

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Наставно-научном већу

ПРЕДМЕТ: Образложење предлога теме докторске дисертације

Молим Наставно-научно веће Универзитета у Београду – Хемијског факултета да одобри пријаву теме докторске дисертације под насловом:

„Синтеза, фармаколошка активност и *in silico* анализа нових деривата тетралона и тетрахидроакридина“

1. Научна област: Хемија

Ужа научна област: Органска хемија

2. Предмет научног истраживања

Планирани предмет научног истраживања предложене докторске дисертације обухвата рационални дизајн и оптимизацију синтетског пута за добијање нових структурних аналога акридина и бензимидазола, као и фармаколошко *in vitro* испитивање њихове активности према биолошким метама које су од значаја у развоју нових потенцијалних лекова у симптоматској терапији Алцхајмерове болести. Истраживање обухвата два сегмента.

У првом делу истраживања планиран је развој и оптимизација синтетског пута за добијање две групе структурно различитих деривата акридина и бензимидазола. Прву групу једињења представљају структурни хибриди 1,2,3,4-тетрахидроакридина и деривата циметне киселине. 1,2,3,4-Тетрахидроакридин је позната фармакофора која је саставни део такрина, јаког инхибитора холинестераза (*ChE*), а који је раније коришћен у симптоматској терапији Алцхајмерове болести. Језгро циметне киселине, које садржи двоструку везу коњуговану са карбонилном групом, је структурни мотив који је често присутан у једињењима која инхибирају моноамин-оксидазу Б (*MAO-B*), ензим који је такође мета у развоју потенцијалних лекова у терапији Алцхајмерове болести. Планирано је да друга група једињења садржи бензимидазол, као потенцијални структурни мотив за инхибицију *ChE*, и 2-бензилиден-1-тетралон, који представља структурну јединицу која се може наћи у појединим инхибиторима *MAO-B*. Такви хибриди у целини чине потенцијалне инхибиторе који могу деловати на више мета, што је пожељан приступ код развоја лекова за терапију болести сложене патофизиологије као што је Алцхајмерова болест. Даљи структурни развој једињења ради побољшања фармаколошког профила, који подразумева промену линкера између наведених фармакофора као и супституената на језгру циметног и бензимидазолног дела молекула, биће извршен на основу резултата добијених *in vitro* биолошким тестирањима и *in silico* компјутерским предвиђањима интеракција ензим–лиганд.

Други део истраживања обухватиће *in vitro* тестирање новосинтетисаних једињења. Планирано је да се испита инхибиторна активност свих једињења према ацетилхолин-естерази (*AChE*) и бутирилхолин-естерази (*BuChE*). У наставку истраживања, за једињења која су показала најбоље резултате биће испитана и инхибиторна активност према *MAO-B*. Коначно, применом *in silico* методе молекулског докинга испитаће се и анализирати начин везивања и врста интеракција које лиганди остварују са ензимима.

3. Основне хипотезе

Алцхајмерова болест је неизлечиво неуродегенеративно обољење, које карактерише прогресивни губитак когнитивних функција као што су памћење, размишљање, учење, говор и оријентација.¹ Глобални тренд пораста броја старије популације условљава све већу учесталост Алцхајмерове болести. Светска здравствена организација (*World Health Organization, WHO*) процењује да је приближно 55 милиона људи широм света оболело од ове болести, и предвиђа се да ће тај број порастати на 139 милиона до 2050. године. Етиологија Алцхајмерове болести укључује сложену међусобну повезаност генетске склоности и фактора средине, што отежава потпуно разјашњење њеног тачног узрока и тока напредовања.²

Главне патолошке промене код Алцхајмерове болести су: смањење нивоа неуротрансмитера ацетилхолина (*ACh*), агрегација β -амилоидних протеина (*A β*), хиперфосфорилација тау-протеина и поремећај хомеостазе јона метала (Cu^{2+} , Zn^{2+} и Fe^{2+}).^{1,2,3} Први терапијски приступ у лечењу Алцхајмерове болести био је усмерен на повећање концентрације ацетилхолина у мозгу.^{2,3} Касније су предложене терапије фокусиране на смањење акумулације *A β* и тау-протеина, међутим ова врста терапије још увек није дала очекивани помак у лечењу. Стога, појачање холинергичке неуротрансмисије и даље представља битан приступ у симптоматском лечењу когнитивних и бихевиоралних симптома ране и средње фазе Алцхајмерове болести.³ Ензими одговорни за хидролитичку деградацију неуротрансмитера ацетилхолина су ацетилхолин-естераза (*AChE*) и бутирилхолин-естераза (*BuChE*), при чему се током напредовања болести ниво *AChE* смањује, док се ниво *BuChE* повећава. Стога је претпоставка да инхибиција оба ензима може имати већи терапијски значај од инхибиције само једног од ова два ензима.^{1,3} *AChE* поседује два главна места везивања супстрата: каталитички активно место (*Catalytic Active Site, CAS*) где се одвија хидролиза *ACh* и периферно анјонско место (*Peripheral Anionic Site, PAS*) које такође има битну улогу у каталитичкој активности путем усмеравања супстрата ка активном месту. *PAS*, поред хидролизе *ACh*, доприноси и агрегацији *A β* протеина, што даље може довести до поремећаја регулације калцијума, стварања реактивних кисеоничних врста и оштећења ћелијске мембране неурона. Сходно томе, сматра се да интеракција лиганда са оба везивна места *AChE* може побољшати њихов терапијски учинак.¹

Поред наведених промена, прогресија Алцхајмерове болести доводи до прекомерне експресије ензима *MAO-B* у хипокампусу и можданој кори. Физиолошка улога моноамин-оксидаза (*MAO*) је регулација моноаминских неуротрансмитера у синаптичком простору, међутим повећана експресија *MAO-B* изоформе доводи и до повећања неуротоксичних нуспроизвода који настају у биохемијским реакцијама које катализује овај ензим.^{4,5} Поред тога, постоје докази да повећана експресија *MAO-B* доприноси стварању β -амилоидних пептида.⁴ Инхибитори *MAO-B* тиме могу имати неуропротективан ефекат који подразумева смањење $A\beta$ и реактивних кисеоничних врста, као и повећање нивоа моноаминских неуротрансмитера.⁵

У литератури се стога може наћи све више примера који подржавају хипотезу развоја дуалних инхибитора *ChE* и *MAO-B* као потенцијалних нових лекова у терапији Алцхајмерове болести.^{2,6}

У оквиру ове докторске дисертације планирана је синтеза лиганада које би потенцијално могла интераговати са *ChE* и *MAO-B*. Циметна киселина и њени деривати представљају важну класу α,β -незасићених карбонилних једињења и налазе се у многим фармаколошки активним једињењима.⁶ Компјутерским прорачунима нађено је да карбонилни угљеник деривата циметне киселине остварује кључне интеракције са *MAO-B* ензимом и на тај начин инхибира његову активност.⁷ Са друге стране, 1,2,3,4-тетрахидро акридин у структурном смислу представља основу лека такрина, првог одобреног лека од стране Управе за храну и лекове (*Food and Drug Administration, FDA*), који је убрзо био избачен из употребе, због изражене хепатотоксичности. Међутим, нађено је да деривати акридина често имају бољи фармаколошки профил и мању токсичност од самог такрина.¹ Битно је нагласити да су у литератури већ описани хибриди акридина и циметне киселине, који су показали инхибиторну активност према *AChE* и заштитни ефекат против $A\beta$ -индуковане ћелијске токсичности.⁶ У оквиру овог истраживања планирано је да се деривати циметне киселине и тетрахидроакридина повежу преко 4-аминопиперидинског моста применом познатих процедура за синтезу које укључују ациловање и укрштено купловање. Увођење пиперидинског моста значајно је због додатна два атома азота, који потенцијално могу остваривати додатне интеракције у активном месту ензима. Поред тога, секундарна аминок група која би на овај начин била део моста, погодна је за даље модификације реакцијама *N*-алкиловања, *N*-ариловања и *N*-ациловања. Применом клик-хемије планирана је даља модификација ових једињења увођењем триазолског прстена између 4-аминопиперидинског и тетрахидроакридинског структурног мотива, чиме се добија другачији мост који додатно, или на други начин, може интераговати са везивним местом ензима у циљу постизања оптималније фармаколошке активности.

На сличан начин је осмишљена и синтеза друге групе једињења у оквиру ове докторске дисертације. Халкони су природна једињења биљног порекла која се одликују широким спектром фармаколошких активности. Циклични деривати халкона – као што су деривати 2-бензилиден-1-тетралона показали су добру инхибиторну активност према *MAO-B*.⁸

Деривати бензимидазола представљају важну класу хетероцикличних једињења који се као фармакофоре могу бити нађени у једињењима са различитом фармаколошком активношћу.⁹ У литератури су описани бројни примери новосинтетисаних једињења који садрже бензимидазолски прстен а који делују на више патолошких промена код Алцхајмерове болести, као што су холинергичка дисфункција, оксидативни стрес и таложење β -амилоидног пептида.¹⁰ У овом истраживању, планирано је да се реакцијама циклизације различито супституисаних 1,2-фенилендиамина добије серија структурно различитих бензимидазола, што даје могућност анализе односа структуре и фармаколошке активности добијених деривата.

4. Циљеви истраживања и очекивани резултати

Научни циљеви овог истраживања су:

- 1) Развој и оптимизација синтетског пута за добијање нових хибрида 1,2,3,4-тетрахидро акридина и циметне киселине.
- 2) Развој и оптимизација синтетског пута за добијање нових хибрида бензимидазола и 2-бензилиден-1-тетралона.
- 3) Испитивање фармаколошке активности новосинтетисаних једињења *in vitro* проценом њихове инхибиторне активности према *AChE* и *BuChE*, при чему ће једињења са најбољим фармаколошким профилем бити додатно испитана на инхибиторну активност према *MAO-B*.
- 4) Испитивање и анализа начина везивања и начина интеракција које новосинтетисана једињења остварују са активним местом ензима методама компјутерске хемије као што је молекулски докинг, коришћењем доступних кристалних структура ензима. Ова *in silico* студија омогућиће увид у просторни распоред лигананда у ензимском активном месту и идентификацију важних нековалентних интеракција. Добијени резултати биће коришћени за тумачење експериментално утврђене инхибиторне активности, што ће омогућити детаљну анализу односа структура–активност, са циљем проналажења кључних структурних фактора који утичу на ефикасност инхибиције.

5. Методе истраживања

У оквиру истраживања користиће се стандардне лабораторијске технике и методе органске синтезе. Планиране су различите трансформације функционалних група, укључујући реакције као што су редукција, редуктивно аминовање, *N*-ациловање, алкиловање, *Buchwald-Hartwig*-ово укрштено купловање, алдолна кондензација, циклоадиција, као и реакције формирања веза угљеник–хетероатом. У зависности од структуре полазних једињења и услова реакције, по потреби ће се спроводити и заштита одређених функционалних група ради селективног одвијања синтетичких корака. Добијена једињења биће пречишћена стандардним лабораторијским методама као што су “*dry-column*

flash” хроматографија и препаративна танкослојна хроматографија. Структурна карактеризација биће извршена применом спектроскопских метода као што су *1D* и *2D* експерименти нуклеарне магнетне резонанције (NMR) и то: *1H*, *13C*, *APT*, *DEPT*, *NOESY*, *HMBC* и *HSQC*, затим масеном спектроскопијом високе резолуције (*HRMS*) и инфрацрвеном спектроскопијом (*IR*).

Инхибиторна активност новосинтетисаних једињења према холинестеразама, као и кинетичка испитивања механизма инхибиције, биће одређивани *in vitro* применом *Ellman*-ове спектрофотометријске методе. У испитивањима ће се користити комерцијално доступне ацетилхолин-естераза (тип *VI-S*) изолована из електричне јегуље, као и бутирилхолин-естераза изолована из коњског серума. Инхибиторна активност према *MAO-B* ће се одредити стандардизованим флуоресцентним тестом уз употребу рекомбинантног хуманог *MAO-B* ензима.

За спровођење компјутерских докинг симулација користиће се кристалне структуре циљних ензима преузете из јавно доступне базе *Protein Data Bank (PDB)*. Структуре испитиваних лиганата биће доковане у активна места одабраних ензима, при чему ће лигандима бити омогућена конформациона флексибилност, док ће протеинска структура бити третирана као семи-ригидна или ригидна, у зависности од примењеног протокола.

6. Литература

1. M. Girek, P. Szymanski, Tacrine hybrids as multi-target-directed ligands in Alzheimer’s disease: influence of chemical structures on biological activities. *Chemical Papers* **2018**, Volume 73, pages 269–289.
<https://doi.org/10.1007/s11696-018-0590-8>
2. V. Francesconi, A. Carbone, G. La Spada, D. Odino, C. Canale, A. Relini, S. Pricl, M. Catto, M. Tonelli, Assessing the Multitarget Therapeutic Potential of Novel 9-Aminoacridine Derivatives for Alzheimer’s Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2026**, 17, 2, 423–439.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.5c00839>
3. G. Marucci, M. Buccioni, D. Dal Ben, C. Lambertucci, R. Volpini, F. Amenta, Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer’s disease. *Neuropharmacology* **190** **2021**, 108352.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>
4. D. Zou, R. Liu, Y. Lv, J. Guo, C. Zhang, Y. Xie, Latest advances in dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase B against Alzheimer’s disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2023**, Volume 38.
<https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2270781>
5. S. Schedin-Weiss, M. Inoue, L. Hromadkova, Y. Teranishi, N. Goto Yamamoto, B. Wiehager, N. Bogdanovic, B. Winblad, A. Sandebring-Matton, S. Frykman, L. O. Tjernberg, Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated

with γ -secretase and regulates neuronal amyloid β -peptide levels. *Alzheimer's Research & Therapy* **2017**, Volume 9, 57.

<https://doi.org/10.1186/s13195-017-0279-1>

6. Y. Liu, Z. Zhang, Z. Zhu, Y. Yang, W. Peng, Q. Chen, S. Mak, K. Wahkeung Tism, R. Pi, Cinnamic Acid Derivatives: Recent Discoveries and Development Strategies for Alzheimer's Disease. *Bentham science, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2025**, Vol. 25, No. 2.
<http://dx.doi.org/10.2174/0113895575330648240819112435>
7. Z. Sang, K. Wang, P. Bai, A. Wu, J. Shi, W. Liu, G. Zhu, Y. Wang, Y. Lan, Z. Chen, Y. Zhao, Z. Qiao, C. Wang, Z. Tan, Design, synthesis and biological evaluation of novel O-carbamoyl ferulamide derivatives as multi-target-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* 194 **2020**, 112265.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112265>
8. K. T. Amakali, L. J. Legoabe, A. Petzer, J. Petzer, Synthesis and Evaluation of 2-benzylidene-1-tetralone Derivatives for Monoamine Oxidase Inhibitory Activity. *Bentham science, Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, **2018**, 18, 136-149.
<http://dx.doi.org/10.2174/1871524918666180501121638>
9. C. S. Wei Law, Z. Ying Ha, X. Brazzolotto, K. Y. Yeong, Structure-guided design and synthesis of selective butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1360 **2026**, 145611
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2026.145611>
10. R. Nath, S. Bhattacharjee, S. Ashique, S. Panda, N. Jyoti Maiti, Md J. Akhtar, I. Debnath, Md S. Hussain, B. Debnath, J. Rajjak Attar, S. Yasmin, M. Yousuf Ansari, Therapeutic potential of nitrogen-containing heterocyclic compounds in Alzheimer's disease: From molecular design to SAR studies. *Journal of Molecular Structure* 1354 **2026**, 144837.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2025.144837>