



Università degli Studi di Genova
Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche
Dipartimento di Farmacia
Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Tesi Sperimentale di Laurea

**Sintesi di derivati citisinici
con potenziale attività multitarget
sul sistema colinergico**

Relatore:

Prof. **Bruno Tasso**

Candidata:

Lucia Zanolo

Anno accademico 2019-2020

INDICE

1. Introduzione	1
2. Ipotesi colinergica del morbo di Alzheimer	4
2.1. Acetilcolina – neurotrasmettitore della sinapsi colinergica: sintesi, rilascio, inattivazione e recupero	7
2.2. Acetilcolinesterasi (AChE)	10
2.3. Recettori colinergici	12
2.3.1. Recettori muscarinici (mAChR)	12
2.3.2. Recettori nicotinici (nAChR)	14
2.4. Interazioni tra sistema colinergico e altre caratteristiche fisiopatologiche del morbo di Alzheimer	15
2.5. Sistema colinergico e fattore di rischio genetico APOE	18
3. Ruolo della terapia colinergica per il morbo di Alzheimer	19
3.1. Problemi associati all'uso degli inibitori della acetilcolinesterasi	24
3.1.1. Periodo di inizio dell'assunzione degli AChEI	25
3.1.2. Dosaggio degli AChEI	26
3.1.3. Passaggio della barriera emato-encefalica e concentrazione nel sistema nervoso centrale degli AChEI	27
4. Dai farmaci a singolo bersaglio ai ligandi multitarget	30
4.1. Ibridi della tacrina	31
4.2. Ibridi tacrina / iperoxo	32
4.3. Ibridi tacrina / xanomelina	34
4.4. Ibridi 77-LH-28-1 / xanomelina	35
4.5. Progettazione di ibridi per il recettore nicotinico: ibridi 1-(2-metossi benzil)piperazincarbazolici	36
5. Prospettive per gli inibitori delle colinesterasi	38
6. Obiettivo della Tesi	39
7. Parte sperimentale chimica	46
8. Parte sperimentale biologica	58
Bibliografia	59

1. Introduzione

Il morbo di Alzheimer (AD) rappresenta la principale forma di demenza correlata all'età; clinicamente è caratterizzato da un declino cognitivo generale che comporta perdita di memoria e dell'orientamento visuospatiale, alterazione delle capacità di giudizio, difficoltà di comunicazione e di ragionamento.

E' una sfida sanitaria importante, in continua crescita in tutto il mondo [1,2]. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), a livello globale, oltre 30 milioni di persone sono affette da AD e questo numero è destinato a duplicarsi ogni vent'anni fino a raggiungere i 66 milioni nel 2030 e circa 115 milioni entro il 2050. Il costo totale stimato a livello mondiale per la cura dei pazienti affetti da AD nel 2018 è di circa 1 trilione di dollari, corrispondente all'1,2% del prodotto interno lordo mondiale; questa cifra salirà a 2 trilioni di dollari all'anno entro il 2030; costi che possono indebolire lo sviluppo sociale ed economico e potrebbero travolgere i servizi sanitari e sociali [3]. Inoltre questa malattia multifattoriale non è più un problema solo per i paesi ad elevato sviluppo. Più dei due terzi di tutti i pazienti affetti da demenza vivono in India, Brasile e Cina, e tale percentuale aumenterà a tre quarti entro il 2050.

L'elevato onere individuale, familiare, sociale e finanziario, determinato dall'AD, richiede la progettazione e la realizzazione di piani complessi e critici. Di conseguenza, la maggior parte degli stati e molte organizzazioni internazionali hanno elaborato differenti strategie per cercare di risolvere tale problema [4]; in questo ambito numerosi studi basati su modelli matematici stanno cercando di prevedere lo sviluppo di questa malattia nella popolazione [5-8]. Un recente studio, basato su simulazioni al computer, sulle previsioni e l'evoluzione dei costi di trattamento e cura dei pazienti affetti da AD nei paesi europei, associati all'introduzione di farmaci nelle diverse fasi della malattia ha rivelato che

qualsiasi coinvolgimento che estenderà la durata del "mantenimento" di un paziente nella fase lieve, moderata o grave della malattia porterà a costi aggiuntivi di assistenza, a causa dell'aumento della percentuale di persone affette da AD. Pertanto, prolungare la durata della vita è essenziale soprattutto in termini di miglioramento della qualità della vita dei pazienti; inoltre l'introduzione di nuovi farmaci deve prendere in considerazione anche i possibili costi supplementari imposti ai servizi sanitari e quindi alla società [9].

A differenza delle forme autosomiche dominanti ad esordio precoce del morbo di Alzheimer, che sono direttamente collegate ad anomalie della β -amiloide, la cascata di eventi fisiopatologici che porta al morbo di Alzheimer ad esordio tardivo non è ancora pienamente compresa. Le attuali evidenze suggeriscono che il morbo di Alzheimer ad esordio tardivo è una complessa malattia poligenica che comporta un'interazione aberrante tra diverse vie molecolari. Per definizione, l'età è il maggiore fattore di rischio [10] seguito dall'allele $\epsilon 4$ dell'apolipoproteina E (APOE $\epsilon 4$) [11,12] probabilmente anche da fattori di rischio cardiovascolari e di stile di vita [13].

I tratti distintivi neuropatologici del sistema nervoso centrale osservati nell'AD sono le placche extracellulari di β -amiloide ($A\beta$), conseguenza della scissione aberrante della proteina transmembrana precursore della β -amiloide (APP), l'accumulo di grandi quantità intracellulari di grovigli neurofibrillari, costituiti da proteina tau, angiopatia amiloide cerebrale, disfunzione cellulare gliale, lesioni sinaptiche e neuronali [14,15] che alla fine causano una massiccia perdita di sinapsi, dendriti e infine neuroni. L'espressione clinica della malattia riflette la disfunzione e la possibile perdita delle reti neurali sia neurochimiche che strutturali, in particolare del "sistema colinergico".

Sebbene gli eventi cardine della patogenesi del morbo di Alzheimer non siano pienamente compresi, negli ultimi anni, una vasta serie di ricerche ha descritto diversi meccanismi patogenetici alla base delle cause dell'AD che comprendono la degenerazione neuronale colinergica, l'ipotesi della cascata amiloide, la fosforilazione della proteina tau, la

neuroinfiammazione, lo stress ossidativo, lo squilibrio del calcio, la disregolazione del metabolismo del ferro, la riduzione dell'utilizzo del glucosio, alterazioni delle vie di segnalazione dell'insulina, l'anomala omeostasi del colesterolo e la disfunzione mitocondriale [16-21].

Queste diverse teorie sulla biologia di base della neurodegenerazione hanno guidato la ricerca ad interventi terapeutici per modificare, arrestare o ritardare la progressione della malattia e delle sue manifestazioni cliniche. Negli ultimi anni, tuttavia, il fallimento degli studi clinici è stata la regola piuttosto che l'eccezione, e nessun nuovo farmaco per il morbo di Alzheimer è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti dal 2003. La fisiopatologia multifattoriale e progressiva del morbo di Alzheimer suggerisce una probabile necessità di trattamenti combinati che potrebbero variare da una fase all'altra della malattia, e forse anche da un paziente all'altro.

Secondo una delle più accreditate teorie, quella colinergica, lo sviluppo dei sintomi del morbo di Alzheimer è principalmente correlato ad alterazioni strutturali nelle sinapsi colinergiche, alla perdita di sottotipi specifici di recettori dell'acetilcolina (ACh), alla morte dei neuroni che rilasciano acetilcolina e, di conseguenza, al deterioramento della neurotrasmissione colinergica [22].

Non esistono opzioni terapeutiche efficaci per la maggioranza dei pazienti e le cause principali della malattia non sono ancora state identificate, ad eccezione di un numero minore di casi familiari prodotti da mutazioni genetiche. Le strategie farmacoterapeutiche per il trattamento dell'AD possono essere classificate in tre categorie generali: (i) terapie che inibiscono l'insorgenza di questa condizione individuando ed influenzando i principali fattori causali; (ii) trattamenti che modificano la malattia, causando l'interruzione o l'inversione della progressione della patologia; e (iii) trattamenti sintomatici che agiscono sui sintomi cognitivi della malattia, proteggendo i pazienti da peggioramento

dell'insufficienza cognitiva [2,22].

L'attuale approccio farmacoterapeutico basato sugli inibitori delle colinesterasi offre un possibile bersaglio terapeutico per la stabilizzazione parziale della funzione cognitiva, il miglioramento della qualità della vita e la moderazione del peso delle cure dei pazienti, poiché il danno dei neuroni colinergici rappresenta un evento costante e primario negli stati della malattia [1,23]. Tuttavia, questi composti offrono risultati positivi per un breve periodo di tempo, di solito 1-3 anni, e non sono in grado di influenzare l'evoluzione della malattia [24]. Nei paragrafi successivi viene descritta una sintesi dell'attuale comprensione del coinvolgimento del sistema colinergico nella progressione del morbo di Alzheimer, soprattutto in relazione al recente stato degli inibitori delle colinesterasi disponibili come opzione terapeutica.

2. Ipotesi colinergica del morbo di Alzheimer

Le prime evidenze che supportavano l'ipotesi colinergica della malattia di Alzheimer sono arrivate a metà degli anni '70 con studi che evidenziarono significativi deficit neocorticali di colina acetiltransferasi (ChAT), l'enzima responsabile della sintesi dell'acetilcolina [25]. I successivi riscontri della diminuzione dell'assorbimento della colina e del rilascio di acetilcolina e della mancanza di corpi cellulari colinergici dal lobo frontale basale hanno confermato un'importante compromissione colinergica presinaptica [26]. La neurotrasmissione colinergica ha dimostrato di essere implicitamente coinvolta in una serie di importanti processi psichici come la memoria, l'apprendimento, il risveglio, il sonno, la risposta allo stress e l'affettività [18,27].

L'ipotesi colinergica ha rivoluzionato il campo della ricerca sul morbo di Alzheimer trasportandola dalla neuropatologia descrittiva al concetto moderno di neurotrasmissione sinaptica. Essa si basa su tre pietre miliari: 1) la scoperta dell'impoverimento dei marcatori colinergici presinaptici nella corteccia cerebrale [28,28]; 2) la scoperta che il nucleo basale

di Meynert (NBM) nel proencefalo basale è la fonte dell'innervazione corticale colinergica che subisce una grave neurodegenerazione nella malattia di Alzheimer [30,31]; 3) la dimostrazione che gli antagonisti colinergici compromettono la memoria mentre gli agonisti hanno l'effetto opposto [32]. L'ipotesi ha ricevuto una validazione quando le terapie di inibizione della colinesterasi hanno dimostrato di indurre un significativo miglioramento sintomatico nei pazienti con malattia di Alzheimer [33].

Per quanto riguarda l'alterazione del sistema colinergico centrale, ci sono state ricerche sull'attività dell'enzima ChAT e sul rapporto tra l'assorbimento della colina e il livello di tale enzima, che non aumenta significativamente tranne in alcune regioni del cervello, ma che è generalmente inferiore rispetto ai livelli presenti nel cervello dei soggetti di controllo, così come sulla possibilità di ottimizzare il livello di acetilcolina cerebrale utilizzando precursori dell'acetilcolina o inibitori delle colinesterasi. A livello cellulare, la carenza neuronale di colina inizialmente suggerita da Wurtman [34] e attestata da alcune scoperte come una diminuzione del 40%-50% del livello di acetilcolina cerebrale, una diminuzione dei costituenti della membrana colina-dipendenti e un aumento dei suoi metaboliti, sono considerate un possibile elemento patogenico per la demenza e per l'Alzheimer. È stato ipotizzato che, in condizioni di carenza di colina, per il recupero della colina necessaria, avviene un vero e proprio "auto-cannibalismo" della colina di membrana, che favorisce la rottura della membrana cellulare con il rilascio di enzimi causando una proteolisi anomala della proteina precursore della β -amiloide e la formazione della proteina amiloide A β 42, altamente dannosa per il suo effetto sulla degenerazione neuronale [18,26,34,35]. L'ipotesi patogenetica riguardante la carenza di colina ha almeno due corollari: uno diagnostico, per la possibilità di determinare la concentrazione di derivati della colina nel liquido cerebrospinale (CSF), e l'altro terapeutico utilizzando inibitori del canale del potassio al fine di migliorare la sintesi della colina e aumentare l'assorbimento di acetilcolina. L'efficacia terapeutica dell'aumento del livello di acetilcolina cerebrale è possibile a causa

della relativa e parziale conservazione dei recettori colinergici muscarinici, in particolare M1, anche nelle aree colpite da ipoperfusione e ipometabolismo [36,37].

Il deficit neurochimico più importante nell'AD è la compromissione dell'acetilcolina. La base anatomica del deficit colinergico è l'atrofia e la degenerazione dei neuroni colinergici subcorticali, specialmente quelli nel lobo frontale basale (nucleus basalis magnocellularis di Meynert) che forniscono l'innervazione colinergica della corteccia cerebrale. La carenza selettiva di acetilcolina in caso di AD, così come l'osservazione che gli antagonisti colinergici centrali come l'atropina possono indurre uno stato di confusione che ha alcune somiglianze con lo stato di demenza presente in caso di Alzheimer, hanno portato all'emergere dell'ipotesi colinergica in cui la carenza di acetilcolina è cruciale nell'insorgenza dei sintomi della malattia [18].

L'acetilcolina è stato il primo neurotrasmettitore identificato. Essa è utilizzata da tutti i neuroni colinergici con un ruolo importante nel sistema nervoso centrale e periferico. Sia i neuroni parasimpatici pre- che postgangliari, i neuroni simpatici pregangliari e alcuni neuroni simpatici postgangliari utilizzano l'acetilcolina come neurotrasmettitore. Le sinapsi colinergiche sono diffuse nel sistema nervoso centrale, evidenziando che la neurotrasmissione colinergica è responsabile della modulazione di importanti funzioni neuronali [25,27].

Sebbene altri meccanismi fisiopatologici abbiano ricevuto maggiore attenzione negli ultimi anni, i trattamenti che migliorano la funzione colinergica rimangono fondamentali nella gestione dei pazienti con malattia di Alzheimer. Per tale motivo è importante caratterizzare la natura della lesione colinergica nel morbo di Alzheimer, le sue potenziali interazioni con altri componenti della patologia e la sua rilevanza per il trattamento. Occorre sottolineare che il cervello contiene diversi percorsi colinergici, ciascuno con il proprio profilo recettoriale, i propri bersagli postsinaptici e la propria vulnerabilità.

2.1. Acetilcolina - neurotrasmettitore della sinapsi colinergica: sintesi, rilascio, inattivazione e recupero

L'acetilcolina è un importante neurotrasmettitore presente nel sistema nervoso centrale, con attività in tutta la corteccia, nei gangli basali e nel proencefalo basale [38]. La Figura 1 illustra i passaggi chiave nella sintesi, nel rilascio e nel reuptake del neurotrasmettitore acetilcolina.

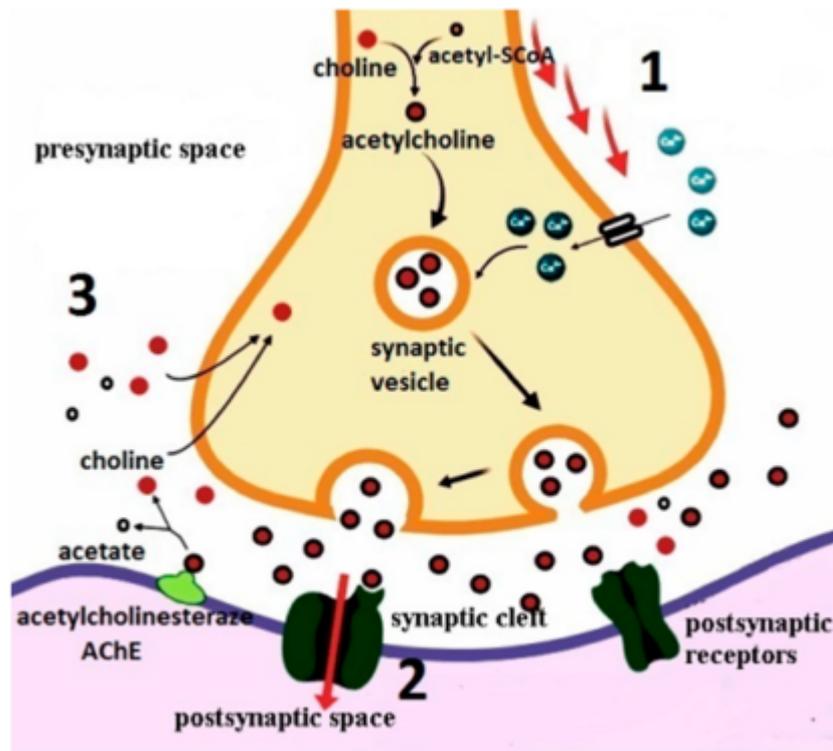


Figura 1. Rappresentazione schematica del processo di rilascio dell'acetilcolina e della sua attività nella sinapsi colinergica. (1) Potenziale d'azione che causa l'afflusso di Ca^{2+} e il successivo aggancio della membrana delle vescicole sinaptiche; (2) l'acetilcolina si lega ai recettori avviando una depolarizzazione nella cellula post-sinaptica; (3) l'AChE catalizza la degradazione dell'acetilcolina e le molecole di colina vengono riassorbite dal neurone presinaptico. [Tratto da G.D. Stanciu et al., *Biomolecules*, 2020, 10, 40]

La neurotrasmissione colinergica si basa su proteine coinvolte nella sintesi, immagazzinamento, trasporto e degradazione dell'acetilcolina. Questa è sintetizzata per circa il 20% nel citoplasma dei neuroni colinergici a partire dalla colina e dall'acetato mentre la maggior parte (80%) è sintetizzata nei bottoni terminali [39]. La colina proviene dall'esterno del neurone (risultato della degradazione lipidica, specialmente della lecitina,

così come dall'idrolisi dell'acetilcolina) e viene catturata dalla terminazione assonale attraverso l'intervento di uno specifico meccanismo di trasporto. L'acetil-coenzima A (acetil-CoA) è formato a partire dal piruvato nei mitocondri. L'esterificazione della colina con il radicale acetile è catalizzata dalla ChAT, un enzima solubile, presente in alta concentrazione nel citoplasma delle terminazioni nervose colinergiche; la sua attività è regolata dalla depolarizzazione neuronale, dall'afflusso di ioni calcio e dalla fosforilazione dell'enzima (Figura 1) [26,27,39].

Il rilascio di acetilcolina avviene per esocitosi delle vescicole sinaptiche. Esse si fondono con la membrana presinaptica, rilasciando il loro contenuto di neurotrasmettitore nella fessura sinaptica dove lo stesso neurotrasmettitore può attivare sia i recettori muscarinici che nicotinici. Le membrane delle vescicole incorporate ampliano temporaneamente la superficie della membrana neuronale, per poi sottoporsi ad un processo di endocitosi, ripristinando la formazione vescicolare nel citoplasma della terminazione della cellula nervosa [18,40]. L'impulso nervoso aumenta notevolmente il rilascio di acetilcolina, raggiungendo una quantità biologicamente attiva. L'attività di rilascio è dovuta all'afflusso di ioni calcio, che si verifica a seguito dell'apertura dei canali lenti nella membrana presinaptica, controllata dalla depolarizzazione [18,26]. L'acetilcolina attraversa lo spazio sinaptico, protetta in parte dall'enzima che la idrolizza, l'AChE, da alcuni componenti della membrana post-sinaptica oppure grazie all'inibizione causata dall'eccesso del substrato.

La molecola di acetilcolina presenta un'estremità cationica, che entra in un sito anionico della superficie attiva del recettore e un gruppo estereo, che interagisce con un sito acilico [41]. L'acetilcolina rilasciata dal complesso del recettore colinergico viene rapidamente idrolizzata e inattivata da parte dell'acetilcolinesterasi, un enzima presente nella fessura sinaptica, probabilmente legato alla lamina basale. Successivamente all'idrolisi dell'acetilcolina, la colina viene ricaptata nei neuroni colinergici presinaptici attraverso un sistema di trasporto attivo [27,42].

Studi sull'uomo che valutano la diagnosi neuropatologica del morbo di Alzheimer hanno dimostrato che la lesione colinergica, che emerge già nelle fasi asintomatiche o prodromiche della malattia, è principalmente presinaptica piuttosto che postsinaptica. In altre parole, la perdita colinergica si basa sulla degenerazione dei neuroni colinergici del NBM e degli assoni che proiettano alla corteccia cerebrale. Nell'ambito della lesione colinergica, anche i recettori nicotinici (ionotropici) e i recettori muscarinici (metabotropici) della corteccia cerebrale subiscono cambiamenti. La maggior parte degli studi mostra una perdita di recettori nicotinici nella corteccia cerebrale. Ad esempio, vi è una diminuzione dei recettori nicotinici postsinaptici sui neuroni corticali [43,44]. Tuttavia, potrebbe esserci anche una componente presinaptica altrettanto importante basata sulla perdita di recettori nicotinici situati sugli assoni colinergici degenerati provenienti dal NBM. Per quanto riguarda i recettori muscarinici della corteccia cerebrale, è interessante notare che i recettori muscarinici M1 (per lo più postsinaptici) non sono diminuiti mentre i recettori M2 (per lo più presinaptici) sono diminuiti [45]. Tuttavia, i restanti recettori postsinaptici M1 della corteccia cerebrale possono essere disfunzionali [46]. Pertanto, una progressiva perdita di neuroni colinergici basali rappresenta un evento neurochimico chiave con una successiva deafferentazione colinergica corticale anterograda, della corteccia cerebrale, dell'ippocampo e dell'amigdala [47]. La possibilità alternativa di una degenerazione iniziale delle terminazioni colinergiche corticali che portano a una degenerazione retrograda dei neuroni del NBM non può essere esclusa ma è improbabile.

Come notato in precedenza, a differenza dei recettori M1, che sono per lo più conservati, c'è una perdita di recettori nicotinici corticali. Il recettore nicotinico postsinaptico $\alpha 7$ migliora la velocità di scarica neuronale contribuendo al potenziamento ippocampale a lungo termine, una componente neuronale dell'apprendimento e della memoria [48]. L'applicazione di agonisti e antagonisti colinergici ai segmenti ippocampali del ratto ha chiarito il ruolo dell'acetilcolina nel potenziamento a lungo termine [49,50]. Pertanto, è

probabile che alterati modelli di distribuzione del recettore nicotinico e muscarinico nella malattia di Alzheimer influenzino molte funzioni della corteccia cerebrale e delle aree limbiche attraverso perturbazioni della fisiologia sinaptica. Un sovraregolazione dell'espressione neuronale della colina acetiltransferasi corticale è stata evidenziata nei pazienti con morbo di Alzheimer prodromico, suggerendo che tali eventi neurochimici possono compensare l'esaurimento dei neuroni colinergici basali [51]. Inoltre, è stato dimostrato che i pazienti affetti dal morbo di Alzheimer hanno livelli più elevati di espressione del gene nicotinico $\alpha 7$ rispetto ai controlli sani. L'influenza di questi cambiamenti dinamici sulla patogenesi della malattia di Alzheimer deve ancora essere pienamente chiarita.

Ci sono anche evidenze che coinvolgono l'acetilcolina in una varietà di funzioni essenziali che promuovono la neuroplasticità indotta dall'esperienza, la sincronizzazione dell'attività neuronale e la connettività delle reti neurali. Ad esempio, la stimolazione variabile del NBM del ratto, un'area ricca di acetilcolina del proencefalo basale con estese proiezioni alla corteccia, ha dimostrato di produrre un ampio rimodellamento corticale [52]. Attraverso l'innervazione intrinseca (NBM) ed estrinseca (nervo simpatico postgangliare perivascolare), il sistema colinergico ha anche dimostrato di promuovere vasodilatazione [53,54]. Nei topi, la stimolazione elettrica e chimica dei neuroni colinergici nel NBM si traduce in un aumento significativo del flusso sanguigno cerebrale in diverse aree corticali [55-59]. Oltre ad interrompere la trasmissione sinaptica nella corteccia e nelle aree limbiche, la lesione colinergica del morbo di Alzheimer può quindi interferire anche con molteplici aspetti della neuroplasticità e con i processi emodinamici cerebrali.

2.2. Acetilcolinesterasi (AChE)

Ad oggi l'AChE rappresenta l'obiettivo biologico più importante per il miglioramento sintomatico dell'AD. Esistono due tipi di colinesterasi, l'acetilcolinesterasi (presente

principalmente nel sangue e nelle sinapsi neuronali) e la butirrilcolinesterasi (presente principalmente nel fegato); una delle differenze tra i due sistemi enzimatici è rappresentata dai loro substrati [23,35]. L'acetilcolinesterasi esiste in due forme molecolari generali: semplici oligomeri di omomeri formati da subunità catalitiche (monomeri, dimeri e tetrameri) e associazioni eteromeriche di subunità catalitiche con diverse subunità strutturali. Le forme omomeriche sono presenti nella cellula come specie solubili, probabilmente destinate all'esportazione o all'associazione con la membrana cellulare, di solito unite mediante un gruppo glicofosfolipidico [60]. Una forma eteromericamente presente nelle sinapsi neuronali è un tetramero di subunità catalitiche legate tramite ponti disolfuro ad una subunità di 20.000 Da legata ad un lipide e situata sulla superficie esterna della membrana cellulare. L'altra forma eteromericamente consiste di tetrameri di subunità catalitiche, collegati da ponti disolfuro a ciascuna delle tre catene di una subunità con struttura simile al collagene. Questa specie molecolare con una massa molecolare di circa 106 Da è associata alla lamina basale delle membrane del muscolo scheletrico. La clonazione molecolare ha dimostrato che un singolo gene codifica per l'acetilcolinesterasi dei vertebrati [23,25,26,42]. La porzione del gene che codifica per il centro catalitico dell'enzima è conservata. Pertanto, i diversi tipi di acetilcolinesterasi hanno identico substrato inibitorio ed uguale specificità [39,60].

Le colinesterasi sono una famiglia di proteine che condividono la struttura delle α,β -idrolasi. La famiglia comprende alcune esterasi, altre idrolasi, che non sono presenti nel sistema nervoso, e sorprendentemente proteine senza attività idrolitica come la tireoglobulina e membri delle famiglie di proteine del tatto e neuropeptidi [61]. La tirosina è più lontana dal centro attivo, ma probabilmente contribuisce alla stabilizzazione di alcuni ligandi. La triade catalitica e la tasca acilica si trovano alla base della depressione, mentre l'area periferica è ai margini della depressione. La depressione ha una profondità di 18-20Å con base centrosimmetrica rispetto alle subunità.

Il meccanismo catalitico è simile a quello di altre idrolasi; il gruppo ossidrilico della serina diventa altamente nucleofilo grazie ad un meccanismo di trasmissione della carica che coinvolge l'anione carbossilato del glutammato, l'anione imidazolo dell'istidina e l'anione ossidrilico della serina. Durante l'attacco enzimatico all'acetilcolina, che è un estere con geometria trigonale, si forma un intermedio tetraedrico tra l'enzima e il substrato [18,41]. L'acetilcolina si decompone in un coniugato acetilico dell'enzima con rilascio concomitante di colina. L'acetil-AChE è altamente sensibile al processo idrolitico che genera acetato e l'enzima attivo. L'AChE è uno degli enzimi più efficienti conosciuti: una molecola di AChE può idrolizzare 6×10^5 molecole di acetilcolina/minuto; quindi, il tempo di recupero dell'enzima è di 100 microsecondi [35,40].

2.3. Recettori colinergici

I recettori colinergici sono proteine "attive" delle membrane che delimitano lo spazio sinaptico essendo in grado di legare l'acetilcolina, innescando una serie di trasformazioni specifiche a livello della membrana o del citoplasma. L'acetilcolina, un neurotrasmettitore con funzioni modulatorie nel SNC, agisce attivando i recettori causando stimolazione o inibizione, a seconda del tipo neuronale e della localizzazione del recettore. I recettori dell'acetilcolina (recettori colinergici) sono stati suddivisi secondo i ligandi farmacologici selettivi (muscarina e nicotina), in muscarinico e nicotinico. Gli effettori cellulari di questi recettori sono canali ionici al sodio e proteine di membrana modulate dalle proteine G [18,23,35].

2.3.1. Recettori muscarinici (mAChR)

I recettori muscarinici fanno parte di un sistema complesso che include proteine G e secondi messaggeri. Sono marcatamente diversi da quelli nicotinici sia dal punto di vista funzionale che strutturale; sono glicoproteine con pesi molecolari intorno agli 80 kDa,

situate a livello di membrana come serpentine, formate da tre porzioni, accoppiate con una proteina G, in grado di modulare un'ampia varietà di canali ionici [62]. Sulla base di studi farmacologici e di metodi di clonazione genetica, sono stati identificati cinque sottotipi di recettori muscarinici: M1, M2, M3, M4 e M5. I recettori M1 si trovano a livello postsinaptico nei neuroni del SNC (della corteccia, dell'ippocampo, dello striato e dei nuclei basali), dei linfonodi vegetativi e dello stomaco. Il recettore M1 è accoppiato alla proteina G-stimolatoria (Gq), che appartiene alla famiglia delle proteine G [63]. Questi recettori agiscono sinergicamente con i recettori M3, producendo una serie di effetti che possono influenzare i processi cognitivi. I recettori M2 si trovano sulla membrana postsinaptica (miocardio e cervello) e sulla membrana presinaptica (agendo come autorecettori) e sono accoppiati con una proteina G inibitoria (Gi) [18]. I recettori M3 sono presenti a livello centrale, specialmente nelle strutture cerebellari, e sono accoppiati con la proteina Gq. I recettori M4, generalmente situati a livello presinaptico, agiscono come autorecettori e regolano il rilascio di acetilcolina o come eterorecettori modulando la trasmissione sinaptica. I recettori M5 sono situati prevalentemente a livello periferico (muscolatura liscia) [40,61]. La stimolazione dei recettori muscarinici da parte dell'agonista fisiologico (acetilcolina), o da parte di quelli farmacologici di tipo muscarinico, influenza due sistemi effettori e due vie metaboliche: adenilato ciclasi e fosfolipasi C. La fosfolipasi C (PLC) è modulata dalla proteina Gq; a seguito dell'attivazione, la PLC catalizza il metabolismo [35,62] del fosfatidilinositolo difosfato con formazione di secondi messaggeri: inositolo trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG). IP3 causa il rilascio di ioni calcio depositati nel reticolo citoplasmatico; gli ioni calcio raggiungono il citoplasma dove formano un complesso con la calmodulina e attivano la chinasi calcio-calmodulina-dipendente che svolge una funzione nella fosforilazione di proteine intracitoplasmatiche; questo evento determina un processo di stimolazione cellulare. L'adenilato ciclasi, modulata dalla proteina (Gi) che provoca la sua inibizione,

diminuisce la biosintesi e la concentrazione di adenosina monofosfato ciclico (cAMP), secondo messaggero intracellulare, e determina l'inibizione dei canali del calcio con conseguente ridotta eccitabilità cellulare [22,40,63].

2.3.2. Recettori nicotinici (nAChR)

I recettori nicotinici si trovano in diverse strutture, tra cui il SNC, i linfonodi e i muscoli.

Ogni recettore è composto da cinque diverse subunità: α , β , γ (fetale), δ , e ϵ (adulto) e funziona come un canale ionico con un cancello regolato dal ligando [64]. Sono stati identificati tre tipi di recettori nicotinici: N1, N2 e N3. Quelli situati nei muscoli e nei linfonodi (N1 e N2) sono composti da due subunità α e una subunità ciascuna di tipo β , γ e δ , mentre quelle situate a livello del SNC (N3) sono formate combinando due tipi di subunità [65]. Ci sono varie forme complesse di recettori nicotinici, ma nel sistema nervoso centrale solo due sottotipi sono i più rappresentativi: uno costituito da subunità $4\alpha 2\beta$ con un'elevata affinità per nicotina e citisina e un altro sottotipo di cinque subunità 7α con una minore affinità per la nicotina, con la subunità 7α che è la più diffusa [64,65]. Ogni recettore nicotinico può avere proprietà e funzioni diverse. Nel SNC, la maggior parte dei recettori nicotinici sono espressi a livello della membrana neuronale presinaptica e hanno il ruolo di regolare il rilascio di neurotrasmettitori (compresa l'acetilcolina), a seguito del processo di stimolazione con l'aumento della concentrazione di calcio presinaptico [18]. I recettori N3 realizzano non solo il recupero e la trasmissione di informazioni da un neurone all'altro, ma anche la loro elaborazione. Numerosi studi hanno dimostrato che i livelli di questi recettori cambiano con l'età, quindi il loro numero è più alto nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, il che suggerisce che questi recettori possano svolgere un ruolo importante nella crescita, nello sviluppo e nell'invecchiamento [40]. A livello del SNC, sono distribuiti in alta percentuale nella corteccia cerebrale prefrontale, nell'ippocampo, nel nucleo basale e nel nucleo talamico reticolare. La

disfunzione di questi recettori è stata associata alla demenza di Alzheimer. Infatti questi recettori regolano la plasticità neuronale, la differenziazione, la proliferazione, l'apoptosi e l'eliminazione dei neuroni più anziani [23]. Inoltre, il sottotipo 7α ha un'elevata permeabilità per gli ioni calcio che con l'aumento della loro concentrazione e con la conseguente attivazione della proteina chinasi, che regola l'espressione genica e il livello delle proteine, portano a cambiamenti strutturali e funzionali dei neuroni. L'attivazione presinaptica di questi recettori è seguita da depolarizzazione della membrana, con aumento dell'esocitosi e rilascio massiccio di neurotrasmettitori (acetilcolina, dopamina, serotonina, glutammato, acido γ -amminobutirrico) [66,67].

2.4. Interazioni tra il sistema colinergico e altre caratteristiche fisiopatologiche del morbo di Alzheimer

I principali tratti distintivi patologici del morbo di Alzheimer comprendono non solo placche di β -amiloide e grovigli neurofibrillari, ma anche neuroinfiammazione, alterata resistenza all'insulina, stress ossidativo e anomalie cerebrovascolari. Questi tratti patologici distintivi hanno complesse interazioni reciproche con la lesione colinergica. Studi post-mortem hanno dimostrato che la perdita dell'innervazione colinergica corticale è associata, e probabilmente causata, dai grovigli neurofibrillari nel NBM [38,68,69]. I neuroni colinergici del proencefalo basale sono tra i corpi cellulari più suscettibili alla degenerazione neurofibrillare e alla formazione di grovigli neurofibrillari [38]. Esiste una relazione consolidata tra anomalie colinergiche e patologia β -amiloide. Perry et al. [70] hanno correlato la diminuzione dell'attività della colina acetiltransferasi, enzima che sintetizza l'acetilcolina, con un numero crescente di placche neuritiche nel cervello di pazienti con malattia di Alzheimer [70]. Questa correlazione è stata mostrata anche in persone cognitivamente non compromesse il cui cervello all'autopsia ha rivelato placche β -amiloidi. Più recentemente, è stata trovata una correlazione inversa tra l'attività della

colina acetiltransferasi e la deposizione di β -amiloide nella circonvoluzione temporale inferiore delle persone che avevano avuto una normale funzione cognitiva [71]. Inoltre, i marcatori presinaptici e postsinaptici dell'attività colinergica sono significativamente ridotti negli individui non dementi il cui cervello mostrava placche neuritiche durante l'autopsia, effetto ancora più pronunciato in individui dementi con malattia di Alzheimer patologicamente confermata [72]. Tuttavia diversi studi che indagavano le correlazioni regionali tra la perdita di assoni colinergici e la densità dei depositi di β -amiloide nel cervello umano affetto dal morbo di Alzheimer hanno mostrato risultati contrastanti. Sebbene la correlazione tra perdita colinergica e grovigli neurofibrillari (sia presinapticamente nell'NBM che postinapticamente nella corteccia) sia più forte, questa correlazione non è uniforme in tutto il cervello [72,73].

Esperimenti su animali hanno suggerito che l'impoverimento colinergico promuove la deposizione di β -amiloide e la patologia tau in modi che contribuiscono al deterioramento cognitivo [74]. Ad esempio, alcune lesioni selettive dei neuroni colinergici nel proencefalo basale dei modelli di roditori del morbo di Alzheimer sono associate ad una maggiore deposizione di β -amiloide e ad aumentati livelli di proteina tau iperfosforilata nell'ippocampo e nella corteccia. Questi tipi di effetti sono stati riportati in passato, ma sono stati difficili da replicare. È stato anche dimostrato che i deficit colinergici nel cervello di ratto interagiscono con meccanismi proinfiammatori acuti per produrre o esacerbare il deterioramento cognitivo [75].

La stimolazione dei recettori nicotinici $\alpha 7$ può avere un effetto protettivo contro la tossicità indotta dall'amiloide- β attraverso l'attivazione dell'asse PI3K-Ak, il fattore anti-apoptotico bcl2 e la sottoregolazione della glicogeno sintasi chinasi-3 (GSK3) [76]. La iperattivazione di GSK3 è correlata con alti livelli di oligomeri tossici di β -amiloide, con l'iperfosforilazione di tau e con i grovigli neurofibrillari [77,78]. L'attivazione del recettore

nicotinico $\alpha 7$ è associata a vie antinfiammatorie anche attraverso la sottoregolazione di NF κ B via Jak2 [79]. Nitsch e Mori [80,81] hanno dimostrato che la stimolazione dei recettori colinergici da parte di agonisti muscarinici o mediante trattamento con inibitori delle colinesterasi ha spostato il processamento della proteina precursore dell'amiloide (APP) verso la via non amiloidogena.

Ulteriori prove hanno dimostrato che gli agonisti muscarinici, principalmente M1 e meno M3, possono sottoregolare le vie amiloidogeniche e generanti la proteina tau. I meccanismi non sono ancora pienamente compresi. Tuttavia, è stato dimostrato che un agonista M1 può agire come attivatore funzionale della proteina chinasi C (PKC) segnale che, a sua volta, promuove uno spostamento metabolico verso l'attività dell' α -secretasi attraverso la sovraregolazione di ADAM17 [noto anche come fattore di necrosi tumorale- α -converting enzym (TACE)]. A sostegno di questa ipotesi, studi sugli animali hanno dimostrato che gli agonisti ortosterici M1-selettivi sono associati ad un aumento della scissione di APP da parte della α -secretasi [82,83]. Presumibilmente, il recettore nicotinico $\alpha 7$ e l'accoppiamento di M1 a PKC possono portare a una sottoregolazione dei processi cellulari dannosi che si verificano nel morbo di Alzheimer come l'iperfosforilazione di tau mediata da GSK3 [84].

La perdita del controllo vasomotorio della barriera emato-encefalica mediato dall'acetilcolina potrebbe anche potenzialmente portare ad aberranti diffusione e trasporto di metaboliti tra il fluido interstiziale e il CSF. Una possibile conseguenza di questo evento è la compromissione della clearance della β -amiloide dal cervello [85]. La deafferentazione colinergica può alterare la barriera emato-encefalica e la dinamica del drenaggio arterioso e perivascolare linfatico della β -amiloide [86].

Queste osservazioni illustrano le interazioni altamente complesse che possono esistere tra la denervazione colinergica e altre caratteristiche patologiche del morbo di Alzheimer [74,87-89]. Inoltre, rimangono da chiarire importanti relazioni neurofisiologiche con altri

importanti sistemi neurotrasmettitoriali (serotonergico, dopaminergico, GABAergico) e neuroormonali (renina-angiotensina) [90].

Le interazioni complesse tra i diversi sistemi neurotrasmettitoriali sono essenziali per le risposte adattive e i meccanismi compensatori sia in condizioni fisiologiche che fisiopatologiche. Ad esempio, l'attività del recettore nicotinic presinaptico $\alpha 7$ può facilitare il rilascio di glutammato, mentre l'attivazione dei recettori muscarinici può diminuire sia il rilascio che la concentrazione di glutammato nella fessura sinaptica [91]. Sebbene variazioni di neurotrasmettitori diversi dall'acetilcolina siano stati ampiamente dimostrati nel morbo di Alzheimer [92-94] va sottolineato che non sono stati approvati farmaci che agiscono selettivamente sui sistemi noradrenergico, serotonergico o GABAergico.

2.5. Sistema colinergico e fattore di rischio genetico APOE

L'allele APOE $\epsilon 4$ è il più forte fattore di rischio genetico per la malattia di Alzheimer sporadica ad insorgenza tardiva. La presenza di due alleli $\epsilon 4$ è collegata a disfunzioni nella proteostasi della β -amiloide e della proteina tau [11,12], ridotta eliminazione, modificazioni post-traduzionali aberranti (cioè iperfosforilazione), disfunzione mitocondriale e processi neuroinfiammatori nell'invecchiamento e nel morbo di Alzheimer. L'allele APOE $\epsilon 4$ è fortemente correlato con un declino cognitivo e funzionale più veloce [95]. Non è ancora chiaro se la presenza dell'allele APOE $\epsilon 4$ influisce sul funzionamento neuronale nel NBM, e se ciò accade indirettamente attraverso l'accumulo di β -amiloide e proteina tau nel proencefalo basale. Ad oggi, solo due studi retrospettivi post-mortem hanno dimostrato che sia individui anziani sani che pazienti con malattia di Alzheimer lieve, portatori dell'allele $\epsilon 4$, avevano una ridotta attività metabolica neuronale nel NBM, misurata tramite la dimensione dell'apparato di Golgi [96,97]. Studi precedenti hanno dimostrato che il genotipo di APOE non influenza in modo significativo l'entità

della risposta agli inibitori della colinesterasi in casi di Alzheimer lieve-moderato [98,99]. Questi studi soffrono di limitazioni metodologiche che potrebbero aver notevolmente influenzato i risultati. In particolare, diversi fattori potenzialmente confondenti non sono stati presi in considerazione cioè stadio dei processi fisiopatologici, background farmacogenomico e comorbidità. È interessante notare che è stato recentemente dimostrato che il genotipo APOE può influenzare i meccanismi di compensazione colinergica. In particolare, l'allele APOE ε4 è associato a deficit nelle risposte di compensazione colinergica nell'ippocampo e nel rimodellamento in risposta a deafferentazione colinergica [100]. Sulla base di queste considerazioni, devono essere effettuate ulteriori ricerche per indagare se lo stato di APOE ε4 possa influenzare la risposta alla terapia colinomimetica.

3. Ruolo della terapia colinergica per il morbo di Alzheimer

Riconosciuta come una condizione multifattoriale che coinvolge molteplici meccanismi fisiologici, l'eziologia del morbo di Alzheimer non è completamente compresa e non è attualmente disponibile alcun composto sicuro ed efficace per prevenire, fermare o invertire la sua evoluzione. La Figura 2 mostra schematicamente alcune strategie terapeutiche che nel tempo sono state studiate per il trattamento dell'Alzheimer.

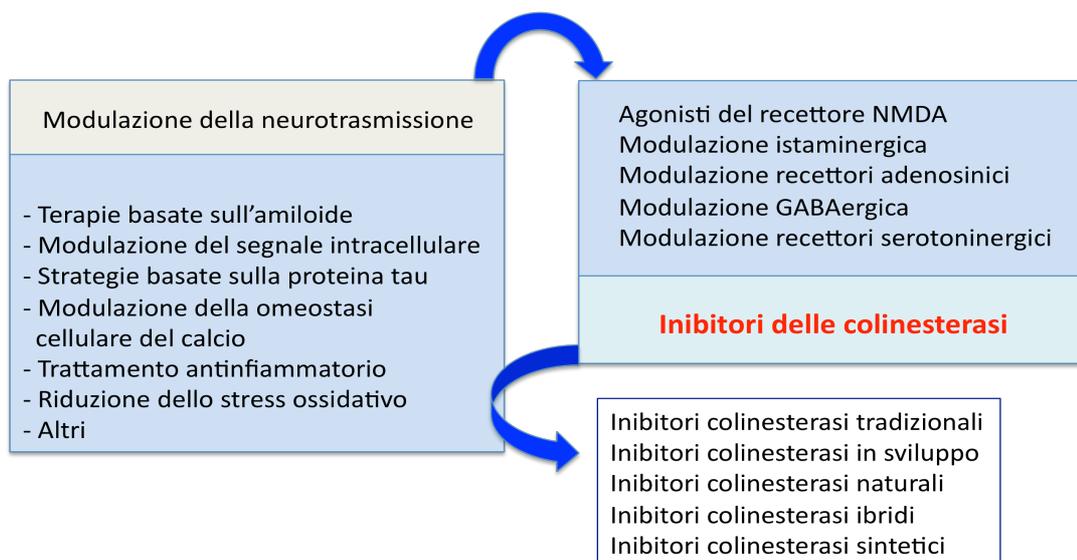


Figura 2. Schema degli approcci farmacologici per la terapia dell'Alzheimer in relazione ai principali meccanismi patogeni tra cui la degenerazione neuronale colinergica, la cascata amiloide,

l'anomala segnalazione dell'insulina, la fosforilazione proteica, la disomeostasi del calcio, la neuroinfiammazione, lo stress ossidativo o altri (disregolazione del metabolismo del ferro, ridotto utilizzo del glucosio, anormale omeostasi del colesterolo e disfunzione mitocondriale).

La strategia terapeutica prevalente nella gestione del morbo di Alzheimer si basa sul ripristino della funzione colinergica attraverso l'uso di composti che mirano ad aumentare i livelli cerebrali di acetilcolina facilitando la neurotrasmissione colinergica attraverso l'inibizione delle colinesterasi. Questi composti, noti come inibitori delle colinesterasi (ChEI), offrono anche la possibilità di influenzare altri bersagli biologici coinvolti in numerosi significativi sintomi del morbo di Alzheimer [101-103]. Tuttavia questi agenti sono progettati per inibire la degradazione dell'acetilcolina e sostenere la sua attività nelle sinapsi colinergiche. Gli inibitori della colinesterasi attualmente disponibili approvati dalla FDA per il trattamento del morbo di Alzheimer sono donepezil, rivastigmina e galantamina. Questi farmaci hanno dimostrato di migliorare in modo statisticamente significativo la cognizione, la funzione quotidiana e globale e alcune manifestazioni comportamentali dell'AD, rispetto al trattamento con placebo [105]. Pertanto, sono considerati i trattamenti sintomatici di prima linea per il morbo di Alzheimer.

I tipi più importanti di colinesterasi nel cervello dei mammiferi sono l'acetilcolinesterasi (AChE) e la butirrilcolinesterasi (BChE) che si differenziano per genetica, struttura e cinetica. L'AChE è osservata prevalentemente nelle sinapsi neuronali e nel sangue; mentre a livello del cervello umano, la BChE si trova vicino a cellule gliali e neuroni o in grovigli e placche neuritiche negli individui con Alzheimer [2,23]. Mentre nei pazienti con AD, l'attività dell'AChE è progressivamente ridotta, quella della BChE aumenta leggermente. La maggior parte degli inibitori delle colinesterasi ad oggi disponibili per la terapia dell'AD agisce sia sull'AChE che sulla BChE [106]. Nella vengono presentate le caratteristiche farmacologiche di alcuni inibitori delle colinesterasi (ChEI): ChEI tradizionali (Figura 3), ChEI in fase di sviluppo (Figura 4), ChEI di origine naturale

(Figura 5), ChEI ibridi (Figura 6) e analoghi sintetici (Figura 7).

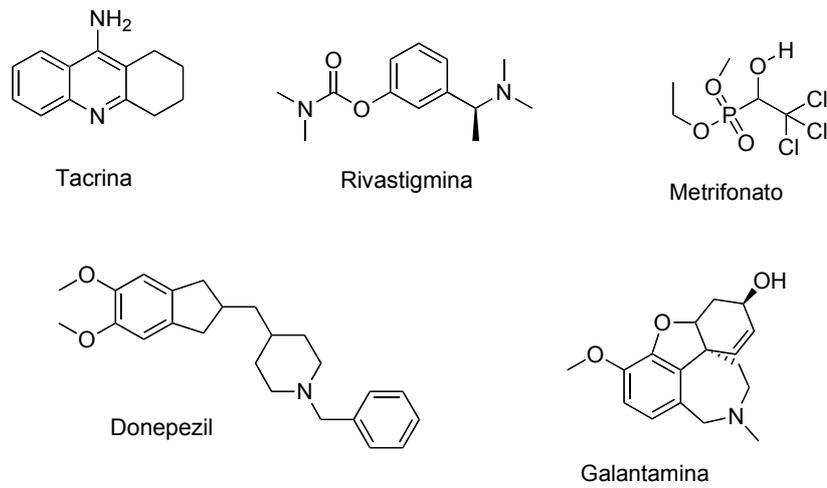


Figura 3. Tradizionali inibitori della colinesterasi (AChEI)

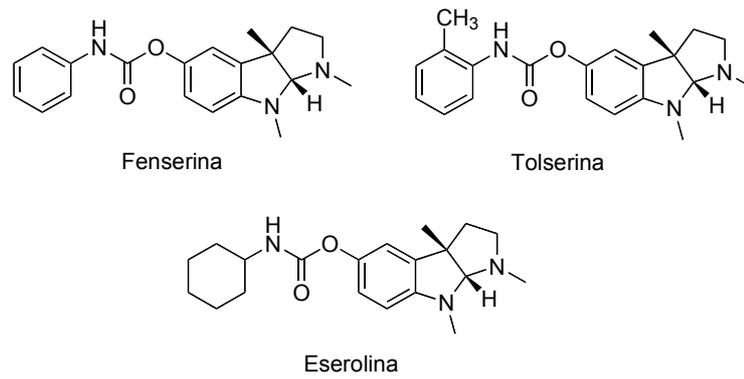


Figura 4. Inibitori della colinesterasi (AChEI) in sviluppo

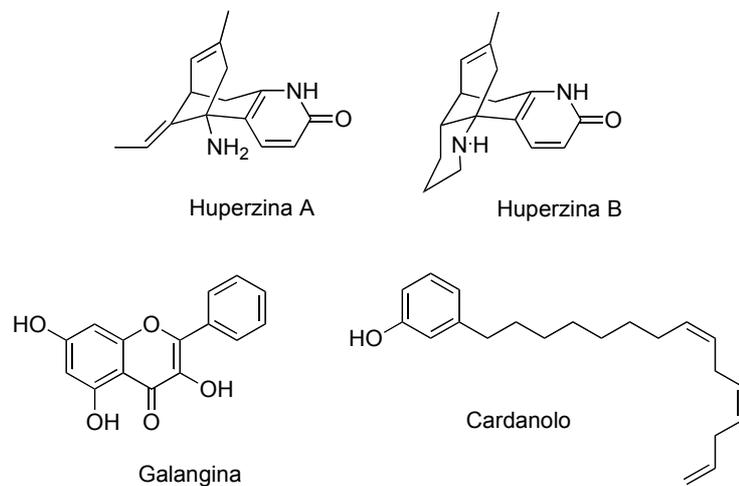


Figura 5. Inibitori della colinesterasi di origine naturale

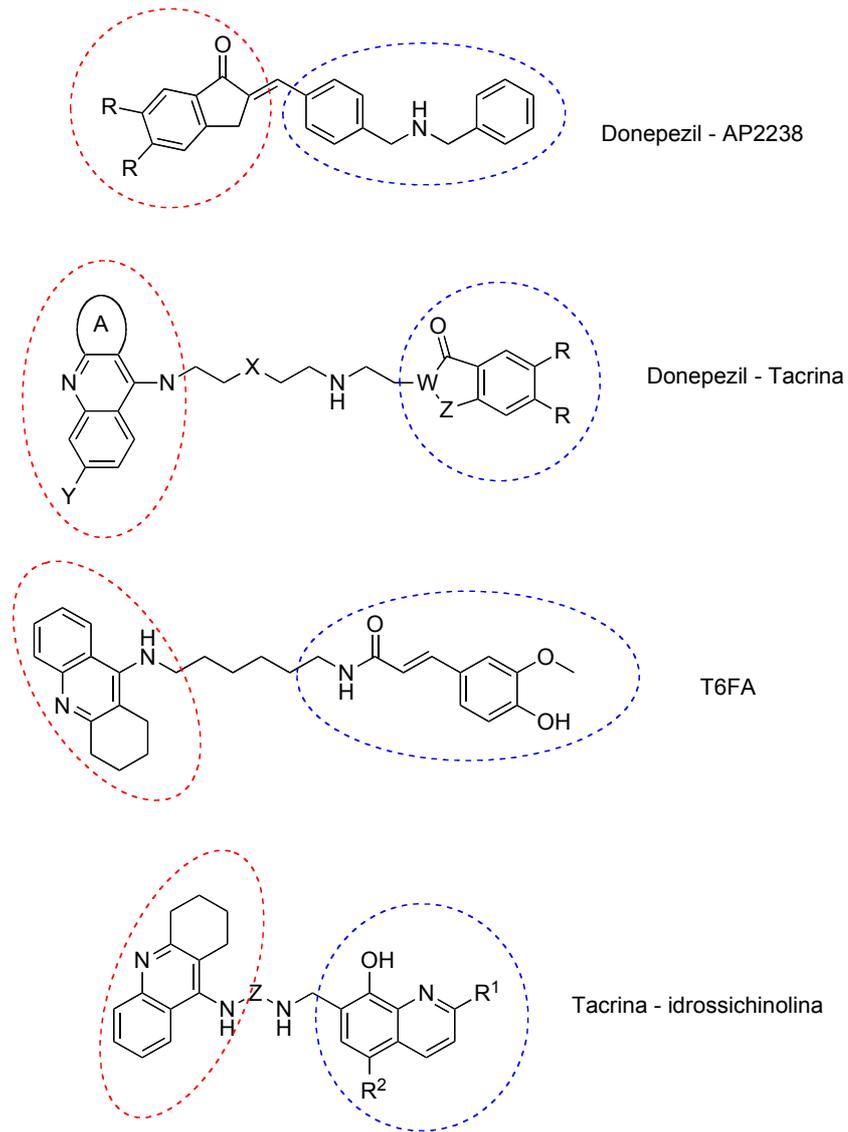


Figura 6. Strutture chimiche di AChEI ibridi

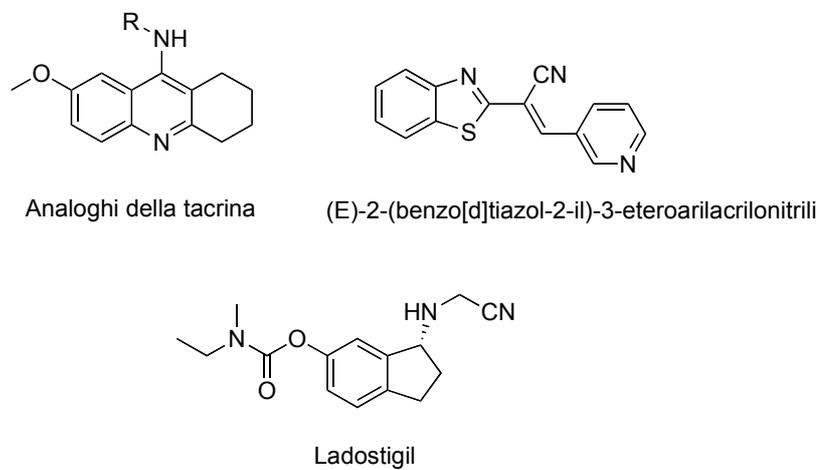


Figura 7. Strutture chimiche di AChEI sintetici

Nella terapia dell'AD, i ChEI vengono dosati in due fasi, una fase iniziale di aumento della dose per ottenere un opportuno dosaggio terapeutico e una fase di mantenimento in cui la dose terapeutica viene somministrata per la terapia cronica [107]. I ChEI possono ritardare discretamente la perdita della funzione cerebrale nei pazienti affetti da AD da lieve a moderato. Tuttavia, questi composti possono anche determinare una varietà di effetti collaterali come conseguenza della stimolazione colinergica in diverse zone del cervello e della periferia. Gli eventi gastrointestinali acuti mediati centralmente (in particolare nausea e vomito) sono effetti collaterali di tutti gli inibitori con doppia azione su AChE e BChE e sono descritti principalmente durante la fase di aumento della dose, all'inizio del trattamento. Tuttavia, questi effetti possono essere ridotti al minimo utilizzando un graduale, lento incremento della dose e somministrandoli con gli alimenti [108]. Gli effetti collaterali registrati più frequentemente durante il mantenimento della terapia includono sintomi associati al sistema nervoso centrale, eventi extrapiramidali, disturbi del sonno e disturbi cardiorespiratori legati all'azione colinergica nella corteccia, nel nucleo caudato dei gangli basali, nel tronco encefalico e nel midollo. I sintomi cardiorespiratori e l'incontinenza urinaria sono determinati dall'azione colinergica periferica [23,35]. Tuttavia, in generale, i ChEI sono ben tollerati e la compliance del paziente e l'adeguatezza dell'assistenza è buona se la terapia viene dosata con cura. I profili di tollerabilità e sicurezza di questi composti li rendono le attuali strategie terapeutiche di prima linea per l'AD [22,108].

Il trattamento che promuove la funzione colinergica negli individui con, o a rischio per il morbo di Alzheimer può avere anche effetti biologici benefici più duraturi rispetto ad un temporaneo aumento della funzione cognitiva. Il gruppo di studio francese Hippocampus ha scoperto, in uno studio controllato con placebo in persone con sospetto morbo di Alzheimer prodromico, che l'uso dell'inibitore della colinesterasi donepezil è associato ad un minore assottigliamento della regione corticale e a minore atrofia del proencefalo basale

[109,110] Uno studio controllato con placebo sulla stessa popolazione ha rilevato una riduzione del 45% nel tasso di atrofia ippocampale dopo 1 anno di trattamento con donepezil [111]. Sebbene questi risultati non siano ancora stati collegati ad uno specifico meccanismo biologico, aumentano le evidenze di sostanziali effetti neuroprotettivi determinati dal trattamento colinergico durante le varie fasi del morbo di Alzheimer. Diversi studi hanno anche esplorato il ruolo degli inibitori della colinesterasi sulla perfusione cerebrovascolare nella malattia di Alzheimer e in altre demenze [112-17]. In effetti in alcuni studi pazienti con demenza dovuta al morbo di Alzheimer hanno ricevuto una singola dose di inibitore della colinesterasi mostrando un aumento [112,113] o una stabilizzazione del flusso sanguigno cerebrale [54,115] nelle regioni frontali superiori e posteriori parieto-temporali. Un altro recente studio ha mostrato una diminuzione del flusso sanguigno cerebrale regionale nella corteccia parietale e un suo aumento nella corteccia frontale e limbica dopo 18 mesi di trattamento con donepezil o galantamina [118]. Casi clinici e indagini con campioni di piccole dimensioni hanno riportato un aumento del flusso sanguigno cerebrale dopo il trattamento con inibitori della colinesterasi in pazienti con demenza vascolare, demenza con corpi di Lewy e demenza da morbo di Parkinson [114,116,117,119].

3.1. Problemi associati all'uso degli inibitori dell'acetilcolinesterasi

Nonostante i dati clinici e le raccomandazioni delle linee guida sostengano l'uso degli inibitori della colinesterasi in tutte le fasi del morbo di Alzheimer, questi farmaci possono essere utilizzati in maniera non appropriata.

In realtà la patologia dell'Alzheimer emerge molti anni prima dell'insorgenza dei sintomi e attualmente non ci sono linee guida approvate riguardanti la terapia colinergica durante le fasi precliniche della malattia.

Una metanalisi di 26 studi su donepezil, rivastigmina e galantamina ha mostrato un

beneficio complessivo modesto ma clinicamente significativo nella stabilizzazione delle funzioni cognitive e del comportamento [120]. I risultati dei pochi confronti testa a testa esistenti per gli inibitori della colinesterasi sono contrastanti; tuttavia, sembra che il donepezil possa avere un leggero vantaggio rispetto alla rivastigmina e alla galantamina in termini di efficacia e tollerabilità [120].

I dati a lungo termine indicano che i pazienti con malattia di Alzheimer che vengono trattati con una dose media più elevata di inibitori della colinesterasi hanno un ritardo nella collocazione in casa di cura [121]. In accordo con tale risultato i pazienti che interrompono, per svariati motivi, la terapia con donepezil (10 mg/die) hanno una probabilità doppia di entrare in casa di cura dopo 1 anno dall'interruzione dell'assunzione rispetto agli individui che hanno continuato il trattamento; tuttavia, questo effetto perde significato statistico dopo 3 anni. Infine, gli inibitori della colinesterasi hanno dimostrato di ridurre l'impatto sugli assistenti sanitari e sui parenti dei pazienti affetti da Alzheimer [122-125].

Ulteriori dati provenienti sia da studi sperimentali che da studi clinici hanno suggerito che gli AChEI possono avere un meccanismo d'azione più ampio rispetto al miglioramento dell'attività colinergica e che possono arrecare un effetto stabilizzante il decorso della demenza da morbo di Alzheimer maggiore di quanto previsto dalla sola inibizione delle colinesterasi [126].

3.1.1. Periodo di inizio dell'assunzione degli AChEI

Nei pazienti con morbo di Alzheimer, in particolare in fase iniziale, un ritardo nella somministrazione degli inibitori della colinesterasi può portare alla perdita irrimediabile dei potenziali benefici terapeutici. Ad esempio, in studi controllati con placebo sulla rivastigmina, una fase iniziale di 26 settimane è stata fatta seguire da un'estensione in aperto di ulteriori 26 settimane in cui tutti i pazienti hanno ricevuto rivastigmina [127,128].

Per le prime 26 settimane, la rivastigmina ha fornito benefici sintomatici statisticamente significativi ai pazienti con malattia di Alzheimer lieve-moderata o malattia più grave. Tuttavia, quando i pazienti inizialmente trattati con placebo hanno ricevuto rivastigmina per le seconde 26 settimane, non sono riusciti a raggiungere benefici comparabili a quelli riscontrati negli individui che hanno ricevuto il farmaco per l'intero anno. In uno studio simile anche la galantamina ha evidenziato lo stesso profilo clinico in caso di Alzheimer lieve-moderato [129].

Gli inibitori della colinesterasi possono anche fornire benefici patologici e anatomici, in particolare prima dell'emergere di sintomi clinici. Come notato all'inizio, gli effetti del donepezil (10 mg/giorno) sulla struttura cerebrale sono stati recentemente dimostrati in uno studio controllato con placebo su adulti con morbo di Alzheimer prodromico [109-111]. Nel corso di 4 anni, i pazienti che hanno ricevuto donepezil hanno dimostrato una diminuzione statisticamente significativa del tasso annuale di atrofia ippocampale (MRI). Durante il primo anno di trattamento, in particolare, il tasso di atrofia ippocampale è stato ridotto del 45% nei soggetti trattati con donepezil [111].

In futuro, le indicazioni per le terapie colinomimetiche, compresi gli inibitori della colinesterasi, potrebbero essere limitate a pazienti con conferma della presenza di specifici biomarcatori. Questo approccio più razionale può dimostrare che le terapie colinergiche sono ancora più efficaci di quanto finora sospettato.

3.1.2. Dosaggio degli AChEI

Aumenti incrementali dei dosaggi degli inibitori della colinesterasi hanno mostrato benefici nel morbo di Alzheimer, in particolare nella malattia più avanzata. In uno studio di fase 3 di 24 settimane in pazienti con malattia di Alzheimer da moderata a grave che stavano assumendo una dose stabile di 10 mg di donepezil al giorno, un aumento del dosaggio a 23 mg al giorno è stato associato ad incrementi statisticamente significativi dei

punteggi cognitivi [130]. Tuttavia occorre notare che, specie dopo 1 mese di trattamento, sono emersi i tipici eventi avversi del trattamento - nausea (6,1% contro 1,9%), vomito (5,0% contro 0,8%) e diarrea (3,2% contro 1,5%) - Dati clinici simili supportano l'uso di rivastigmina ad alta dose nel morbo di Alzheimer grave per migliorare la funzione cognitiva e le attività della vita quotidiana a 16 e 24 settimane [131]. Quando si considera il valore della gestione farmacologica del morbo di Alzheimer, è essenziale considerare la naturale progressione della malattia [132]. La stabilizzazione iniziale - o addirittura il miglioramento - della cognizione e del funzionamento quotidiano con l'uso dei farmaci anti-demenza attualmente approvati non possono essere sostenuti per lungo tempo. Tuttavia, con un trattamento coerente, ci si può aspettare un declino meno precipitoso. È anche interessante sottolineare che l'acetilcolina è uno dei principali neuromodulatori coinvolti nella regolazione del ciclo sonno-veglia, la cui conservazione è essenziale per molte funzioni cognitive legate ai processi di memoria [133,134]. C'è un ritmo circadiano nella trasmissione colinergica centrale con uno spostamento a bassi livelli di rilascio di acetilcolina durante il sonno ad onde lente rispetto alla veglia. Inoltre, sono state segnalate fluttuazioni circadiane per l'attività enzimatica colinergica e per la regolazione dei recettori colinergici, aumentando la possibilità che le strategie terapeutiche debbano considerare i tempi diurni di somministrazione e l'emivita del farmaco utilizzato. Alterazioni legate all'età di questo ritmo circadiano si verificano nella malattia di Alzheimer in stretta relazione con la progressione delle caratteristiche cliniche [135]. Resta da determinare se gli inibitori della colinesterasi influenzino questi ritmi circadiani, già alterati nel morbo di Alzheimer.

3.1.3. Passaggio della barriera emato-encefalica e concentrazione nel sistema nervoso centrale degli AChEI

La barriera emato-encefalica (BEE) rappresenta un ostacolo importante nella efficace somministrazione di composti terapeutici a livello cerebrale, imponendo dimensioni e

limitazioni biochimiche al passaggio delle molecole. Nel corso del tempo, sono state esplorate un gran numero di strategie per superare la BEE, anche se piuttosto limitate dalla mancanza di specificità, dai problemi di sicurezza e dal mancato raggiungimento di adeguate concentrazioni nell'appropriato volume del tessuto cerebrale [136,137]. Inoltre, secondo l'ipotesi vascolare dell'AD, il deterioramento dei vasi sanguigni rappresenta il danno primario, causando disfunzione della barriera emato-encefalica (BEE) e ridotta perfusione cerebrale che, a sua volta, porta a danno neuronale e accumulo di A β nel cervello [138-140]. In questo contesto, i farmaci possono raggiungere in modo differenziato il sistema nervoso centrale del paziente affetto da AD rispetto agli individui sani. Le variazioni che avvengono nell'AD relative a questo aspetto sono determinate dalle proprietà della BEE, dal riassorbimento del CSF, dal flusso sanguigno cerebrale e dalla permeabilità della P-glicoproteina 1 (P-gp), nota anche come proteina associata alla resistenza multifarmaco 1-P-gp. Alcuni di questi effetti spostano l'equilibrio favorendo l'aumento della concentrazione dei farmaci all'interno del cervello, mentre altri lo diminuiscono. Queste differenze potrebbero portare a variazioni nell'efficacia, nella potenza, nella finestra terapeutica, negli effetti collaterali a livello del SNC e nel raggiungimento di adeguate dosi dei farmaci in uso clinico [141,142]. In caso di diminuzione del riassorbimento nel CSF, i farmaci possono rimanere più a lungo nel SNC. La diminuzione del flusso sanguigno nel cervello incide soprattutto su quei farmaci che entrano rapidamente nel SNC. La somministrazione di inibitori delle colinesterasi come il donepezil dipende probabilmente dal flusso cerebrale e una sua diminuzione si può tradurre in un ridotto assorbimento e quindi in una riduzione dell'effetto terapeutico [143]. Altri studi farmacocinetici *in vivo* hanno messo in evidenza la capacità del donepezil di attraversare la BEE per diffusione passiva, come precedentemente confermato da altre ricerche che hanno dimostrato che le concentrazioni di donepezil nel cervello espresse come area sotto la curva della concentrazione, superano le concentrazioni plasmatiche in

topi, ratti e conigli [144,145]. Una serie di studi ha dimostrato che dosi elevate di donepezil (23 mg) sono più efficaci di dosi più basse (5 e 10 mg), ma gli effetti farmacologici dipendevano non solo dall'aumento della dose e dalla formulazione del farmaco, ma anche dal meccanismo di efflusso attivo attraverso la barriera ematico-encefalica, essendo la P-glicoproteina un fattore determinante nell'efflusso del donepezil dal compartimento centrale al flusso sanguigno [146,147].

Anche la tacrina viene rapidamente assorbita nel cervello, e viene rilevata nella corteccia, nell'ippocampo, nel talamo e nei corpi striati, ma la sua distribuzione non è correlata alla distribuzione dell'AChE. Con una concentrazione 10 volte superiore a livello cerebrale rispetto al plasma, la tacrina diventa un inibitore non selettivo e reversibile dell'AChE centrale e periferica [148,149].

I dati neuropatologici e clinici sopra riassunti dimostrano che gli inibitori della colinesterasi o altri interventi colinomimetici rimangono componenti essenziali della terapia per il morbo di Alzheimer. La dimostrazione di un coinvolgimento precoce [150,151] del sistema colinergico a partire dalle fasi precliniche della malattia, suggerisce che i colinomimetici, insieme agli interventi anti-amiloide e anti-tau, possano avere ciascuno un ruolo distinto nella prevenzione della malattia. Tuttavia le risultanze cliniche legate al morbo di Alzheimer indicano che un approccio più appropriato deve tenere conto delle interazione tra fattori come la predisposizione genetica, lo stress ossidativo, la disfunzione mitocondriale, i meccanismi infiammatori, l'insufficienza vascolare, l'accumulo di amiloide- β , degenerazione neurofibrillare, deficit colinergici ed altre anomalie neurotrasmettitorie.

Dal 1998 al 2018, un centinaio di candidati farmaci sono stati testati in studi clinici e solo quattro sono stati approvati. A causa dei numerosi fallimenti e del gran numero di evidenze che attestano la complessa fisiopatologia della malattia, le ricerche stanno indirizzandosi

verso un approccio multi-target basato sulla combinazione di diversi farmaci in un'unica formulazione, ottenendo molecole ibride che esercitano contemporaneamente gli effetti di entrambi i singoli farmaci. A questo proposito, sono state progettate e sintetizzate molecole ibride anti-colinesterasi ottenendo ligandi multi-bersaglio. Sono stati ottenuti ibridi, come gli ibridi della tacrina, la cui selettività sull'inibizione della colinesterasi è marcatamente superiore alla stessa tacrina. Inoltre diverse molecole hanno anche dimostrato la capacità di attraversare la BEE [152,153]. Anche la stessa BEE può rappresentare un obiettivo terapeutico per ottenere farmaci idonei per i disturbi neurodegenerativi. Pertanto, la regolazione delle sue funzioni potrebbe essere un nuovo attraente bersaglio terapeutico per il trattamento dell'AD.

4. Dai farmaci a singolo bersaglio ai ligandi multitarget

Il concetto di "una molecola-un bersaglio-una malattia" non riesce a fornire una soluzione completa per il trattamento di AD a causa della natura complessa e multifattoriale di questa patologia [154]. Di conseguenza, al giorno d'oggi la ricerca sui farmaci anti-AD si sta muovendo verso un nuovo approccio che affronta i vari percorsi coinvolti nell'insorgenza e nell'evoluzione di questa patologia – i ligandi multi-target (MTDL) [155]. Le nuove molecole comportano ulteriori sfide come una affinità di legame dei ligandi per più bersagli, un profilo farmacologico favorevole, azioni neuroprotettive e proprietà chimico-fisiche compatibili con candidati farmaci, come ad esempio una buona permeabilità della BEE [156]. Oltre all'inibizione delle colinesterasi, che rimane l'attuale opzione terapeutica efficace per il sollievo sintomatico, alcune altre attività possono essere introdotte negli MTDL per progettare e produrre un'ampia varietà di possibili composti anti-AD a doppia e multipla azione [156-158].

Gli inibitori delle colinesterasi che interagiscono simultaneamente con l'AChE (siti catalitici e periferici), con la BChE e con la deposizione della placca di A β accoppiati con

proprietà aggiuntive come l'azione antiossidante [159], l'attività neuroprotettiva o antagonista del canale del calcio voltaggio-dipendente [160-163], l'antagonismo del recettore dell'istamina H3 [164-167], l'antagonismo del recettore cannabinoide CB1 [168,169], e l'inibizione dell'enzima di scissione del sito β di APP (BACE1) [170,171] mostrano il potenziale per raggiungere un miglioramento del deficit cognitivo in AD ripristinando le attività colinergiche [172-174].

Una delle strategie di chimica farmaceutica più utilizzata è la sintesi di molecole ibride, che contengono nella loro struttura chimica i farmacofori responsabili dell'interazione con i bersagli biologici. La presenza in una singola entità chimica di più farmacofori fornisce la possibilità di interagire contemporaneamente con differenti bersagli biologici, influenzandone l'attività. Di seguito vengono riportati alcuni esempi di ibridi che possono svolgere la loro azione su più bersagli appartenenti al sistema colinergico.

4.1. Ibridi della tacrina

Al fine di indagare la potenza della tacrina come inibitore dell'AChE ma con ridotta epatotossicità, la tacrina è stata utilizzata per lo sviluppo di molecole ibride. Pang et al. hanno riportato un omodimero bis-C7-tacrinico ((1-C7), Figura 8) che mostra una potenza inibitoria sull'AChE 1000 volte superiore nei ratti rispetto al monomero, indicando l'assenza di problemi sterici per l'interazione nella stretta cavità che introduce nel sito catalitico dell'enzima.

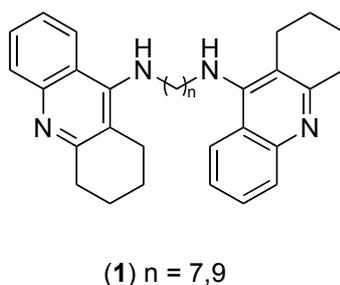


Figura 8. Omodimeri bis-tacrinici

I dimeri tacrinici sono in grado di stabilire interazioni sia con il sito catalitico che con quello periferico. Una catena di connessione più corta (< 5 unità metileniche) ostacola il legame simultaneo a entrambi i siti di interazione della AChE (legame duale). Inoltre, la lipofilia dell'ibrido aumenta rispetto alla stessa tacrina [175,176].

4.2. Ibridi tacrina / iperossido

Alcuni ligandi bitopici che combinano la struttura del modulatore allosterico per il recettore M2 W84 e del nafmetonio e il superagonista non selettivo iperossido, razionalmente sviluppato come ligando selettivo del sottotipo M2 ((**2a**, **2b**-C6,7,8,9,10), Figura 9), hanno dimostrato un'attività modesta come inibitori dell'AChE. La potenza è influenzata dalla lunghezza della catena di connessione.

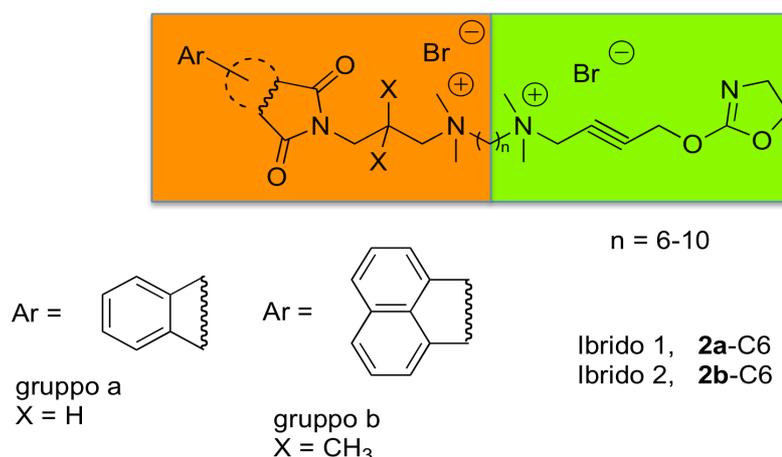


Figura 9. Ibridi bitopici. Ibridi muscarinici M2. In verde nucleo ortosterico, in rosso nucleo allosterico

Le catene più lunghe determinano una maggiore attività: il derivato decametilenico sembra riuscire ad attraversare la gola dell'AChE, consentendo alla testa ammoniaca quaternaria dell'iperossido di localizzarsi vicino al sito PAS. Composti contenenti la porzione naftalimmidica ((**2b**-C6,7,8,9,10), Figura 9) mostrano un'inibizione più forte rispetto a quelli contenenti quella ftalimmidica ((**2a**-C6,7,8,9,10), Figura 9). Quando si sostituisce la porzione iperossido con un anello isossazolico, non si osserva alcuna inibizione delle

colinesterasi (AChE e BChE) ((**3**-C4,6,8), Figura 10) [177].

A partire da questo risultato, sono stati progettati nuovi ibridi con potenziale profilo multitarget ((**4**), Figura 10) costituiti da una porzione tacrinica e una iperossica, finalizzata ad una maggiore attività inibitoria per AChE e BChE [178]. L'idea era di combinare l'affinità dell'iperosso per i recettori M1 e M2 con l'attività inibitoria sulla AChE. La tacrina può agire sia come modulatore allosterico per il recettore M che come inibitore dell'AChE [179–181]. In particolare, Tac-10-iper ((**4**-C10), Figura 10) è estremamente potente come inibitore ($pIC_{50} = 9,81$ eeAChE; pIC_{50} tacrina 7,60; $pIC_{50} = 8,75$ (esBChE; tacrina pIC_{50} 8.57) migliore della stessa tacrina. Inoltre, possiede minore citotossicità. L'affinità notevolmente inferiore di **45**-C10 è probabilmente dovuta al gruppo ammonico quaternario aggiuntivo dei composti Phtal e Naph che causa una desolvatazione molto più elevata rispetto alla catena alchilenica non carica.

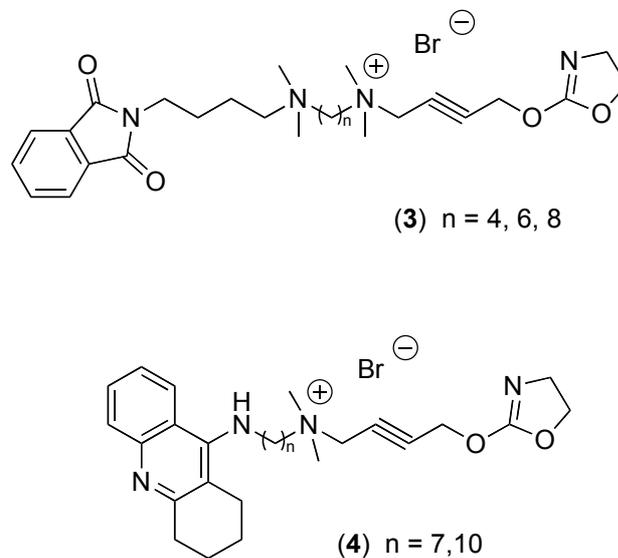


Figura 10. Composti inibitori AChE/agonisti mAChR

A causa dell'elevata affinità per i recettori M1 e M2 può essere possibile un duplice meccanismo d'azione, opportuna opzione per combattere la patologia dell'AD. Infatti, studi funzionali hanno dimostrato la capacità di **4**-C10, Figura 10) di attivare il recettore muscarinico M1 a concentrazioni nanomolari. Sono necessari ulteriori studi per lo sviluppo

di molecole non cariche in grado di attraversare la BEE; finora, è promettente vedere che a composti con una singola carica positiva è associata una migliore attività rispetto ai composti con doppia carica [176,178].

4.3. Ibridi tacrina / xanomelina

Una strategia simile di legame duale è stata impiegata dal gruppo di Decker [181] nella progettazione di composti ibridi tacrina/xanomelina (**5**), Figura 11). Il rationale di questi ibridi mirava ad un triplice meccanismo di azione: l'attivazione del recettore M1 attraverso la porzione molecolare della xanomelina, la modulazione allosterica positiva al sottotipo recettoriale M1 grazie alle proprietà allosteriche della tacrina e l'aumento della quantità di acetilcolina nelle sinapsi colinergiche a causa dell'attività inibitoria sull'AChE [181].

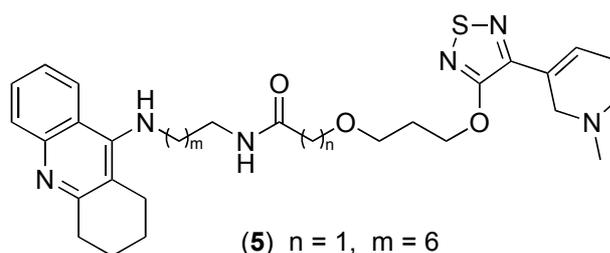
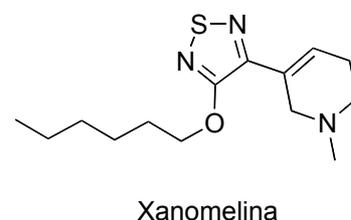


Figura 11. Composto 5, inibitore duale AChE/Agonista mAChR

La xanomelina è un agonista M1, ma sfortunatamente mostra anche una certa affinità per il recettore M4. Questo causa effetti collaterali parasimpatici tra cui bradicardia, aumento della motilità intestinale e salivazione. La xanomelina è nota per le sue proprietà anti-demenza in vivo e per la capacità di attenuazione del declino cognitivo (studi clinici di 6 mesi in pazienti umani affetti da AD) [182]. L'instabilità metabolica dovuta a un esteso metabolismo di primo passaggio, i ben noti effetti collaterali colinomimetici e la sua indesiderata attività per i recettori dopaminergici e della serotonina hanno reso questo composto un cattivo candidato clinico [183,184]. La xanomelina induce



una particolare modalità di attivazione del recettore M1 interagendo con un sito che non si sovrappone completamente al sito di legame ortosterico. Differenze nella cinetica di legame [185] e una probabile interazione idrofobica della catena O-esilica della xanomelina con i lipidi di membrana che circondano il recettore [186,187], possono spiegare la sua selettività [188]. La porzione della xanomelina è stata collegata alla tacrina con ponti ammidici di diversa lunghezza (distanziatore a 10-17 atomi). È stato osservato un chiaro incremento dell'inibizione dell'AChE con l'aumento della catena spaziatrice da pIC₅₀ 7.20 a 8.21. Gli ibridi inibiscono l'AChE con una potenza simile o maggiore rispetto alla tacrina ma non attivano il recettore M1. Invece di un legame simultaneo ai siti allosterico/ortosterico, questi ligandi sembrano preferire un legame puramente allosterico al recettore. Questi risultati sono stati supportati da studi in vivo su ratti ((**5**), Figura 11). I deficit cognitivi scopolamina-indotti sono stati aumentati dall'interazione allosterica al recettore M1 dell'ibrido 46a che controbilancia le sue elevate proprietà di inibizione delle ChE. Purtroppo con questi composti il desiderato triplo meccanismo d'azione non ha luogo. Questo dimostra la difficoltà di prevedere le attività intrinseche delle varie componenti strutturali di queste molecole e l'importanza della loro cooperazione, che deve portare a un compromesso ben equilibrato.

4.4. Ibridi 77-LH-28-1 / xanomelina

Il composto 77-LH-28-1, ((**6**), Figura 12) che mostra modalità miste di interazione ortosterica o allosterica a seconda delle condizioni del saggio sperimentale [189], è stato incorporato in una serie di ibridi in grado di legare i siti allosterico/ortosterico, ipotizzando una funzione condivisa delle strutture di xanomelina e 77-LH-28-1 ((**7a**, **7b**), Figura 12). Con un approccio di fusione, i due scaffold sono stati fusi nei nuovi ibridi, con l'obiettivo di una migliore occupazione della tasca di legame ortosterica e di migliorata comprensione delle interazioni che si possono instaurare per il legame bitopico attuato dal composto 77-

LH-28-1.

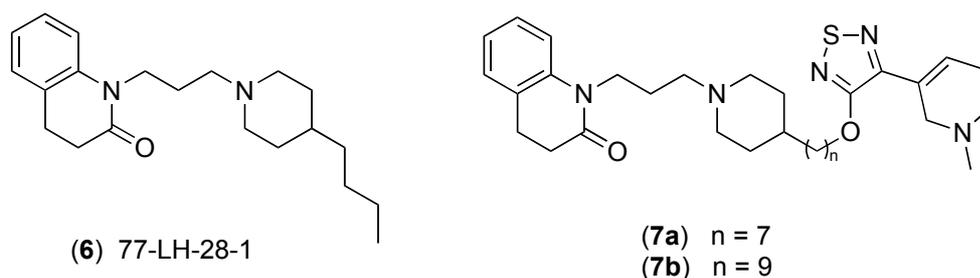


Figura 12. Composti inibitori duali AChE/agonisti mAChR

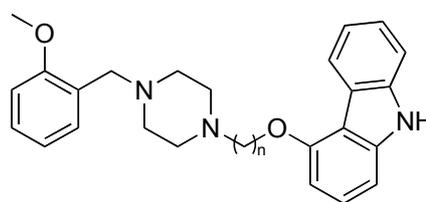
Gli studi farmacologici di questi ibridi hanno evidenziato un'affinità al recettore M1 superiore a quella di 77-LH-28-1, ma inferiore a quella della xanomelina. In generale, questi composti ibridi hanno mostrato un profilo di attività da debole agonista o antagonista (M1 e M4) in tutti i saggi funzionali, mentre l'attività/selettività era correlata alla lunghezza del distanziatore. In particolare ad una catena di sette o nove atomi di carbonio sono associati i valori di affinità più elevati, indicando che i due farmacofori probabilmente interagiscono con due siti distinti situati a una distanza di 7-9 frazioni metileniche. In linea con le proprietà funzionali riportate della catena alifatica in 77-LH-28-1, questi risultati indicano che l'estensione della catena di connessione permette di colpire il sito di legame ortosterico [190].

4.5. Progettazione di composti ibridi per studiare il recettore nicotico: ibridi 1-(2-metossibenzil)-piperazincarbazolici

A seguito di un approccio basato sul ligando, sono stati sintetizzati e studiati farmacologicamente composti ibridi che agiscono sull'AChE e sui recettori nicotinici. Queste molecole combinano un agonista $\alpha 7$ e un nucleo carbazolico avente proprietà di inibizione dell'AChE ((8a, 8b), Figura 13) [191]. I carbazoli sostituiti sono in grado di interagire con la parte interna della gola dell'enzima AChE e presentano anche attività anti-

amiloidogenica. Questo nucleo è stato collegato al frammento 1-(2-metossibenzil)piperazिनico dotato di attività $\alpha 7$ -agonista [192]. Tale frammento è stato selezionato a causa della somiglianza strutturale con l'etil-(2-metossibenzil)ammina, gruppo che riconosce il sito catalitico dell'AChE [193,194].

I composti multitarget risultanti, in particolare il composto ((**8b**), Figura 13), presentano un'azione inibitrice della AChE a concentrazioni micromolari (composto con distanziatore a sei unità metileniche $IC_{50} = 0,773 \mu M$). Pertanto l'inibizione della AChE è fortemente dipendente dall'allungamento della catena di connessione. In particolare i composti con una catena più corta hanno valori IC_{50} inferiori.



(**8a**) $n = 5$
 (**8b**) $n = 6$

Figura 13. Composti inibitori duali AChE/agonisti nAChR

Nei saggi di legame con radioligando, i composti hanno mostrato una affinità micromolare con valori di K_i compresi tra 15 e 120 μM nello spiazzamento della [3H]-epibatidina e [^{125}I]- α -bungarotossina dai sottotipi recettoriali $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ di corteccia di ratto. È interessante notare che la loro capacità di inibizione della formazione di fibrille di $A\beta$ alla concentrazione 10 μM , dimostrata con un test fluorimetrico basato su ThT, è simile all'attività anti-aggregante e bloccante della formazione di fibrille della curcumina [195] (28-36% rispetto a 34,4% per la curcumina). Un'azione sinergica che comporti una, seppur debole perturbazione di alcuni sistemi coinvolti nella neurotrasmissione colinergica (AChE, nAChR) associata ad una perturbazione dell'aggregazione amiloide potrebbe essere sufficiente per modificare la progressione della malattia. Pertanto, i composti

possono rappresentare un adatto punto di partenza per un'ulteriore processo di ottimizzazione.

5. Prospettive per gli inibitori delle colinesterasi

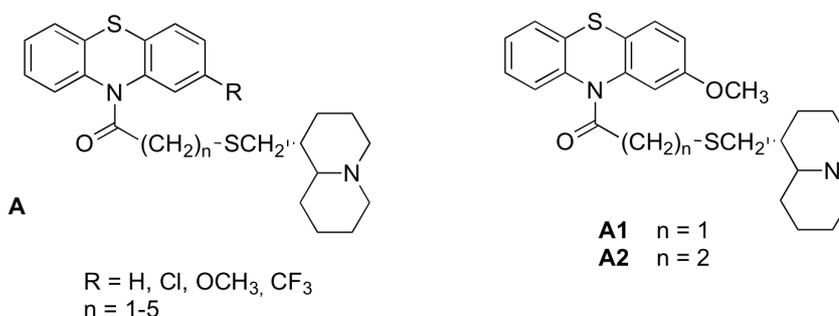
I composti ibridi in grado di agire su diverse proteine biologiche e che possiedono caratteristiche come ligandi duali per parti distinte di uno stesso bersaglio biologico o una combinazione di entrambe le strategie forniscono strumenti farmacologici che potrebbero espandere gli orizzonti della progettazione di nuovi candidati farmaci. Tutti gli esempi di ibridi riportati forniscono informazioni utili e dimostrano che lo sviluppo di composti bivalenti non solo è possibile ma anche promettente nell'offrire nuovi possibili strumenti farmacologici. Le scarse proprietà farmaceutiche sono la diretta conseguenza del peso molecolare relativamente alto dei ligandi bitopici che ne impedisce la progressione nello processo di sviluppo del farmaco. I composti bivalenti possono fornire comunque nuove informazioni utili sulle interazioni proteina-ligando, comprendendo l'intricata relazione tra attivazione del recettore, dinamiche conformazionali, profilo di segnalazione del sistema colinergico e la connessione tra i diversi tratti distintivi dell'AD. Vantaggi come una migliore selettività o una ridotta tossicità di alcuni ibridi possono essere ulteriormente sfruttati attraverso un successivo processo basato sui frammenti cercando di ridurre i problemi fisico-chimici ma mantenendo il miglioramento ottenuto.

6. Obiettivo della Tesi

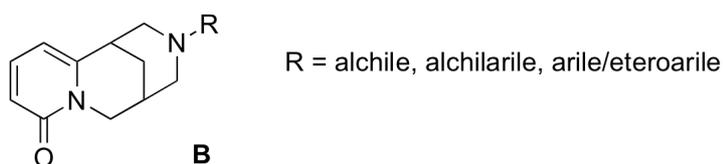
Da molti anni il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la tesi sperimentale è impegnato in alcune linee di ricerca miranti alla sintesi di nuovi composti con potenziale azione sul sistema colinergico.

Come prima serie di composti sono state sintetizzate le N-(acil)fenotiazine **A** che hanno mostrato una elevata affinità per il recettore muscarinico M1 (intervallo 2.3-35.6 nM).

In particolare i composti **A1** e **A2**, recanti un sostituito 2-metossile sulla fenotiazina, hanno evidenziato la migliore affinità con valori di $K_i = 2.8$ nM (**A1**, $n = 1$) e 2.3 nM (**A2**, $n = 2$) [196].

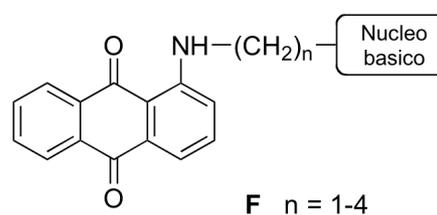
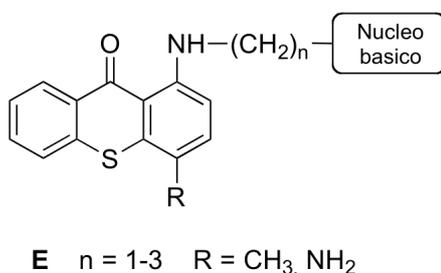
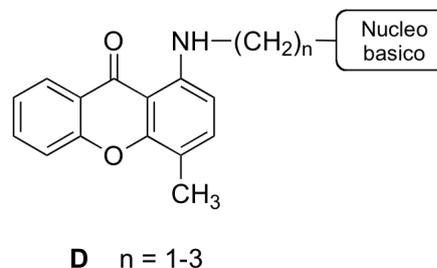
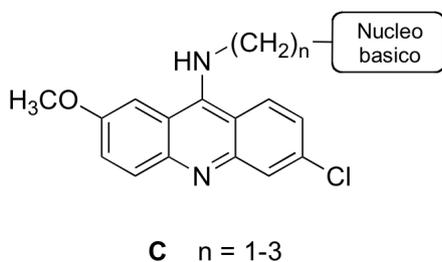


In seguito è stato perseguito un programma di ricerca che ha portato alla progettazione e sintesi di oltre 100 derivati della citisina (**B**), alcaloide chinolizidinico con azione agonista sui recettori $\alpha 4\beta 2$. Molti di questi derivati hanno evidenziato interessanti attività biologiche, in funzione del sostituito sull'atomo di azoto, ma tutti hanno mantenuto affinità per il recettore nicotino nell'intervallo basso nanomolare, submicromolare o basso micromolare [197,198].



Infine negli ultimi anni il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la tesi sperimentale è impegnato in un ampio programma di ricerca che mira alla progettazione e alla sintesi di

composti caratterizzati da sistemi triciclici aromatici (acridine (**C**), xantenoni (**D**) e tioxantenoni (**E**), antrachinoni (**F**)), dotati di attività inibitoria selettiva o duale sulle colinesterasi (AChE e BChE) per indagarne il potenziale utilizzo in patologie neurodegenerative, in particolare come agenti anti-Alzheimer [199,200].



Nella maggior parte dei composti sintetizzati è stata evidenziata una buona/notevole attività inibitoria delle colinesterasi, ma in alcuni di essi si è riscontrata anche la capacità di inibire direttamente l'aggregazione della proteina A β , conferendo a tali derivati un profilo farmacologico di ligandi multitarget (MTDL), fondamentale per una patologia multifattoriale quale il morbo di Alzheimer.

Negli ultimi due anni è stato ripreso lo studio delle N-(acil)fenotiazine che ha portato alla sintesi di nuovi derivati in cui il tricyclo fenotiazinico è unito tramite la catena acilica a nuclei basici di varia natura (N-fenilpiperazina/piperidina, N-benzilpiperazina/piperidina), già presenti nei derivati triciclici **C-F** [201-203].

In alcuni casi questi nuovi composti hanno mostrato una interessante attività inibitoria delle colinesterasi, più pronunciata verso la BChE, rispetto alla AChE.

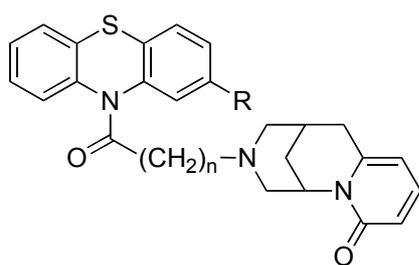
Tali risultati hanno suggerito la possibilità di sintetizzare nuovi derivati fenotiazinici che

potessero avere multipli bersagli appartenenti alla neurotrasmissione colinergica.

Per ottenere tale risultato si è pensato di sintetizzare nuovi derivati della citisina, che potrebbero mantenere una certa affinità per il recettore nicotino $\alpha 4\beta 2$, come dimostrato dai numerosi derivati **B** già preparati, unendola al sistema tricyclico della fenotiazina, che ha dimostrato di possedere una buona capacità inibitrice delle colinesterasi (AChE e BChE) quando collegata ad un nucleo basico tramite una catena acilica. E' probabile che l'azione su più bersagli biologici possa esplicarsi al meglio con un opportuno distanziamento tra i due frammenti (fenotiazina-citisina), come dimostrato dagli esempi riportati nella parte introduttiva.

Per tali motivi, durante la mia tesi ho preparato una piccola serie di derivati fenotiazinici, anche 2-sostituiti, (**1-8**) che recano sull'atomo di azoto la catena acilica di lunghezza variabile e, come nucleo terminale basico, la citisina.

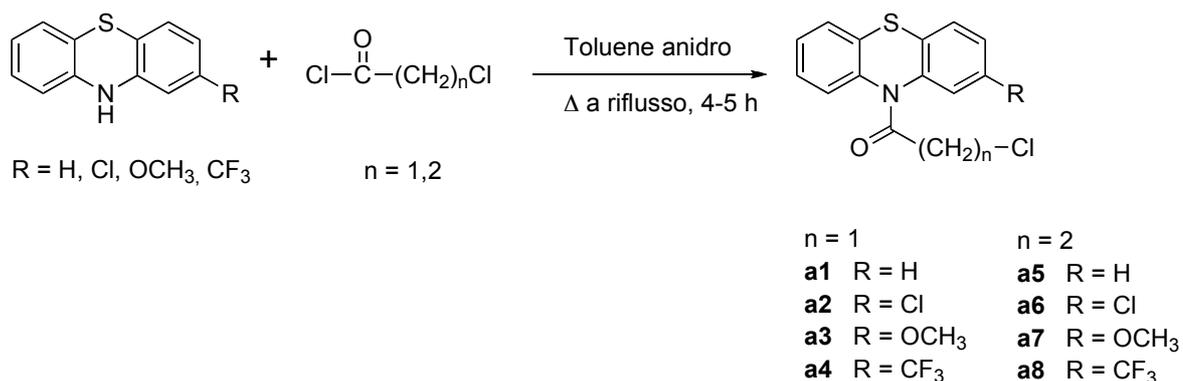
La prima attività biologica testata per questi nuovi composti è la loro attività inibitrice sulle colinesterasi, sia AChE che BChE.



n = 1	n = 2
1 R = H	5 R = H
2 R = Cl	6 R = Cl
3 R = OCH ₃	7 R = OCH ₃
4 R = CF ₃	8 R = CF ₃

Per la sintesi dei composti **1-8** sono state dapprima preparate le opportune N-acetil- (**a1-a4**) e N-(propionil)fenotiazine (**a5-a8**).

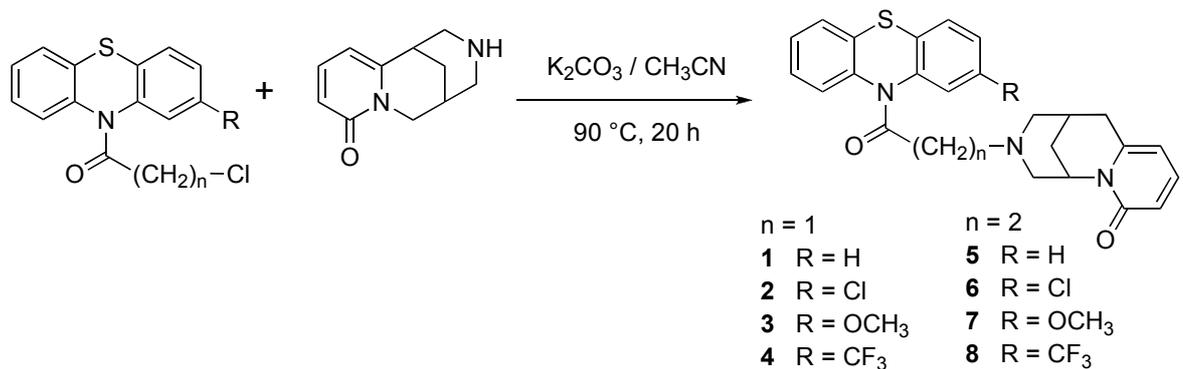
I composti N-(acil)fenotiazinici (**a1-a8**) si ottengono facendo reagire direttamente l'opportuna fenotiazina con un leggero eccesso (10%) di 2-cloroacetilcloruro o 3-cloropropionilcloruro in toluene anidro scaldando per 4-5 ore.



I prodotti della reazione, purificati tramite ripetuti lavaggi con pentano, sono ottenuti in alta resa (oltre il 90%).

Nella reazione successiva le N-(ω -cloroacil)-2R-fenotiazine (**a1-a8**) vengono fatte reagire con quantità stechiometriche di citisina e di K₂CO₃ anidro.

La reazione viene condotta in tubo chiuso, sotto atmosfera di azoto, scaldando a 90 °C per 20 ore.



I prodotti finali **1-8** vengono purificati tramite cromatografia su Al₂O₃ (1 : 30) eluendo con CH₂Cl₂. Si ottengono solidi amorfi bianchi in buona resa

Composto	Resa (%)	p.f. (°C)
1	77.7	98-100
2	70.5	96-98
3	90.3	105-108
4	68.3	101-103
5	90.8	120-122
6	69.8	115-117
7	91.8	133-136
8	63.3	123-125

I composti sono stati inviati al Prof. Marco Catto, del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Bari, e sono stati studiati in saggi per l'attività inibitoria su AChE e BChE. Le attività inibitorie sugli enzimi eeAChE (di torpedine) e eqBChE (da siero equino) sono state determinate col metodo spettrofotometrico di Ellman [204]. I valori sono espressi come percentuale di inibizione a 10 μM e per i composti che a tale concentrazione hanno una percentuale di inibizione superiore a 60% è stato calcolato il valore di IC_{50} .

Per alcuni composti sarà valutata anche l'inibizione dell'aggregazione di A β (1-40) *in vitro* utilizzando il metodo ThT basato sulla fluorescenza che richiede l'uso di esafluoroisopropanolo (HFIP) per stimolare l'aggregazione [205].

I risultati sono raccolti in Tabella 1.

Tabella 1. Risultati di inibizione AChE/BChE

Composto	eeAChE		eqBChE	
	% (10 μM)	IC_{50} (μM)	% (10 μM)	IC_{50} (μM)
1	54 \pm 3			1.09 \pm 0.13
2	51 \pm 3		38 \pm 1	
3	37 \pm 3		34 \pm 1	
4	45 \pm 4		23 \pm 3	
5	57 \pm 4			0.829 \pm 0.032
6	46 \pm 3		37 \pm 3	
7	51 \pm 4		55 \pm 2	
8	40 \pm 2		24 \pm 3	
Donepezil		0.02		1.9

I risultati mostrano una moderata attività di tutti i composti sintetizzati verso la AChE (intervallo 57-37% di inibizione alla concentrazione 10 μM), con la metà dei composti che possiedono una IC_{50} uguale o inferiore a 10 μM (**1**, **2**, **5**, **7**).

Si può affermare che la natura del sostituente non determina particolari effetti sull'attività, ma la mancanza di sostituzione in posizione 2 è positiva dal momento che i composti **1** e **5** possiedono le più alte percentuali di inibizione.

Anche l'allungamento della catena acilica non comporta variazioni significative.

Più interessante appare il profilo di attività verso la BChE.

Per i derivati che recano la sostituzione in 2 si evidenzia una modesta attività. Infatti solo il composto **7** ($\text{R} = \text{OCH}_3$) raggiunge una percentuale di inibizione oltre il 50% (55%) alla concentrazione 10 μM . Anche per l'attività sulla butirrilcolinesterasi, l'allungamento della catena acilica non comporta sensibile miglioramento o peggioramento dell'attività inibitoria.

Invece è importante evidenziare i risultati dei derivati non sostituiti in posizione 2 (della semplice fenotiazina) **1** e **5** che mostrano una notevole attività, nell'intervallo 1.09 e 0.829 μM , rispettivamente, dati migliori anche del farmaco di riferimento, il donepezil (1.9 μM).

In questo caso sembra che l'allungamento della catena acilica sia positiva e pertanto sarà opportuno preparare gli omologhi superiori per verificare come varia l'attività.

E' importante sottolineare che i nuovi composti appaiono interessanti per la loro attività sulle colinesterasi, considerando che per gli agenti multitarget non è detto che sia ideale una azione molto elevata su un bersaglio biologico, ma talvolta è positiva un'attività bilanciata su più bersagli. A tale riguardo oltre i composti **1** e **5**, anche il composto **7** possiede una azione duale bilanciata su entrambi gli enzimi (IC_{50} inferiori a 10 μM), anche se nessuno dei composti dimostra di possedere particolare selettività nei riguardi di uno dei due enzimi.

I risultati ottenuti giustificano l'effettuazione degli altri saggi biologici previsti, affinità sui

recettori nicotinici $\alpha 4\beta 2$ e muscarinici M1. Se anche tali saggi dimostreranno interessanti profili di affinità e attività, sarà necessario indagare anche la selettività verso altri recettori colinergici, il cui coinvolgimento potrebbe comportare l'insorgenza di effetti indesiderati.

7. PARTE SPERIMENTALE CHIMICA

I solventi e i reagenti usati per le sintesi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. La colonna cromatografica (CC): Al_2O_3 o SiO_2 (Merck).

I punti di fusione sono stati determinati in capillare con apparecchio Stuart SMP3 e sono non corretti. Le analisi elementari (C, H, N, S) sono state eseguite presso il Laboratorio di Microanalisi della Sezione di Chimica del Farmaco e del Prodotto Cosmetico del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Genova usando uno strumento Flash 2000 CHNS (Thermo Scientific). Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati eseguiti con apparecchio Varian-Gemini 200, usando CDCl_3 come solvente; J (espresse in Hz).

Sintesi delle N-(acil)fenotiazine (a1-a8)

N-(2-Cloroacetil)-fenotiazina (a1)

Ad una sospensione contenente 1 g (5 mmol) di fenotiazina in 20 mL di toluene anidro viene aggiunta, goccia a goccia, una soluzione contenente 0.61 g (5.5 mmol; $d = 1.418$; 0.41 mL) di 2-cloroacetil cloruro sciolti in 5 mL di toluene anidro. Si scalda a riflusso per 4 ore monitorando l'andamento della reazione mediante TLC (CH_2Cl_2 : Al_2O_3 neutra). Alla fine, dopo raffreddamento, si ottiene una soluzione che viene lavata due volte con acqua, seccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata a pressione ridotta. Si ottiene un olio giallo che solidifica per aggiunta di poco Et_2O anidro. Il solido ottenuto viene triturato e lavato per decantazione due volte con pentano. Si ottengono 1.28 g di solido bianco con p.f. = 114-115 °C. (Resa = 92.8%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 61.21	H% 3.93	N% 4.97	S% 11.28
Per $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClNOS}$	calc.:	C% 60.98	H% 3.66	N% 5.08	S% 11.63

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.69-7.12 (m, 4H, arom); 7.02-6.75 (m, 4H, arom); 4.19 (s, 2H, C(O)CH₂Cl).

N-(2-Cloroacetil)-2-clorofenotiazina (a2)

Ad una sospensione contenente 1 g (4.3 mmoli) di 2-clorofenotiazina in 25 mL di toluene anidro viene aggiunta, goccia a goccia, una soluzione contenente 0.52 g (4.7 mmoli; d = 1.417; 0.37 mL) di 2-cloroacetil cloruro sciolti in 6 mL di toluene anidro. Si scalda a riflusso per 4 ore monitorando l'andamento della reazione mediante TLC (CH₂Cl₂: Al₂O₃ neutra). Dopo raffreddamento, la soluzione organica verde scura viene lavata due volte con acqua, seccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata a pressione ridotta. Si ottiene un olio verde chiaro che solidifica per aggiunta di poco Et₂O anidro. Il solido ottenuto viene triturato e lavato per decantazione due volte con pentano. Si ottengono 1.23 g di solido verde chiaro con p.f. = 113-114 °C. (Resa = 92.5%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 54.02	H% 3.18	N% 4.28	S% 9.96
Per C ₁₄ H ₉ Cl ₂ NOS	calc.:	C% 54.21	H% 2.92	N% 4.52	S% 10.34

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.65-7.09 (m, 4H, arom); 6.97-6.72 (m, 3H, arom); 4.16 (s, 2H, C(O)CH₂Cl).

N-(2-Cloroacetil)-2-metossifenotiazina (a3)

Ad una sospensione contenente 1 g (3.6 mmoli) di 2-metossifenotiazina in 25 mL di toluene anidro viene aggiunta, goccia a goccia, una soluzione contenente 0.54 g (4.8 mmoli; d = 1.417; 0.37 mL) di 2-cloroacetil cloruro sciolti in 5 mL di toluene anidro. Si

scalda a riflusso per 4 ore monitorando l'andamento della reazione mediante TLC (CH_2Cl_2 : Al_2O_3 neutra). Dopo raffreddamento, la soluzione organica di colore rosso viene lavata due volte con acqua, seccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata a pressione ridotta. Si ottiene un olio rosso chiaro che solidifica per aggiunta di poco Et_2O anidro. Il solido ottenuto viene triturato e lavato per decantazione tre volte con pentano. Si ottengono 1.26 g di solido rosa chiaro con p.f. = 131-133 °C. (Resa = 94.7%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 59.18	H% 4.11	N% 4.45	S% 10.03
Per $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{S}$	calc.:	C% 58.92	H% 3.96	N% 4.58	S% 10.49

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.67-7.16 (m, 6H, arom); 6.87 (dd, J = 8.8, 2.8, 1H, arom); 4.22 (s, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$); 3.86 (s, 3H, OCH_3).

N-(2-Cloroacetil)-2-trifluorometilfenotiazina (a4)

Ad una sospensione contenente 0.80 g (3 mmol) di 2-trifluorometilfenotiazina in 20 mL di toluene anidro viene aggiunta, goccia a goccia, una soluzione contenente 0.37 g (3.3 mmol; $d = 1.418$; 0.26 mL) di 2-cloroacetil cloruro sciolti in 5 mL di toluene anidro. Si scalda a riflusso per 4 ore monitorando l'andamento della reazione mediante TLC (CH_2Cl_2 : Al_2O_3 neutra). Alla fine, dopo raffreddamento, si ottiene una soluzione che viene lavata due volte con acqua, seccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata a pressione ridotta. Si ottiene un olio giallo che solidifica per aggiunta di poco Et_2O anidro. Il solido ottenuto viene triturato e lavato per decantazione due volte con pentano. Si ottengono 0.94 g di solido bianco con p.f. = 113-115 °C. (Resa = 91.3%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 52.48	H% 2.87	N% 3.94	S% 8.99
Per $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{NOS}$	calc.:	C% 52.41	H% 2.64	N% 4.07	S% 9.33

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.72-7.15 (m, 4H, arom); 7.03-6.81 (m, 3H, arom); 4.20 (s, 2H, C(O)CH₂Cl).

N-(3-Cloropropionil)-fenotiazina (a5)

Ad una sospensione contenente 1 g (5 mmol) di fenotiazina in 20 mL di toluene anidro viene aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di 0.70 g (5.5 mmol; d = 1.33; 0.52 mL) di 2-cloropropionil cloruro sciolti in 5 mL di toluene anidro. Si scalda a riflusso per 4 ore monitorando la reazione mediante TLC (CH₂Cl₂ : Al₂O₃ neutra). Alla fine, dopo raffreddamento, si ottiene una soluzione che viene lavata due volte con acqua, seccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata a pressione ridotta. Si ottiene un olio giallo che solidifica per aggiunta di poco Et₂O anidro. Il solido ottenuto viene tritato e lavato per decantazione due volte con pentano. Si ottengono 1.34 g di solido bianco con p.f. = 115-117 °C. (Resa = 92.4%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 62.38	H% 4.41	N% 4.55	S% 10.82
Per C ₁₅ H ₁₂ ClNOS	calc.:	C% 62.17	H% 4.17	N% 4.83	S% 11.07

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.61-7.08 (m, 4H, arom); 6.98-6.73 (m, 4H, arom); 3.39 (t, J = 6.2, 2H, CH₂Cl); 2.75 (t, J = 6.2, 2H, CH₂N).

N-(3-Cloropropionil)-2-clorofenotiazina (a6)

Ad una sospensione contenente 0.83 g (3.5 mmoli) di 2-clorofenotiazina in 20 mL di toluene anidro viene aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di 0.51 g (3.8 mmoli; d = 1.33; 0.38 mL) di 2-cloropropionil cloruro sciolti in 5 mL di toluene anidro. Si scalda a

riflusso per 4 ore monitorando la reazione mediante TLC (CH_2Cl_2 : Al_2O_3 neutra). Dopo raffreddamento, la soluzione organica di colore verde scuro viene lavata due volte con acqua, seccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata a pressione ridotta. Si ottiene un olio verde che solidifica per aggiunta di poco Et_2O anidro. Il solido ottenuto viene triturato e lavato per decantazione due volte con pentano. Si ottengono 1.02 g di solido verde chiaro con p.f. = 127-128 °C. (Resa = 90.3%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 55.83	H% 3.57	N% 4.20	S% 9.74
Per $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NOS}$	calc.:	C% 55.57	H% 3.42	N% 4.32	S% 9.89

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.62-7.13 (m, 4H, arom); 7.02-6.80 (m, 3H, arom); 3.42 (t, J = 6.4, 2H, CH_2Cl); 2.77 (t, J = 6.4, 2H, CH_2N).

N-(3-Cloropropionil)-2-metossifenotiazina (a7)

Ad una sospensione contenente 1 g (4.36 mmoli) di 2-metossifenotiazina in 20 mL di toluene anidro viene aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di 0.61 g (4.8 mmoli; d = 1.33; 0.38 mL) di 2-cloropropionil cloruro sciolti in 5 mL di toluene anidro. Si scalda a riflusso per 4 ore monitorando la reazione mediante TLC (CH_2Cl_2 : Al_2O_3 neutra). Dopo raffreddamento, la soluzione organica di colore rosso scuro viene lavata due volte con acqua, seccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata a pressione ridotta. Si ottiene un olio rosso che solidifica per aggiunta di poco Et_2O anidro. Il solido ottenuto viene triturato e lavato per decantazione tre volte con pentano. Si ottengono 1.28 g di solido rosa chiaro con p.f. = 119-120 °C. (Resa = 92.1%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 60.32	H% 4.57	N% 4.21	S% 9.67
Per $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2\text{S}$	calc.:	C% 60.09	H% 4.41	N% 4.38	S% 10.03

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.65-7.14 (m, 6H, arom); 6.83 (dd, J = 8.4, 2.8, 1H, arom); 3.84 (s, 3H, OCH₃); 3.56 (t, J = 6.2, 2H, CH₂Cl); 2.82 (t, J = 6.2, 2H, CH₂N).

N-(3-Cloropropionil)-2-trifluorometilfenotiazina (a8)

Ad una sospensione contenente 0.67 g (2.5 mmol) di 2-trifluorometilfenotiazina in 20 mL di toluene anidro viene aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di 0.36 g (2.8 mmol; d = 1.33; 0.27 mL) di 2-cloropropionil cloruro sciolti in 5 mL di toluene anidro. Si scalda a riflusso per 4 ore monitorando la reazione mediante TLC (CH₂Cl₂ : Al₂O₃ neutra). Alla fine, dopo raffreddamento, si ottiene una soluzione che viene lavata due volte con acqua, seccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata a pressione ridotta. Si ottiene un olio giallo che solidifica per aggiunta di poco Et₂O anidro. Il solido ottenuto viene tritato e lavato per decantazione due volte con pentano. Si ottengono 0.81 g di solido bianco con p.f. = 127-128 °C. (Resa = 91.0%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 53.94	H% 3.45	N% 4.02	S% 8.66
Per C ₁₆ H ₁₁ ClF ₃ NOS	calc.:	C% 53.71	H% 3.10	N% 3.91	S% 8.96

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.65-7.11 (m, 4H, arom); 7.02-6.72 (m, 3H, arom); 3.40 (t, J = 6.2, 2H, CH₂Cl); 2.77 (t, J = 6.2, 2H, CH₂N).

N-[2-(Citisinil)acetil]fenotiazina (1)

In tubo a 0,74 g (3,87 mmoli) di citisina sono aggiunti 0,54 g (3,87 mmoli) di K₂CO₃ anidro e 1,07 (3,87 mmoli) N-(2-cloroacetil)fenotiazina, in 5 mL di acetonitrile. Si chiude il tubo sotto atmosfera di N₂ e si scalda a 90°C per 20 ore. Dopo aver raffreddato si elimina

il CH_3CN sotto vuoto e si riprende il residuo con HCl 2N (si nota effervescenza). La soluzione acquosa acida, lavata due volte con CH_2Cl_2 , viene alcalinizzata nettamente con NaOH 2N ed estratta 4 volte con CH_2Cl_2 . La fase organica viene seccata su Na_2SO_4 , filtrata e portata a secco. Si ottengono 1,47 g di solido che viene purificato per cromatografia su Al_2O_3 (1 : 20) eluendo con CH_2Cl_2 . Si ottengono 1,29 g di solido amorfo biancastro con p.f. = 98-100 °C. (Resa = 77,7%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 70.10	H% 5.15	N% 9.45	S% 7.08
Per $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$	calc.:	C% 69.91	H% 5.40	N% 9.78	S% 7.47

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ =7,58-7,07 (m, 9H, 8H arom, 1H citisina); 6,49 (d, 1H, J = 9Hz, citisina); 5,99 (d, 1H, J = 6,6Hz, citisina); 3,98-3,78 (m, 2H, citisina); 3,24 (s, 2H, CO- CH_2); 3,03-2,53 (m, 5H, citisina); 2,48-2,30 (m, 1H, citisina); 1,97-1,63 (m, 2H, citisina).

N-[2-(Citisinil)acetil]-2-clorofenotiazina (2)

In tubo a 0,35 g (1,83 mmoli) di citisina vengono aggiunti e 0,25 g (1,83 mmoli) di K_2CO_3 anidro e 0,57 g (1,83 mmoli) di N-(2-cloroacetil)-2-clorofenotiazina in 5 mL di acetonitrile. Si chiude il tubo sotto atmosfera di N_2 e si scalda a 90°C per 20 ore. Dopo aver raffreddato si elimina il CH_3CN sotto vuoto e si riprende il residuo con HCl 2N (si nota effervescenza). La soluzione acquosa acida, lavata due volte con CH_2Cl_2 , viene alcalinizzata nettamente con NaOH 2N ed estratta 4 volte con CH_2Cl_2 .

La fase organica viene seccata su Na_2SO_4 , filtrata e portata a secco. Si ottengono 0,74 g di solido che viene purificato per cromatografia su Al_2O_3 (1 : 30) eluendo con CH_2Cl_2 e CH_2Cl_2 + 0,5 % MeOH. Si ottengono 0,63 g di solido amorfo bianco con p.f. = 96-98 °C.

(Resa = 70,5%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 64.74	H% 5.10	N% 9.32	S% 6.99
Per C ₂₅ H ₂₂ ClN ₃ O ₂ S	calc.:	C% 64.72	H% 4.78	N% 9.06	S% 6.91

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): d 7,58-6,74 (m, 8H, 7H arom, 1H citisina); 6,57-6,42 (m, 1H, citisina); 6,05-5,95 (m, 1H, citisina); 4,02-3,58 (m, 5H, 2H citisina e a 3,84, s, 3H OCH₃); 3,39 (s, 2H, CO-CH₂); 3,03-2,61 (m, 5H, citisina); 2,48-2,29 (m, 1H, citisina); 1,91-1,64 (m, 2H, citisina).

N-[2-(Citisinil)acetil]-2-metossifenotiazina (3)

In tubo a 0,68 g (3,6 mmoli) di citisina sono aggiunti 1,09 g (3,6 mmoli) di N-(2-cloroacetil)-(2-metossifenotiazina e 0,49 g (3,6 mmoli) di K₂CO₃ anidro in 5 mL di acetonitrile. Si chiude il tubo sotto atmosfera di N₂ e si scalda a 90°C per 20 ore. Dopo aver raffreddato si elimina il CH₃CN sotto vuoto e si riprende il residuo con HCl 2N (si nota effervescenza). La soluzione acquosa acida, lavata due volte con CH₂Cl₂, viene alcalinizzata nettamente con NaOH 2N ed estratta 4 volte con CH₂Cl₂. La fase organica viene seccata su Na₂SO₄, filtrata e portata a secco. Si ottengono 1,55 g di solido che viene purificato per cromatografia su Al₂O₃ (1 : 20) eluendo con CH₂Cl₂. Si ottengono 1,49 g di solido amorfo beige con p.f. = 105-108 °C. (Resa = 90,3%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 68.03	H% 5.77	N% 8.77	S% 6.77
Per C ₂₆ H ₂₅ N ₃ O ₃ S	calc.:	C% 67.95	H% 5.48	N% 9.14	S% 6.98

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): d 7,46-6,68 (m, 8H, 7H arom, 1H citisina); 6,55-6,40 (m,

1H, citisina); 6,04-5,98 (m, 1H, citisina); 3,99-3,63 (m, 5H, 2H citisina e a 3,82, s, 3H OCH₃); 3,38 (s, 2H, CO-CH₂); 3,0-2,6 (m, 5H, citisina); 2,48-2,3 (m, 1H, citisina); 1,88-1,65 (m, 2H, citisina).

N-[2-(Citisinil)acetil]-2-trifluorometilfenotiazina (4)

In tubo a 0,3 g (1,6 mmoli) di citisina sono aggiunti 0,22 g (1,6 mmoli) di K₂CO₃ e 0,55 g (1,6 mmoli) di N-(2-cloroacetil)-2-trifluorometilfenotiazina sciolti in 5 mL di acetonitrile. Si chiude il tubo sotto atmosfera di N₂ e si scalda a 90°C per 20 ore. Dopo aver raffreddato si elimina il CH₃CN sotto vuoto e si riprende il residuo con HCl 2N (si nota effervescenza). La soluzione acquosa acida, lavata due volte con CH₂Cl₂, viene alcalinizzata nettamente con NaOH 2N ed estratta 4 volte con CH₂Cl₂.

La fase organica viene seccata su Na₂SO₄, filtrata e portata a secco. Si ottengono 0,63 g di solido che viene purificato per cromatografia su Al₂O₃ (1 : 30) eluendo con CH₂Cl₂ e CH₂Cl₂ + 0,5 % MeOH. Si ottengono 0,54 g di solido amorfo biancastro con p.f. =101-103 °C. (Resa = 68,3%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

trov.: C% 62.78 H% 4.58 N% 8.09 S% 6.51

Per C₂₆H₂₂F₃N₃O₂S calc.: C% 62.77 H% 4.46 N% 8.45 S% 6.44

1H-NMR (200 MHz, CDCl₃): d 7,55-6,79 (m, 8H, 7H arom, 1H citisina); 6,55-6,47 (m, 1H, citisina); 6,04-5,92 (m, 1H, citisina); 3,98-3,61 (m, 2H citisina); 3,41 (s, 2H, CO-CH₂); 3,01-2,63 (m, 5H, citisina); 2,52-2,32 (m, 1H, citisina); 1,89-1,62 (m, 2H, citisina).

N-[3-(Citisinil)propionil]fenotiazina (5)

In tubo a 0,66 g (3,45 mmoli) di citisina vengono aggiunti 1,00 g (3,45 mmoli) di N-(3-

cloropropionil)fenotiazina e 0,48 g (3,45 mmoli) di K_2CO_3 anidro in 5 mL di acetonitrile.

Dopo aver raffreddato si elimina il CH_3CN sotto vuoto e si riprende il residuo con HCl 2N (si nota effervescenza). La soluzione acquosa acida, lavata due volte con CH_2Cl_2 , viene alcalinizzata nettamente con NaOH 2N ed estratta 4 volte con CH_2Cl_2 .

La fase organica viene seccata su Na_2SO_4 , filtrata e portata a secco. Si ottengono 1,48 g di solido che viene purificato per cromatografia su Al_2O_3 (1 : 30) eluendo con CH_2Cl_2 e $CH_2Cl_2 + 0,5 \% MeOH$. Si ottengono 1,39 g di solido amorfo bianco con p.f. = 120-122 °C. (Resa = 90,8%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 70.66	H% 5.83	N% 9.28	S% 7.54
Per $C_{26}H_{25}N_3O_2S$	calc.:	C% 70.40	H% 5.68	N% 9.47	S% 7.23

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): d 7,55-6,75 (m, 9H, 8H arom e 1H citisina); 6,43 (d, 1H, $J=9,38$ Hz, citisina); 5,97 (d, 1H, $J=4,93$ Hz, citisina); 4,03-3,95 (m, 2H citisina); 2,98-2,18 (m, 9H, 4H CO- CH_2CH_2 e 5H citisina); 2,06-1,92 (m, 1H, citisina); 1,91-1,65 (m, 2H, citisina).

N-[3-(Citisinil)propionil]-2-clorofenotiazina (6)

In tubo a 0,56 g (1,56 mmoli) di citisina vengono aggiunti 0,56 g (1,81 mmoli) di N-(3-cloropropionil)-2-clorofenotiazina e 0,25 g (1,81 mmoli) di K_2CO_3 anidro in 5 mL di acetonitrile.

Dopo aver raffreddato si elimina il CH_3CN sotto vuoto e si riprende il residuo con HCl 2N (si nota effervescenza). La soluzione acquosa acida, lavata due volte con CH_2Cl_2 , viene alcalinizzata nettamente con NaOH 2N ed estratta 4 volte con CH_2Cl_2 .

La fase organica viene seccata su Na_2SO_4 , filtrata e portata a secco. Si ottengono 0,75 g di

solido che viene purificato per cromatografia su Al_2O_3 (1 : 30) eluendo con CH_2Cl_2 . Si ottengono 0,60 g di solido amorfo biancastro con p.f. = 115-117 °C. (Resa = 69,8%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 65.45	H% 5.24	N% 8.45	S% 6.38
Per $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$	calc.:	C% 65.33	H% 5.06	N% 8.79	S% 6.71

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): d 7,61-6,83 (m, 8H, 7H arom e 1H citisina); 6,42 (d, 1H, $J=9,38$ Hz, citisina); 5,99 (d, 1H, $J=4,93$ Hz, citisina); 4,01-3,91 (m, 2H citisina); 3.03-2,22 (m, 9H, 4H $\text{CO-CH}_2\text{CH}_2$ e 5H citisina); 2,00-1,91 (m, 1H, citisina); 1,87-1,62 (m, 2H, citisina).

N-[3-(Citisinil)propionil]-2-metossifenotiazina (7)

In tubo a 0,64 g (3,38 mmoli) di citisina vengono aggiunti 1,08 g (3,38 mmoli) di N-3-cloropropionil)-2-metossifenotiazina e 0,47 g (3,38 mmoli) di K_2CO_3 anidro in 5 mL di acetonitrile.

Dopo aver raffreddato si elimina il CH_3CN sotto vuoto e si riprende il residuo con HCl 2N (si nota effervescenza). La soluzione acquosa acida, lavata due volte con CH_2Cl_2 , viene alcalinizzata nettamente con NaOH 2N ed estratta 4 volte con CH_2Cl_2 .

La fase organica viene seccata su Na_2SO_4 , filtrata e portata a secco. Si ottengono 1,53 g di solido che viene purificato per cromatografia su Al_2O_3 (1 : 30) eluendo con CH_2Cl_2 e $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 0,5\%$ MeOH. Si ottengono 1,47 g di solido amorfo biancastro con p.f. = 133-136 °C. (Resa = 91,8%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 68.65	H% 5.33	N% 8.71	S% 6.50
Per $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	calc.:	C% 68.48	H% 5.75	N% 8.87	S% 6.77

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): d 7,53-6,72 (m, 8H, 7H arom e 1H citisina); 6,39 (d, 1H,

J=9,38 Hz, citisina); 5,95 (d, 1H, J=4,93 Hz, citisina); 4,05-3,72 (m, 5H, 2H citisina a 3,8, s, 3H OCH₃); 2,95-2,17 (m, 9H, 4H CO-CH₂CH₂ e 5H citisina); 2,08-1,93 (m, 1H, citisina); 1,93-1,62 (m, 2H, citisina).

N-[3-(Citisinil)propionil]-2-trifluorometilfenotiazina (8)

In tubo a 0,56 g (1,56 mmoli) di citisina vengono aggiunti 0,56 g (1,56 mmoli) di N-(3-cloropropionil)-2-trifluorometilfenotiazina e 0,22 g (1,56 mmoli) di K₂CO₃ anidro in 5 mL di acetonitrile.

Dopo aver raffreddato si elimina il CH₃CN sotto vuoto e si riprende il residuo con HCl 2N (si nota effervescenza). La soluzione acquosa acida, lavata due volte con CH₂Cl₂, viene alcalinizzata nettamente con NaOH 2N ed estratta 4 volte con CH₂Cl₂.

La fase organica viene seccata su Na₂SO₄, filtrata e portata a secco. Si ottengono 0,55 g di solido che viene purificato per cromatografia su Al₂O₃ (1 : 30) eluendo con CH₂Cl₂. Si ottengono 0,5 g di solido amorfo bianco con p.f. = 123-125 °C. (Resa = 63,3%).

L'analisi elementare ha fornito i seguenti risultati:

	trov.:	C% 63.50	H% 5.00	N% 7.91	S% 6.06
Per C ₂₇ H ₂₄ F ₃ N ₃ O ₂ S	calc.:	C% 63.99	H% 4.73	N% 8.21	S% 6.27

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): d 7,60-6,86 (m, 8H, 7H arom e 1H citisina); 6,40 (d, 1H, J=9,38 Hz, citisina); 5,94 (d, 1H, J=4,93 Hz, citisina); 3,98-3,87 (m, 2H citisina); 3,01-2,18 (m, 9H, 4H CO-CH₂CH₂ e 5H citisina); 2,02-1,93 (m, 1H, citisina); 1,88-1,59 (m, 2H, citisina).

8. Parte sperimentale biologica

La concentrazione dei composti studiati, determinata come inibizione del 50% dell'attività misurata (IC_{50}), è stata ottenuta saggiando 5-7 concentrazioni (eseguite in duplicato) in un intervallo compreso tra 100-0,01 μ M, e calcolata mediante regressione non lineare di una curva risposta/log(concentrazione), usando il software GraphPad Prism® v. 5.01 (La Jolla, CA, USA). I valori sono stati ottenuti come media di tre esperimenti indipendenti.

Saggio di inibizione delle Colinesterasi

I saggi in vitro di inibizione dell'AChE di torpedine (463 U/mg) e della BChE ottenuta da siero equino (13 U/mg) sono stati eseguiti in tampone fosfato 0,1 M, pH 8.0. L'acetil- e butirrilcolina ioduro sono state utilizzate, rispettivamente, come substrato, e l'acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) è stato usato come reagente cromoforo. I saggi di inibizione sono stati effettuati con uno spettrofotometro UV-visibile Agilent 8453 E. Le soluzioni dei composti sono state preparate partendo da soluzioni standard 10 mM in DMSO, diluite con acqua fino ad un contenuto finale di solvente organico inferiore all'1%. L'attività inibitoria di AChE è stata determinata in una miscela di reazione contenente 100 μ L di soluzione di AChE (0,9 U/mL in tampone fosfato 0,1 M, pH 8.0), 100 μ L di una soluzione 3,3 mM di DTNB in tampone fosfato 0,1 M (pH 7,0) con $NaHCO_3$ 6 mM, 100 μ L di una soluzione dell'inibitore (sei o sette intervalli di concentrazione da 1×10^{-8} a 1×10^{-4} M), e 600 μ L di soluzione tampone. Dopo incubazione a 25°C per 20 minuti, l'acetilcolina ioduro (100 μ L di soluzione acquosa 5 mM) viene aggiunta al substrato, e l'idrolisi catalizzata da AChE è stata monitorata misurando l'aumento dell'assorbanza a 412 nm per 5 minuti a 25°C. L'attività inibitoria BChE è stata valutata in modo simile usando ioduro di butirrilcolina come substrato.

Bibliografia

- [1] Ghumatkar, P.J.; Patil, S.P.; Jain, P.D.; Tambe, R.M.; Sathaye, S. Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effects of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015, 135, 182–191.
- [2] Deture, M.A.; Dickson, D.W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 2019, 5, 1–18.
- [3] Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2018—The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers; Alzheimer's Disease International (ADI): London, UK, 2018.
- [4] Maresova, P.; Mohelska, H.; Dolejs, J.; Kuca, K. Socio-economic Aspects of Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2015, 12, 903–911.
- [5] Brookmeyer, R.; Johnson, E.; Ziegler-Graham, K.; Arrighi, H.M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer Dement.* 2007, 3, 186–191.
- [6] Ferri, C.P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; et al. Global prevalence of dementia: A Delphi consensus study. *Lancet* 2005, 366, 2112–2117.
- [7] Prince, M.; Bryce, R.; Albanese, E.; Wimo, A.; Ribeiro, W.; Ferri, C.P. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer Dement.* 2013, 9, 63–75.
- [8] Gustavsson, A.; Green, C.; Jones, R.W.; Förstl, H.; Simsek, D.; de Reydet de Vulpillieres, F.; Luthman, S.; Adlard, N.; Bhattacharyya, S.; Wimo, A. Current issues and future research priorities for health economic modelling across the full continuum of Alzheimer's disease. *Alzheimer Dement.* 2017, 13, 312–321.
- [9] Cimler, R.; Maresova, P.; Kuhnova, J.; Kuca, K. Predictions of Alzheimer's disease treatment and care costs in European countries. *PLoS ONE* 2019, 14, e0210958.
- [10] Hebert, L.E.; Scherr, P.A.; Beckett, L.A.; Albert, M.S.; Pilgrim, D.M.; Chown, M.J. et al. Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *JAMA* 1995; 273: 1354–9.
- [11] Liu, C.C.; Kanekiyo, T.; Xu, H.; Bu, G. Apolipoprotein e and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 106–18.
- [12] Shi, Y.; Yamada, K.; Liddelow, S.A.; Smith, S.T.; Zhao, L.; Luo, W. et al. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* 2017; 549: 523–7.
- [13] de Bruijn, R.F.A.G.; Ikram, M.A. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Medicine* 2014; 12: 130.
- [14] Serrano-Pozo, A.; Frosch, M.P.; Masliah, E.; Hyman, B.T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011, 1, 1–23.
- [15] Singh, S.K.; Srivastav, S.; Yadav, A.K.; Srikrishna, S.; Perry, G. Overview of Alzheimer's disease and some therapeutic approaches targeting A β by using several synthetic and herbal compounds. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2016, 22.
- [16] Swerdlow, R.H. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer Dis.* 2018, 62, 1403–1416.
- [17] Perez, S.E.; Ginsberg, S.D.; Counts, S.E.; Mufson, E.J. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: Therapeutic implications. *Expert Rev. Neurother.* 2009, 8, 1703–1718.
- [18] Ferreira-Vieira, T.; Guimaraes, I.; Silva, F.; Ribeiro, F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* 2016, 14, 101–115.
- [19] Oshiro, S.; Morioka, M.S.; Kikuchi, M. Dysregulation of Iron Metabolism in Alzheimer's

- Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2011, 2011, 8.
- [20] Gibson, G.; Cotman, C.; Lynch, G.; Blass, J. Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. *Alzheimer Dement.* 2017, 13, 178–182.
- [21] Gamba, P.; Staurengi, E.; Testa, G.; Giannelli, S.; Sottero, B.; Leonarduzzi, G. A crosstalk between brain cholesterol oxidation and glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 2019, 13, 1–9.
- [22] Martinez, A.; Castro, A. Novel cholinesterase inhibitors as future effective drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2006, 15, 1–12.
- [23] Mehta, M.; Adem, A.; Sabbagh, M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimer Dis.* 2012, 2012, 728983.
- [24] Sun, Y.; Lai, M.; Lu, C.; Chen, R. How long can patients with mild or moderate Alzheimer's dementia maintain both the cognition and the therapy of cholinesterase inhibitors: A national population-based study. *Eur. J. Neurol.* 2008, 15, 278–283.
- [25] Nestor, P.J.; Scheltens, P.; Hodges, J.R. Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004, 10, S34.
- [26] Francis, P.T.; Palmer, A.M.; Snape, M.; Wilcock, G.K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 1999, 66, 137–147.
- [27] Chen, X.Q.; Mobley, W.C. Exploring the pathogenesis of Alzheimer disease in basal forebrain cholinergic neurons: Converging insights from alternative hypotheses. *Front. Neurosci.* 2019, 13, 446.
- [28] Bowen, D.M.; Smith, C.B.; White, P.; Davison, A.N. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 1976; 99: 459–96.
- [29] Davis, K.L.; Mohs, R.C.; Marin, D.; Purohit, D.P.; Perl, D.P.; Lantz, M. et al. Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *JAMA* 1999; 281: 1401–6.
- [30] Mesulam, M. A horseradish peroxidase method for the identification of the efferents of acetyl cholinesterase-containing neurons. *J Histochem Cytochem* 1976; 24: 1281–5.
- [31] Whitehouse, P.J.; Price, D.L.; Clark, A.W.; Coyle, J.T.; DeLong, M.R. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol* 1981; 10: 122–6.
- [32] Drachman, D.A.; Leavitt, J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol* 1974; 30: 113–21.
- [33] Summers, W.K.; Majorski, L.V.; Marsh, G.M.; Tachiki, K.; Kling, A. Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *New Engl J Med* 1986; 315: 1241–5.
- [34] Wurtman, R.J. American Society for Clinical Investigation. *J. Clin. Investig.* 1994, 94, 470.
- [35] Sharma, K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol. Med. Rep.* 2019, 20, 1479–1487.
- [36] Doody, R.S.; Stevens, J.C.; Beck, C.; Dubinsky, R.M.; Kaye, J.A.; Gwyther, L.; Mohs, R.C.; Thal, L.J.; Whitehouse, P.J.; DeKosky, S.T.; et al. Practice parameter: Management of dementia (an evidence-based review): Report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001, 56, 1154–1166.
- [37] Richter, N.; Nellessen, N.; Dronse, J.; Dillen, K.; Jacobs, H.I.L.; Langen, K.J.; Dietlein, M.; Kracht, L.; Neumaier, B.; Fink, G.R.; et al. Spatial distributions of cholinergic impairment and neuronal hypometabolism differ in MCI due to AD. *NeuroImage Clin.* 2019, 24, 101978.
- [38] Mesulam, M.M. Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in

- Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 2013; 521: 4124–44.
- [39] Picciotto, M.R.; Higley, M.J.; Mineur, Y.S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* 2012, 76, 116–129.
- [40] Talesa, V.N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 2001, 122, 1961–1969.
- [41] Rees, T.M.; Brimijoin, S. The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Drugs Today* 2003, 39, 75–83.
- [42] Francis, P.T. The Interplay of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. *CNS Spectr.* 2005, 10, 6–9.
- [43] Nordberg, A.; Winblad, B. Reduced number of [3H]nicotine and [3H]acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains. *Neurosci Lett* 1986; 72: 115–19.
- [44] Schroder, H.; Giacobini, E.; Struble, R.G.; Zilles, K.; Maelicke, A. Nicotinic cholinergic neurons of the frontal cortex are reduced in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1991; 12: 259–62.
- [45] Mash, D.C.; Flynn, D.D.; Potter, L.T. Loss of M2 muscarinic receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science* 1985; 228: 1115–17.
- [46] Jiang, S.; Li, Y.; Zhang, C.; Zhao, Y.; Bu, G.; Xu, H. et al. M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull* 2014; 30: 295–307.
- [47] Sassin, I.; Schultz, C.; Thal, D.R.; Rüb, U.; Arai, K.; Braak, E. et al. Evolution of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes in the basal nucleus of Meynert. *Acta Neuropathol* 2000; 100: 259–69.
- [48] Francis, P.T.; Ramírez, M.J.; Lai, M.K. Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2010; 59: 221–9.
- [49] Blitzer, R.D.; Gil, O.; Landau, E.M. Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1990; 119: 207–10.
- [50] Auerbach, J.M.; Segal, M. Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol* 1996; 492 (Pt 2): 479–93.
- [51] Ikonovic, M.D.; Abrahamson, E.E.; Isanski, B.A.; Wu, J.; Mufson, E.J.; DeKosky, S.T. Superior frontal cortex cholinergic axon density in mild cognitive impairment and early Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2007; 64: 1312–17.
- [52] Kilgard, M.P.; Merzenich, M.M. Plasticity of temporal information processing in the primary auditory cortex. *Nat Neurosci* 1998; 1: 727–31.
- [53] Claassen, J.; Jansen, R. Cholinergically mediated augmentation of cerebral perfusion in Alzheimer's disease and related cognitive disorders: the cholinergic-vascular hypothesis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61: 267–71.
- [54] Van Beek, A.H.; Claassen, J.A. The cerebrovascular role of the cholinergic neural system in Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2011; 221: 537–42.
- [55] Lacombe, P.; Sercombe, R.; Verrecchia, C.; Philipson, V.; MacKenzie, E.T.; Seylaz, J. Cortical blood flow increases induced by stimulation of the substantia innominata in the unanesthetized rat. *Brain Res* 1989; 491: 1–14.
- [56] Sato, A.; Sato, Y. Cerebral cortical vasodilatation in response to stimulation of cholinergic fibres originating in the nucleus basalis of Meynert. *J Auton Nerv Syst* 1990; 30: S137–40.
- [57] Barbelivien, A.; MacKenzie, E.T.; Dauphin, F. Regional cerebral blood flow responses to neurochemical stimulation of the substantia innominata in the anaesthetized rat. *Neurosci Lett* 1995; 190: 81–4.
- [58] Lacombe, P.; Sercombe, R.; Vaucher, E.; Seylaz, J. Reduced cortical vasodilatory response to stimulation of the nucleus basalis of Meynert in the aged rat and evidence for a control

- of the cerebral circulation. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 826: 410–15.
- [59] Vaucher, E.; Borredon, J.; Bonvento, G.; Seylaz, J.; Lacombe, P. Autoradiographic evidence for flow-metabolism uncoupling during stimulation of the nucleus basalis of meynert in the conscious rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 686–94.
- [60] Tabet, N. Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: Anti-inflammatories in acetylcholine clothing! *Age Ageing* 2006, 35, 336–338.
- [61] Sanabria-Castro, A.; Alvarado-Echeverría, I.; Monge-Bonilla, C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Ann. Neurosci.* 2017, 24, 46–54.
- [62] Jiang, S.; Li, Y.; Zhang, C.; Zhao, Y.; Bu, G.; Xu, H.; Zhang, Y.W. M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* 2014, 30, 295–307.
- [63] Pavía, J.; De Ceballos, M.; Sanchez De La Cuesta, F. Alzheimer's disease: Relationship between muscarinic cholinergic receptors, β -amyloid and tau proteins. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1998, 12, 473–481.
- [64] Lombardo, S.; Maskos, U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology* 2015, 96, 255–262.
- [65] Oddo, S.; LaFerla, F.M. The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *J. Physiol. Paris* 2006, 99, 172–179.
- [66] Buckingham, S.D.; Jones, A.K.; Brown, L.A.; Sattelle, D.B. Nicotinic acetylcholine receptor signalling: Roles in alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol. Rev.* 2009, 61, 39–61.
- [67] Georgi, S. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Alzheimer's Disease Therapeutics: A Review of Current Literature. *J. Young Investig.* 2005, 4, 7–14.
- [68] Geula, C.; Mesulam, M. Cholinergic systems and related neuropathological predilection patterns in Alzheimer disease. In: Terry RD, Katzman R, Bick KL, editors. *Alzheimer disease*. New York, NY: Raven Press; 1994. p. 263–94.
- [69] Braak, H.; Del Tredici, K. Reply: the early pathological process in sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2013; 126: 615–18.
- [70] Perry, E.K.; Tomlinson, B.E.; Blessed, G.; Bergmann, K.; Gibson, P.H.; Perry, R.H. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaque and mental test scores in senile dementia. *Br Med J* 1978; 2: 1457–9.
- [71] Beach, T.G.; Kuo, Y.M.; Spiegel, K.; Emmerling, M.R.; Sue, L.I.; Kokjohn, K. et al. The cholinergic deficit coincides with Abeta deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 308–13.
- [72] Potter, P.E.; Rauschkolb, P.K.; Pandya, Y.; Sue, L.I.; Sabbagh, M.N.; Walker, D.G. et al. Pre- and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 49–60.
- [73] Geula, C.; Mesulam, M.; Saroff, D.; Wu, C. Relationship between plaques, tangles, and loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer disease. *J Neuropath Exp Neurol* 1998; 57: 63–75.
- [74] Ramos-Rodriguez, J.J.; Pacheco-Herrero, M.; Thyssen, D.; Murillo-Carretero, M.I.; Berrocoso, E.; Spires-Jones, T.L. et al. Rapid b-amyloid deposition and cognitive impairment after cholinergic denervation in APP/PS1 mice. *J Neuropath Exp Neurol* 2013; 72: 272–85.
- [75] Field, R.H.; Gossen, A.; Cunningham, C. Prior pathology in the basal forebrain cholinergic system predisposes to inflammation-induced working memory deficits: reconciling inflammatory and cholinergic hypotheses of delirium. *J Neurosci* 2012; 32: 6288–94.
- [76] Beaulieu, J.M. A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health. *J Psychiatry Neurosci* 2012; 37: 7–16.
- [77] Jaworski, T.; Dewachter, I.; Lechat, B.; Gees, M.; Kremer, A.; Demedts, D. et al. GSK-

- 3 β /b kinases and amyloid production in vivo. *Nature* 2011; 480: E4–5; discussion E6.
- [78] Chu, J.; Lauretti, E.; Praticò, D. Caspase-3-dependent cleavage of Akt modulates tau phosphorylation via GSK3b kinase: implications for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2017; 22: 1002–8.
- [79] Kalkman, H.O.; Feuerbach, D. Modulatory effects of α 7 nAChRs on the immune system and its relevance for CNS disorders. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 2511–30.
- [80] Nitsch, R.M.; Slack, B.E.; Wurtman, R.J.; Growdon, J.H. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 1992; 258: 304–7.
- [81] Mori, F.; Lai, C.C.; Fusi, F.; Giacobini, E. Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. *Neuroreport* 1995; 6: 633–6.
- [82] Cisse, M.; Braun, U.; Leitges, M.; Fisher, A.; Pages, G.; Checler, F. et al. ERK1-independent alpha-secretase cut of beta-amyloid precursor protein via M1 muscarinic receptors and PKCalpha/epsilon. *Mol Cell Neurosci* 2011; 47: 223–32.
- [83] Welt, T.; Kulic, L.; Hoey, S.E.; McAfoose, J.; Spani, C.; Chadha, A.S. et al. Acute effects of muscarinic M1 receptor modulation on AbetaPP metabolism and amyloid-beta levels in vivo: a Microdialysis Study. *J Alzheimers Dis* 2015; 46: 971–82.
- [84] Espada, S.; Rojo, A.I.; Salinas, M.; Cuadrado, A. The muscarinic M1 receptor activates Nrf2 through a signaling cascade that involves protein kinase C and inhibition of GSK-3beta: connecting neurotransmission with neuroprotection. *J Neurochem* 2009; 110: 1107–19.
- [85] Hunter, J.M.; Kwan, J.; Malek-Ahmadi, M.; Maarouf, C.L.; Kokjohn, T.A.; Belden, C. et al. Morphological and pathological evolution of the brain microcirculation in aging and Alzheimer's disease. *PLoS One* 2012; 7: e36893.
- [86] Engelhardt, B.; Carare, R.O.; Bechmann, I.; Flugel, A.; Laman, J.D.; Weller, R.O. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2016; 132: 317–38.
- [87] Szutowicz, A.; Bielarczyk, H.; Jankowska-Kulawy, A.; Pawelczyk, T.; Ronowska, A. Acetyl-CoA the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 2013; 38: 1523–42.
- [88] Hartig, W.; Saul, A.; Kacza, J.; Grosche, J.; Goldhammer, S.; Michalski, D. et al. Immunolesion-induced loss of cholinergic projection neurones promotes beta-amyloidosis and tau hyperphosphorylation in the hippocampus of triple-transgenic mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40: 106–20.
- [89] Kolisnyk, B.; Al-Onaizi, M.; Soreq, L.; Barbash, S.; Bekenstein, U.; Haberman, N. et al. Cholinergic surveillance over hippocampal RNA metabolism and Alzheimer's-like pathology. *Cereb Cortex* 2017; 27: 3553–67.
- [90] Bodiga, V.; Bodiga, S. Renin angiotensin system in cognitive function and dementia. *Asian J Neurosci* 2013; 2013: 102602.
- [91] Higley, M.J.; Soler-Llavina, G.J.; Sabatini, B.L. Cholinergic modulation of multivesicular release regulates striatal synaptic potency and integration. *Nat Neurosci* 2009; 12: 1121–8.
- [92] Limon, A.; Reyes-Ruiz, J.M.; Miledi, R. Loss of functional GABA(A) receptors in the Alzheimer diseased brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 10071–6.
- [93] Chalermpanupap, T.; Kinkead, B.; Hu, W.T.; Kummer, M.P.; Hammerschmidt, T.; Heneka, M.T. et al. Targeting norepinephrine in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2013; 5: 21.
- [94] McNamara, C.G.; Tejero-Cantero, A.; Trouche, S.; Campo-Urriza, N.; Dupret, D. Dopaminergic neurons promote hippocampal reactivation and spatial memory persistence. *Nat Neurosci* 2014; 17: 1658–60.
- [95] Whitehair, D.C.; Sherzai, A.; Emond, J.; Raman, R.; Aisen, P.S.; Petersen, R.C. et al.

- Influence of apolipoprotein E varepsilon4 on rates of cognitive and functional decline in mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement* 2010; 6: 412–19.
- [96] Salehi, A.; Dubelaar, E.J.; Mulder, M.; Swaab, D.F. Aggravated decrease in the activity of nucleus basalis neurons in Alzheimer's disease is apolipoprotein E-type dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11445–9.
- [97] Dubelaar, E.J.; Verwer, R.W.; Hofman, M.A.; Van Heerikhuize, J.J.; Ravid, R.; Swaab, D.E. ApoE epsilon4 genotype is accompanied by lower metabolic activity in nucleus basalis of Meynert neurons in Alzheimer patients and controls as indicated by the size of the Golgi apparatus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 159–69.
- [98] Miranda, L.F.; Gomes, K.B.; Silveira, J.N.; Pianetti, G.A.; Byrro, R.M.; Peles, P.R. et al. Predictive factors of clinical response to cholinesterase inhibitors in mild and moderate Alzheimer's disease and mixed dementia: a one-year naturalistic study. *J Alzheimers Dis* 2015; 45: 609–20.
- [99] Waring, J.F.; Tang, Q.; Robieson, W.Z.; King, D.P.; Das, U.; Dubow, J. et al. APOE-e4 carrier status and donepezil response in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015; 47: 137–48.
- [100] Bott, J.B.; Heraud, C.; Cosquer, B.; Herbeaux, K.; Aubert, J.; Sartori, M. et al. APOE-sensitive cholinergic sprouting compensates for hippocampal dysfunctions due to reduced entorhinal input. *J Neurosci* 2016; 36: 10472–86.
- [101] Cao, J.; Hou, J.; Ping, J.; Cai, D. Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease 11 Medical and Health Sciences 1109 Neurosciences. *Mol. Neurodegener.* 2018, 13, 64.
- [102] Folch, J.; Petrov, D.; Ettcheto, M.; Abad, S.; Sánchez-López, E.; García, M.L.; Olloquequi, J.; Beas-Zarate, C.; Auladell, C.; Camins, A. Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. *Neural Plast.* 2016, 2016, 1–15.
- [103] Graham, W.V.; Bonito-Oliva, A.; Sakmar, T.P. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu. Rev. Med.* 2017, 68, 413–430.
- [104] Frozza, R.L.; Lourenco, M.V.; de Felice, F.G. Challenges for Alzheimer's disease therapy: Insights from novel mechanisms beyond memory defects. *Front. Neurosci.* 2018, 12, 37.
- [105] Massoud, F.; Gauthier, S. Update on the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 2010; 8: 69–80.
- [106] Giacobini, E. Cholinesterases: New Roles in Brain Function and in Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* 2003, 28, 515–522.
- [107] Birks, J.S. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*; Birks, J.S., Ed.; JohnWiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2006.
- [108] Dou, K.-X.; Tan, M.-S.; Tan, C.-C.; Cao, X.-P.; Hou, X.-H.; Guo, Q.-H.; Tan, L.; Mok, V.; Yu, J.-T. Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: A network meta-analysis of 41 randomized controlled trials. *Alzheimer Res. Ther.* 2018, 10, 126.
- [109] Cavedo, E.; Dubois, B.; Colliot, O.; Lista, S.; Croisile, B.; Tisserand, G.L. et al. Reduced regional cortical thickness rate of change in donepezil-treated subjects with suspected prodromal Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 2016; 77: e1631–8.
- [110] Cavedo, E.; Grothe, M.J.; Colliot, O.; Lista, S.; Chupin, M.; Dormont, D. et al. Reduced basal forebrain atrophy progression in a randomized donepezil trial in prodromal Alzheimer's disease. *Sci Rep* 2017; 7: 11706.
- [111] Dubois, B.; Chupin, M.; Hampel, H.; Lista, S.; Cavedo, E.; Croisile, B. et al. Donepezil decreases annual rate of hippocampal atrophy in suspected prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2015; 11: 1041–9.
- [112] Geaney, D.P.; Soper, N.; Shepstone, B.J.; Cowen, P.J. Effect of central cholinergic stimulation on regional cerebral blood flow in Alzheimer disease. *Lancet* 1990; 335: 1484–

7.

- [113] Ebmeier, K.P.; Hunter, R.; Curran, S.M.; Dougal, N.J.; Murray, C.L.; Wyper, D.J. et al. Effects of a single dose of the acetylcholinesterase inhibitor velnacrine on recognition memory and regional cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology* 1992; 108: 103–9.
- [114] Arahata, H.; Ohyagi, Y.; Matsumoto, S.; Furuya, H.; Murai, H.; Kuwabara, Y. et al. A patient with probable dementia with Lewy bodies, who showed improvement of dementia and parkinsonism by the administration of donepezil [in Japanese]. *Rinsho Shinkeigaku* 2001; 41: 402–6.
- [115] Venneri, A.; Shanks, M.F.; Staff, R.T.; Pestell, S.J.; Forbes, K.E.; Gemmell, H.G. et al. Cerebral blood flow and cognitive responses to rivastigmine treatment in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2002; 13: 83–7.
- [116] Lojkowska, W.; Ryglewicz, D.; Jedrzejczak, T.; Minc, S.; Jakubowska, T.; Jarosz, H. et al. The effect of cholinesterase inhibitors on the regional blood flow in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci* 2003; 216: 119–26.
- [117] Ceravolo, R.; Volterrani, D.; Frosini, D.; Bernardini, S.; Rossi, C.; Logi, C. et al. Brain perfusion effects of cholinesterase inhibitors in Parkinson's disease with dementia. *J Neural Transm* 2006; 113: 1787–90.
- [118] Shirayama, Y.; Takahashi, M.; Oda, Y.; Yoshino, K.; Sato, K.; Okubo, T. et al. rCBF and cognitive impairment changes assessed by SPECT and ADAS-cog in late-onset Alzheimer's disease after 18 months of treatment with the cholinesterase inhibitors donepezil or galantamine. *Brain Imaging Behav* 2017; 1–12. doi: 10.1007/s11682-017-9803-y.
- [119] Mori, S. Responses to donepezil in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 977: 493–500.
- [120] Hansen, R.A.; Gartlehner, G.; Webb, A.P.; Morgan, L.C.; Moore, C.G.; Jonas, D.E. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging* 2008; 3: 211–25.
- [121] Wattmo, C.; Wallin, A.K.; Londos, E.; Minthon, L. Risk factors for nursing home placement in Alzheimer's disease: a longitudinal study of cognition, ADL, service utilization, and cholinesterase inhibitor treatment. *Gerontologist* 2011; 51: 17–27.
- [122] Feldman, H.; Gauthier, S.; Hecker, J.; Vellas, B.; Emir, B.; Mastey, V. et al. Efficacy of donepezil on maintenance of activities of daily living in patients with moderate to severe Alzheimer's disease and the effect on caregiver burden. *J Am Geriatr Soc* 2003; 51: 737–44.
- [123] Hashimoto, M.; Yatabe, Y.; Kaneda, K.; Honda, K.; Ikeda, M. Impact of donepezil hydrochloride on the care burden of family caregivers of patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 2009; 9: 196–203.
- [124] Schoenmakers, B.; Buntinx, F.; De Lepeleire, J. Can pharmacological treatment of behavioural disturbances in elderly patients with dementia lower the burden of their family caregiver? *Fam Pract* 2009; 26: 279–86.
- [125] Adler, G.; Mueller, B.; Articus, K. The transdermal formulation of rivastigmine improves caregiver burden and treatment adherence of patients with Alzheimer's disease under daily practice conditions. *Int J Clin Pract* 2014; 68: 465–70.
- [126] a) Giacobini, E. Alzheimer disease, from molecular biology to therapy. *Adv Exp Med Biol* 1997; 429: 235–45; b) Giacobini, E. Long-term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 2002; 62: 181–7.
- [127] Farlow, M.; Anand, R.; Messina, J.Jr.; Hartman, R.; Veach, J. A 52-week study of the efficacy of rivastigmine in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *Eur Neurol* 2000; 44: 236–41.

- [128] Doraiswamy, P.M.; Krishnan, K.R.; Anand, R.; Sohn, H.; Danyluk, J.; Hartman, R.D. et al. Long-term effects of rivastigmine in moderately severe Alzheimer's disease: does early initiation of therapy offer sustained benefits? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26: 705–12.
- [129] Raskind, M.A.; Peskind, E.R.; Wessel, T.; Yuan, W. Galantamine in AD: a 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group. *Neurology* 2000; 54: 2261–8.
- [130] Farlow, M.R.; Salloway, S.; Tariot, P.N.; Yardley, J.; Moline, M.L.; Wang, Q. et al. Effectiveness and tolerability of high-dose (23 mg/d) versus standard-dose (10 mg/d) donepezil in moderate to severe Alzheimer's disease: a 24-week, randomized, double-blind study. *Clin Ther* 2010; 32: 1234–51.
- [131] Farlow, M.R.; Grossberg, G.T.; Sadowsky, C.H.; Meng, X.; Somogyi, M. A 24-week, randomized, controlled trial of rivastigmine patch 13.3 mg/24 h versus 4.6 mg/24 h in severe Alzheimer's dementia. *CNS Neurosci Ther* 2013; 19: 745–52.
- [132] Geldmacher, D.S.; Frolich, L.; Doody, R.S.; Erkinjuntti, T.; Vellas, B.; Jones, R.W. et al. Realistic expectations for treatment success in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging* 2006; 10: 417–29.
- [133] Aston-Jones, G.; Chen, S.; Zhu, Y.; Oshinsky, M.L. A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci* 2001; 4: 732–8.
- [134] Power, A.E. Slow-wave sleep, acetylcholine, and memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 1795–6.
- [135] Mitsushima, D.; Mizuno, T.; Kimura, F. Age-related changes in diurnal acetylcholine release in the prefrontal cortex of male rats as measured by microdialysis. *Neuroscience* 1996; 72: 429–34.
- [136] Zenaro, E.; Piacentino, G.; Constantin, G. The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 2017, 107, 41–56.
- [137] Lipsman, N.; Meng, Y.; Bethune, A.J.; Huang, Y.; Lam, B.; Masellis, M.; Herrmann, N.; Heyn, C.; Aubert, I.; Boutet, A.; et al. Blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease using MR-guided focused ultrasound. *Nat. Commun.* 2018, 9, nyz310_208.
- [138] Cai, Z.; Qiao, P.F.; Wan, C.Q.; Cai, M.; Zhou, N.K.; Li, Q. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer Dis.* 2018, 63, 1223–1234.
- [139] Montagne, A.; Zhao, Z.; Zlokovic, B.V. Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? *J. Exp. Med.* 2017, 214, 3151–3169.
- [140] Sweeney, M.D.; Sagare, A.P.; Zlokovic, B.V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 2018, 14, 133–150.
- [141] Marques, F.; Sousa, J.; Sousa, N.; Palha, J. Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 2013, 8, 38.
- [142] Kalaria, R.N. Blood Brain Barrier Dysfunction and Cerebrovascular Degeneration in Alzheimer's Disease. In *Cerebral Amyloid Angiopathy in Alzheimer's Disease and Related Disorders*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2000; pp. 189–206.
- [143] Banks, W.A. Drug delivery to the brain in Alzheimer's disease: Consideration of the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012, 64, 629–639.
- [144] Matsui, K.; Taniguchi, S.; Yoshimura, T. Correlation of the intrinsic clearance of donepezil (Aricept®) between in vivo and in vitro studies in rat, dog and human. *Xenobiotica* 1999, 29, 1059–1072.
- [145] Geerts, H.; Guillaumat, P.O.; Grantham, C.; Bode, W.; Anciaux, K.; Sachak, S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits. *Brain Res.* 2005, 1033, 186–193.
- [146] Chakraborty, A.; deWit, N.M.; van der Flier, W.M.; de Vries, H.E. The blood brain barrier in Alzheimer's disease. *Vascul. Pharmacol.* 2017, 89, 12–18.

- [147] Zdarova Karasova, J.; Sestak, V.; Korabecny, J.; Mezeiova, E.; Palicka, V.; Kuca, K.; Mzik, M. 1-Benzyl-4-methylpiperidinyl moiety in donepezil: The priority ticket across the blood-brain-barrier in rats. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2018, 1092, 350–358.
- [148] Nordberg, A.; Svensson, A.L. Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. A comparison of tolerability and pharmacology. *Drug Saf.* 1998, 19, 465–480.
- [149] Wagstaff, A.J.; McTavish, D. Tacrine: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy in Alzheimer's Disease. *Drugs Aging* 1994, 4, 510–540.
- [150] Schmitz, T.W.; Spreng, R.N. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Basal forebrain degeneration precedes and predicts the cortical spread of Alzheimers pathology. *Nat Commun* 2016; 7: 13249.
- [151] Richter, N.; Beckers, N.; Onur, O.A.; Dietlein, M.; Tittgemeyer, M.; Kracht, L. et al. Effect of cholinergic treatment depends on cholinergic integrity in early Alzheimer's disease. *Brain* 2018; 141: 903–15.
- [152] Mishra, P.; Kumar, A.; Panda, G. Anti-cholinesterase hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease (1998–2018). *Bioorganic Med. Chem.* 2019, 27, 895–930.
- [153] Zueva, I.; Dias, J.; Lushchekina, S.; Semenov, V.; Mukhamedyarov, M.; Pashirova, T.; Babaev, V.; Nachon, F.; Petrova, N.; Nurullin, L.; et al. New evidence for dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase as improved drugs for treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2019, 155, 131–141.
- [154] Knez, D.; Coquelle, N.; Pišlar, A.; Žakelj, S.; Jukič, M.; Sova, M.; Mravljak, J.; Nachon, F.; Brazzolotto, X.; Kos, J.; et al. Multi-target-directed ligands for treating Alzheimer's disease: Butyrylcholinesterase inhibitors displaying antioxidant and neuroprotective activities. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 156, 598–617.
- [155] Kumar, A.; Tiwari, A.; Sharma, A. Changing Paradigm from one Target one Ligand Towards Multi-target Directed Ligand Design for Key Drug Targets of Alzheimer Disease: An Important Role of In Silico Methods in Multi-target Directed Ligands Design. *Curr. Neuropharmacol.* 2018, 16, 726–739.
- [156] Bolognesi, M.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Melchiorre, C. From Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors to Multi-Target-Directed Ligands (MTDLs): A Step Forward in the Treatment of Alzheimers Disease. *Mini Rev. Med. Chem.* 2008, 8, 960–967.
- [157] Mohamed, T.; Shakeri, A.; Rao, P.P.N. Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 113, 258–272.
- [158] Bajda, M.; Guzior, N.; Ignasik, M.; Malawska, B. Multi-Target-Directed Ligands in Alzheimer's Disease Treatment. *Curr. Med. Chem.* 2011, 18, 4949–4975.
- [159] Oliveira, C.; Cagide, F.; Teixeira, J.; Amorim, R.; Sequeira, L.; Mesiti, F.; Silva, T.; Garrido, J.; Remião, F.; Vilar, S.; et al. Hydroxybenzoic Acid Derivatives as Dual-Target Ligands: Mitochondriotropic Antioxidants and Cholinesterase Inhibitors. *Front. Chem.* 2018, 6, 126.
- [160] Yu, Q.S.; Holloway, H.W.; Utsuki, T.; Brossi, A.; Greig, N.H. Synthesis of novel phenserine-based-selective inhibitors of butyrylcholinesterase for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 1855–1861.
- [161] Unzeta, M.; Esteban, G.; Bolea, I.; Fogel, W.A.; Ramsay, R.R.; Youdim, M.B.H.; Tipton, K.F.; Marco-Contelles, J. Multi-target directed donepezil-like ligands for Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 2016, 10, 1–24.
- [162] Lu, C.; Guo, Y.; Yan, J.; Luo, Z.; Luo, H.B.; Yan, M.; Huang, L.; Li, X. Design, synthesis, and evaluation of multitarget-directed resveratrol derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 5843–5859.

- [163] Lee, H.Y.; Fan, S.J.; Huang, F.I.; Chao, H.Y.; Hsu, K.C.; Lin, T.E.; Yeh, T.K.; Lai, M.J.; Li, Y.H.; Huang, H.L.; et al. 5-Aroylindoles Act as Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Ameliorating Alzheimer's Disease Phenotypes. *J. Med. Chem.* 2018, 61, 7087–7102.
- [164] Vohora, D.; Bhowmik, M. Histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists on cognitive and motor processes: Relevance to Alzheimer's disease, ADHD, schizophrenia, and drug abuse. *Front. Syst. Neurosci.* 2012, 6, 72.
- [165] Gemkow, M.J.; Davenport, A.J.; Harich, S.; Ellenbroek, B.A.; Cesura, A.; Hallett, D. The histamine H3 receptor as a therapeutic drug target for CNS disorders. *Drug Discov. Today* 2009, 14, 509–515.
- [166] Berlin, M.; Boyce, C.W.; De Lera Ruiz, M. Histamine H3 receptor as a drug discovery target. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 26–53.
- [167] Muñoz-Ruiz, P.; Rubio, L.; García-Palomero, E.; Dorronsoro, I.; Del Monte-Millán, M.; Valenzuela, R.; Usán, P.; De Austria, C.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; et al. Design, synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: New disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 7223–7233.
- [168] Lange, J.H.M.; Coolen, H.K.A.C.; Van Der Neut, M.A.W.; Borst, A.J.M.; Stork, B.; Verveer, P.C.; Kruse, C.G. Design, synthesis, biological properties, and molecular modeling investigations of novel tacrine derivatives with a combination of acetylcholinesterase inhibition and cannabinoid CB1 receptor antagonism. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 1338–1346.
- [169] Smith, T.H.; Sim-Selley, L.J.; Selley, D.E. Cannabinoid CB 1 receptor-interacting proteins: Novel targets for central nervous system drug discovery? *Br. J. Pharmacol.* 2010, 160, 454–466.
- [170] Ghosh, A.K.; Osswald, H.L. BACE1 (β -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43, 6765–6813.
- [171] Prati, F.; Bottegoni, G.; Bolognesi, M.L.; Cavalli, A. BACE-1 Inhibitors: From Recent Single-Target Molecules to Multitarget Compounds for Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* 2018, 61, 619–637.
- [172] Wu, H.; Li, X.D.; Peng, D.T.; Jiao, J.S.; Li, Y.F.; Yu, P.L.; Ji, Y. The role of butyrylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Chin. J. Contemp. Neurol. Neurosurg.* 2017, 17, 933–936.
- [173] Wu, Y.; Li, Z.; Huang, Y.Y.; Wu, D.; Luo, H. Bin Novel Phosphodiesterase Inhibitors for Cognitive Improvement in Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* 2018, 61, 5467–5483.
- [174] Vila-Real, H.; Coelho, H.; Rocha, J.; Fernandes, A.; Ventura, M.R.; Maycock, C.D.; Iranzo, O.; Simplício, A.L. Peptidomimetic β -Secretase Inhibitors Comprising a Sequence of Amyloid- β Peptide for Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 5408–5418.
- [175] Pang, Y.P.; Hong, F.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Brimijoin, S. Synthesis of alkylene linked bis-THA and alkylene linked benzyl-THA as highly potent and selective inhibitors and molecular probes of acetylcholinesterase. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1997.
- [176] Messerer, R.; Dallanoce, C.; Matera, C.; Wehle, S.; Flammini, L.; Chirinda, B.; Bock, A.; Irmen, M.; Tränkle, C.; Barocelli, E.; et al. Novel biparmacophoric inhibitors of the cholinesterases with affinity to the muscarinic receptors M 1 and M 2. *Med. Chem. Commun.* 2017, 8, 1346–1359.
- [177] Matera, C.; Flammini, L.; Quadri, M.; Vivo, V.; Ballabeni, V.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.; Amici, M.; Barocelli, E.; Bertoni, S.; et al. Bis(ammonio)alkane-type agonists of muscarinic acetylcholine receptors: Synthesis, in vitro functional characterization, and in vivo evaluation of their analgesic activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 75, 222–232.
- [178] Messerer, R. Synthesis of Dualsteric Ligands for Muscarinic Acetylcholine Receptors and Cholinesterase Inhibitors. Ph.D Thesis, Universität Würzburg, Würzburg, German, March

2017.

- [179] Campiani, G.; Fattorusso, C.; Butini, S.; Gaeta, A.; Agnusdei, M.; Gemma, S.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Savini, L.; Nacci, V.; et al. Development of molecular probes for the identification of extra interaction sites in the mid-gorge and peripheral sites of butyrylcholinesterase (BuChE). Rational design of novel, selective, and highly potent BuChE inhibitors. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 1919–1929.
- [180] Carlier, P.R.; Han, Y.F.; Chow, E.S.H.; Li, C.P.L.; Wang, H.; Lieu, T.X.; Wong, H.S.; Pang, Y.P. Evaluation of short-tether Bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* 1999, 7, 351–357.
- [181] Fang, L.; Jumpertz, S.; Zhang, Y.; Appenroth, D.; Fleck, C.; Mohr, K.; Tränkle, C.; Decker, M. Hybrid molecules from xanomeline and tacrine: Enhanced tacrine actions on cholinesterases and muscarinic M1 receptors. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 2094–2103.
- [182] Bymaster, F.P.; Whitesitt, C.A.; Shannon, H.E.; DeLapp, N.; Ward, J.S.; Calligaro, D.O.; Shipley, L.A.; Buelke-Sam, J.L.; Bodick, N.C.; Farde, L.; et al. Xanomeline: A selective muscarinic agonist for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Dev. Res.* 1997, 40, 158–170.
- [183] Farrell, M.; Roth, B.L. Allosteric antipsychotics: M4 muscarinic potentiators as novel treatments for schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2010, 35, 851–852.
- [184] Mirza, N.R.; Peters, D.; Sparks, R.G. Xanomeline and the Antipsychotic Potential of Muscarinic Receptor Subtype Selective Agonists. *CNS Drug Rev.* 2003, 9, 159–186.
- [185] Jakubík, J.; El-Fakahany, E.E.; Dolezal, V. Differences in kinetics of xanomeline binding and selectivity of activation of G proteins at M (1) and M (2) muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* 2006, 70, 656–666.
- [186] Jakubík, J.; Tucek, S.; El-Fakahany, E.E. Role of receptor protein and membrane lipids in xanomeline wash-resistant binding to muscarinic M1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004, 308, 105–110.
- [187] Kane, B.E.; Grant, M.K.O.; El-Fakahany, E.E.; Ferguson, D.M. Synthesis and evaluation of xanomeline analogs—Probing the wash-resistant phenomenon at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 1376–1392.
- [188] Randáková, A.; Dolejší, E.; Rudajev, V.; Zimčík, P.; Doležal, V.; El-Fakahany, E.E.; Jakubík, J. Classical and atypical agonists activate M1 muscarinic acetylcholine receptors through common mechanisms. *Pharmacol. Res.* 2015, 97, 27–39.
- [189] Kruse, A.C.; Kobilka, B.K.; Gautam, D.; Sexton, P.M.; Christopoulos, A.; Wess, J. Muscarinic acetylcholine receptors: Novel opportunities for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014, 13, 549–560.
- [190] Bonifazi, A.; Yano, H.; Del Bello, F.; Farande, A.; Quaglia, W.; Petrelli, R.; Matucci, R.; Nesi, M.; Vistoli, G.; Ferre, S.; et al. Synthesis and biological evaluation of a novel series of heterobivalent muscarinic ligands based on xanomeline and 1-3-(4-butylpiperidin-1-yl)propyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-one (77-LH-28-1). *J. Med. Chem.* 2014, 57, 9065–9077.
- [191] Simoni, E.; Bartolini, M.; Abu, I.F.; Blockley, A.; Gotti, C.; Bottegoni, G.; Caporaso, R.; Bergamini, C.; Andrisano, V.; Cavalli, A.; et al. Multitarget drug design strategy in Alzheimer's disease: Focus on cholinergic transmission and amyloid- β aggregation. *Future Med. Chem.* 2017, 9, 953–963.
- [192] Haydar, S.N.; Ghiron, C.; Bettinetti, L.; Bothmann, H.; Comery, T.A.; Dunlop, J.; La Rosa, S.; Micco, I.; Pollastrini, M.; Quinn, J.; et al. SAR and biological evaluation of SEN12333/WAY-317538: Novel $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 5247–5258.
- [193] Cavalli, A.; Bolognesi, M.L.; Capsoni, S.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Margotti, E.; Cattaneo, A.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. A small molecule targeting the multifactorial nature of Alzheimer's disease. *Angew. Chem.* 2007, 46, 3689–3692.

- [194] Rosini, M.; Simoni, E.; Bartolini, M.; Tarozzi, A.; Matera, R.; Milelli, A.; Hrelia, P.; Andrisano, V.; Bolognesi, M.L.; Melchiorre, C. Exploiting the lipoic acid structure in the search for novel multi target ligands against Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 5435–5442.
- [195] Bolognesi, M.L.; Bartolini, M.; Tarozzi, A.; Morroni, F.; Lizzi, F.; Milelli, A.; Minarini, A.; Rosini, M.; Hrelia, P.; Andrisano, V.; et al. Multitargeted drugs discovery: Balancing anti-amyloid and anticholinesterase capacity in a single chemical entity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 2655–2658.
- [196] Tasso, B.; Sparatore, A.; Sparatore F. N-Homolupinanoyl and N-(ω -lupinylthio)alkanoyl derivatives of some tricyclic systems as ligands for muscarinic M1 and M2 receptor subtypes, *Farmaco*, 2003, 58, 669-676.
- [197] Canu, C.; Tasso, B.; VBoido, V.; Sparatore F. Cytisine derivatives as ligands for neuronal nicotine receptors and with various pharmacological activities, *Farmaco*, 2003, 58, 265-277.
- [198] B. Tasso, C. Canu, E. Terranova, C. Gotti, L. Riganti, F. Clementi, R. Artali, G. Bombieri, F. Meneghetti, F. Sparatore, Synthesis, binding and modeling studies of new cytisine derivatives, as ligands for neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes, *J. Med. Chem.*, 2009, 52, 4345-4357.
- [199] Tasso, B.; Catto, M.; Nicolotti, O.; Novelli, F.; Tonelli, M.; Giangreco, I.; Pisani, L.; Sparatore, A.; Boido, V.; Carotti, A.; Sparatore, F. Quinolizidinyl derivatives of bi and tricyclic systems as potent inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase with potential in Alzheimer disease. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 2170-2184.
- [200] Tonelli, M.; Catto, M.; Tasso, B.; Novelli, F.; Canu, C.; Iusco, G.; Pisani, L.; De stradis, A.; Denora, N.; Sparatore, A.; Boido, V.; Carotti, A.; Sparatore, F. Multitarget therapeutic leads for Alzheimer's disease: quinolizidinyl derivatives of bi- and tricyclic systems as dual inhibitors of cholinesterases and β -amyloid (A β) aggregation. *ChemMedChem* 2015, 10, 1040-1053.
- [201] Camerini, B. Tesi di Laurea, Università di Genova, 2020.
- [202] Servetto, I. Tesi di Laurea, Università di Genova, 2020.
- [203] Schenone, P. Tesi di Laurea, Università di Genova, 2021.
- [204] Ellman, G. L.; Courtney, D.; Andres, V.; Feartherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, 7, 88-95.
- [205] Cellamare, S.; Stefanachi, A.; Stolfa, D. A.; Basile, T.; Catto, M.; Campagna, F.; Sotelo, E.; Acquafredda, P.; Carotti, A. Design, synthesis and biological evaluation of glycine-based molecular tongs as inhibitors of A β 1-40 aggregation in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 4810-4822.

Ringraziamenti

Giungere alla fine di questo percorso di studio non è stato semplice, per tanti motivi. La mia famiglia e i miei amici lo sanno, ma quella che più di tutti ne è consapevole sono certamente io.

Perciò la prima persona a cui devo dire grazie è sicuramente Lucia, perché non è stato scontato per lei arrivare a tagliare questo traguardo. Grazie per aver continuato a percorrere quella galleria, a volte buia a volte illuminata, nella direzione dell'uscita.

Più volte hai avvertito l'istinto di girare i tacchi e tornare all'entrata, soprattutto quando la strada ti si allungava sotto i piedi e avevi la sensazione di non arrivare mai alla fine. Fortunatamente in quei momenti c'è stato Enrico che ha saputo motivarti e che si è posto come esempio del fatto che "volere è potere", che "bisogna essere determinati e tracciare un percorso programmatico per arrivare in fondo".

Quando invece hai trovato il terreno dissestato, "a bricchi e fossi" diciamo a Genova, e ti sembrava di poter scivolare hai avuto Valentina al tuo fianco che ti dava man forte. Con lei hai fatto molta strada ed avete condiviso tanti ricordi tutti bellissimoi. Inoltre durante il cammino hai conosciuto ragazze che percorrevano la tua stessa strada, ragazze la cui compagnia ti allontanava dal pensiero della fatica e che presto sarebbero diventate care amiche. Mi riferisco a Rita, Martina, Alice, Lylia, Neghi: con ognuna di loro hai stretto un rapporto di amicizia spontanea che oggi è rispetto e stima reciproche, sia come donne che come professioniste in campo farmaceutico. Grazie per aver alleggerito quello zaino che portavo sulle spalle con la vostra allegria ed i vostri incoraggiamenti. A tutte queste persone (così come a tutte quelle che non ho citato, ma ugualmente importanti: Erika, Valentina D., Sara, Onorata) che mi sono state vicine, sia nei momenti felici che in quelli più tristi della vita, devo un grande ringraziamento, perché ognuna di loro ha contribuito a rendermi quella che sono oggi.

Un grande ringraziamento va al Dottor Parodi, che ringrazio infinitamente per la professionalità e la presenza paterna che mi ha dimostrato in tutti questi anni nei momenti di bisogno.

Ultimi, ma non ultimi, ringrazio di cuore il mio relatore Prof. Tasso per tutte le nozioni che mi ha trasmesso e soprattutto per la pazienza, la passione e l'ironia che contraddistinguono il suo lavoro di insegnante e che lo rendono la persona stimabile che è. Grazie molte.

L'altro grande ringraziamento va alla mia famiglia, papà, mamma, nonna, fratello perché senza il loro sostegno non sarei mai arrivata alla fine del tunnel.

Ringrazio mia madre perché è per me esempio quotidiano di coraggio e forza profonda, forza vitale che non si esaurisce ma che si trasforma continuamente. Questo mi porta ad una analogia con la chimica, la legge di conservazione della massa di Lavoisier che recita "in una reazione chimica nulla si crea, nulla si distrugge ma tutto si trasforma". Mamma mi ha insegnato che è così anche nella vita.

Ringrazio mio padre perché è esempio per me di perseveranza, forza e coraggio, instancabile lavoratore. È l'esempio che non bisogna arrendersi di fronte alle difficoltà. Grazie per tutta la dolcezza e l'affetto che mi dimostri. Per me è "la torre che non crolla sotto l'impeto dei venti".

Ringrazio mia nonna Maria per l'infinito affetto che sempre mi dimostra, per avermi cresciuta, per la sua pazienza e la dolcezza inesauribili e per la forza d'animo che quotidianamente dimostra. I

suoi incoraggiamenti e le sue domande sull'università sono sempre stati fonti di stimolo per proseguire il mio percorso.

Grazie a mio fratello.

Grazie a tutta la mia famiglia per esserci sempre stata per me, nonostante le difficoltà, per avere speso parole di conforto e di incoraggiamento durante questo percorso di studi e per avermi sempre sostenuto con ogni mezzo. Mi avete insegnato cosa significa essere una famiglia.