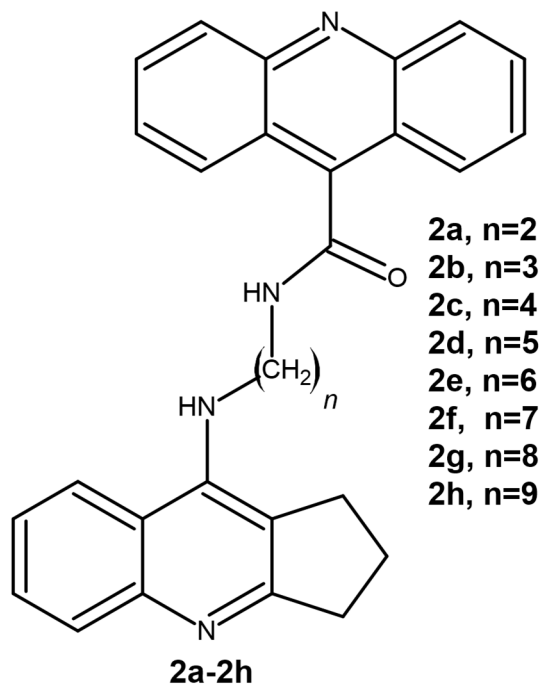
**Ryc. 14** Wzór ogólny związków **1a-1h**.

#### 4.1.2 Synteza związków 2a-2h



**Schemat 3.** Reakcja syntezy związków **2a-2h** (II etap).

Drugi etap syntezy (**Schemat 3**) polegał na utworzeniu wiązania amidowego między produktami I etapu syntezy (**1a-1h**) a kwasem 9-akrydynokarboksylowym [166, 169, 170]. W reakcji tej użyto CDMT (2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę) jako odczynnika kondensującego, którego rolą była aktywacja kwasu 9-akrydynokarboksylowego w celu otrzymania reaktywnego estru. Uzyskane *in situ* estry reagowały z cząsteczkami I-rzędowej aminy alifatycznej doprowadzając do utworzenia wiązania amidowego. Zastosowana w reakcji N-metylmorfolina jako III-rzędowa amina o właściwościach zasadowych zapewniała odpowiednie pH reakcji oraz wiązała powstające cząsteczki wody. Ponadto, N-metylmorfolina reagując z CDMT powodowała powstawanie DMTMM [chlorowodoru 4-(4,6-dimethoksy-1,3,5-triazin-2-ylo)-4-metylo-morfoliny] o silnych właściwościach acylujących grupy aminowe. W wyniku tej reakcji powstała seria ośmiu nowych, wcześniej nieopisanych w piśmiennictwie pochodnych cząsteczki 9-chloro-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinoliny oraz kwasu 9-akrydynokarboksylowego (**Ryc. 15, str. 69**). Właściwości fizyko-chemiczne oraz wyniki badań strukturalnych związków **2a-2h** zestawiono w **Tabeli 4, str. 70 i 5, str.71-74**.



- 2a, n=2**
- 2b, n=3**
- 2c, n=4**
- 2d, n=5**
- 2e, n=6**
- 2f, n=7**
- 2g, n=8**
- 2h, n=9**

**Ryc. 15** Wzór ogólny związków **2a-2h**.

**Tabela 4.** Właściwości fizyko-chemiczne związków **2a-2h**.

Symbol związku	Wzór sumaryczny	Nazwa związku	Masa molowa [g/mol]	Postać i kolor	Temperatura topnienia [°C]	Wydajność [%]
<b>2a</b>	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O	N-[2-({ 1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo } amino)etylo]akrydino-9-karboksamid	432,5164	Zielonkawy osad	130-132	26,28
<b>2b</b>	C <sub>29</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O	N-[3-({ 1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo } amino)propylo]akrydino-9-karboksamid	446,5429	Żółto-zielony osad	138-141	16,50
<b>2c</b>	C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O	N-[4-({ 1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo } amino)butylo]akrydino-9-karboksamid	460,5695	Intensywnie żółty osad	140-143	25,77
<b>2d</b>	C <sub>31</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O	N-[5-({ 1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo } amino)pentylo]akrydino-9-karboksamid	474,5961	Żółty osad	168-172	21,84
<b>2e</b>	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O	N-[6-({ 1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo } amino)heksylo]akrydino-9-karboksamid	488,6227	Żółto-pomarańczowy olej	-	10,39
<b>2f</b>	C <sub>33</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O	N-[7-({ 1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo } amino)heptylo]akrydino-9-karboksamid	502,6493	Żółty olej	-	7,87
<b>2g</b>	C <sub>34</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O	N-[8-({ 1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo } amino)oktylo]akrydino-9-karboksamid	516,6758	Żółty olej	-	6,70
<b>2h</b>	C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O	N-[9-({ 1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo } amino)nonylo]akrydino-9-karboksamid	530,7024	Żółto-pomarańczowy olej	-	7,35

**Tabela 5.** Wyniki badań strukturalnych związków **2a-2h** metodami spektroskopowym.

Symbol związku	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR	FTIR-ATR ν (cm <sup>-1</sup> )	MS (ESI)	MS-HR (ESI) m/z	
					Obliczona	Oznaczona w badaniu
<b>2a</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,41 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz; 1H, ArH); 8,18 – 8,21 (m, 2H, ArH); 7,94 – 7,97 (m, 2H, ArH); 7,83 – 7,89 (m, 4H, ArH); 7,65 (t, <i>J</i> = 8,4 Hz; 1H, ArH); 7,45 – 7,49 (m, 2H, ArH); 4,28 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ); 4,06 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,55 – 3,51 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,20 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,29 (p, <i>J</i> = 7,8 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 175,7; 162,1; 152,8; 138,7; 132,1; 130,8; 128,3; 126,7; 126,1; 124,9; 122,4; 122,1; 117,3; 112,7; 48,2; 39,9; 31,4; 31,2; 20,7	752,8;1279,1;1367,4;1463,1; 1569,4;2942,2;3195,1	85,1; 185,1; 206,0; 249,1	432,1963	432,1950
<b>2b</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,37 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz; 1H, ArH); 8,24 (dd, <i>J</i> = 8,8 Hz; 2H, ArH); 8,12 (dd, <i>J</i> = 8,5 Hz; 2H, ArH); 7,91 – 7,94 (m, 2H, ArH); 7,76 – 7,83 (m, 2H, ArH); 7,66 – 7,70 (m, 2H, ArH); 7,61 (t, <i>J</i> = 8,3 Hz; 1H, ArH); 4,06 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,84 (t, <i>J</i> = 6,8 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,42 – 3,46 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,17 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,25 (dp, <i>J</i> = 20,8; 7,3 Hz; 4H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 168,2; 148,2; 142,1; 130,9; 128,3; 126,9; 125,3; 125,1; 122,2; 122,1; 121,8; 117,9; 112,6; 42,3; 36,9; 32,2; 31,1; 30,6; 22,0	750,8; 1275,1; 1373,8; 1457,8; 1558,5; 2917,2; 3197,0	149,0; 185,1; 223,1; 263,1	446,2119	446,2106

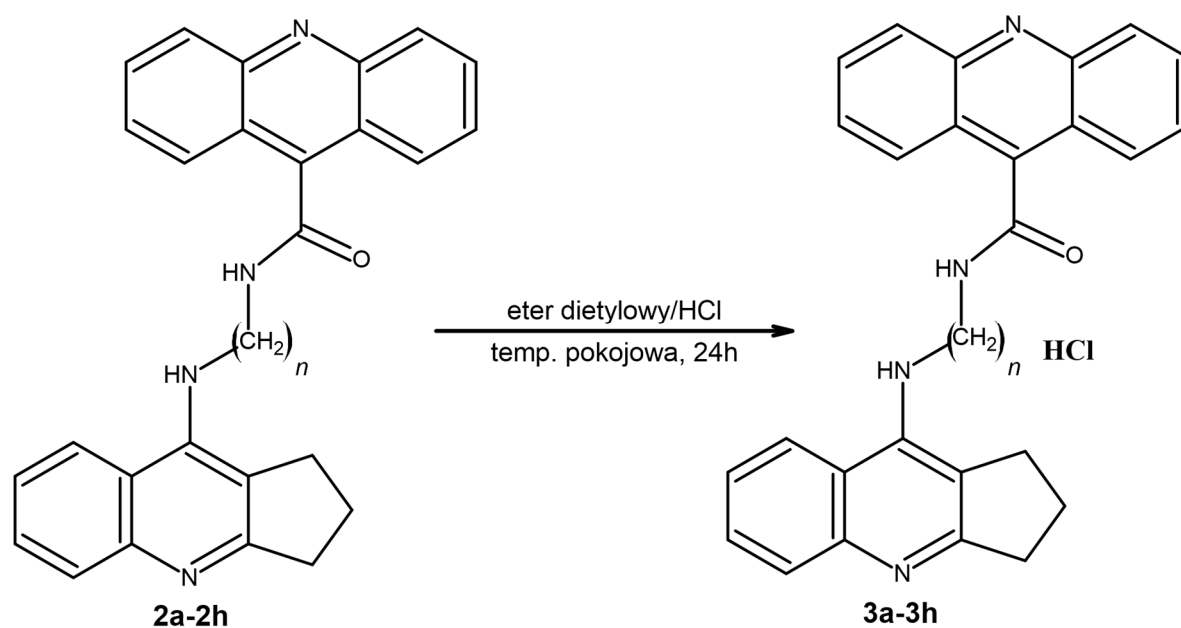
<b>2c</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,37 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz; 1H, ArH); 8,23 (dd, <i>J</i> = 8,8 Hz; 2H, ArH); 8,07 (dd, <i>J</i> = 8,6 Hz; 2H, ArH); 7,85 – 7,94 (m, 3H, ArH); 7,78 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz; 1H, ArH); 7,59 – 7,68 (m, 3H, ArH); 3,96 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,75 (t, <i>J</i> = 6,7 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,41 – 3,46 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,16 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,24 (p, <i>J</i> = 7,7 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,92 – 1,97 (m, 4H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMSO) δ 168,3; 166,4; 148,6; 148,3; 146,9; 142,9; 131,1; 129,7; 128,7; 128,4; 127,2; 126,0; 123,6; 122,2; 122,1; 119,4; 112,5; 44,2; 40,3; 34,6; 31,1; 29,1; 26,8; 23,2	756,8; 1258,3; 1367,5; 1458,0; 1541,1; 2915,6; 3233,4	185,1; 206,0; 239,2; 282,2	460,2293	460,2263
<b>2d</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,30 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H, ArH); 8,22 (dd, <i>J</i> = 8,8 Hz; 2H, ArH); 8,08 (dd, <i>J</i> = 8,4 Hz; 2H, ArH); 7,87 – 7,94 (m, 1H, ArH); 7,80 (t, <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H, ArH); 7,72 – 7,75 (m, 1H, ArH); 7,62 – 7,66 (m, 1H, ArH); 7,55 (t, <i>J</i> = 8,4 Hz; 1H, ArH); 3,89 (t, <i>J</i> = 7,3 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,70 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,40 – 3,46 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,16 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,28 (p, <i>J</i> = 7,8 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,85 – 1,95 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ); 1,70 (p, <i>J</i> = 7,8; 7,3 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 176,8; 161,7; 152,6; 142,5; 138,7; 131,9; 130,9; 128,3; 126,7; 125,7; 125,1; 122,2; 122,2; 112,1; 44,4; 39,4; 31,4; 31,2; 30,6; 28,8; 22,4; 21,4	761,8; 1273,9; 1371,8; 1466,5; 1558,0; 2925,8; 3209,0	185,1; 206,0; 253,2; 296,2; 447,2	474,2454	474,2419



<b>2e</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,22 (dd, <i>J</i> = 8,8 Hz; 2H, ArH); 8,14 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz; ArH); 8,08 (dd, <i>J</i> = 8,6 Hz; 2H, ArH); 7,88 – 7,93 (m, 2H, ArH); 7,75 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz; 1H, ArH); 7,60 – 7,66 (m, 3H, ArH); 7,44 (t, <i>J</i> = 7,3 Hz; 1H, ArH); 3,71 – 3,76 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,67 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,30 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,02 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,16 (p, <i>J</i> = 7,6 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,80 (dp, <i>J</i> = 21,1; 7,1 Hz; 4H, CH <sub>2</sub> ); 1,58 – 1,67 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,33 – 1,41 (m, 2H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 167,7; 163,8; 148,2; 142,5; 130,9; 130,6; 128,2; 126,7; 125,1; 125,0; 122,4; 122,3; 121,7; 117,9; 112,2; 53,7; 39,4; 32,3; 31,0; 30,9; 28,9; 26,5; 18,4	757,0; 1255,6; 1364,2; 1458,4; 1562,1; 2916,8; 3253,1	185,1; 206,0; 310,2	488,2597	488,2576
<b>2f</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,21 (dd, <i>J</i> = 8,8 Hz; 2H, ArH); 8,13 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz; 1H, ArH); 8,07 (dd, <i>J</i> = 8,6 Hz; 2H, ArH); 7,84 – 7,88 (m, 2H, ArH); 7,75 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz; 1H, ArH); 7,61 – 7,65 (m, 3H, ArH); 7,43 (t, <i>J</i> = 7,7 Hz; 1H, ArH); 3,70 – 3,73 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,66 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,28 – 3,32 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,01 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,17 (p, <i>J</i> = 7,6 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,78 (dp, <i>J</i> = 14,1; 7,0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ); 1,54 – 1,59 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ); 1,33 – 1,41 (m, 2H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 167,7; 163,4; 148,2; 142,6; 130,8; 130,8; 128,2; 126,7; 125,1; 125,1; 122,3; 122,0; 121,8; 112,2; 44,5; 39,5; 32,1; 31,0; 31,0; 29,4; 28,9; 28,6; 26,6; 26,2; 22,5; 22,4	752,5; 1265,2; 1367,5; 1456,2; 1567,6; 2918,2; 3220,5	151,0; 185,1; 206,0; 281,2; 324,2	502,2761	502,2732

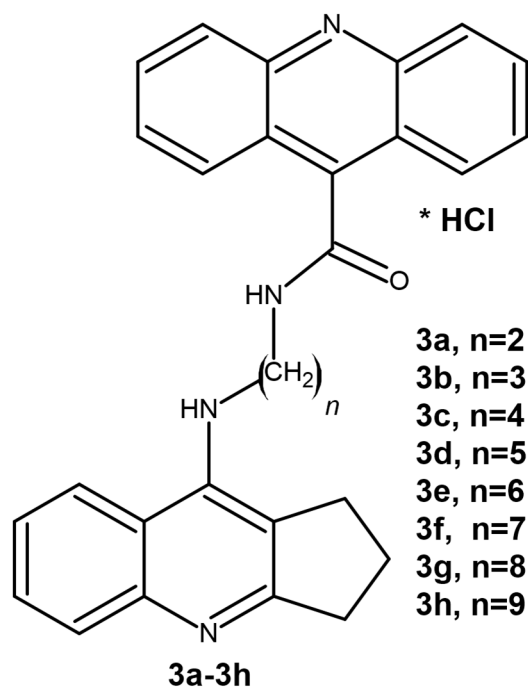
2g	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,22 (dd, <i>J</i> = 8,8 Hz; 2H, ArH); 8,06 – 8,10 (m, 3H, ArH); 7,86 – 7,91 (m, 2H, ArH); 7,74 (d, <i>J</i> = 7,7 Hz; 1H, ArH); 7,65 – 7,69 (m, 2H, ArH); 7,55 – 7,59 (m, 1H, ArH); 7,38 (t, <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H, ArH); 3,62 – 3,69 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ); 3,27 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,99 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,15 (p, <i>J</i> = 7,6 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,75 (dp, <i>J</i> = 31,4; 7,8; 7,3 Hz; 4H, CH <sub>2</sub> ); 1,46 – 1,56 (m, 6H, CH <sub>2</sub> ); 1,33 – 1,40 (m, 2H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 167,7; 166,8; 146,0; 142,6; 130,8; 128,7; 128,2; 126,7; 125,7; 125,2; 123,8; 122,3; 121,0; 112,3; 53,6; 40,4; 33,5; 30,9; 30,8; 29,0; 29,0; 28,9; 28,9; 28,8; 26,7; 26,4; 26,3; 26,3; 22,7	753,8; 1260,1; 1358,3; 1457,2; 1566,9; 2924,7; 3239,3	185,1; 206,0; 295,2; 338,2	516,2928	516,2889
2h	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,23 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz; 1H, ArH); 8,07 – 8,11 (m, 3H, ArH); 7,90 – 7,94 (m, 1H, ArH); 7,73 – 7,76 (m, 2H, ArH); 7,68 – 7,72 (m, 1H, ArH); 7,58 – 7,61 (m, 2H, ArH); 7,39 – 7,44 (m, 2H, ArH); 3,64 – 3,67 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,25 – 3,30 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,14 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,01 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,18 (p, <i>J</i> = 7,7 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,68 (p, <i>J</i> = 7,6 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,31 – 1,52 (m, 12H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 172,2; 147,2; 142,6; 130,9; 128,2; 128,2; 126,7; 125,2; 123,5; 122,3; 120,8; 112,3; 53,6; 40,4; 30,9; 30,9; 30,8; 29,2; 29,1; 29,0; 29,0; 29,0; 28,9; 28,8; 28,8; 26,7; 26,4; 26,3; 26,3; 22,8	753,3; 1260,0; 1368,3; 1457,2; 1567,3; 2920,4; 3192,7	206,0; 309,2; 352,2	530,3071	530,3045

### 4.1.3 Synteza związków 3a-3h



**Schemat 4.** Reakcja syntezy związków **3a-3h** (III etap).

W trzecim etapie syntezy w celu poprawy rozpuszczalności w wodzie nowych pochodnych, otrzymane i oczyszczone związki **2a-2h** przeprowadzono w chlorowodorki, otrzymując nową serię związków **3a-3h**[166, 169, 170]. Chlorowodorki otrzymano poprzez rozpuszczenie związków **2a-2h** w niewielkiej ilości metanolu, a następnie dodaniu w nadmiarze eteru dietylowego nasyconego chlorowodorem. Reakcje III etapu syntezy związków **3a-3h** przedstawiono na **Schemacie 4**. Ogólny wzór serii związków **3a-3h** przedstawiono na **Rycinie 16**, str. 76. Właściwości fizyko-chemiczne oraz wyniki badań strukturalnych związków zestawiono w **Tabeli 6**, str. 77 i 7, str. 78-81.



**Ryc. 16** Wzór ogólny związków **3a-3h**.

**Tabela 6.** Właściwości fizyko-chemiczne związków **3a-3h**.

Symbol związku	Wzór sumaryczny	Nazwa związku	Masa molowa [g/mol]	Postać i kolor	Temperatura topnienia [°C]	Wydajność [%]
<b>3a</b>	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>4</sub> O	chlorowodorek N-[2-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)etylo]akrydyno-9-karboksamidu	468,9773	Intensywnie żółty, krystaliczny osad	249-250	82,57
<b>3b</b>	C <sub>29</sub> H <sub>26</sub> ClN <sub>4</sub> O	chlorowodorek N-[3-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)propylo]akrydyno-9-karboksamidu	483,0039	Intensywnie żółty, krystaliczny osad	198-200	64,00
<b>3c</b>	C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> ClN <sub>4</sub> O	chlorowodorek N-[4-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)butylo]akrydyno-9-karboksamidu	497,0305	Intensywnie żółty, krystaliczny osad	238-240	74,06
<b>3d</b>	C <sub>31</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>4</sub> O	chlorowodorek N-[5-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)pentylo]akrydyno-9-karboksamidu	511,0570	Intensywnie żółty, krystaliczny osad	240-241	86,49
<b>3e</b>	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> ClN <sub>4</sub> O	chlorowodorek N-[6-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)heksylo]akrydyno-9-karboksamidu	525,0836	Intensywnie żółty, krystaliczny osad	158-160	62,50
<b>3f</b>	C <sub>33</sub> H <sub>34</sub> ClN <sub>4</sub> O	chlorowodorek N-[7-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)heptylo]akrydyno-9-karboksamidu	539,1102	Intensywnie żółty, krystaliczny osad	179-180	78,64
<b>3g</b>	C <sub>34</sub> H <sub>36</sub> ClN <sub>4</sub> O	chlorowodorek N-[8-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)oktylo]akrydyno-9-karboksamidu	553,1368	Intensywnie żółty, krystaliczny osad	183-185	91,29
<b>3h</b>	C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> ClN <sub>4</sub> O	chlorowodorek N-[9-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)nonylo]akrydyno-9-karboksamidu	567,1634	Intensywnie żółty, krystaliczny osad	190 -195	89,66

**Tabela 7.** Wyniki badań strukturalnych związków **3a-3h** metodami spektroskopowymi

Symbol związku	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR	FTIR-ATR ν (cm <sup>-1</sup> )	MS (ESI)	MS-HR (ESI) m/z	
					Obliczona	Oznaczona w badaniu
<b>3a</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,50 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz; 1H, ArH); 8,43 (dd, <i>J</i> = 8,8 Hz; 2H, ArH); 8,34 – 8,39 (m, 2H, ArH); 8,32 (dd, <i>J</i> = 8,7 Hz; 2H, ArH); 7,93 (t, <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H); 7,84 – 7,89 (m, 3H, ArH); 7,71 (t, <i>J</i> = 8,3 Hz; 1H, ArH); 4,35 (t, <i>J</i> = 6,2 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 4,14 (t, <i>J</i> = 6,2 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,52 (q, <i>J</i> = 7,0 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,27 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,36 (p, <i>J</i> = 7,7 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 165,4; 152,6; 140,3; 137,9; 132,7; 128,9; 126,7; 126,5; 122,6; 122,6; 119,8; 119,4; 117,2; 44,4; 40,3; 31,2; 22,5	755,9; 1243,1; 1370,9; 1465,8; 1569,5; 3023,1; 3232,9	185,1; 206,0; 226,1; 249,1	432,1950	432,1960
<b>3b</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,47 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz; 1H, ArH); 8,41 – 8,45 (m, 4H, ArH); 8,36 – 8,39 (m, 2H, ArH); 8,01 – 8,04 (m, 2H, ArH); 7,90 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz; 1H, ArH); 7,80 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H, ArH); 7,67 (t, <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H, ArH); 4,12 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,91 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,52 (q, <i>J</i> = 6,7 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,24 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,29 – 2,36 (m, 4H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 165,0; 140,7; 137,7; 137,5; 132,5; 128,9; 126,8; 126,2; 122,7; 120,3; 119,2; 117,2; 42,3; 37,2; 31,3; 31,2; 30,7; 22,4	753,4; 1260,6; 1370,2; 1464,6; 1558,3; 3027,4; 3222,9	185,1; 223,1; 235,1; 263,1	446,2107	446,2106

<b>3c</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,42 – 8,47 (m, 3H, ArH); 8,36 – 8,41 (m, 4H, ArH); 7,99 – 8,03 (m, 2H, ArH); 7,88 (t, <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H, ArH); 7,78 (d, <i>J</i> = 7,9 Hz; 1H, ArH); 7,67 (t, <i>J</i> = 8,3 Hz; 1H, ArH); 4,00 (t, <i>J</i> = 6,6 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,82 (t, <i>J</i> = 6,5 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,48 (q, <i>J</i> = 7,3; 6,2 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,22 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,31 (p, <i>J</i> = 7,7 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,97 – 2,05 (m, 4H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 164,5; 161,1; 153,4; 140,3; 137,8; 137,6; 132,5; 128,9; 126,9; 126,2; 122,7; 122,5; 119,9; 119,2; 112,3; 44,1; 39,6; 31,3; 31,1; 28,7; 26,1; 22,4	743,9; 1263,7; 1368,4; 1466,9; 1552,4; 3025,9; 3189,1	185,1; 206,0; 239,2; 282,2	460,2263	460,2276
<b>3d</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,43 – 8,47 (m, 2H, ArH); 8,41 – 8,36 (m, 5H, ArH); 7,99 – 8,04 (m, 2H, ArH); 7,86 (t, <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H, ArH); 7,76 (d, <i>J</i> = 7,9 Hz; 1H, ArH); 7,61 (t, <i>J</i> = 8,3 Hz; 1H, ArH); 3,93 (t, <i>J</i> = 7,3 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,78 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,46 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,22 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,32 (p, <i>J</i> = 7,7 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,95 (dp, <i>J</i> = 14,6; 7,4 Hz; 4H, CH <sub>2</sub> ); 1,72 (p, <i>J</i> = 7,7 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 164,4; 153,3; 140,2; 137,9; 137,6; 132,4; 128,9; 126,9; 126,1; 122,7; 122,5; 119,8; 119,2; 117,1; 44,4; 39,8; 31,3; 31,1; 30,6; 28,8; 23,8; 22,3	748,1; 1267,4; 1369,7; 1465,6; 1557,9; 3030,0; 3185,2	185,1; 206,1; 268,2; 296,2	474,2420	474,2441

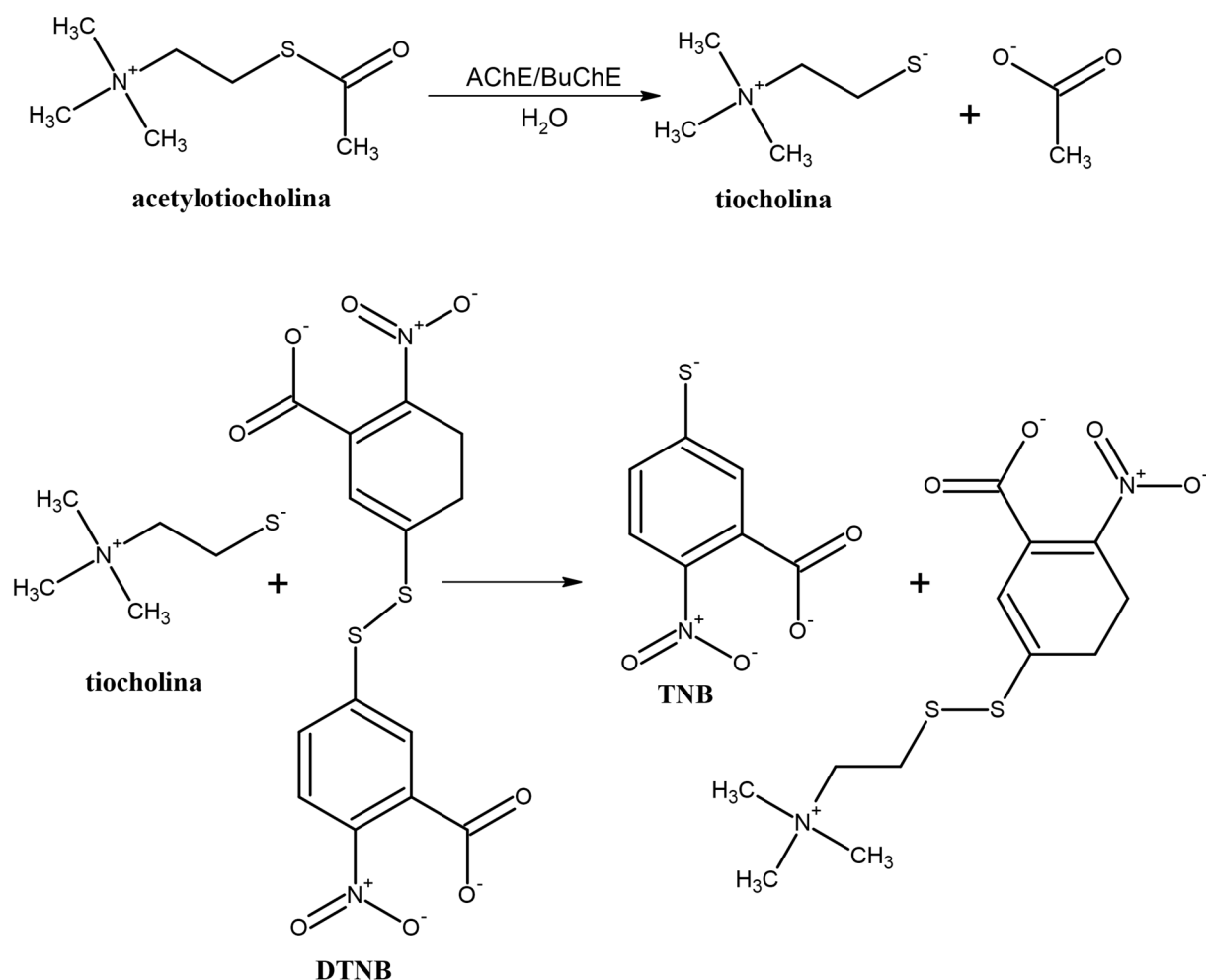
3e	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,44 – 8,47 (m, 2H, ArH); 8,36 – 8,42 (m, 5H, ArH); 8,02 – 8,05 (m, 2H, ArH); 7,87 (t, <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H, ArH); 7,76 (d, <i>J</i> = 7,9 Hz; 1H, ArH); 7,64 (t, <i>J</i> = 8,3 Hz; 1H, ArH); 3,91 – 3,88 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,75 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,44 (t, <i>J</i> = 7,3 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,21 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,32 (p, <i>J</i> = 7,8 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,85 – 1,92 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ); 1,65 (p, <i>J</i> = 3,5 Hz; 4H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 164,3; 153,3; 140,2; 137,9; 137,6; 132,4; 128,9; 126,9; 126,1; 122,7; 122,5; 119,8; 119,2; 117,1; 44,5; 39,8; 39,2; 31,3; 31,1; 31,0; 28,9; 28,8; 26,5; 26,2; 25,8; 20,9	753,7; 1262,9; 1368,9; 1464,3; 1558,2; 2934,2; 3196,3	180,1; 206,1; 267,2; 310,2	488,2576	488,2600
3f	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,44 – 8,47 (m, 2H, ArH); 8,35 – 8,40 (m, 5H, ArH); 8,00 – 8,04 (m, 2H, ArH); 7,85 – 7,88 (m, 1H, ArH); 7,76 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz; 1H, ArH); 7,64 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz; 1H, ArH); 3,85 – 3,89 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,74 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,43 (t, <i>J</i> = 7,3 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,20 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,32 (p, <i>J</i> = 7,8 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,85 (q, <i>J</i> = 6,9 Hz; 4H, CH <sub>2</sub> ); 1,60 (d, <i>J</i> = 15,0 Hz; 6H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 164,3; 153,3; 153,3; 140,3; 137,8; 137,6; 132,4; 128,9; 126,8; 126,1; 122,7; 122,5; 119,8; 119,2; 117,1; 44,5; 39,8; 31,2; 31,1; 31,0; 28,9; 28,6; 26,7; 26,2; 22,3	753,5; 1263,9; 1362,6; 1464,4; 1558,4; 2931,3; 3196,4	178,1; 206,1; 296,2; 324,2	502,2733	502,2749



<b>3g</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,43 – 8,46 (m, 2H, ArH); 8,34 – 8,40 (m, 5H, ArH); 8,01 – 8,05 (m, 2H, ArH); 7,85 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz; 1H, ArH); 7,75 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz; 1H, ArH); 7,63 (t, <i>J</i> = 7,3 Hz; 1H, ArH); 3,83 – 3,88 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,73 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,42 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,21 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,32 (p, <i>J</i> = 7,8 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,84 (p, <i>J</i> = 7,1 Hz; 4H, CH <sub>2</sub> ); 1,48 – 1,61 (m, 8H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 164,4; 153,3; 153,1; 140,4; 137,7; 137,6; 132,4; 128,9; 126,8; 126,0; 122,6; 122,4; 119,9; 119,2; 117,1; 44,6; 39,9; 31,2; 31,1; 31,0; 29,0; 28,9; 28,8; 26,7; 26,2; 22,3	753,6; 1262,6; 1362,5; 1464,4; 1558,3; 2927,6; 3196,6	185,1; 206,1; 295,2; 338,2	516,2889	516,2902
<b>3h</b>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ 8,43 – 8,46 (m, 2H, ArH); 8,33 – 8,40 (m, 5H, ArH); 8,01 – 8,05 (m, 2H, ArH); 7,86 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz; 1H, ArH); 7,75 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz; 1H, ArH); 7,63 (t, <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H, ArH); 3,83 – 3,87 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,73 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,41 (t, <i>J</i> = 7,3 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,20 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,32 (p, <i>J</i> = 7,7 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> ); 1,78 – 1,87 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ); 1,59 – 1,44 (m, 12H, CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, MeOD) δ 164,4; 153,3; 153,1; 140,4; 137,7; 132,4; 128,9; 126,8; 126,0; 122,6; 122,4; 120,0; 119,1; 117,1; 44,6; 39,9; 31,2; 31,1; 31,0; 29,2; 29,0; 28,9; 28,8; 26,8; 26,2; 22,3	753,7; 1262,6; 1362,6; 1464,4; 1558,4; 2923,5; 3196,6	185,1; 206,0; 223,1; 253,2; 280,2; 309,2; 336,2; 352,2	530,3046	530,3072

## 4.2 Ocena aktywności inhibicyjnej in vitro związków 3a-3h wobec AChE i BuChE

Ocenę aktywności inhibicyjnej zsyntetyzowanej serii związków **3a-3h**, pochodnych cyklopentachinoliny i kwasu 9-akrydynokarboksylowego, wobec cholinoesteraz przeprowadzono przy użyciu metody Ellmana [166, 170, 171]. Mechanizm reakcji polegał na interakcji substratu (jodku acetylotiocholiny) z cholinoesterazami (AChE i BuChE) w obecności inhibitora oraz odczynnika Ellmana - kwasu 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowego) (DTNB). W wyniku hydrolizy substratu powstaje tiocholina, która reagując z odczynnikiem DTNB prowadziła do redukcji wiązania disiarczkowego oraz utworzenia anionu kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego (TNB) o charakterystycznej żółtej barwie. Intensywność żółtego zabarwienia jest proporcjonalna do aktywności enzymu. Obecność inhibitora AChE lub BuChE powoduje spadek aktywności enzymu, co objawia się zmniejszeniem intensywności roztworu. Ocenę aktywności inhibicyjnej związków przeprowadza się przy użyciu metody spektrofotometrycznej, przy długości fali 412 nm. Aktywność związków wyrażana jest w wartościach  $IC_{50}$  (ang. half maximal inhibitory concentration), które określa stężenie badanego związku powodującego spadek aktywności enzymu o 50%. Przebieg mechanizmu reakcji przedstawia **Schemat 5, str. 83**. Wyniki badania przedstawiono w **Tabeli 8, str. 84**. W celach porównawczych, wyniki wszystkich związków z serii zestawiono z wynikami badań nad uznanymi inhibitorami cholinoesteraz - takryną i bistakryną, posiadającymi wysoki stopień podobieństwa w budowie strukturalnej do związków **3a-3h**.



**Schemat 5.** Przebieg reakcji enzymatycznej w metodzie Ellmana wykorzystanej w ocenie aktywności inhibicyjnej związków **3a-3h**. DTNB [kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy)], TNB (kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy), AChE (acetylocholinesteraza), BuChE(butyrylocholinoesteraza), H<sub>2</sub>O (woda).

Większość związków **3a-3h** wykazała wysoką aktywność inhibicyjną wobec AChE w zakresie IC<sub>50</sub>=113,34 – 700,98 nM. Związek **3f**, o dłuższym łańcuchu alkilowym składającym się z siedmiu grup metylenowych, wykazał najwyższy potencjał inhibicyjny wobec AChE (IC<sub>50</sub>=113,34 ± 7,14 nM), znacznie niższy niż takryna (IC<sub>50</sub>=226,97 ± 27,05 nM) i bistakryna (IC<sub>50</sub>=405,10 ± 28,62 nM). Ponadto, związek **3f** wykazał również wysoką aktywność wobec BuChE (IC<sub>50</sub>=203,52 ± 16,02nM). Związki **3b** (IC<sub>50</sub>=272,33 ± 35,11 nM) i **3c** (IC<sub>50</sub>=272,79 ± 22,11 nM) posiadały wobec AChE identyczną aktywność, natomiast wobec BuChE związek **3b** (IC<sub>50</sub>=103,73 ± 7,63 nM) wykazał prawie dwukrotnie wyższą aktywność od związku **3c** (IC<sub>50</sub>=200,20 ± 18,07 nM). Wszystkie związki **3a-3h** wykazały wyższą selektywność wobec BuChE niż AChE. Wysoką aktywność inhibicyjną nowych związków wobec cholinoesteraz potwierdzają wartości IC<sub>50</sub> dla całej serii w zakresie od

103,73 do 539,92 nM. Najaktywniejszym związkiem wobec BuChE okazał się związek **3b** ( $IC_{50}=103,73 \pm 7,63$  nM), charakteryzujący się krótkim łańcuchem alkilowych, składającym się z trzech grup metylenowych. Był on ponad dwukrotnie bardziej aktywny niż bistakryna. Wyniki badań dowiodły brak zależności między aktywnością biologiczną związku wobec cholinoesteraz a długością łańcuch alkilowego łączącego cząsteczkę cyklopentachinoliny i kwasu akrydynowego.

Na podstawie uzyskanych wyników wyselekcjonowano najbardziej aktywne związki, zarówno wobec AChE, jak i BuChE. Pochodne **3b** i **3f** ze względu na najniższe wartości  $IC_{50}$  zostały wybrane do dalszych badań. **Wykres 1, str. 85** obrazuje zależność aktywności pochodnych wobec AChE w zależności od ilości atomów węgla w łańcuchu alifatycznym.

**Tabela 8.** Aktywność inhibicyjna serii badanych związków **3a-3h** wobec AChE and BuChE.

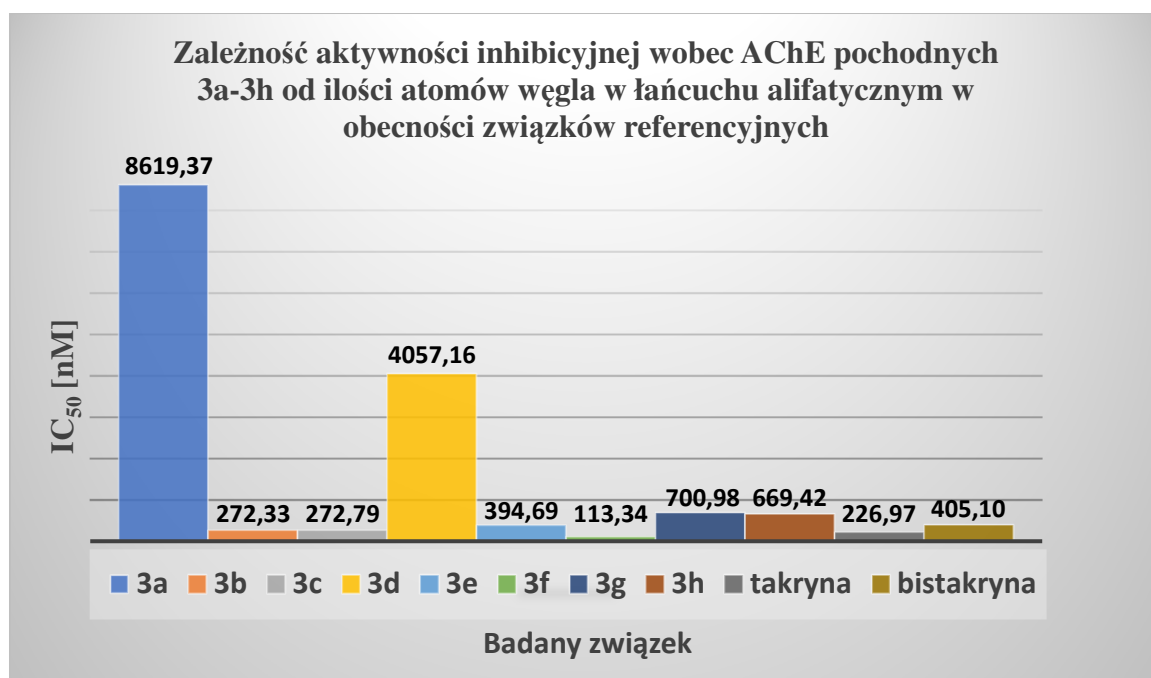
Związek	AChE $IC_{50} \pm SD$ [nM] <sup>a</sup>	BuChE $IC_{50} \pm SD$ [nM] <sup>b</sup>	Selektywność wobec AChE <sup>c</sup>	Selektywność wobec BuChE <sup>d</sup>
<b>3a</b>	8619,37 ± 606,33	539,92 ± 66,90	0,06	15,96
<b>3b</b>	272,33 ± 35,11	<b>103,73 ± 7,63</b>	0,38	2,62
<b>3c</b>	272,79 ± 22,11	200,20 ± 18,07	0,73	1,36
<b>3d</b>	4057,16 ± 535,79	173,41 ± 18,89	0,04	23,39
<b>3e</b>	394,69 ± 36,07	194,88 ± 11,02	0,49	2,02
<b>3f</b>	<b>113,34 ± 7,14</b>	203,52 ± 16,02	1,79	0,56
<b>3g</b>	700,98 ± 67,08	177,63 ± 17,03	0,25	3,95
<b>3h</b>	669,42 ± 83,39	226,97 ± 27,05	0,34	2,95
<b>Takryna</b>	226,97 ± 27,05	7,20 ± 0,51	0,03	31,52
<b>Bistakryna</b>	405,10 ± 28,62	226,00 ± 30,40	0,56	1,79

<sup>a</sup> Stężenie związku [nM] powodujące spadek aktywności AChE o 50% (± SD)

<sup>b</sup> Stężenie związku [nM] powodujące spadek aktywności BuChE o 50% (± SD)

<sup>c</sup>  $IC_{50}(\text{BuChE})/IC_{50}(\text{AChE})$ .

<sup>d</sup>  $IC_{50}(\text{AChE})/IC_{50}(\text{BuChE})$ .

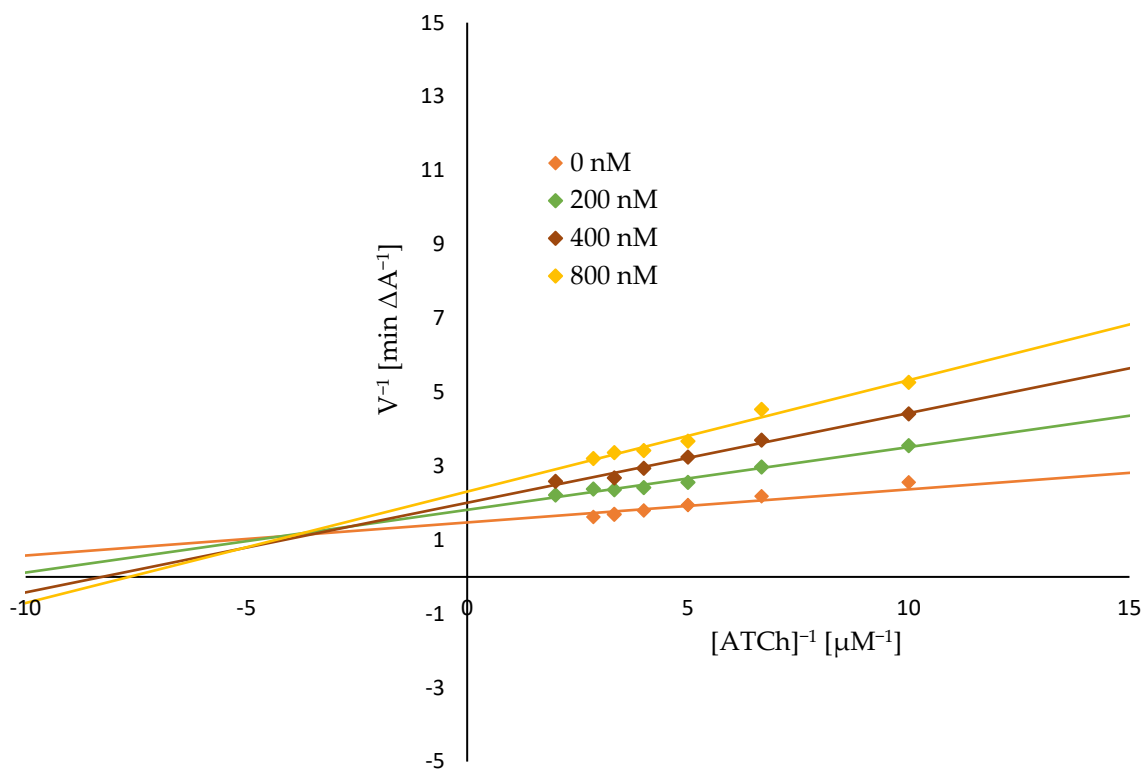


**Wykres 1.** Zależność aktywności biologicznej pochodnych 3a-3h wobec AChE w zależności od ilości atomów węgla w łańcuchu alifatycznym.

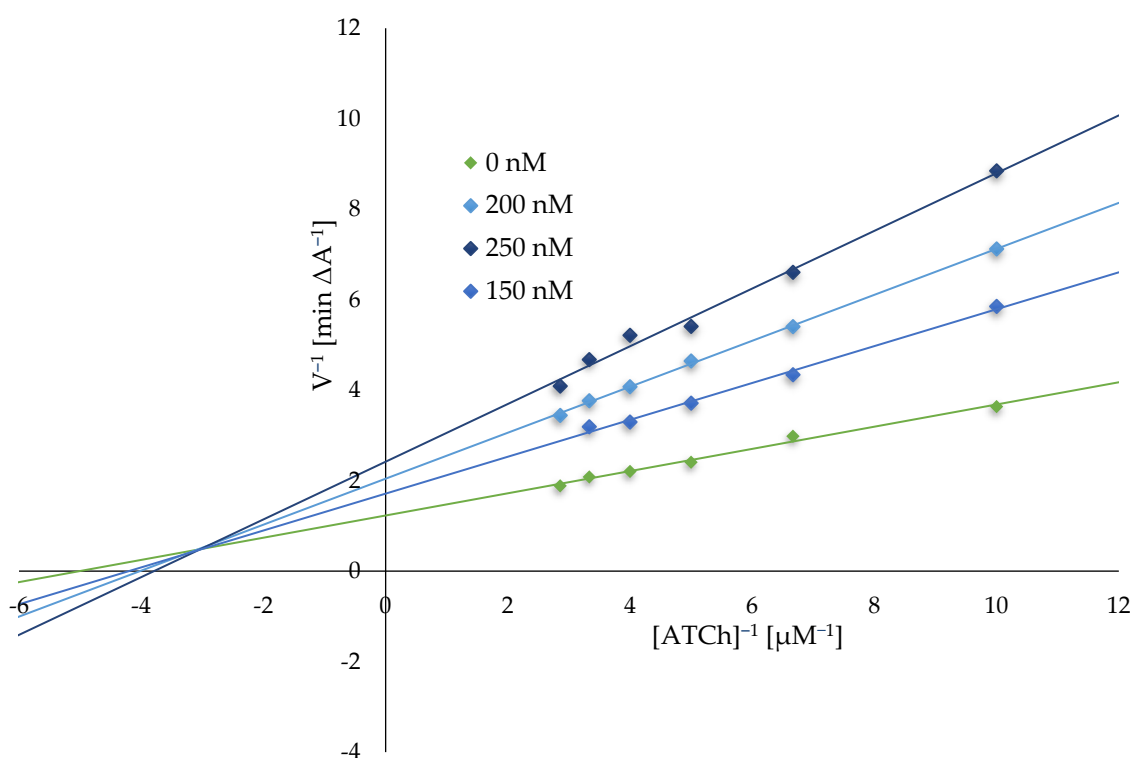
#### 4.3 Charakterystyka kinetyki reakcji enzymatycznej AChE i BuChE

Analizę kinetyki reakcji inhibicji AChE i BuChE przeprowadzono metodą Ellmana dla związków o najwyższej aktywności - związek **3b** i **3f**. Badanie kinetyki enzymatycznej wykonano dla wybranych stężeń związku **3b** (150, 200, 250 nM) oraz **3f** (200, 400, 800 nM) w różnych stężeniach jodku acetylotiocholiny z zakresu 35-350  $\mu$ M. Stężenia związków do badań kinetycznych były dobierane biorąc pod uwagę wyniki aktywności inhibicyjnej wobec enzymów. Na podstawie wyników badań sporządzono wykresy Lineweaver'a-Burk'a, zależności odwrotności szybkości reakcji ( $1/[V]$ ) do odwrotności stężenia substratu – jodku acetylocholin ( $1/[S]$ ).

Na podstawie wyników analizy oraz wykresów Lineweaver'a-Burk'a (**Wykres 2, str. 86, Wykres 3, str. 86**) wykazano mieszany typ inhibicji wobec AChE i BuChE. Dowodzą tego przecinające się linie wykresów poza osią odciętych (x) oraz rzędnych (y). Ponadto zmniejszające się wartości  $K_m$  przy rosnących wartościach  $V_{max}$ , potwierdzają, że oba związki charakteryzują się mieszanym typem inhibicji. Związki **3b** oraz **3f** nie powodują całkowitego zablokowania enzymów, ale prowadzą do czasowego spadku aktywności AChE i BuChE. Powstający kompleks substrat-enzym-inhibitor posiada zmniejszoną aktywność katalityczną.



**Wykres 2.** Wykres Lineweaver'a-Burk'a obrazujący mieszany typ inhibicji AChE powodowany przez związek **3f**.



**Wykres 3.** Wykres Lineweaver'a-Burk'a obrazujący mieszany typ inhibicji BuChE powodowany przez związek **3b**.

#### 4.4 Ocena właściwości antyoksydacyjnych wybranych związków metodą ORAC-FL

Stres oksydacyjny uważany jest za ważny czynnik biorący udział w patogenezie choroby Alzheimera. Projektowanie nowych, wielofunkcyjnych związków często zakłada obecność komponentów o działaniu antyoksydacyjnym. W celu określenia właściwości antyoksydacyjnych najaktywniejszych związków **3b** i **3f** zastosowano fluorymetryczną metodę ORAC-FL. Metoda ORAC-FL opiera się na zdolności absorpcji przez badany związek wolnych rodników tlenowych, generowanych przez APPH w obecności fluoresceiny sodowej. W celu porównania potencjalnych właściwości antyoksydacyjnych nowych pochodnych, przeprowadzono również badanie właściwości antyoksydacyjnych, takryny jako związku referencyjnego o znacznym podobieństwie strukturalnym do kwasu 9-akrydynokarboksyłowego i cyklopentachinoliny (analog takryny o uwodornionym pięciowęglowym pierścieniu).

Dane z pomiarów zmian fluorescencji zebrane w oprogramowaniu czytnika Gen5 Data Analysis zostały wyeksportowane do MS Excel w celu prowadzenia dalszych obliczeń. Krzywe związków i Troloxu® (krzywa fluorescencji w funkcji czasu) znormalizowano w stosunku do krzywej ślepej próby dla tego samego testu, przez pomnożenie danych fluorescencyjnych przez współczynnik  $f_i/f_0$  (fluorescencja ślepej próby,  $t=0$ /fluorescencja próbki,  $t=0$ ). Pole pod krzywą zaniku fluorescencji (AUC) obliczono z równania:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=86} f_i/f_0 \quad 1)$$

$$Net\ AUC = AUC_{sample} - AUC_{blank} \quad 2)$$

Wartości Net AUC (wartość różnicy pól pod krzywą zaniku fluorescencji między związkiem badanym a ślepa próbą) dla każdego związku i Troloxu® obliczono zgodnie z równaniem (2) i wykreślono w funkcji ich stężeń. Ekwivalenty Troloxu® (TE) zostały określone przez stosunek nachylenia krzywej regresji liniowej każdego związku ( $m_{compound}$ ) do nachylenia krzywej regresji liniowej standardu (Trolox®) ( $m_{trolox}$ ). Dane wyrażono jako średnią arytmetyczną oraz obliczono odchylenie standardowe.

$$TE\ (range\ of\ concentrations) = m_{compound}/m_{Trolox} \quad 3)$$

**Tabela 9.** Wyniki badania ORAC-FL związków **3b**, **3f** i **takryny** wyrażone w formie ekwiwalentów troloxu (TE ± SD).

Związek	TE ± SD
<b>3b</b>	0,4614 ± 0,056
<b>3f</b>	0,3254 ± 0,014
<b>takryna</b>	0,0132 ± 0,009

Na podstawie uzyskanych wyników (**Tabela 9.**) potwierdzono, że badane związki **3b** i **3f** wykazały aktywność antyoksydacyjną. Związek **3b**, charakteryzujący się krótszym łańcuchem alkilowym łączącym strukturę cyklopentachinoliny i kwasu 9-akrydynokarboksylowego, wykazał najwyższą aktywność antyoksydacyjną (TE=0,4614 ± 0,056) spośród badanych substancji. W porównaniu do takryny, pochodna **3b** posiadała około 35 razy większą aktywność antyoksydacyjną. Natomiast związek **3f** (TE=0,3254 ± 0,014), charakteryzujący się dłuższym łańcuchem alkilowym, będący jednocześnie najbardziej skutecznym inhibitorem AChE, wykazał około 25 razy wyższą aktywność antyoksydacyjną w porównaniu do takryny.

#### 4.5 Badanie hepatotoksyczności wybranych pochodnych na linii ludzkich komórek gwiaździstych wątroby (HSCs)

Toksyczne działanie leku na komórki wątroby było przyczyną wycofania z leczenia pierwszego leku stosowanego w chorobie Alzheimera – takryny. Ze względu na strukturalne podobieństwo zaprojektowanych pochodnych do takryny, zdecydowano się na wykonanie badania hepatotoksyczności na zdrowych, ludzkich komórkach gwiaździstych wątroby (ang. human hepatic stellate cells, HSCs, Sciencell). Komórki wątroby stanowią istotny element w prawidłowym funkcjonowaniu tego narządu oraz uczestniczą w odpowiedzi na czynniki uszkodzające m.in. toksyny i leki.

W celu określenia potencjalnego działania hepatotoksycznego pochodnych **3b** i **3f** wykonano test przy użyciu linii komórkowej zdrowych, ludzkich komórek gwiaździstych wątroby. Wyniki badania przedstawiono w **Tabeli 10.**

**Tabela 10.** Wyniki badania hepatotoksyczności na linii komórkowej HSCs, prezentujące stężenia powodujące 50% spadek żywotności komórek.

Związek	IC <sub>50</sub> ± SD [µM]
<b>3b</b>	31,96 ± 2,05
<b>3f</b>	49,75 ± 4,36

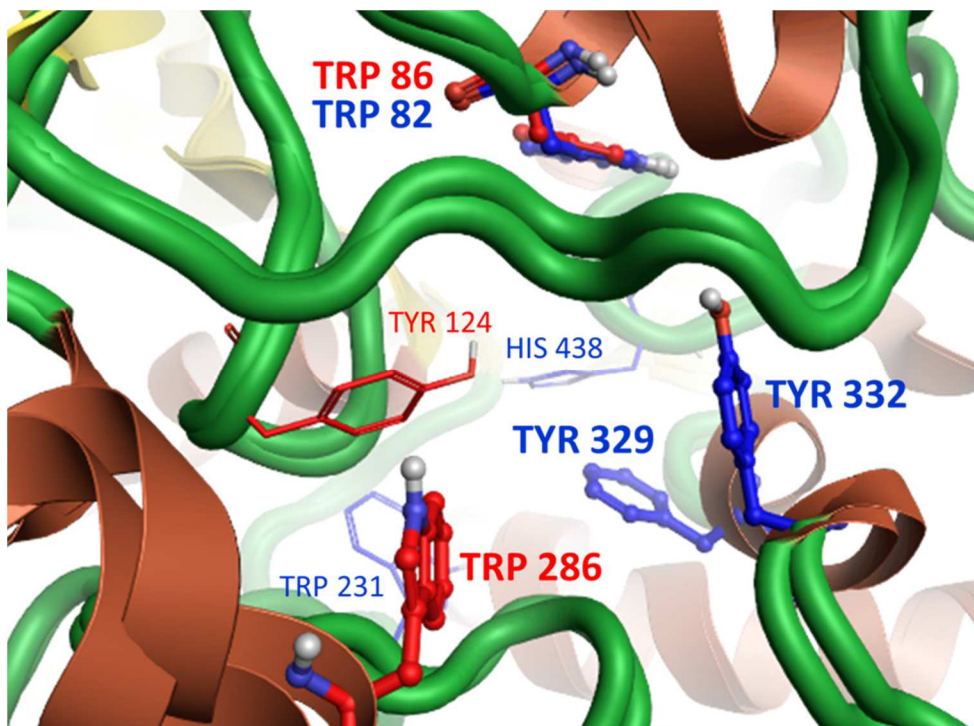


Związek **3b** wykazał się wyższą toksycznością ( $IC_{50}=31,96 \pm 2,05 \mu M$ ) wobec ludzkich komórek gwiaździstych wątroby, niż pochodna **3f** ( $IC_{50}=49,75 \pm 4,36 \mu M$ ). Zwiększona toksyczność pochodnej **3b** w stosunku do związku **3f** może wynikać z długości łącznika alkilowego łączącego cząsteczkę cyklopentachinoliny z kwasem 9-akrydynokarboksylowym. Niemniej warto podkreślić, że stężenia powodujące 50% zmniejszenie przeżywalności ludzkich komórek gwiaździstych wątroby są znacząco niższe od stężeń aktywnych wobec AChE i BuChE uzyskanych w badaniu aktywności inhibicyjnej metodą Ellmana.

#### 4.6 Modelowanie molekularne

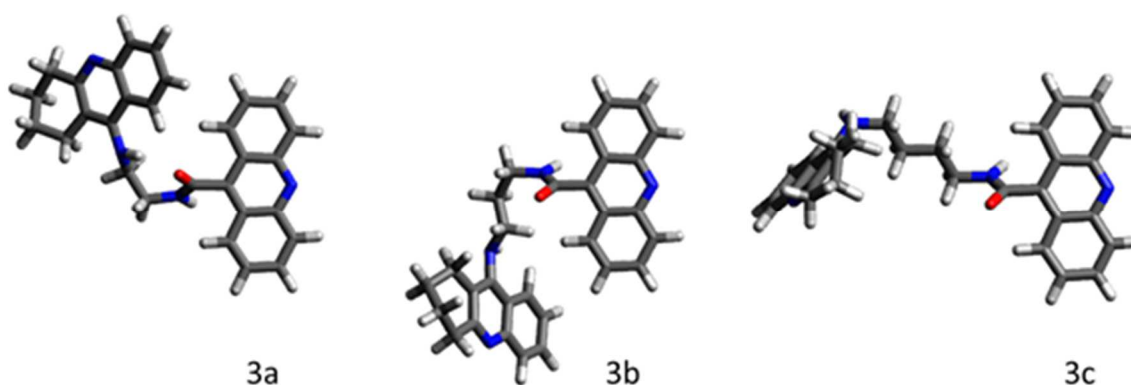
Trójwymiarowa struktura wejścia i wnętrza kieszeni wiążącej AChE i BuChE oraz charakter chemiczny aminokwasów budujących kieszeń, determinują sposób wiązania badanych ligandów poprzez wymuszanie ich zmian konformacyjnych pod wpływem oddziaływań z otaczającymi resztami aminokwasowymi. Główną rolą łańcucha alifatycznego łącznikowego jest dostosowanie geometrii liganda do warunków panujących wewnątrz kieszeni wiążącej enzymu, które zależą bezpośrednio od reszt aminokwasowych. Analizę dokowania ligandów do gardzieli enzymu wykonano na strukturach wszystkich otrzymanych związków serii **3a-3h**.

Kształt kieszeni AChE przypomina gardziel o długości  $\sim 20 \text{ \AA}$  i szerokości  $\sim 8 \text{ \AA}$ , podczas gdy kieszeń BuChE jest bardziej kulista i ma średnicę około  $15 \text{ \AA}$ . Ilość aminokwasów aromatycznych jest wyższa w AChE niż BuChE (szczególnie w katalitycznym miejscu anionowym CAS). BuChE zawiera więcej hydrofilowych i obdarzonych ładunkiem reszt aminokwasowych niż AChE (szczególnie w peryferyjnym miejscu anionowym, PAS). TRP86 (w CAS) i TRP286 (w PAS) to kluczowe reszty aromatyczne, odpowiedzialne za interakcje między kieszenią wiążącą AChE a układami trójpierścieniowymi badanej serii ligandów (akrydyna i cyklopentachinolina) (**Rycina 17, str. 90**). W przypadku BuChE rolę tę pełnią cztery reszty aromatyczne: PHE329, TYR332 i TRP231 oraz oddzielona od nich o około  $\sim 10 \text{ \AA}$  reszta TRP82, znajdującą się po drugiej stronie regionu CAS (**Rycina 17, str. 90**).



**Rycina 17.** Model reszt aromatycznych aminokwasów wiążących ligand w kieszeniach AChE (czerwony) i BuChE (niebieski). W przypadku obu enzymów region odpowiedzialny za wiązanie liganda angażuje reszty aminokwasowe TRP86 i TRP82.

Badania nowej serii pochodnych **3a-3h** potwierdziły, że długość łańcucha alifatycznego między ugrupowaniami akrydyny i cyklopentachinoliny jest bezpośrednio skorelowana z elastycznością ligandu. Łańcuchy alifatyczne z maksymalnie czterema grupami metylenowymi (**3a - 3c**) są sztywne ze względu na efekty steryczne i elektronowe wynikające z bliskiego sąsiedztwa sztywnych trójpierścieniowych układów cyklopentachinoliny i akrydyny. Z tego powodu, związki posiadające krótki łańcuch alifatyczny w sposób korzystny przyjmują określoną geometrię (**Rycina 18, str. 91**). Należy zauważyć, że po wejściu do kieszeni wiążącej związki te mogą przejść gruntowne zmiany konformacyjne wywołane oddziaływaniami z otaczającymi je resztami aminokwasowymi.



**Rycina 18.** Struktury stabilnych związków **3a-3c** obliczone na poziomie kwantowo mechanicznym. Konformacja związku **3a** jest dodatkowo stabilizowana przez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe NH...O. Związek **3b** i **3c** posiadają konformację w kształcie haka.

Najmniejszy i najsztyniejszy ligand z serii (związek **3a**) w swojej stabilnej konformacji (**Rycina 18, 3a**) jest zbyt duży, aby wejść do kieszeni AChE o szerokości  $\sim 8$  Å. Mało prawdopodobne jest, że związek **3a** przyjmie bardziej wydłużoną konformację i zdoła wejść do kieszeni AChE. Krótki i sztywny łańcuch alifatyczny uniemożliwia równocześnie, równoległe oddziaływania w układzie  $\pi$ - $\pi$  obu układów trójpierścieniowych z kluczowymi resztami tryptofanu wiążącymi ligand (TRP86 i TRP286), znajdującymi się w odległości  $\sim 16$  Å od siebie. Niezdolność do wystarczającej interakcji z obydwojema kluczowymi resztami wiążącymi w tym samym czasie (tj. brak podwójnego wiązania) ma silny wpływ na powinowactwo wiązania związku **3a** z AChE, co objawia się wysoką wartością jego  $IC_{50}$ .

Związek **3a** przechodzi przez szersze wejście do kieszeni BuChE i idealnie pasuje do jego przestrzonnego wnętrza, jednocześnie sięgając po kluczowe reszty aminokwasowe TRP231 (oddziaływanie  $\pi$  w kształcie litery T z akrydyną) i TRP82 (oddziaływanie równoległe  $\pi$  powodujące nakładanie się na siebie cząsteczki akrydyny i cyklopentachinoliny). Z tego powodu związek **3a** wykazuje bardzo wysokie powinowactwo do BuChE, co przejawia się niską wartością  $IC_{50}$ .

Jak przedstawiono na **Rycinie 18** ligandy **3b** i **3c** wykazują podobne ułożenie atomów w przestrzeni w kształcie haka, które mogą zarówno przechodzić przez wąskie wejścia gardzieli, jak i dobrze pasować do wnętrza kieszeni obu enzymów. Związki **3b** i **3c** rozwijają się strukturalnie, dopasowując się do wąskiej kieszeni AChE przyjmując bardzo podobny sposób oddziaływania  $\pi$  odpowiednio TRP86 i TRP286, z akrydyną i cyklopentachinoliną ułożonymi równoległe do siebie. Obie pozycje wiązania związków **3b** i **3c** są dodatkowo stabilizowane przez wiązania wodorowe pomiędzy grupą hydroksylową TYR124 a tlenem

grupy amidowej liganda. Prawie identyczne sposoby wiązania ligandów **3b** i **3c** w kieszeni AChE odpowiadają za wysokie powinowactwo tych ligandów do AChE, które potwierdzają podobne wartości  $IC_{50}$ .

Konformacje związków **3b** i **3c** pozostają w kształcie haka po wejściu do szerszej kieszeni BuChE, przyjmując podobny sposób podwójnego oddziaływania  $\pi$ - $\pi$ . Cyklopentachinolina oddziałując z TRP82 układa się w pozycji równoległej do cząsteczki akrydyny, zaangażowanej w interakcje w z TRP231 i PHE329 przyjmując kształt litery T. Nieco szerszy odstęp między resztami aromatycznymi aminokwasów, a ugrupowaniem akrydyny w przypadku związku **3c** jest odpowiedzialny za jego mniejsze powinowactwo do BuChE w stosunku do związku **3b**.

Dla dłuższych łańcuchów alkilowych niż cztery grupy metylenowe (**3d** – **3g**), wykazano nieograniczony ruch obrotowy pomiędzy ugrupowaniami metylenowymi. W wyniku tego zaobserwowano proporcjonalną do długości łącznika zwiększoną elastyczność łańcuchów alifatycznych tych pochodnych.

Pochodne **3d** – **3h**, dzięki elastycznym łańcuchom alifatycznym, najprawdopodobniej wnikają do wąskiego tunelu kieszeni AChE na czele z cząsteczką akrydyny. Podczas gdy akrydyna wnika głęboko do wnętrza kieszeni, oddziałując tam z resztą TRP86, cyklopentachinolina wnika w linii prostej oddziałując z TRP286. Ważną rolę w dopasowaniu się ligandów **3d** - **3h** do wnętrza wąskiej kieszeni AChE pełnią elastyczne łańcuchy alifatyczne. Odpowiadają one za ułożenie przestrzenne ligandów wewnątrz kieszeni wiążącej enzymu w celu efektywnego oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  układu trójpierścieniowego części akrydyny i cyklopentachinoliny z kluczowymi resztami tryptofanowymi AChE. W przypadku pochodnej **3d**, pięciowęglowy łańcuch alkilowy ma idealną długość, która pozwala zarówno akrydynie, jak i cyklopentacholinie na ścisłe ułożenie w formie układu  $\pi$ - $\pi$  odpowiednio z TRP86 i TRP286. Te silne podwójne oddziaływania, dodatkowo stabilizowane wiązaniem wodorowym pomiędzy grupą hydroksylową TYR124, a tlenem grupy amidowej liganda, odpowiadają za bardzo wysokie powinowactwo **3d** do AChE, potwierdzone niską wartością  $IC_{50}$ . Zaobserwowano prawie identyczne oddziaływania układów trójpierścieniowych ligandów **3f** i **3h**. Rozwinięte łańcuchy alkilowe związków **3f** i **3h** (tj. dłuższe niż odległość między resztą TRP86 a TRP286 wynosząca 16 Å) wiążą się ze zmianą geometrii wewnątrz wąskiej kieszeni wiążącej w AChE. Zmiana geometrii jest wymuszona w celu osiągnięcia efektywnego oddziaływania  $\pi$ , między układami trójpierścieniowymi akrydyny i cyklopentachinoliny a resztami wiążącymi tryptofanu. Układ ten dodatkowo jest stabilizowany przez wiązania wodorowe między grupą hydroksylową TYR124 a tlenem grup

amidowych ligandów. Nieparzysta liczba grup metylenowych w łączniku alkilowym odpowiada odwrotnej konformacji akrydyny i cyklopentachinoliny, która sprzyja ich dobremu nakładaniu się z pierścieniami TRP86 i TRP286. To z kolei sprzyja silnym oddziaływaniom typu  $\pi$ - $\pi$  między tymi resztami, a obydwoma układami trójpierścieniowymi akrydyny i cyklopentachinoliny. Z tego powodu związki **3d**, **3f** i **3h** wykazują wysokie powinowactwo do AChE. Z drugiej strony posiadanie parzystej liczby grup metylenowych w łańcuchu alkilowym przeszkadza w odpowiednim ułożeniu pierścieni akrydyny i cyklopentachinoliny równoległe do siebie i wytworzeniu podwójnego oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  z resztami aminokwasowymi. Sytuacja ta powoduje widoczny spadek w powinowactwie związków **3e** i **3g** do AChE.

Biorąc pod uwagę strukturę kieszeni wiążącej BuChE z dwoma głównymi regionami wiążącymi ligand oddzielonymi jedynie o  $\sim 10$  Å w obrębie CAS, aby uzyskać podwójny układ wiązania, struktury ligandów **3d** – **3h** muszą przyjąć zwarte konformacje z zakrzywionymi łańcuchami alkilowymi, aby umożliwić wystąpienie oddziaływań  $\pi$ - $\pi$  między pierścieniami akrydyny i cyklopentachinoliny, a umieszczonymi blisko siebie kluczowymi resztami aromatycznymi aminokwasów. Szerokie wejście, a także obszerne wnętrze umożliwiają dostanie się do kieszeni BuChE związków **3d** – **3h**, z zwiniętymi łańcuchami alkilowymi. Tak zwarte konformacje mogą być dodatkowo stabilizowane przez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe NH...O (**3d** i **3g**) lub oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$  pomiędzy ugrupowaniami akrydyny i cyklopentachinoliny (**3h**).

Chociaż związek **3d** przyjmuje geometrię w kształcie haka wewnątrz kieszeni BuChE, jest on związany w odwrotny sposób do **3b** i **3c**. Reszta TRP82 wiąże **akrydynę** poprzez równoległe oddziaływanie typu  $\pi$ , podczas gdy ugrupowanie takryny tworzy zwarte układy  $\pi$  z PHE329 w kształcie litery T. Taka sterycznie korzystna geometria **3d**, dodatkowo stabilizowana wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym, pozwala na silniejsze oddziaływanie z resztą TRP82 poprzez strukturę akrydynę zamiast ugrupowania cyklopentachinoliny. Zmiana geometrii, odpowiada za kilkukrotny wzrost powinowactwa **3d** do BuChE w stosunku do **3b** i **3c**.

Pomimo, że związek **3e** przyjmuje również geometrię w kształcie haka z ugrupowaniem akrydyny zaangażowanym w słabsze oddziaływanie w układzie  $\pi$  z TRP82, jego dodatkowa grupa metylenowa odpycha ugrupowanie cyklopentachinoliny od innego regionu wiążącego ligand, zawierającego reszty PHE329, TYR332 i TRP231. Pojedyncze oddziaływanie odpowiada za bardzo niskie powinowactwo **3e** do BuChE, wykazane wysoką wartością  $IC_{50}$ .

Siedmiowęglowy łańcuch alkilowy jest wystarczająco długi, aby przyjąć z powodzeniem odwrotne położenie układów trójpierścieniowych związku **3f** w odniesieniu do kluczowych reszt aminokwasowych wiążących ligand. Oprócz równoległych oddziaływań w układzie  $\pi$  między akrydyną i TRP82, ugrupowanie cyklopentachinoliny bierze udział w dwóch oddziaływaniach w układzie  $\pi$  w kształcie litery T z resztami PHE329 i TRP231. Ugrupowanie akrydyny związku **3g** oprócz bliskiego oddziaływania  $\pi$  z TRP82, oddziałuje również z resztą HIS438. Podczas gdy ugrupowanie cyklopentachinoliny wiąże się poprzez oddziaływanie  $\pi$  z resztą PHE329 w kształcie litery T. Taki tryb podwójnego wiązania wraz z dodatkową stabilizacją geometrii liganda przez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe przyczynia się do wyższego powinowactwa związku **3g** niż **3f** do BuChE, co przekłada się na nieco niższą wartość  $IC_{50}$  ligandu **3g**.

Łańcuch alkilowy związku **3h** zawierający dziewięć grup metylenowych, ze względu na swoją długość ulega załamaniu, umożliwiając układom trójpierścieniowym oddziaływania międzycząsteczkowe typu  $\pi$ - $\pi$ . Układ podwójnego oddziaływania  $\pi$  jest sterycznie ograniczony do słabszego, przesuniętego równolegle oddziaływania między akrydyną i TRP82 oraz PHE329 w kształcie litery T. Ponadto geometria związku **3h** jest znacznie większa niż konformacje w kształcie haka pochodnych **3a** – **3g**. Konformacje w kształcie haka najprawdopodobniej mogą łatwiej wnikać do kieszeni BuChE. Słaby układ podwójnego oddziaływania  $\pi$  w połączeniu z zakrzywionym łańcuchem alkilowym, ograniczającym zdolność wnikania do kieszeni BuChE skutkuje jej niższym powinowactwem do enzymu, na co wskazują stosunkowo wysokie wartości  $IC_{50}$ .

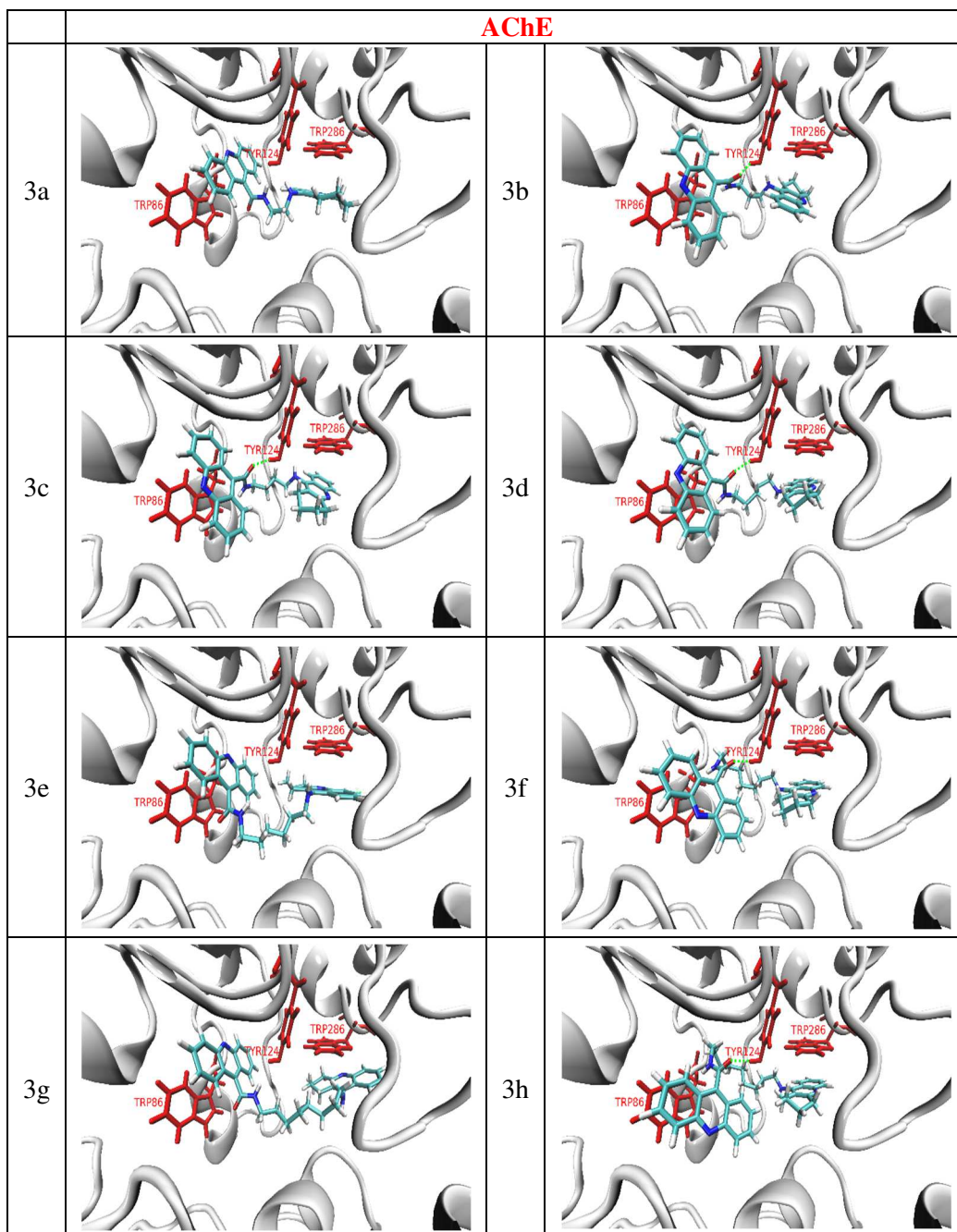
Podsumowując, przeprowadzone badania modelowania molekularnego wykazały, że aktywność hamująca badanych serii związków wobec AChE i BuChE zależą od:

- reszt aminokwasowych, a co za tym idzie trójwymiarowych struktur wejścia i wnętrza kieszeni wiążącej enzymu,
- odwrotna konformacja ugrupowań akrydyny i cyklopentachinoliny w zależności od (nieparzystej lub parzystej) liczby grup metylenowych w łańcuchu alifatycznym,
- obecność zewnątrz- i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, które dodatkowo stabilizują zarówno konformację liganda, jak i miejsce wiązania wewnątrz kieszeni,
- długość, a co za tym idzie elastyczność łańcucha alkilowego; dłuższe łańcuchy alkilowe zapewniają większą zdolność do zmian konformacyjnych, promując korzystniejsze pozycje ligandów wewnątrz kieszeni enzymu.

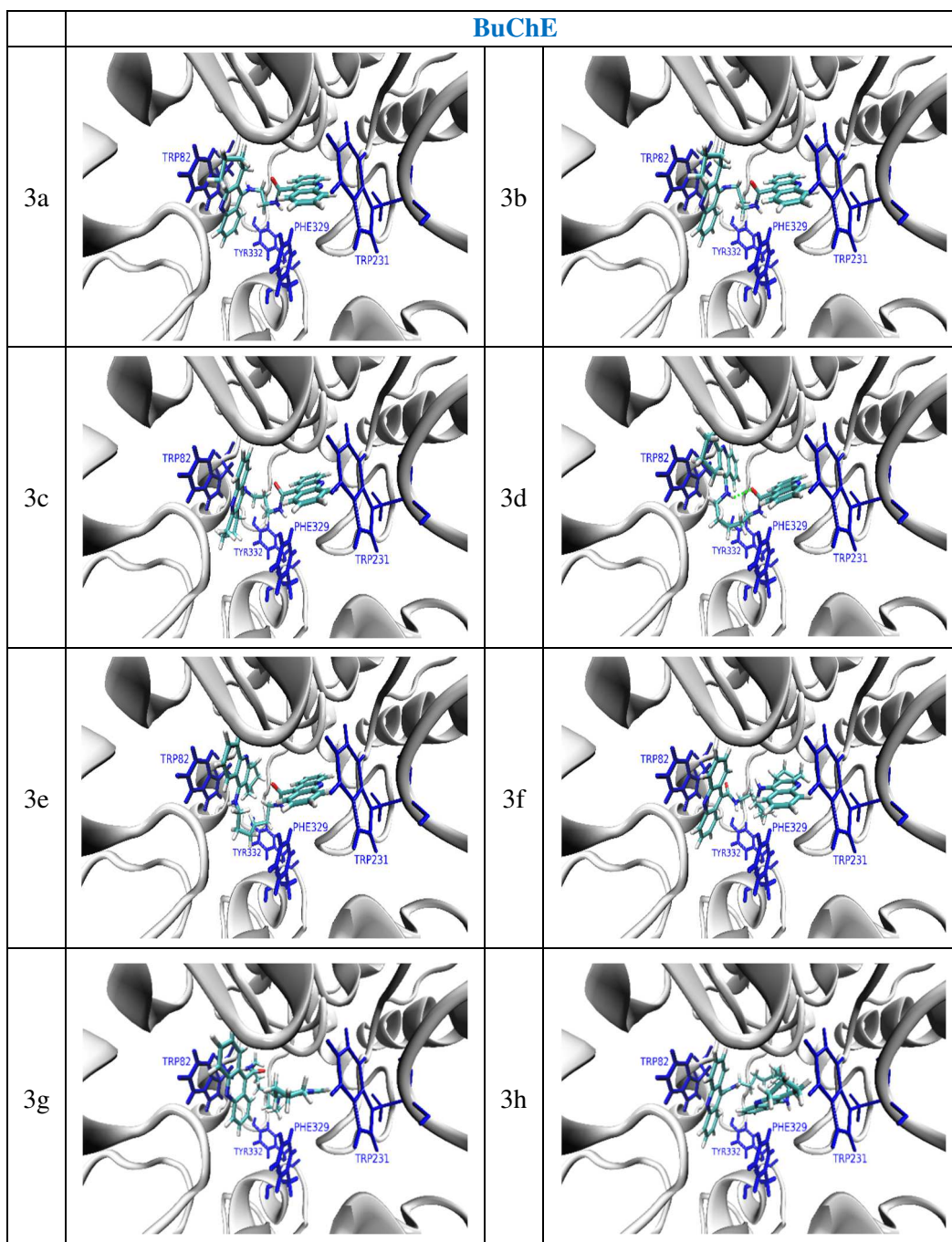
Wzajemne oddziaływanie wyżej wymienionych czynników skutkuje powinowactwem liganda względem enzymu. Jednoczesne oddziaływania reszt akrydyny i cyklopentachinoliny

z kluczowymi resztami aromatycznymi aminokwasów wiążącymi ligand wewnątrz kieszeni enzymu (tj. układ podwójnego oddziaływania) zapewniają powinowactwo związków, które jest proporcjonalne do zakresu oddziaływań między nimi a resztami aminokwasowymi wewnątrz kieszeni enzymu.

**Tabela 11.** Model oddziaływań serii związków **3a** - **3h** w kieszeniach AChE. Kluczowe reszty aromatyczne wiążące ligandy w kieszeniach AChE zaznaczono na czerwono.



**Tabela 12.** Model oddziaływań serii związków **3a** - **3h** w kieszeniach BuChE. Kluczowe reszty aromatyczne wiążące ligandy w kieszeniach AChE zaznaczono na niebiesko.





## 4.7 Analiza ADMET

Profile farmakokinetyczne związków uzyskane z analizy komputerowej wykazują spore zróżnicowanie. Profile fizykochemiczne związków **3a**, **3b** oraz **3c** wskazują, że stanowią one potencjalne substancje lecznicze. Spełniają one regułę Lipińskiego[186], Egana[187] oraz Vebera[188]. Związki **3d** oraz **3e** spełniają tylko zasadę Vebera. Podstawowe właściwości fizykochemiczne wszystkich substancji analizowanych zebrano w **Tabeli 13, str. 98**.

Symulacja za pomocą oprogramowania admetSAR 2.0 wskazała na wysokie prawdopodobieństwo wiązania z białkami dla związków **3a**, **3b** oraz **3c** (odpowiednio 86,87%, 90,29%, 91,70%). Natomiast oprogramowanie ADC/Percepta wskazało na możliwość wystąpienia dużej objętości dystrybucji (>11 L/kg) dla wszystkich związków z serii. Oprogramowania ACD/Percepta oraz admetSAR 2.0 wskazało na wysokie prawdopodobieństwo wchłaniania z przewodu pokarmowego dla związków **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e**. Wyniki przewidywania zdolności pokonywania bariery krew-mózg wykonane za pomocą oprogramowania ACD/Percepta oraz admetSAR 2.0 wskazują, że wszystkie związki z serii wykazują wystarczające właściwości do pokonania tej bariery biologicznej, lecz znacząco lepsze wyniki przenikania bariery krew-mózg uzyskano dla związków **3a**, **3b**, **3c**. Analizy wykonane przy użyciu oprogramowania Analiza ProTox II wskazują na możliwość zakwalifikowania związku **3a** do 5 klasy toksyczności (przewidywane wartości LD<sub>50</sub>=2100 mg/kg), związek **3b** do 3 klasy toksyczności (przewidywane wartości LD<sub>50</sub>=200 mg/kg), a pozostałe struktury do 4 klasy toksyczności (przewidywane wartości LD<sub>50</sub>=1000 mg/kg). Związek **3a** uzyskał bardzo obiecujące wyniki szczegółowej analizy o przewidywanej toksyczności – z prawdopodobieństwem 50% wywołania efektu mutagennego (1 słabo pozytywny wynik testu przewidywania efektów toksycznych na 17 różnych testów). Związki **3b** oraz **3c** wykazały kolejno 64% i 58% prawdopodobieństwa wywołania efektu immunotoksycznego oraz 55% i 53% prawdopodobieństwa wywołania efektu mutagennego (2 słabo pozytywne wyniki testów przewidywania efektów toksycznych na 17 różnych testów).

**Tabela 13.** Podstawowe właściwości fizykochemiczne związków badanych. Podana wartość logP jest średnią 5 różnych algorytmów obliczeniowych dotyczących tego parametru. TPSA – ang. Topological Polar Surface Area, Topologiczna Powierzchnia Polarna.

Związek	Masa molowa [g/mol]	LogP	pKa (acid)	pKa (base)	TPSA [Å <sup>2</sup> ]	Refrakcja molowa [m <sup>3</sup> /mol]	Liczba akceptorów wiązania H	Liczba donorów wiązania H
<b>3a</b>	432,52	4,70	13,19	8,71	66,91	133,80	3	2
<b>3b</b>	446,54	5,03	13,52	8,90	66,91	138,61	3	2
<b>3c</b>	460,57	5,31	13,65	8,97	66,91	143,42	3	2
<b>3d</b>	474,60	5,47	13,71	9,00	66,91	148,23	3	2
<b>3e</b>	488,62	5,93	13,73	9,01	66,91	153,03	3	2
<b>3f</b>	502,65	6,17	13,73	9,02	66,91	157,84	3	2
<b>3g</b>	516,68	6,60	13,74	9,02	66,91	162,65	3	2
<b>3 h</b>	530,70	6,96	13,74	9,02	66,91	167,45	3	2

## 5 Wnioski

Choroba Alzheimera jest najczęściej występującą chorobą neurodegeneracyjną, powodującą upośledzenie funkcji kognitywnych w związku z odkładaniem się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej neuronów toksycznego  $\beta$ -amyloidu oraz powstawaniu splątków neurofibrylarnych w wyniku hiperfosforylacji i agregacji białka tau wewnątrz neuronów. W patomechanizmie choroby Alzheimera istotne znaczenie ma również upośledzenie neurotransmisji cholinergiczej, stres oksydacyjny, długotrwałe stany zapalne w obrębie OUN i wiele innych czynników. Ze względu na wieloczynnikowy patomechanizm rozwoju choroby, który nie został do końca zdefiniowany przez naukowców, farmakoterapia AD stanowi ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny i farmacji. Złożony patomechanizm choroby wymusił wielokierunkowe podejście w projektowaniu nowych leków. Tworzenie nowych związków o wielokierunkowym działaniu tzw. MTDL's, działających jednocześnie na kilka patomechanizmów choroby Alzheimera stanowi jedną z najbardziej obiecujących strategii leczenia choroby Alzheimera.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie oraz otrzymanie innowacyjnych związków o wielokierunkowym działaniu na złożony patomechanizm choroby Alzheimera. Zsyntetyzowano serię ośmiu nowych związków, pochodnych cyklopentachinoliny oraz kwasu 9-akrydynokarboksyłowego połączonych łańcuchem alkilowym o różnej długości. Związki przeprowadzono w formę chlorowodorków w celu poprawienia ich rozpuszczalności w wodzie. Struktury wszystkich otrzymanych związków zostały potwierdzone przy użyciu metod spektroskopowych: IR, MS, HR-MS,  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR. Określono aktywność inhibicyjną oraz selektywność zsyntetyzowanych związków wobec kluczowych enzymów związanych z patomechanizmem choroby Alzheimera: AChE oraz BuChE. Potencjał inhibicyjny wobec cholinoesteraz określono przy pomocy zmodyfikowanej, spektrofotometrycznej metody Ellmana. Większość związków osiągnęła wartości  $\text{IC}_{50}$  w zakresie nanomolowym. Zsyntetyzowane związki wykazały większą selektywność wobec BuChE niż AChE. Wynik ten jest znaczący w świetle badań, które dowodzą, że w chorobie Alzheimera następuje zwiększenie aktywności BuChE w stosunku do AChE. Najwyższą aktywność inhibicyjną wobec AChE wykazał związek **3f** posiadający siedem grup metylenowych w łańcuchu alkilowym ( $\text{IC}_{50}=113,34 \pm 7,14$  nM). W stosunku do BuChE, najaktywniejszym związkiem okazała się pochodna **3b** posiadająca trzy grupy metylenowe w łączniku alkilowym między strukturą cyklopentachinoliny i kwasu 9-akrydynokarboksyłowego ( $\text{IC}_{50}=103,73 \pm 7,63$  nM). Dla najaktywniejszych związków

określono typ inhibicji AChE oraz BuChE metodą Ellmana. Na podstawie uzyskanych wyników oraz wykresów Lineweaver'a-Burk'a, dla obu pochodnych określono mieszany typ inhibicji. Związki o najwyższej aktywności inhibicyjnej wobec AChE i BuChE (**3b** i **3f**) zostały wyselekcjonowane do dalszych badań ze względu na duże prawdopodobieństwo wielokierunkowej aktywności biologicznej. W celu potwierdzenia wielokierunkowego działania badanych związków przeprowadzono badania aktywności antyoksydacyjnej fluorymetryczną metodą ORAC-FL. W celach porównawczych wyniki badanych dwóch pochodnych zestawiono z takryną, pierwszym lekiem stosowanym w chorobie Alzheimera, wykazującym strukturalne podobieństwo do zsyntetyzowanych pochodnych. Związek **3f** wykazał najwyższą aktywność antyoksydacyjną ( $TE=0,3254 \pm 0,014$ ), ponad 35 razy większą niż takryna. Natomiast, związek **3b** ( $TE=0,4614 \pm 0,056$ ) okazał się ponad 25 razy bardziej aktywny niż takryna. Ze względu na podobieństwo strukturalne nowych związków do takryny, mając na uwadze jej hepatotoksyczne działanie leżące u podstaw jej wycofania z lecznictwa, wykonano badanie *in vitro* hepatotoksyczności na linii zdrowych, ludzkich komórkach gwiazdzistych wątroby (HSCs). Związek **3f** ( $IC_{50}=49,75 \pm 4,36 \mu M$ ) posiadający siedmiowęglowy łańcuch alkilowy wykazał niższe właściwości hepatotoksyczne niż pochodna **3b** ( $IC_{50}=31,96 \pm 2,05 \mu M$ ) o krótkim łańcuchu alkilowym. Następnie dla całej serii związków przeprowadzono analizę komputerową w zakresie modelowania molekularnego w celu precyzyjnego określenia typu interakcji związku z enzymem, w tym określenia rodzaju oddziaływań oraz powstających wiązań między cząsteczką pochodnej a resztami aminokwasowymi budującymi miejsce aktywne katalitycznie enzymu oraz peryferyjne miejsce anionowe. Interakcje związków z AChE oraz BuChE okazały się zależne od długości łańcucha alkilowego, w tym jego elastyczności, rodzaju reszt aminokwasowych budujących wejście oraz wewnątrz miejsca aktywnego enzymów, obecności wiązań wodorowych dodatkowo stabilizujących konformację związku wewnątrz enzymu oraz ustawienia względem siebie dwóch kluczowych katalitycznie grup – akrydyny oraz cyklopentachinoliny. Co jednoznacznie tłumaczy mechanizm oddziaływania poszczególnych grup farmakoforowych z miejscami aktywnymi obu enzymów (aminokwasami). W celu przewidzenia właściwości farmakokinetycznych oraz toksyczności serii nowych pochodnych **3a-3h** przeprowadzono analizę komputerową ADMET. Związek **3b** wykazał optymalne właściwości farmakokinetyczne, aktywność inhibicyjną oraz działanie toksyczne spośród wszystkich badanych związków. W związku z tym, związek **3b** jako najbardziej obiecująca struktura, w przyszłości powinien być przedmiotem dalszych badań.

Wyniki wszystkich przeprowadzonych analiz pozwalają stwierdzić, że zaprojektowane i zsyntetyzowane związki wykazały wysoką aktywność inhibicyjną wobec cholinoesteraz oraz korzystny profil farmakokinetyczny. Spośród wszystkich zsyntetyzowanych związków, pochodna **3b** charakteryzująca się łańcuchem alkilowym złożonym z trzech metylenowych atomów węgla, wykazała wysoką aktywność wobec cholinoesteraz, działanie antyoksydacyjne oraz optymalne właściwości farmakokinetyczne oraz niską toksyczność. Z tego powodu związek **3b** wykazujący wielokierunkowe działanie połączone z wysoką aktywnością wobec BuChE ma szansę na dalsze badania określające wpływ na inne patomechanizmy charakterystyczne dla rozwoju choroby Alzheimera. Tym samym daje nadzieję na znaczące poszerzenie wiedzy w tym obszarze i pracę nad nowymi substancjami leczniczymi w obszarze chorób neurodegeneracyjnych.

## 6 Streszczenie w języku polskim

Choroba Alzheimerera jest postępującym schorzeniem neurodegeneracyjnym ośrodkowego układu nerwowego charakteryzującym się zaburzeniami funkcji poznawczych m.in. pamięci, orientacji, mowy oraz zmianami osobowości i zachowania. Choroba ta dotyka głównie osoby po 65 roku życia. Patogeneza choroby Alzheimerera nie została w pełni wyjaśniona, mimo że od momentu jej opisanie przez Aloisa Alzheimerera minęło ponad 100 lat. Na przestrzeni tych lat naukowcy wysunili kilka hipotez przyczyn rozwoju tego schorzenia. Wśród najlepiej zbadanych i potwierdzonych znajduje się hipoteza cholinergiczna, kaskada A $\beta$  oraz hiperfosforylacja i agregacja białka tau. Niestety obecna farmakoterapia choroby Alzheimerera polega głównie na łagodzeniu objawów mających na celu poprawę komfortu życia pacjentów. Wieloczynnikowy patomechanizm rozwoju choroby stanowi wyzwanie w projektowaniu nowych leków. Projektowanie związków o wielokierunkowym działaniu, mających wpływ jednocześnie na kilka patomechanizmów jest jedną z najbardziej obiecujących strategii walki z chorobą Alzheimerera.

Celem pracy doktorskiej było zaprojektowanie oraz zsyntetyzowanie serii nowych, innowacyjnych hybryd cyklopentachinoliny oraz kwasu 9-akrydynokarboksylowego połączonych łańcuchem alkilowym o różnej długości. Struktury zsyntetyzowanych pochodnych zostały potwierdzone kilkoma metodami spektrometrycznymi, m.in. IR,  $^1\text{H}$  NMR  $^{13}\text{C}$  NMR, MS oraz HR-MS. Nowe związki zostały poddane ocenie aktywności inhibicyjnej wobec AChE oraz BuChE, których aktywność stanowi kluczowy aspekt w patogenezie choroby Alzheimerera. Z serii ośmiu związków wyselekcjonowano dwa najaktywniejsze wobec każdego enzymu. Najwyższą aktywność inhibicyjną wobec AChE wykazał chlorowoderek N-[7-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)heptylo]akrydyno-9-karboksamid (**3f**) ( $\text{IC}_{50}=113,34 \pm 7,14$  nM), posiadający siedem grup metylenowych w łańcuchu alkilowym. Dla BuChE, najaktywniejszym związkiem jest chlorowoderek N-[3-({1H,2H,3H-cyklopenta[b]chinolino-9-ylo}amino)propylo]akrydyno-9-karboksamid (**3b**) ( $\text{IC}_{50}=103,73 \pm 7,63$  nM) posiadająca trzy grupy metylenowe w łączniku alkilowym. Dla obydwu związków poprzez badanie kinetyki reakcji enzymatycznej określono typ inhibicji jako mieszany. Związki **3b** i **3f** charakteryzujące się najwyższą aktywnością wybrano do dalszych badań. Stres oksydacyjny i wolne rodniki stanowią ważny element patomechanizmu choroby Alzheimerera. Biorąc pod uwagę ich rolę w rozwoju choroby określono aktywność antyoksydacyjną dla związków **3b** i **3f**. Oba związki wykazały kilkadziesiąt razy wyższą aktywność niż takryna, będąca związkiem referencyjnym o znacznym podobieństwie

strukturalnym do zsyntetyzowanych pochodnych. Dodatkowo biorąc pod uwagę, że takryna jako pierwszy lek na Alzheimera wykazywała silne właściwości hepatotoksyczne, będące powodem jej wycofania z leczenia, związki **3b** i **3f** zostały poddane ocenie potencjalnego działania toksycznego na komórki wątroby. Wartości  $IC_{50}$  uzyskane w badaniu na linii ludzkich komórek wątroby wykazały, że obie pochodne powodowały 50% zmniejszenie przeżywalności komórek w stężeniach znacząco wyższych od tych uzyskanych w badaniach aktywności inhibicyjnej. W celu próby wyjaśnienia mechanizmu działania otrzymanych substancji wykonano analizę dokowania otrzymanych struktur do receptora. W ich wyniku wykazano kluczową rolę długości łańcucha alkilowego w wiązaniu z enzymem, w tym ułożenia pierścieni akrydyny i cyklopentachinoliny względem siebie oraz zaangażowania specyficznych reszt aminokwasowych w oddziaływanie między ligandem a miejscem wiążącym enzymu. Interakcje związków z AChE oraz BuChE okazały się zależne również od obecności zewnątrz- i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych dodatkowo stabilizujących konformację związku wewnątrz enzymu. Właściwości farmakokinetyczne oraz toksyczność związków **3a-3h** oceniono za pomocą komputerowej analizy ADMET.

Biorąc pod uwagę aktywność, potencjał antyoksydacyjny oraz właściwości farmakokinetyczne, pochodna **3b** wykazała największy potencjał jako związek o wielokierunkowym działaniu oraz o potencjalnym wykorzystaniu w farmakoterapii choroby Alzheimera.

## 7 Streszczenie w języku angielskim

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease of the central nervous system characterized by impaired cognitive functions, including memory, orientation, speech, and changes in personality and behavior. This disease mainly affects people over 65 years of age. The pathogenesis of Alzheimer's disease has not been fully elucidated, although more than 100 years have passed since Alois Alzheimer described it. Over the years, scientists have developed several hypotheses as to why this disease develops. Among them, the best-studied and confirmed is the cholinergic hypotheses, the A $\beta$  cascade, and the Tau hypothesis. Unfortunately, pharmacotherapy for Alzheimer's disease is mainly based on relieving symptoms to improve the quality of life of patients. The multifactorial pathomechanism of disease development is a challenge in the design of new drugs. Designing compounds with multidirectional action that affect several pathomechanisms simultaneously is one of the most promising strategies in the fight against Alzheimer's disease.

The aim of the doctoral thesis was to design and synthesize a series of new, innovative cyclopentaquinoline and 9-acridine carboxylic acid hybrids linked by an alkyl chain of various lengths. The structures of the synthesized derivatives have been confirmed by several spectrometric methods, including IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS, and HR-MS. The new compounds were assessed for the inhibitory activity against AChE and BuChE, the activity of which is a key aspect in the pathogenesis of Alzheimer's disease. From a series of eight compounds, the two most active against each enzyme were selected. The highest inhibitory activity towards AChE was shown by N-[7-({1H,2H,3H-cyclopenta[b]quinolin-9-yl}amino)heptyl]acridine-9-carboxamidehydrochloride (**3f**) ( $\text{IC}_{50} = 113,34 \pm 7,14$  nM), having seven methylene groups in the alkyl chain. For BuChE, the most active compound is N-[3-({1H,2H,3H-cyclopenta[b]quinolin-9-yl}amino)propyl]acridine-9-carboxamidehydrochloride (**3b**) ( $\text{IC}_{50} = 103,73 \pm 7,63$  nM) having three methylene groups in the alkyl linker. For both compounds, the type of inhibition was determined to be mixed by examining the kinetics of the enzymatic reaction. The most active compounds **3b** and **3f** were selected for further studies. Oxidative stress and free radicals are an integral part of the pathomechanism of Alzheimer's disease. Taking into account their role in the development of the disease, the antioxidant activity of compounds **3b** and **3f** was determined. Both compounds showed several dozen times higher activity than tacrine, which is a reference compound with significant structural similarity to the synthesized derivatives. Additionally, considering that tacrine was the first Alzheimer's drug to display strong hepatotoxic



properties, which led to its withdrawal from treatment, compounds **3b** and **3f** were assessed for potential toxic effects on liver cells. The  $IC_{50}$  values obtained in the study on the human liver cell line showed that both derivatives caused a 50% reduction in cell survival at concentrations significantly higher than those obtained in the inhibitory activity tests. In order to determine the exact type of interaction of the compound with the enzymes, including the type of interaction between the structure of the compound and the amino acid structure of the interior of the enzyme binding pocket, molecular modeling studies were performed for the entire series of compounds. As a result, the key role of the length of the alkyl linker in the interaction of the compound with the enzyme, including the alignment of acridine and cyclopentaquinoline rings in relation to each other and the involvement of specific amino acid residues in the interaction between ligand and binding site of enzyme, was proved.

Interactions of compounds with AChE and BuChE turned out to be dependent also on the presence of extra- and intramolecular hydrogen bonds, additionally stabilizing the conformation of the compound inside the enzyme. The pharmacokinetic properties and toxicity of compounds **3a-3h** were assessed by ADMET computer analysis.

Taking into account the activity, antioxidant potential, and pharmacokinetic properties, derivative **3b** showed the greatest potential as a compound with multidirectional action and potential use in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease.

## 8 Bibliografia

- [1] J. A. Soria Lopez, H. M. González, and G. C. Léger, "Alzheimer's disease", *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 167, pp. 231-255, **2019**, doi: 10.1016/b978-0-12-804766-8.00013-3.
- [2] C. R. Jack *et al.*, "NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease", *Alzheimers & Dementia*, vol. 14, no. 4, pp. 535-562, **2018**, doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018.
- [3] M. Perez, F. Hernandez, and J. Avila, "Protein Biomarkers for the Diagnosis of Alzheimer's Disease at Different Stages of Neurodegeneration", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 18, p. 10, **2020**, Art no. 6749, doi: 10.3390/ijms21186749.
- [4] A. Atri, "The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum Diagnosis and Management", *Medical Clinics of North America*, vol. 103, no. 2, pp. 263-293, **2019**, doi: 10.1016/j.mcna.2018.10.009.
- [5] J. W. Ashford, "Treatment of Alzheimer's Disease: The Legacy of the Cholinergic Hypothesis, Neuroplasticity, and Future Directions", *Journal of Alzheimers Disease*, vol. 47, no. 1, pp. 149-156, **2015**, doi: 10.3233/jad-150381.
- [6] V. Mantzavinos and A. Alexiou, "Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis", *Current Alzheimer Research*, vol. 14, no. 11, pp. 1149-1154, **2017**, doi: 10.2174/1567205014666170203125942.
- [7] P. S. Aisen *et al.*, "On the path to 2025: understanding the Alzheimer's disease continuum", *Alzheimers Research & Therapy*, vol. 9, p. 10, **2017**, Art no. 60, doi: 10.1186/s13195-017-0283-5.
- [8] R. C. Petersen *et al.*, "NIA-AA Alzheimer's Disease Framework: Clinical Characterization of Stages", *Annals of Neurology*,; vol. 89, no. 6, p. 1145-1156, **2021**, doi: 10.1002/ana.26071.
- [9] L. Vermunt *et al.*, "Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype", *Alzheimers & Dementia*, vol. 15, no. 7, pp. 888-898, **2019**, doi: 10.1016/j.jalz.2019.04.001.
- [10] R. A. Sperling *et al.*, "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease", *Alzheimers & Dementia*, vol. 7, no. 3, pp. 280-292, **2011**, doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.003.
- [11] M. A. DeTure and D. W. Dickson, "The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease", *Molecular Neurodegeneration*, vol. 14, no. 1, p. 18, **2019**, Art no. 32, doi: 10.1186/s13024-019-0333-5.
- [12] A. M. Kiselica and I. Alzheimers Dis Neuroimaging, "Empirically defining the preclinical stages of the Alzheimer's continuum in the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative", *Psychogeriatrics*, vol. 21, no. 4, p. 491-502, **2021** , doi: 10.1111/psyg.12697.
- [13] P. Scheltens *et al.*, "Alzheimer's disease", *Lancet*, vol. 388, no. 10043, pp. 505-517, **2016**, doi: 10.1016/s0140-6736(15)01124-1.
- [14] T. R. Thamizhvani *et al.*, "Classification of progressive stages of Alzheimer's disease in MRI hippocampal region", *Biomedical Engineering-Applications Basis Communications*, vol. 32, no. 6, p. 11, **2020**, Art no. 2050050, doi: 10.4015/s1016237220500507.
- [15] H. Kuang *et al.*, "Sleep disorders in Alzheimer's disease: the predictive roles and potential mechanisms", *Neural Regeneration Research*, vol. 16, no. 10, pp. 1965-1972, **2021**, doi: 10.4103/1673-5374.308071.

- [16] J. T. Fuller *et al.*, "Hallucinations and Delusions Signal Alzheimer's Associated Cognitive Dysfunction More Strongly Compared to Other Neuropsychiatric Symptoms", *Journals of Gerontology Series B-Psychological Sciences and Social Sciences*, vol. 75, no. 9, pp. 1894-1904, **2020**, doi: 10.1093/geronb/gbz032.
- [17] S. Dietlin *et al.*, "Neuropsychiatric Symptoms and Risk of Progression to Alzheimer's Disease Among Mild Cognitive Impairment Subjects", *Journal of Alzheimers Disease*, vol. 70, no. 1, pp. 25-34, **2019**, doi: 10.3233/jad-190025.
- [18] C. Goodman *et al.*, "Reducing and managing faecal incontinence in people with advanced dementia who are resident in care homes: protocol for a realist synthesis", *Bmj Open*, vol. 5, no. 7, p. 8, **2015**, Art no. e007728, doi: 10.1136/bmjopen-2015-007728.
- [19] G. Alcorn *et al.*, "Urinary incontinence in people with Alzheimer's disease", *International Journal of Geriatric Psychiatry*, vol. 29, no. 1, pp. 107-109, **2014**, doi: 10.1002/gps.3991.
- [20] L. C. Hanson *et al.*, "Outcomes of Feeding Problems in Advanced Dementia in a Nursing Home Population", *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 61, no. 10, pp. 1692-1697, **2013**, doi: 10.1111/jgs.12448.
- [21] E. Nichols *et al.*, "Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016", *Lancet Neurology*, vol. 18, no. 1, pp. 88-106, **2019**, doi: 10.1016/s1474-4422(18)30403-4.
- [22] Alzheimer's Disease International *et al.*, "World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends," Alzheimer's Disease International (ADI), **2015**. [Online]. Available: <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2015.pdf> (12.11.2021)
- [23] K. A. Ellen and T.-V. Betzaida, "Dementia Mortality in the United States, 2000–2017," U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, **2019**, vol. 68. [Online]. Available [https://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr68/nvsr68\\_02-508.pdf](https://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr68/nvsr68_02-508.pdf) (12.11.2021)
- [24] T. Jiang *et al.*, "Epidemiology and etiology of Alzheimer's disease: from genetic to non-genetic factors", *Current Alzheimer Research*, vol. 10, no. 8, pp. 852-67, **2013**, doi: 10.2174/15672050113109990155.
- [25] T. Ayodele *et al.*, "Early-Onset Alzheimer's Disease: What Is Missing in Research?", *Current Neurology and Neuroscience Reports*, vol. 21, no. 2, p. 10, **2021**, Art no. 4, doi: 10.1007/s11910-020-01090-y.
- [26] O. Sheppard and M. Coleman, "Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis," in *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*, X. Huang Ed. Brisbane (AU): Exon Publications, **2020**, 18. Chapter 1. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK566126>, doi:10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020.ch1(12.11.2021)
- [27] J. H. K. Tam, C. Seah, and S. H. Pasternak, "The Amyloid Precursor Protein is rapidly transported from the Golgi apparatus to the lysosome and where it is processed into beta-amyloid", *Molecular Brain*, vol. 7, p. 18, **2014**, Art no. 54, doi: 10.1186/s13041-014-0054-1.
- [28] G. Joshi and Y. Z. Wang, "Golgi defects enhance APP amyloidogenic processing in Alzheimer's disease", *Bioessays*, vol. 37, no. 3, pp. 240-247, **2015**, doi: 10.1002/bies.201400116.
- [29] J. H. Kim, "Genetics of Alzheimer's Disease", *Dementia and Neurocognitive Disorders*, vol. 17, no. 4, pp. 131-136, **2018**, doi: 10.12779/dnd.2018.17.4.131.

- [30] Q. Qin *et al.*, "TREM2, microglia, and Alzheimer's disease", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 195, p. 14, **2021**, Art no. 111438, doi: 10.1016/j.mad.2021.111438.
- [31] S. Carmona *et al.*, "The role of TREM2 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders", *Lancet Neurology*, vol. 17, no. 8, pp. 721-730, **2018**, doi: 10.1016/s1474-4422(18)30232-1.
- [32] B. J. Balin and A. P. Hudson, "Etiology and Pathogenesis of Late-Onset Alzheimer's Disease", *Current Allergy and Asthma Reports*, vol. 14, no. 3, p. 10, **2014**, Art no. 417, doi: 10.1007/s11882-013-0417-1.
- [33] A. L. Pierce, S. S. Bullain, and C. H. Kawas, "Late-Onset Alzheimer Disease", *Neurologic Clinics*, vol. 35, no. 2, pp. 283-293, **2017**, doi: 10.1016/j.ncl.2017.01.006.
- [34] C. Reitz, E. Rogaeva, and G. W. Beecham, "Late-onset vs nonmendelian early-onset Alzheimer disease: A distinction without a difference?", *Neurology-Genetics*, vol. 6, no. 5, p. 9, **2020**, Art no. e512, doi: 10.1212/nxg.0000000000000512.
- [35] V. S. Marshe *et al.*, "Clinical implications of APOE genotyping for late-onset Alzheimer's disease (LOAD) risk estimation: a review of the literature", *Journal of Neural Transmission*, vol. 126, no. 1, pp. 65-85, **2019**, doi: 10.1007/s00702-018-1934-9.
- [36] J. Poirier *et al.*, "Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease", *Neurobiology of Aging*, vol. 35, pp. S3-S10, **2014**, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.037.
- [37] W. K. Gottschalk *et al.*, "The Role of Upregulated APOE in Alzheimer's Disease Etiology", *Journal of Alzheimer's Disease and Parkinsonism*, vol. 6, no. 1, **2016**, doi: 10.4172/2161-0460.1000209.
- [38] D. H. Kim *et al.*, "Integrated late onset Alzheimer's disease (LOAD) susceptibility genes: Cholesterol metabolism and trafficking perspectives", *Gene*, vol. 597, pp. 10-16, **2017**, doi: 10.1016/j.gene.2016.10.022.
- [39] P. Mecocci *et al.*, "Brain Aging and Late-Onset Alzheimer's Disease: A Matter of Increased Amyloid or Reduced Energy?", *Journal of Alzheimers Disease*, vol. 64, pp. S397-S404, **2018**, doi: 10.3233/jad-179903.
- [40] X. Z. Yuan *et al.*, S. Sun, C. C. Tan, J. T. Yu, and L. Tan, "The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease", *Journal of Alzheimers Disease*, vol. 58, no. 2, pp. 303-321, **2017**, doi: 10.3233/jad-170061.
- [41] P. R. Manzine *et al.*, "ADAM10 in Alzheimer's disease: Pharmacological modulation by natural compounds and its role as a peripheral marker", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 113, p. 10, **2019**, Art no. 108661, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108661.
- [42] R. A. Armstrong, "Risk factors for Alzheimer's disease", *Folia Neuropathologica*, vol. 57, no. 2, pp. 87-105, **2019**, doi: 10.5114/fn.2019.85929.
- [43] R. A. Hickman, A. Faustin, and T. Wisniewski, "Alzheimer Disease and Its Growing Epidemic Risk Factors, Biomarkers, and the Urgent Need for Therapeutics", *Neurologic Clinics*, vol. 34, no. 4, pp. 941-953, **2016**, doi: 10.1016/j.ncl.2016.06.009.
- [44] G. D. Rabinovici, "Late-onset Alzheimer Disease", *Continuum : lifelong learning in neurology*, vol. 25, no. 1, pp. 14-33, **2019**, doi: 10.1212/con.0000000000000700.
- [45] M. V. F. Silva *et al.*, "Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures", *Journal of Biomedical Science*, vol. 26, p. 11, **2019**, Art no. 33, doi: 10.1186/s12929-019-0524-y.
- [46] A. Serrano-Pozo and J. H. Growdon, "Is Alzheimer's Disease Risk Modifiable?", *Journal of Alzheimers Disease*, vol. 67, no. 3, pp. 795-819, **2019**, doi: 10.3233/jad181028.

- [47] G. A. Edwards *et al.*, "Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease", *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 11, p. 18, **2019**, Art no. 146, doi: 10.3389/fnagi.2019.00146.
- [48] K. Maciejewska, K. Czarnecka, and P. Szymanski, "A review of the mechanisms underlying selected comorbidities in Alzheimer's disease", *Pharmacological Reports*,; vol. 73, no. 6, p. 1565-1581, **2021**, doi: 10.1007/s43440-021-00293-5.
- [49] A. Caruso *et al.*, "Risk Factors for Alzheimer's Disease: Focus on Stress", *Frontiers in Pharmacology*, vol. 10, p. 8, **2019**, Art no. 976, doi: 10.3389/fphar.2019.00976.
- [50] R. A. A. de Heus *et al.*, "Blood Pressure Variability and Progression of Clinical Alzheimer Disease", *Hypertension*, vol. 74, no. 5, pp. 1172-1180, **2019**, doi: 10.1161/hypertensionaha.119.13664.
- [51] N. Garg, R. Joshi, and B. Medhi, "Cracking novel shared targets between epilepsy and Alzheimer's disease: need of the hour", *Reviews in the Neurosciences*, vol. 29, no. 4, pp. 425-442, **2018**, doi: 10.1515/revneuro-2017-0064.
- [52] M. L. Haaksma *et al.*, "Comorbidity and progression of late onset Alzheimer's disease: A systematic review", *Plos One*, vol. 12, no. 5, p. 15, **2017**, Art no. e0177044, doi: 10.1371/journal.pone.0177044.
- [53] C. M. Nday, D. Eleftheriadou, and G. Jackson, "Shared pathological pathways of Alzheimer's disease with specific comorbidities: current perspectives and interventions", *Journal of Neurochemistry*, vol. 144, no. 4, pp. 360-389, **2018**, doi: 10.1111/jnc.14256.
- [54] J. A. Santiago and J. A. Potashkin, "The Impact of Disease Comorbidities in Alzheimer's Disease", *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 13, p. 631770, **2021**, doi: 10.3389/fnagi.2021.631770.
- [55] Z. Arvanitakis, R. C. Shah, and D. A. Bennett, "Diagnosis and Management of Dementia: Review", *Jama-Journal of the American Medical Association*, vol. 322, no. 16, pp. 1589-1599, **2019**, doi: 10.1001/jama.2019.4782.
- [56] R. S. Turner *et al.*, "Potential New Approaches for Diagnosis of Alzheimer's Disease and Related Dementias", *Frontiers in Neurology*, vol. 11, p. 10, **2020**, Art no. 496, doi: 10.3389/fneur.2020.00496.
- [57] J. L. Whitwell, "Alzheimer's disease neuroimaging", *Current Opinion in Neurology*, vol. 31, no. 4, pp. 396-404, **2018**, doi: 10.1097/wco.0000000000000570.
- [58] J. Weller and A. Budson, "Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment", *F1000Research*, vol. 7, **2018**, doi: 10.12688/f1000research.14506.1.
- [59] R. T. Bartus, "On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: Lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis", *Experimental Neurology*, vol. 163, no. 2, pp. 495-529, **2000**, doi: 10.1006/exnr.2000.7397.
- [60] R. T. Bartus *et al.*, "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction", *Science*, vol. 217, no. 4558, pp. 408-417, **1982**, doi: 10.1126/science.7046051.
- [61] H. Sugimoto, "The new approach in development of anti-Alzheimer's disease drugs via the cholinergic hypothesis", *Chemico-Biological Interactions*, vol. 175, no. 1-3, pp. 204-208, **2008**, doi: 10.1016/j.cbi.2008.05.031.
- [62] T. H. Ferreira-Vieira *et al.*, "Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System", *Current Neuropharmacology*, vol. 14, no. 1, pp. 101-115, **2016**, doi: 10.2174/1570159x13666150716165726.
- [63] X. Q. Chen and W. C. Mobley, "Exploring the Pathogenesis of Alzheimer Disease in Basal Forebrain Cholinergic Neurons: Converging Insights From Alternative Hypotheses", *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, p. 18, **2019**, Art no. 446, doi: 10.3389/fnins.2019.00446.

- [64] L. A. Craig, N. S. Hong, and R. J. McDonald, "Revisiting the cholinergic in the development of Alzheimer's disease", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 35, no. 6, pp. 1397-1409, **2011**, doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.03.001.
- [65] A. V. Terry and J. J. Buccafusco, "The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 306, no. 3, pp. 821-827, **2003**, doi: 10.1124/jpet.102.041616.
- [66] A. Contestabile, "The history of the cholinergic hypothesis", *Behavioural Brain Research*, vol. 221, no. 2, pp. 334-340, **2011**, doi: 10.1016/j.bbr.2009.12.044.
- [67] H. Xu *et al.*, "Long-term Effects of Cholinesterase Inhibitors on Cognitive Decline and Mortality", *Neurology*, vol. 96, no. 17, pp. E2220-E2230, **2021**, doi: 10.1212/wnl.00000000000011832.
- [68] G. Mushtaq *et al.*, "Status of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus", *Cns & Neurological Disorders-Drug Targets*, vol. 13, no. 8, pp. 1432-1439, **2014**, doi: 10.2174/1871527313666141023141545.
- [69] K. Sharma, "Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics", *Molecular Medicine Reports*, vol. 20, no. 2, pp. 1479-1487, **2019**, doi: 10.3892/mmr.2019.10374.
- [70] L. Berg *et al.*, "Targeting Acetylcholinesterase: Identification of Chemical Leads by High Throughput Screening, Structure Determination and Molecular Modeling", *Plos One*, vol. 6, no. 11, p. 12, **2011**, Art no. e26039, doi: 10.1371/journal.pone.0026039.
- [71] S. M. Cheng *et al.*, "Gorge Motions of Acetylcholinesterase Revealed by Microsecond Molecular Dynamics Simulations", *Scientific Reports*, vol. 7, p. 12, **2017**, Art no. 3219, doi: 10.1038/s41598-017-03088-y.
- [72] H. Dvir *et al.*, "Acetylcholinesterase: From 3D structure to function", *Chemico-Biological Interactions*, vol. 187, no. 1-3, pp. 10-22, **2010**, doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.042.
- [73] R. M. Lane, S. G. Potkin, and A. Enz, "Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia", *International Journal of Neuropsychopharmacology*, vol. 9, no. 1, pp. 101-124, **2006**, doi: 10.1017/s1461145705005833.
- [74] A. Nordberg *et al.*, "A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease", *Primary Care Companion to CNS Disorders*, vol. 15, no. 2, **2013**, doi: 10.4088/PCC.12r01412.
- [75] N. H. Greig, D. K. Lahiri, and K. Sambamurti, "Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy", *International Psychogeriatrics*, vol. 14 Suppl 1, pp. 77-91, **2002**, doi: 10.1017/s1041610203008676.
- [76] J. Jonczyk *et al.*, "Molecular Modeling Studies on the Multistep Reactivation Process of Organophosphate-Inhibited Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase", *Biomolecules*, vol. 11, no. 2, p. 21, **2021**, Art no. 169, doi: 10.3390/biom11020169.
- [77] X. G. Du, X. Y. Wang, and M. Y. Geng, "Alzheimer's disease hypothesis and related therapies", *Translational Neurodegeneration*, vol. 7, p. 7, **2018**, Art no. 2, doi: 10.1186/s40035-018-0107-y.
- [78] G. V. De Ferrari *et al.*, "A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation", *Biochemistry*, vol. 40, no. 35, pp. 10447-10457, **2001**, doi: 10.1021/bi0101392.
- [79] M. C. Dinamarca *et al.*, "Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the A beta peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease", *Molecular Neurodegeneration*, vol. 5, p. 15, **2010**, Art no. 4, doi: 10.1186/1750-1326-5-4.

- [80] L. Jean, S. Brimijoin, and D. J. Vaux, "In vivo localization of human acetylcholinesterase-derived species in a  $\beta$ -sheet conformation at the core of senile plaques in Alzheimer's disease", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 294, no. 16, pp. 6253-6272, **2019**, doi: 10.1074/jbc.RA118.006230.
- [81] S. Lombardo and U. Maskos, "Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment", *Neuropharmacology*, vol. 96, pp. 255-262, **2015**, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.11.018.
- [82] N. K. Singh and D. Garabadu, "Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Down Regulation Impairs Mitochondrial Function in Streptozotocin-induced Sporadic Alzheimer's Disease Model in Rats", *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, vol. 55, no. 1, pp. 153-163, **2021**, doi: 10.5530/ijper.55.1.17.
- [83] J. M. Ren *et al.*, "Expression levels of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in the brains of patients with Alzheimer's disease and their effect on synaptic proteins in SH-SY5Y cells", *Molecular Medicine Reports*, vol. 22, no. 3, pp. 2063-2075, **2020**, doi: 10.3892/mmr.2020.11253.
- [84] K. G. Ma and Y. H. Qian, "Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease", *Neuropeptides*, vol. 73, pp. 96-106, **2019**, doi: 10.1016/j.nepep.2018.12.003.
- [85] S. Verma, A. Kumar, and T. Tripathi, "Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists: current scenario in Alzheimer's disease therapy", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 70, no. 8, pp. 985-993, **2018**, doi: 10.1111/jphp.12919.
- [86] H. Hampel *et al.*, "The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease", *Brain*, vol. 141, pp. 1917-1933, **2018**, doi: 10.1093/brain/awy132.
- [87] A. Martorana, Z. Esposito, and G. Koch, "Beyond the Cholinergic Hypothesis: Do Current Drugs Work in Alzheimer's Disease?", *CNS Neuroscience & Therapeutics*, vol. 16, no. 4, pp. 235-245, **2010**, doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00175.x.
- [88] S. Kozlov *et al.*, "Alzheimer's disease: as it was in the beginning", *Reviews in the Neurosciences*, vol. 28, no. 8, pp. 825-843, **2017**, doi: 10.1515/revneuro-2017-0006.
- [89] A. B. Reiss *et al.*, "Amyloid toxicity in Alzheimer's disease", *Reviews in the Neurosciences*, vol. 29, no. 6, pp. 613-627, **2018**, doi: 10.1515/revneuro-2017-0063.
- [90] R. A. Armstrong, "The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease", *Folia Neuropathologica*, vol. 47, no. 4, pp. 289-299, **2009**.
- [91] F. Kametani and M. Hasegawa, "Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease", *Frontiers in Neuroscience*, vol. 12, p. 11, **2018**, Art no. 25, doi: 10.3389/fnins.2018.00025.
- [92] E. Head *et al.*, "Aging in Down Syndrome and the Development of Alzheimer's Disease Neuropathology", *Current Alzheimer Research*, vol. 13, no. 1, pp. 18-29, **2016**, doi: 10.2174/1567205012666151020114607.
- [93] D. Vijayan and R. Chandra, "Amyloid Beta Hypothesis in Alzheimer's Disease: Major Culprits and Recent Therapeutic Strategies", *Current Drug Targets*, vol. 21, no. 2, pp. 148-166, **2020**, doi: 10.2174/1389450120666190806153206.
- [94] H. Hillen, "The Beta Amyloid Dysfunction (BAD) Hypothesis for Alzheimer's Disease", *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, p. 10, **2019**, Art no. 1154, doi: 10.3389/fnins.2019.01154.
- [95] D. J. Selkoe and J. Hardy, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25years", *Embo Molecular Medicine*, vol. 8, no. 6, pp. 595-608, **2016**, doi: 10.15252/emmm.201606210.

- [96] S. H. Barage and K. D. Sonawane, "Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease", *Neuropeptides*, vol. 52, pp. 1-18, **2015**, doi: 10.1016/j.npep.2015.06.008.
- [97] G. Forloni and C. Balducci, "Alzheimer's Disease, Oligomers, and Inflammation", *Journal of Alzheimers Disease*, vol. 62, no. 3, pp. 1261-1276, **2018**, doi: 10.3233/jad-170819.
- [98] D. J. Selkoe, "Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior", *Behavioural Brain Research*, vol. 192, no. 1, pp. 106-113, **2008**, doi: 10.1016/j.bbr.2008.02.016.
- [99] D. Puzzo *et al.*, "Tau is not necessary for amyloid-beta-induced synaptic and memory impairments", *Journal of Clinical Investigation*, vol. 130, no. 9, pp. 4831-4844, **2020**, doi: 10.1172/jci137040.
- [100] I. C. Stancu *et al.*, "Models of beta-amyloid induced Tau-pathology: the long and "folded" road to understand the mechanism", *Molecular Neurodegeneration*, vol. 9, p. 14, **2014**, Art no. 51, doi: 10.1186/1750-1326-9-51.
- [101] J. Sevigny *et al.*, "The antibody aducanumab reduces A beta plaques in Alzheimer's disease", *Nature*, vol. 537, no. 7618, pp. 50-56, **2016**, doi: 10.1038/nature19323.
- [102] M. Tolar *et al.*, "Aducanumab, gantenerumab, BAN2401, and ALZ-801-the first wave of amyloid-targeting drugs for Alzheimer's disease with potential for near term approval", *Alzheimers Research & Therapy*, vol. 12, no. 1, p. 10, **2020**, Art no. 95, doi: 10.1186/s13195-020-00663-w.
- [103] N. N. Naseri *et al.*, "The complexity of tau in Alzheimer's disease", *Neuroscience Letters*, vol. 705, pp. 183-194, **2019**, doi: 10.1016/j.neulet.2019.04.022.
- [104] P. d'Errico and M. Meyer-Luehmann, "Mechanisms of Pathogenic Tau and A beta Protein Spreading in Alzheimer's Disease", *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 12, p. 10, **2020**, Art no. 265, doi: 10.3389/fnagi.2020.00265.
- [105] E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, "Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration", *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 2, no. 7, p. 25, **2012**, Art no. a006247, doi: 10.1101/cshperspect.a006247.
- [106] J. W. Vogel *et al.*, "Spread of pathological tau proteins through communicating neurons in human Alzheimer's disease", *Nature Communications*, vol. 11, no. 1, p. 15, **2020**, doi: 10.1038/s41467-020-15701-2.
- [107] N. Okamura and K. Yanai, "Applications of tau PET imaging", *Nature Reviews Neurology*, vol. 13, no. 4, p. 2, **2017**, doi: 10.1038/nrneurol.2017.38.
- [108] A. Bejanin *et al.*, "Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease", *Brain*, vol. 140, pp. 3286-3300, **2017**, doi: 10.1093/brain/awx243.
- [109] N. J. Braun *et al.*, "Mechanical injuries of neurons induce tau mislocalization to dendritic spines and tau-dependent synaptic dysfunction", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 117, no. 46, pp. 29069-29079, **2020**, doi: 10.1073/pnas.2008306117.
- [110] S. H. Nies *et al.*, "Spreading of Alzheimer tau seeds is enhanced by aging and template matching with limited impact of amyloid- $\beta$ ", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 297, no. 4, p. 101159, **2021**, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101159.
- [111] A. De Simone *et al.*, "Glycogen Synthase Kinase 3 beta: A New Gold Rush in Anti-Alzheimer's Disease Multitarget Drug Discovery?", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 64, no. 1, pp. 26-41, **2021**, doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00931.
- [112] A. B. Allnut *et al.*, "Physiological and Pathological Roles of Cdk5: Potential Directions for Therapeutic Targeting in Neurodegenerative Disease", *ACS Chemical*



- Neuroscience*, vol. 11, no. 9, pp. 1218-1230, **2020**, doi: 10.1021/acscemneuro.0c00096.
- [113] A. Wilkaniec *et al.*, "Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 affects early neuroinflammatory signalling in murine model of amyloid beta toxicity", *Journal of Neuroinflammation*, vol. 15, p. 18, **2018**, Art no. 1, doi: 10.1186/s12974-017-1027-y.
- [114] C. L. Sayas and J. Avila, "GSK-3 and Tau: A Key Duet in Alzheimer's Disease", *Cells*, vol. 10, no. 4, p. 19, **2021**, Art no. 721, doi: 10.3390/cells10040721.
- [115] D. Toral-Rios *et al.*, "GSK3 beta and Tau Protein in Alzheimer's Disease and Epilepsy", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 14, p. 9, **2020**, Art no. 19, doi: 10.3389/fncel.2020.00019.
- [116] E. Lauretti, O. Dincer, and D. Pratico, "Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease", *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, vol. 1867, no. 5, p. 7, **2020**, Art no. 118664, doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118664.
- [117] M. Vaz and S. Silvestre, "Alzheimer's disease: Recent treatment strategies", *European Journal of Pharmacology*, vol. 887, p. 13, **2020**, Art no. 173554, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173554.
- [118] J. Folch *et al.*, "Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment", *Neural Plasticity*, vol. 2016, p. 15, **2016**, Art no. 8501693, doi: 10.1155/2016/8501693.
- [119] W. J. Geldenhuys and A. S. Darvesh, "Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current and future trends", *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 15, no. 1, pp. 3-5, **2015**, doi: 10.1586/14737175.2015.990884.
- [120] F. Stella *et al.*, "Anti-dementia medications: current prescriptions in clinical practice and new agents in progress", *Therapeutic Advances in Drug Safety*, vol. 6, no. 4, pp. 151-165, **2015**, doi: 10.1177/2042098615592116.
- [121] J. Godyń *et al.*, "Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials", *Pharmacological Reports*, vol. 68, no. 1, pp. 127-138, **2016**, doi: 10.1016/j.pharep.2015.07.006.
- [122] K. Chopra, S. Misra, and A. Kuhad, "Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's disease", *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, vol. 12, no. 3, pp. 335-350, **2011**, doi: 10.1517/14656566.2011.520702.
- [123] J. Q. Cao *et al.*, "Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease", *Molecular Neurodegeneration*, vol. 13, p. 20, **2018**, Art no. 64, doi: 10.1186/s13024-018-0299-8.
- [124] N. H. Ibrahim *et al.*, "Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease: Seeking Clarity in a Time of Uncertainty", *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11, p. 16, **2020**, Art no. 261, doi: 10.3389/fphar.2020.00261.
- [125] B. Ray *et al.*, "Rivastigmine modifies the alpha-secretase pathway and potentially early Alzheimer's disease", *Translational Psychiatry*, vol. 10, no. 1, p. 17, **2020**, Art no. 47, doi: 10.1038/s41398-020-0709-x.
- [126] K. Nguyen *et al.*, "Evaluation of rivastigmine in Alzheimer's disease", *Neurodegenerative Disease Management*, vol. 11, no. 1, pp. 35-48, **2021**, doi: 10.2217/nmt-2020-0052.
- [127] R. A. Marasco, "Current and evolving treatment strategies for the Alzheimer disease continuum", *The American Journal of Managed Care*, vol. 26, no. 8 Suppl, pp. S167-s176, **2020**, doi: 10.37765/ajmc.2020.88481.
- [128] R. Khoury, J. Rajamanickam, and G. T. Grossberg, "An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine", *Therapeutic Advances in Drug Safety*, vol. 9, no. 3, pp. 171-178, **2018**, doi: 10.1177/2042098617750555.

- [129] D. Prvulovic, H. Hampel, and J. Pantel, "Galantamine for Alzheimer's disease", *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, vol. 6, no. 3, pp. 345-354, **2010**, doi: 10.1517/17425251003592137.
- [130] N. Herrmann *et al.*, "Current and emerging drug treatment options for Alzheimer's disease: a systematic review", *Drugs*, vol. 71, no. 15, pp. 2031-65, **2011**, doi: 10.2165/11595870-000000000-00000.
- [131] G. Razay and G. K. Wilcock, "Galantamine in Alzheimer's disease", *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 8, no. 1, pp. 9-17, **2008**, doi: 10.1586/14737175.8.1.9.
- [132] L. Sutthapitaksakul, C. R. Dass, and P. Sriamornsak, "Donepezil-an updated review of challenges in dosage form design", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 63, p. 12, **2021**, Art no. 102549, doi: 10.1016/j.jddst.2021.102549.
- [133] X. Rong *et al.*, "Enhancing Therapeutic Efficacy of Donepezil by Combined Therapy: A Comprehensive Review", *Current Pharmaceutical Design*, vol. 27, no. 3, pp. 332-344, **2021**, doi: 10.2174/1381612826666201023144836.
- [134] J. S. Birks and R. J. Harvey, "Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease", *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 6, p. 349, **2018**, Art no. Cd001190, doi: 10.1002/14651858.CD001190.pub3.
- [135] K. Hirano *et al.*, "Neuroprotective effects of memantine via enhancement of autophagy", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 518, no. 1, pp. 161-170, **2019**, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.025.
- [136] R. McShane *et al.*, "Memantine for dementia", *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 3, p. 454, **2019**, Art no. Cd003154, doi: 10.1002/14651858.CD003154.pub6.
- [137] B. Winblad *et al.*, "Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomised clinical trials", *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, vol. 24, no. 1, pp. 20-27, **2007**, doi: 10.1159/000102568.
- [138] T. Kishi *et al.*, "Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis", *Journal of Alzheimers Disease*, vol. 60, no. 2, pp. 401-425, **2017**, doi: 10.3233/jad-170424.
- [139] K. X. Dou *et al.*, "Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: a network meta-analysis of 41 randomized controlled trials", *Alzheimers Research & Therapy*, vol. 10, p. 10, **2018**, Art no. 126, doi: 10.1186/s13195-018-0457-9.
- [140] A. Calhoun *et al.*, "An evaluation of memantine ER plus donepezil for the treatment of Alzheimer's disease", *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, vol. 19, no. 15, pp. 1711-1717, **2018**, doi: 10.1080/14656566.2018.1519022.
- [141] P. Yang and F. Sun, "Aducanumab: The first targeted Alzheimer's therapy", *Drug Discoveries & Therapeutics*, vol. 15, no. 3, pp. 166-168, **2021**, doi: 10.5582/ddt.2021.01061.
- [142] J. Cummings *et al.*, "Aducanumab: Appropriate Use Recommendations", *The Journal of Prevention Alzheimer's Disease*, vol. 8, no. 4, pp. 398-410, **2021**, doi: 10.14283/jpad.2021.41.
- [143] F. Tagliavini, P. Tiraboschi, and A. Federico, "Alzheimer's disease: the controversial approval of Aducanumab", *Neurological Sciences*, vol. 42, no. 8, **2021**, pp. 3069-3070.
- [144] S. Dhillon, "Aducanumab: First Approval", *Drugs*, vol. 81, no. 12, pp. 1437-1443, **2021**, doi: 10.1007/s40265-021-01569-z.
- [145] G. C. Alexander *et al.*, "Revisiting FDA Approval of Aducanumab", *The New England Journal of Medicine*, vol. 385, no. 9, pp. 769-771, **2021**, doi: 10.1056/NEJMp2110468.

- [146] J. Cummings, "Why aducanumab is important", *Nature Medicine*, vol. 27, no. 9, pp. 1498-1498, **2021**, doi: 10.1038/s41591-021-01478-4.
- [147] M. Gensicka-Kowalewska, G. Cholewinski, and K. Dzierzbicka, "Recent developments in the synthesis and biological activity of acridine/acridone analogues", *Rsc Advances*, vol. 7, no. 26, pp. 15776-15804, **2017**, doi: 10.1039/c7ra01026e.
- [148] M. Demeunynck, F. Charmantray, and A. Martelli, "Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy", *Current Pharmaceutical Design*, vol. 7, no. 17, pp. 1703-1724, **2001**, doi: 10.2174/1381612013397131.
- [149] M. Kozurkova, D. Sabolova, and P. Kristian, "A new look at 9-substituted acridines with various biological activities", *Journal of Applied Toxicology*, vol. 41, no. 1, pp. 175-189, **2021**, doi: 10.1002/jat.4072.
- [150] W. A. Denny, "Acridine derivatives as chemotherapeutic agents", *Current Medicinal Chemistry*, vol. 9, no. 18, pp. 1655-65, **2002**, doi: 10.2174/0929867023369277.
- [151] S. Girault *et al.*, "Antimalarial, antitrypanosomal, and antileishmanial activities and cytotoxicity of bis(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): Influence of the linker", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 43, no. 14, pp. 2646-2654, **2000**, doi: 10.1021/jm990946n.
- [152] B. Zhang *et al.*, "Acridine and its derivatives: a patent review (2009-2013)", *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, vol. 24, no. 6, pp. 647-664, **2014**, doi: 10.1517/13543776.2014.902052.
- [153] T. N. Poly *et al.*, "Association between Use of Statin and Risk of Dementia: A Meta-Analysis of Observational Studies", *Neuroepidemiology*, vol. 54, no. 3, pp. 214-226, **2020**, doi: 10.1159/000503105.
- [154] M. Girek and P. Szymanski, "Tacrine hybrids as multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease: influence of chemical structures on biological activities", *Chemical Papers*, vol. 73, no. 2, pp. 269-289, **2019**, doi: 10.1007/s11696-018-0590-8.
- [155] W. Y. Wu *et al.*, "Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 32, no. 1, pp. 572-587, **2017**, doi: 10.1080/14756366.2016.1210139.
- [156] A. Minarini *et al.*, "Multifunctional Tacrine Derivatives in Alzheimer's Disease", *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 13, no. 15, pp. 1771-1786, **2013**, doi: 10.2174/15680266113139990136.
- [157] I. Gabriel, "'Acridines' as New Horizons in Antifungal Treatment", *Molecules*, vol. 25, no. 7, p. 14, **2020**, Art no. 1480, doi: 10.3390/molecules25071480.
- [158] M. Kaya, Y. Yildirim, and G. Y. Celik, "Synthesis, characterization, and *in vitro* antimicrobial and antifungal activity of novel acridines", *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 48, no. 11, pp. 724-728, **2015**, doi: 10.1007/s11094-015-1181-4.
- [159] D. B. C. de Oliveira *et al.*, "A new acridone with antifungal properties against *Candida* spp. and dermatophytes, and antibiofilm activity against *C. albicans*", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 127, no. 5, pp. 1362-1372, **2019**, doi: 10.1111/jam.14381.
- [160] I. Gabriel *et al.*, "Antifungal Activity of Capridine beta as a Consequence of Its Biotransformation into Metabolite Affecting Yeast Topoisomerase II Activity", *Pathogens*, vol. 10, no. 2, p. 11, **2021**, Art no. 189, doi: 10.3390/pathogens10020189.
- [161] P. Yadav and K. Shah, "Quinolines, a perpetual, multipurpose scaffold in medicinal chemistry", *Bioorganic Chemistry*, vol. 109, p. 42, **2021**, Art no. 104639, doi: 10.1016/j.bioorg.2021.104639.
- [162] R. Kaur and K. Kumar, "Synthetic and medicinal perspective of quinolines as antiviral agents", *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 215, p. 39, **2021**, Art no. 113220, doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113220.

- [163] A. Dorababu, "Quinoline: A Promising Scaffold in Recent Antiprotozoal Drug Discovery", *Chemistryselect*, vol. 6, no. 9, pp. 2164-2177, **2021**, doi: 10.1002/slct.202100115.
- [164] L. F. E. Moor *et al.*, "Quinoline: An Attractive Scaffold in Drug Design", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 21, no. 16, pp. 2209-2226, **2021**, doi: 10.2174/1389557521666210210155908.
- [165] R. J. Man *et al.*, "Recent Progress in the Development of Quinoline Derivatives for the Exploitation of", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 21, no. 7, pp. 825-838, **2021**, doi: 10.2174/1871520620666200516150345.
- [166] K. Czarnecka *et al.*, "Discovery of New Cyclopentaquinoline Analogues as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 3, p. 22, **2019**, Art no. 498, doi: 10.3390/ijms20030498.
- [167] K. Czarnecka *et al.*, "New cyclopentaquinoline hybrids with multifunctional capacities for the treatment of Alzheimer's disease", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 33, no. 1, pp. 158-170, **2017**, doi: 10.1080/14756366.2017.1406485.
- [168] R. Tabassum, M. Ashfaq, and H. Oku, "Current Pharmaceutical Aspects of Synthetic Quinoline Derivatives", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 21, no. 10, pp. 1152-1172, **2021**, doi: 10.2174/1389557520999201214234735.
- [169] P. Szymanski *et al.*, "2,3-Dihydro-1H-cyclopenta b quinoline Derivatives as Acetylcholinesterase Inhibitors-Synthesis, Radiolabeling and Biodistribution", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 8, pp. 10067-10090, **2012**, doi: 10.3390/ijms130810067.
- [170] N. Chufarova *et al.*, "New tacrine-acridine hybrids as promising multifunctional drugs for potential treatment of Alzheimer's disease", *Archiv Der Pharmazie*, vol. 351, no. 7, p. 11, **2018**, Art no. e1800050, doi: 10.1002/ardp.201800050.
- [171] G. L. Ellman *et al.*, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochemical Pharmacology*, vol. 7, no. 2, pp. 88-95, **1961**, doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- [172] B. X. Ou, M. Hampsch-Woodill, and R. L. Prior, "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 10, pp. 4619-4626, **2001**, doi: 10.1021/jf010586o.
- [173] A. Davalos, C. Gomez-Cordoves, and B. Bartolome, "Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 1, pp. 48-54, **2004**, doi: 10.1021/jf0305231.
- [174] J. A. Plumb, "Cell sensitivity assays : the MTT assay", *Methods in Molecular Medicine*, vol. 28, pp. 25-30, **1999**, doi: 10.1385/1-59259-687-8:25.
- [175] F. Mao *et al.*, "Tacrine-propargylamine derivatives with improved acetylcholinesterase inhibitory activity and lower hepatotoxicity as a potential lead compound for the treatment of Alzheimer's disease", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 30, no. 6, pp. 995-1001, **2015**, doi: 10.3109/14756366.2014.1003212.
- [176] X. Y. Chen *et al.*, "Tacrine-Silibinin Codrug Shows Neuro- and Hepato protective Effects in Vitro and Pro-Cognitive and Hepatoprotective Effects in Vivo", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 55, no. 11, pp. 5231-5242, **2012**, doi: 10.1021/jm300246n.
- [177] "Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B.

- Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT,," ed, **2016**.
- [178] M. R. Bauer and M. D. Mackey, "Electrostatic Complementarity as a Fast and Effective Tool to Optimize Binding and Selectivity of Protein-Ligand Complexes", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 62, no. 6, pp. 3036-3050, **2019**, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01925.
- [179] J. Eberhardt *et al.*, "AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings", *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 61, no. 8, pp. 3891-3898, **2021**, doi: 10.1021/acs.jcim.1c00203.
- [180] Q. F. Liu and W. C. Yin, "Crystal Structure of Recombinant Human Acetylcholinesterase in Complex with Compound 2", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 64, no. 4, pp. 1844-1855, **2021**, doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01863.
- [181] M. Rossi *et al.*, "Sustainable Drug Discovery of Multi-Target-Directed Ligands for Alzheimer's Disease", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 64, no. 8, pp. 4972-4990, **2021**, doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c00048.
- [182] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, "VMD: Visual molecular dynamics", *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, vol. 14, no. 1, pp. 33-38, **1996**, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- [183] A. Daina, O. Michielin, and V. Zoete, "SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules", *Scientific Reports*, vol. 7, p. 13, **2017**, Art no. 42717, doi: 10.1038/srep42717.
- [184] H. B. Yang *et al.*, "admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties", *Bioinformatics*, vol. 35, no. 6, pp. 1067-1069, **2019**, doi: 10.1093/bioinformatics/bty707.
- [185] P. Banerjee *et al.*, "ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals", *Nucleic Acids Research*, vol. 46, no. W1, pp. W257-W263, **2018**, doi: 10.1093/nar/gky318.
- [186] C. A. Lipinski *et al.*, "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings (Reprinted from *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol 23, pg 3-25, 1997)", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Reprint vol. 46, no. 1-3, pp. 3-26, **2001**, doi: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
- [187] W. J. Egan, K. M. Merz, and J. J. Baldwin, "Prediction of drug absorption using multivariate statistics", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 43, no. 21, pp. 3867-3877, **2000**, doi: 10.1021/jm000292e.
- [188] D. F. Veber *et al.*, "Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 45, no. 12, pp. 2615-2623, **2002**, doi: 10.1021/jm020017n.